

ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΔΑΣΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΑΣΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ
ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΔΑΣΟΠΟΝΙΚΩΝ ΕΙΔΩΝ

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΣΤΟ ΚΥΠΑΡΙΣΣΙ (*Cupressus sempervirens* L.)



**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΑΒΡΑΜΙΔΟΥ Β. ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ
ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:
ΦΙΛΙΠΠΟΣ Α. ΑΡΑΒΑΝΟΠΟΥΛΟΣ**

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2014

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος II. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.



ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΔΑΣΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΔΑΣΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Επιβλέπων Καθηγητής

Φίλιππος Α. Αραβανόπουλος

Μέλη Συμβουλευτικής Επιτροπής

Παρασκευή Αλιζώτη

Ευάγγελος Μπάρμπας

Επίκουρη Καθηγήτρια

Επίκουρος Καθηγητής

ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΔΑΣΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΔΑΣΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Καθηγητής Αραβανόπουλος Φίλιππος, Τμήμα Δασολογίας και Φυσικού Περιβάλλοντος, Α.Π.Θ.

Επίκουρη Καθηγήτρια Αλιζώτη Παρασκευή, Τμήμα Δασολογίας και Φυσικού Περιβάλλοντος, Α.Π.Θ.

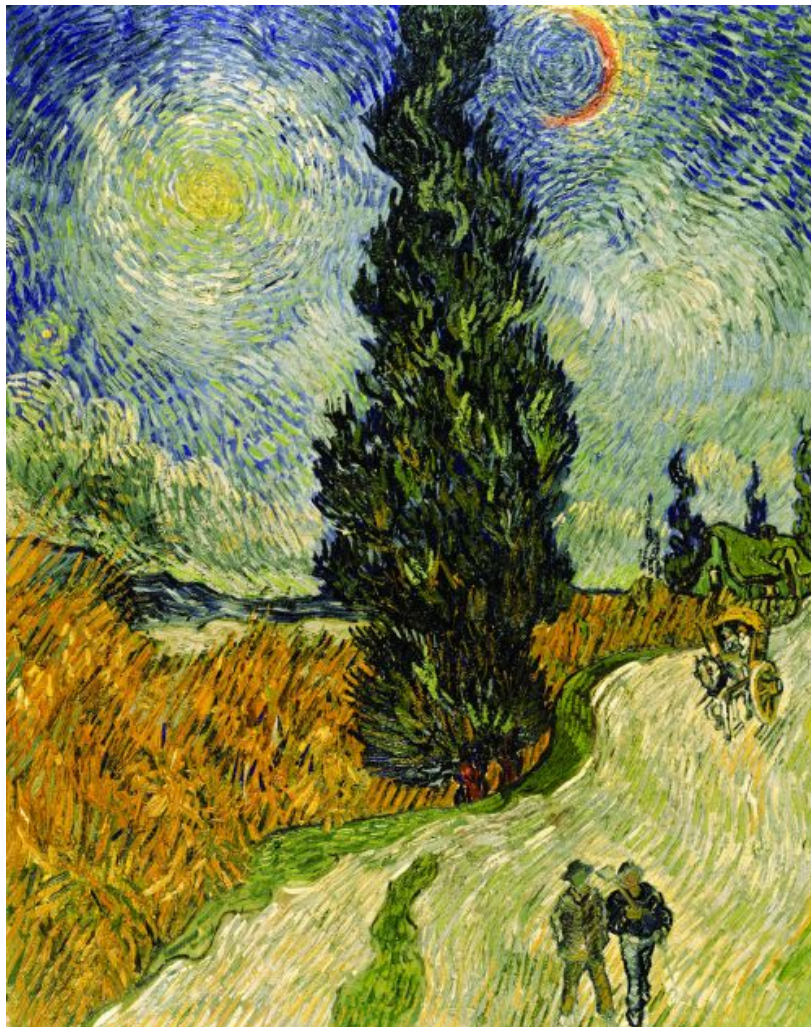
Επίκουρος Καθηγητής Μπάρμπας Ευάγγελος, Τμήμα Δασολογίας και Φυσικού Περιβάλλοντος, Α.Π.Θ.

Καθηγητής-Κοσμήτορας Σκαράκης Γεώργιος, Σχολή Αγροτικής Παραγωγής Υποδομών και Περιβάλλοντος, Γ.Π.Α.

Καθηγητής Τοκατλίδης Ιωάννης, Τμήμα Αγροτικής Ανάπτυξης, Α.Π.Θ.

Αναπληρωτής Καθηγητής Παπαγεωργίου Αριστοτέλης, Τμήμα Δασολογίας και Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Α.Π.Θ.

Επίκουρος Καθηγητής Πολύδωρας Αλέξιος, Τμήμα Γεωπονίας, Α.Π.Θ.



Δρόμος με κυπαρίσσι και αστέρι (Vincent van Gogh, 1890)

Αφιερωμένο στη γλυκύτατη μου γιαγιά
που πάντα με προστατεύει από ψηλά.....

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως θερμά τον επιβλέποντα Καθηγητή μου κ. Φίλιππο Αραβανόπουλο για την ανάθεση του θέματος, τις υποδείξεις, την πολύτιμη βοήθεια που μου πρόσφερε και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά τη διάρκεια των διδακτορικών μου σπουδών.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Επίκουρη καθηγήτρια του Τμήματος Δασολογίας και Φυσικού Περιβάλλοντος κ. Αλιζώτη Παρασκευή και τον Επίκουρο καθηγητή του Τμήματος Δασολογίας και Φυσικού Περιβάλλοντος κ. Ευάγγελο Μπάρμπα για την πολύτιμη βοήθεια τους και τις χρήσιμες υποδείξεις του κατά τη διάρκεια της διδακτορικής μου διατριβής.

Ευχαριστώ ιδιαιτέρως τα μέλη της επταμελούς μου επιτροπής κ. Γεώργιο Σκαράκη, Καθηγητή Βελτίωσης Φυτών και Γεωργικού Πειραματισμού και Κοσμήτορα της Σχολής Αγροτικής Παραγωγής, Υποδομών και Περιβάλλοντος του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, τον κ. Ιωάννη Τοκατλίδη, Καθηγητή Γενετικής και Βελτίωσης του Τμήματος Αγροτικής Ανάπτυξης του Δημοκριτείου Πανεπιστημίου Θράκης, τον κ. Αριστοτέλη Παπαγεωργίου, Αναπληρωτή καθηγητή του Τμήματος Δασολογίας και Φυσικού Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων του Δημοκριτείου Πανεπιστημίου Θράκης και τον κ. Αλέξιο Πολύδωρα Επίκουρο καθηγητή του τμήματος Γεωπονίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης για την κριτική ανάγνωση της διατριβής μου και τις χρήσιμες υποδείξεις.

Ευχαριστώ επίσης ιδιαιτέρως τον κ. Αντρέα Ντούλη, Ερευνητή του ΕΛΓΟ-Δήμητρα για την πολύτιμη βοήθεια του και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά τη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Παναγιώτη Τσόπελα, Ερευνητή Α΄ και την κ. Νικολέτα Σουλιώτη Ερευνήτρια του Ινστιτούτου Μεσογειακών Δασικών Οικοσυστημάτων και Τεχνολογίας Δασικών προϊόντων / Ε.Λ.Γ.Ο. «Δήμητρα» για την πολύτιμη βοήθεια τους κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων μου.

Ευχαριστώ επίσης τον Ιωάννη Γανόπουλο Διδάκτορα, της Σχολής Γεωπονίας Δασολογίας και Φυσικού Περιβάλλοντος του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, την συνάδελφο Ερμιόνη Μαλλιάρου Δασολόγο (Msc) και όλη την

ομάδα του Εργαστηρίου Δασικής Γενετικής και Βελτίωσης Δασοπονικών Ειδών για την ηθική στήριξη και εμπύχωση κατά τη διάρκεια συγγραφής του διδακτορικού.

Τέλος, θα ήθελα επίσης να απευθύνω τις ευχαριστίες μου στην οικογένεια μου, στους φίλους μου από Θεσσαλονίκη μέχρι Κρήτη, και σε όλους τους ανθρώπους που με στήριξαν και με βοήθησαν κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Περίληψη

Οι γενετικοί χάρτες αναφέρονται στον προσδιορισμό της θέσης και των αποστάσεων μοριακών δεικτών και γονιδίων πάνω στα χρωμοσώματα. Πέρα από το θεωρητικό ενδιαφέρον που παρουσιάζουν για την εξέλιξη και την οργάνωση γονιδιωμάτων, αποτελούν απαραίτητο εργαλείο για την εύρεση υποψηφίων γονιδίων που ελέγχουν ποσοτικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά οικονομικής σημασίας. Οι γονιδιακές θέσεις ποσοτικών γνωρισμάτων (QTLs) για γνωρίσματα όπως το ύψος, η διάμετρος, η αντοχή σε ασθένειες, μπορούν να ανιχνευθούν με τη βοήθεια γενετικών χαρτών με τελικό στόχο τη γενετική βελτίωση μέσω της υποβοηθούμενης από μοριακούς δείκτες επιλογής (MAS).

Το κυπαρίσσι (*Cupressus sempervirens* L.) αποτελεί σημαντικό είδος της μεσογειακής χλωρίδας και αποτελεί ένα από τα κύρια είδη των ευαίσθητων μεσογειακών οικοσυστημάτων που παρουσιάζει ευρεία αντοχή σε αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες. Πέραν της παραγωγής τεχνητής ξυλείας χρησιμοποιείται για ανεμοφράκτες και ως καλλωπιστικό. Απαντάται σε δύο κύριες μορφές λόγω της ιδιαιτερότητας της μορφής της κόμης που παρουσιάζει: την οριζοντιόκλαδη (*Cupressus sempervirens* var. *horizontalis*) και την ορθόκλαδη μορφή (*Cupressus sempervirens* var. *pyramidalis*). Η παρούσα διδακτορική διατριβή εστιάστηκε για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία στη λεπτομερή χαρτογράφηση του γονιδιώματος του κυπαρισσιού. Με τη χρήση 24 f-AFLP και οκτώ f-SSR εκκινητών προέκυψαν 1332 γονιδιακές θέσεις εκ των οποίων οι 1260 ήταν πολυμορφικές. Δημιουργήθηκαν τέσσερις γενετικοί χάρτες με χρήση χαρτογραφικής οικογένειας που προήλθε από ελεγχόμενη διασταύρωση ενός οριζοντιόκλαδου θηλυκού και ενός ορθόκλαδου αρσενικού γονέα και αποτελούνταν από 382 απογόνους. Ο χάρτης πλαισίου της οριζοντιόκλαδης ποικιλίας (μητρικός) περιελάμβανε έξι ομάδες σύνδεσης συνολικού μήκους 818.58 cM και ο αντίστοιχος της ορθόκλαδης ποικιλίας (πατρικός) πέντε ομάδες σύνδεσης συνολικού μήκους γονιδιώματος 560.33 cM. Ο ενιαίος χάρτης πλαισίου που δημιουργήθηκε χρησιμοποιώντας τις γονιδιακές θέσεις f-AFLP με αναλογία διαχωρισμού 1:1 και τις f-SSR γονιδιακές θέσεις, αποτελείται από 11 ομάδες σύνδεσης συνολικού μήκους 1278.74 cM. Προσθέτοντας τις f-AFLP

γονιδιακές θέσεις με αναλογία διαχωρισμού 3:1 το συνολικό μήκος του ολοκληρωμένου χάρτη ήταν 2.374,41 cM. Ο γενετικός χάρτης που δημιουργήθηκε αποτελεί χάρτη αναφοράς όπου νέοι μοριακοί δείκτες (SNPs, ESTs, ISSRs) μπορούν να προστεθούν και να χρησιμοποιηθεί για την εύρεση γονιδίων που ελέγχουν σημαντικά ποσοτικά και ποιοτικά γνωρίσματα.

Επιπρόσθετα με τη μέθοδο χαρτογράφησης διαστημάτων βρέθηκε ένα QTL που είναι συνδεδεμένο με μια f-AFLP γονιδιακή θέση στο 11^ο χρωμόσωμα και σχετίζεται στατιστικά σημαντικά ($LOD=3.30$) με τη μορφή της κόμης. Ο δείκτης αυτός ενδέχεται να αποτελέσει εν δυνάμει μοριακό δείκτη πρώιμης επιλογής για τη μορφή της κόμης, μπορεί δηλαδή να εφαρμοστεί η υποβοηθούμενη από γονίδια σημάσεως επιλογή (MAS) και η διερεύνηση ύπαρξης αντίστοιχων QTL σε άλλα είδη. Επιπλέον ανιχνεύθηκαν δύο QTLs με ασθενέστερη σύνδεση σε δείκτες f-AFLP στο 3^ο και 11^ο χρωμόσωμα για τα ποσοτικά γνώρισμα του ύψους ($LOD=1.65$ και $LOD=1.63$, $0.001 < p < 0.004$) ενώ για το γνώρισμα της διαμέτρου δεν ανιχνεύθηκαν QTL με στατιστικά σημαντικές τιμές.

Το έλκος του κυπαρισσιού προκαλείται από το μύκητα *Seiridium cardinale* και είναι μια από τις πιο καταστρεπτικές ασθένειες για την οικογένεια των Cupressaceae. Η αντοχή της χαρτογραφικής οικογένειας στο μύκητα εξετάστηκε χρησιμοποιώντας την τεχνική του εμβολιασμού με τον μύκητα. Μετά από την πάροδο έξι μηνών καταγράφηκαν τα ποσοστά ανθεκτικών, μερικώς ανθεκτικών και ευαίσθητων στο μύκητα ατόμων που ήταν 22.64%, 70.94% και 6.42% αντίστοιχα. Στην περαιτέρω διερεύνηση, μέσω γενετικής χαρτογράφησης QTL βρέθηκαν δύο QTL ασθενώς συνδεδεμένα με δύο δείκτες f-AFLP, με τιμές $LOD=1.78$ ($0.01 < p < 0.04$) και $LOD=1.48$ ($0.01 < p < 0.04$) στο 10^ο και στο 3^ο χρωμόσωμα αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να θεωρηθούν ως μια πρώτη προσέγγιση εύρεσης γονιδίων που μπορεί να ελέγχουν την ανθεκτικότητα του γενετικού υλικού στην ασθένεια. Σημαντικό ήταν επίσης το γεγονός ότι βρέθηκε ένας γενότυπος που παρουσίασε 100% ανθεκτικότητα στο μύκητα *Seiridium cardinale*. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση *in-vitro* πρωτοκόλλου (συνδυασμό MS και SH πρωτοκόλλων), η οποία προσφέρει τη δυνατότητα αγενούς αναπαραγωγής του ανθεκτικού κλώνου με δυνατότητα μαζικής φύτευσης του σε περιοχές της Ελλάδας με σοβαρά προβλήματα προσβολής.

Η φαινοτυπική παραλλακτικότητα των φυτών αποδίδεται στον συνδυασμό της επίδρασης της γενετικής ποικιλότητας, την επίδραση του περιβάλλοντος και την αλληλεπίδραση γενοτύπων και περιβάλλοντος. Η μεθυλίωση του DNA είναι ένας από τους κύριους μηχανισμούς δημιουργίας παραλλακτικότητας που μπορεί να κληρονομείται και να επηρεάζει την φαινοτυπική παραλλακτικότητα. Μελετήθηκε η επιγενετική κληρονομησιμότητα για πρώτη φορά στη χαρτογραφική οικογένεια του κυπαρισσιού χρησιμοποιώντας f-MSAP μοριακούς δείκτες. Χρησιμοποιώντας τέσσερις συνδυασμούς f-MSAP προέκυψαν 266 πολυμορφικές γονιδιακές θέσεις. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μέση τιμή της συνολικής μεθυλίωσης του DNA στους απογόνους (28.2%) ήταν υψηλότερη από τη μέση τιμή των γονικών τύπων. Επίσης βρέθηκε υψηλότερη μητρική κληρονομησιμότητα της μεθυλίωσης του DNA (5.65%) έναντι της πατρικής (3.01%). Η πιστή Μενδελική κληρονομησιμότητα μεθυλιωμένων γονιδιακών θέσεων παρουσιάστηκε σε ένα μικρό ποσοστό (4.29%). Βρέθηκε επίσης ένα μεγάλο ποσοστό *de novo* μεθυλίωσης (19.65%). στους απογόνους σε σχέση με τους γονικούς τύπους. Τέλος, βρέθηκαν θετικές συσχετίσεις της συνολικής και της CG μεθυλίωσης για το αυξητικό γνώρισμα του ύψους, ενώ παρουσιάστηκε θετική συσχέτιση της CG/CNG μεθυλίωσης με το ύψος και τη διάμετρο.

Σύμφωνα με τις υπάρχουσες αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία, είναι η πρώτη φορά όπου παρουσιάζεται ένας ολοκληρωμένος γενετικός χάρτης στο κυπαρίσσι, που συνδυάζει εντοπισμό QTL για αυξητικά γνώρισμα οικονομικής σημασίας με ταυτόχρονη μελέτη της επιγενετικής κληρονομησιμότητας.

Λέξεις κλειδιά : γενετικοί χάρτες σύνδεσης, κυπαρίσσι (*Cupressus sempervirens* L.), γονιδιακές θέσεις ποσοτικών γνωρισμάτων (QTLs), μορφή της κόμης, έλκος του κυπαρισσιού, μεθύλιωση DNA, επιγενετική κληρονομησιμότητα

Abstract

Genetic linkage maps refer to the order of molecular markers across the genome and require a high number of markers for a detailed coverage of the genome. Such maps represent a framework which enables the identification and localization of Quantitative Trait Loci (QTLs) for traits of interest, such as growth or disease resistance, with the final aim of achieving genetic improvement through marker-assisted selection (MAS).

Cupressus sempervirens L. is an important conifer tree in the Mediterranean region, bearing two phenotypic varieties, which are associated with the crown form (*C. sempervirens* var. *pyramidalis* and *C. sempervirens* var. *horizontalis*). In this thesis, genetic linkage maps of *Cupressus sempervirens* for the two different varieties, including a framework consensus map and a final consensus map, are being reported. Twenty four primer combinations of fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism (f-AFLP) and eight fluorescent SSR markers were used and produced 1260 polymorphic loci, in a mapping family containing 382 full-sibs resulting from a controlled cross (part of a larger full-sib mating scheme) between a female *horizontalis* and a male *pyramidalis* parent applying a double pseudo-test cross strategy. The female framework map (*C. sempervirens* var. *horizontalis*) consisted of six linkage groups covering 818.58 cM. The male framework map (*C. sempervirens* var. *pyramidalis*) featured five linkage groups covering 560.33 cM. The basic framework consensus map was created by testcross segregating markers (1:1) and SSR markers presenting 11 linkage groups, and a total length of 1278.74 cM. With the addition of 3:1 f-AFLP markers the total length of the final consensus map reached 2,347.41 cM in cypress. This map can be further detailed with more genetic markers in the future, such as SNPs, ISSRs, and can be used in order to dissect the genetic architecture of economically (e.g. growth, wood quality) and ecologically (e.g. water-use efficiency, disease resistance) important traits into Mendelian inherited components (QTLs).

Moreover, a QTL mapping analysis was performed. A potential QTL associated to crown form was detected with an operationally significant LOD value of 3.30. This QTL is associated with a marker that will be a marker of choice in order to evaluate and select genotypes of particular crown form at the early stages of plant

development. The analysis also indicated two QTLs for height (LOD=1.65 and LOD=1.63, $0.01 < p < 0.004$) in chromosomes three and eleven respectively. QTLs analysis for diameter did not reveal statistically significant results.

The fungus *Seiridium cardinale* causes a serious canker disease on cypress trees and other members of the Cupressaceae. The resistance of the mapping family to the fungus was examined. The experimental set up consisted of a six-month *in-situ* inoculation experiment with *Seiridium cardinale* in order to identify potentially resistant genotypes. The percentage of resistant, tolerant and susceptible to *Seiridium cardinale* genotypes, was 22.64%, 70.94% and 6.42% respectively. Two potential QTLs for resistance to *Seiridium cardinale* were identified with LOD scores 1.78 and 1.48. The results for these QTLs represent a first step towards identifying underlying genes controlling resistance to *Seiridium cardinale* and applying MAS. Lastly and importantly a fully resistant clone has been identified to be capable of healing the artificial infection. The presence of resistant and fully resistant genotypes called for the development of protocols for *in vitro* propagation in cypress. An optimization of a combination of MS and SH protocols was achieved. Therefore, the *in vitro* propagation and mass production of the fully resistant genotype can be achieved presenting a key solution for areas in Greece that are heavily affected by the canker disease.

Although DNA genetic transmission over generations affects phenotypic variation for organisms, epigenetic interaction has also been recently found to be a significant determinant of phenotypic variation. DNA cytosine methylation is a primary phenomenon that affects phenotypes and may present transgenerational inheritance. Epigenetic inheritance was studied for the first time in the full-sib mapping family of *Cupressus sempervirens* L. by fluorescent Methylation Sensitive Amplified Polymorphism (f-MSAP). By using four primer combinations of f-MSAP molecular markers 266 polymorphic loci were found. Results showed that total methylation reached a mean value of 28.2% which was higher than the midparent value, while maternal inheritance was higher (5.65%) than paternal (3.01%). Faithfull Mendelian inheritance was low (4.29%), whereas *de novo* methylation in the full-sib progeny was high (19.65%). Furthermore, correlation of total relative methylation and CG methylation with growth parameters (height and diameter) was

studied. Total relative methylation and CG methylation was found to be positively correlated with height, whilst CG/CNG methylation correlation was positively correlated with both height and diameter.

To the author's knowledge, this is the first time that an extensive mapping approach that involves molecular genetic markers, QTL detection and epigenetic inheritance is performed in a member of the Cupressaceae family.

Keywords: genetic molecular mapping, *Cupressus sempervirens* L., QTLs, crown form, *Seiridium cardinale*, DNA methylation, epigenetic inheritance

Συντμήσεις

- F-AFLPs = Fluorescent Amplified fragment length polymorphisms = Φθορίζων Πολλαπλασιασμός Πολυμορφικών Τμημάτων DNA εκ Περιορισμού
- BSA = Bulk Segregant Analysis = Ανάλυση Διαχωρισμού Μεγέθους
- CAPS = Cleaved Amplified Polymorphic Sequences = Πέψη Ενισχυόμενων Πολυμορφικών Αλληλουχιών
- CTAB = Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide = βρωμιούχο ακετυλοτριμεθυλαμμώνιο
- dNTPs = deoxynucleotide triphosphates = Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια
- EST= Expressed Sequence Tag = Αναγνωριστική εκφρασμένη ακολουθία
- gDNA= genomic DNA = γονιδιωματικό DNA
- MAS = Marker Assistant Selection = επιλογή βοηθούμενη από μοριακούς δείκτες
- f-MSAP = Fluorescent Methylation Sensitive Amplified Polymorphism = Φθορίζων Πολυμορφισμός ενισχυμένων θραυσμάτων ευαίσθητων στη μεθυλίωση
- QTL = Quantitative trait locus = γονιδιακές θέσεις ποσοτικών χαρακτήρων
- PCR = Polymerase Chain Reaction = Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης
- RAPD = Random Amplified Polymorphic DNA = Τυχαίο ενισχυμένο πολυμορφικό DNA
- RLFP = Restriction Fragment Length Polymorphism = Πολυμορφισμός Μήκους Θραυσμάτων εκ Περιορισμού
- RNA = Ribonucleic Acid = Ριβονουκλεϊκό οξύ
- SCAR = Sequence Characterized Amplified Region = Χαρακτηρισμένες αλληλουχίες Ενισχυόμενων Περιοχών
- SNP = Single Nucleotide Polymorphism = Μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός

- SSRs = Simple Sequence Repeats = Απλές Επαναλαμβανόμενες Αλληλουχίες
- STRs = Short Tandem Repeats = Σύντομες διαδοχικές επαναλήψεις
- STS = Sequence Tagged Site = Θέσεις επισημασμένης αλληλούχισης

Σύμφωνα με το λεξικό της Ελληνικής Επιστημονικής Εταιρίας Γενετικής Βελτίωσης Των Φυτών (Γαλανοπούλου κ.α., 1994).

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	6
Περίληψη.....	8
Abstract.....	11
Συντμήσεις.....	14
Κατάλογος πινάκων	19
Κατάλογος σχημάτων	21
1 Εισαγωγή	24
1.1 Το κυπαρίσσι (<i>Cupressus sempervirens</i> L.).....	29
1.1.1 Ιστορικές αναφορές	29
1.1.2 Βοτανική ταξινόμηση του <i>Cupressus sempervirens</i> L.	30
1.1.3 Φυσική εξάπλωση του είδους	32
1.1.4 Οικολογική - Αισθητική σημασία του είδους.....	32
1.2 Έλκος του κυπαρισσιού (<i>Seiridium cardinale</i>)	34
1.2.1 Συμπτώματα.....	34
1.2.2 Βιολογικός κύκλος του <i>S. Cardinale</i>	36
1.3 Δείκτες.....	37
1.3.1 Μορφολογικά γνωρίσματα και δείκτες.....	37
1.3.2 Βιοχημικοί Δείκτες	37
1.3.3 Μοριακοί δείκτες	39
1.3.3.1 Πολυμορφισμός Μεγέθους θραυσμάτων εκ περιορισμού DNA (RFLP)	39
1.3.3.2 Τυχαία Ενισχυμένο Πολυμορφικό DNA (RAPD).....	40
1.3.3.3 Φθορίζων Πολυμορφισμός Μήκους ενισχυμένων θραυσμάτων (f-AFLP)	41
1.3.3.4 Φθορίζοντες Μικροδορυφόροι ή Απλές φθορίζουσες Επαναλαμβανόμενες Αλληλουχίες (f-SSR).....	44
1.3.3.5 Πολυμορφισμός ενισχυμένων θραυσμάτων ευαίσθητων στη μεθυλίωση (MSAP- Methylation Sensitive Amplified Polymorphism).....	46
1.4 Γενετικοί χάρτες.....	49
1.4.1 Ορισμός Γενετικού Χάρτη.....	49
1.4.2 Εκτίμηση σύνδεσης και υπολογισμός της συχνότητας ανασυνδυασμών ..	50
1.4.3 Γενετικοί χάρτες στα κωνοφόρα.....	51
1.4.4 Γενετικοί χάρτες στο κυπαρίσσι	57
1.5 Χαρτογράφηση γονιδιακών θέσεων ποσοτικών γνωρισμάτων (Quantitative Trait Loci).....	59
1.6 Επιγενετική - «Μεθυλίωση του DNA».....	63
1.7 Βλαστικός πολλαπλασιασμός.....	64
1.7.1 Βλαστικός πολλαπλασιασμός στο κυπαρίσσι.....	67

2	Σκοπός και στόχοι της διδακτορικής διατριβής.....	68
3	Υλικά και Μέθοδοι	69
3.1	Δημιουργία φυτείας - Συλλογή φυτικού ιστού.....	69
3.2	Μέτρηση αυξητικών γνωρισμάτων - Δοκιμή Bouroulet.....	72
3.3	Εκχύλιση DNA	73
3.4	Εκτίμηση Αποτελεσματικότητας της μεθόδου f-AFLP και f-SSR	74
3.5	Διαδικασία f-AFLP	77
3.5.1	Πέψη του γενωμικού DNA f-AFLP	77
3.5.2	Λιγοποίηση των προσαρμοστών (f-AFLP)	77
3.5.3	Προεπιλεκτική ενίσχυση (f-AFLP).....	78
3.5.4	Επιλεκτική Ενίσχυση (f-AFLP).....	80
3.6	Μεθοδολογία f-SSR	83
3.7	Πολυμορφισμός ενισχυμένων θραυσμάτων ευαίσθητων στη μεθυλίωση (Methylation Susceptible Amplified Polymorphisms MSAP)	85
3.7.1	Πέψη DNA για την ανάπτυξη μοριακών δεικτών MSAP	85
3.7.2	Αντίδραση της Λιγάνσης για την ανάπτυξη μοριακών δεικτών MSAP..	85
3.7.3	Προεπιλεκτική Ενίσχυση για την ανάπτυξη μοριακών δεικτών MSAP	87
3.7.4	Επιλεκτική Ενίσχυση για την ανάπτυξη μοριακών δεικτών MSAP.....	87
3.8	Μόλυνση με τον μύκητα <i>Seiridium cardinale</i>	88
3.9	Βλαστικός Πολλαπλασιασμός στο κυπαρίσσι	91
3.9.1	Προετοιμασία συλλογή και απολύμανση φυτικού ιστού	91
3.9.2	Μικροπολλαπλασιασμός.....	91
3.10	Επεξεργασία δεδομένων	95
3.10.1	Επεξεργασία δεδομένων f-AFLP και f-SSR και f-MSAP	95
3.10.2	Ανάλυση σύνδεσης – Σχεδιασμός χαρτογράφησης.....	95
3.10.3	Εύρεση γονιδιακών θέσεων σημαντικών ποσοτικών γνωρισμάτων (QTLs)	98
3.10.4	Επεξεργασία δεδομένων f-MSAP.....	98
4	Αποτελέσματα και Συζήτηση.....	100
4.1	Ανάπτυξη Γενετικών Χαρτών.....	100
4.1.1	Μενδελική κληρονομησιμότητα f-AFLP γονιδιακών θέσεων	100
4.1.2	Μενδελική κληρονομησιμότητα f-SSR γονιδιακών θέσεων	100
4.1.3	Κατασκευή Μητρικού χάρτη Πλαισίου - Οριζοντιόκλαδη μορφή.....	103
4.1.4	Κατασκευή Πατρικού χάρτη Πλαισίου - Ορθόκλαδη μορφή.....	103
4.1.5	Κατασκευή Ενιαίου Χάρτη Πλαισίου του <i>Cupressus sempervirens</i> L.	106
4.1.6	Κατασκευή Ολοκληρωμένου Χάρτη του Κυπαρισσιού (<i>Cupressus sempervirens</i> L.)	111
4.1.7	Ανάπτυξη Γενετικών Χαρτών - Συζήτηση	116
4.2	Ποσοτικά Γνωρίσματα	120
4.2.1	Αποτελέσματα από την ανίχνευση ανθεκτικότητας στο μύκητα <i>Seiridium cardinale</i>	122

4.2.2	Ανίχνευση γονιδιακών θέσεων Ποσοτικών Γνωρισμάτων QTLs	125
4.2.3	Διερεύνηση ύπαρξης QTL για το ποσοτικό γνώρισμα της μορφής της κόμης	126
4.2.4	Διερεύνηση ύπαρξης QTL για το ποσοτικό γνώρισμα του ύψους	129
4.2.5	Διερεύνηση ύπαρξης QTL για το ποσοτικό γνώρισμα της διαμέτρου	130
4.2.6	Διερεύνηση ύπαρξης QTL για το ποσοτικό γνώρισμα της ανθεκτικότητας στο έλκος του κυπαρισσιού	132
4.2.7	Χαρτογράφηση QTL – Συζήτηση.....	133
4.3	Αποτελέσματα Ιστοκαλλιέργειας του κυπαρισσιού.....	137
4.4	Επιγενετική ανάλυση – Κληρονομησιμότητα των μεθυλιωμένων περιοχών του DNA και συσχέτιση με ποσοτικά γνώρισματα	138
4.4.1	Εκτίμηση της σχετικής CG, CNG, CG/CNG μεθυλίωσης και απομεθυλίωσης του DNA στο κυπαρίσσι.....	138
4.4.2	Διαφορές μεθυλίωσης DNA μεταξύ γονέων και απογόνων	140
4.4.3	Συσχέτιση αυξητικών γνωρισμάτων ύψους και διαμέτρου με τη μεθυλίωση του DNA.....	144
4.4.4	Επιγενετική ανάλυση – Συζήτηση	145
5	Γενική Ανασκόπηση και Συμπεράσματα.....	147
6	Βιβλιογραφία	150

Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 1: Συγκριτικός πίνακας μοριακών δεικτών.....	47
Πίνακας 2: Γενετικοί χάρτες στα κωνοφόρα. Είδος, οικογένεια, αριθμός χρωμοσωμάτων, ομάδες σύνδεσης, μέγεθος χάρτη, αριθμός /τύπος δεικτών λογισμικό κατασκευής των ομάδων σύνδεσης και βιβλιογραφική αναφορά.....	52
Πίνακας 3: Είδη κωνοφόρων, QTL που ανιχνεύθηκαν και αναφορές.....	60
Πίνακας 4: Διασταυρώσεις, βάρος σπερμάτων, αριθμός σπερμάτων και ποσοστό φυτρωτικότητας οικογενειών κυπαρισσιού.....	69
Πίνακας 5: Προσαρμοστές των 2 διαφορετικών ενζύμων.....	77
Πίνακας 6: Συνδυασμοί 24 f-AFLP εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την επιλεκτική ενίσχυση των 384 δειγμάτων κυπαρισσιού.....	81
Πίνακας 7: Ζεύγη εκκινητών φθορίζοντων SSR, μήκος βάσεων.....	83
Πίνακας 8: Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία των MSAP στα στάδια της λιγάσης, της προεπιλεκτικής και επιλεκτικής ενίσχυσης.....	85
Πίνακας 9: Θρεπτικό διάλυμα πολλαπλασιασμού MS (Murashige and Skoog).....	91
Πίνακας 10: Συνδυασμός θρεπτικών διαλυμάτων MS (Murashige and Skoog medium) και SH (Schenk and Hilderbrandt).....	92
Πίνακας 11: Κατάταξη δεικτών σύμφωνα με τον διαχωρισμό τους από το Wu <i>et al.</i> , 2002.....	96
Πίνακας 12: Συνδυασμοί f-AFLP εκκινητών και παραγόμενος αριθμός δεικτών.....	100
Πίνακας 13: f-SSR δείκτες, αριθμός αλληλομόρφων, διαχωρισμός και τύπος σήμανσης διαχωρισμού κατά Wu <i>et al.</i> , 2002.....	101
Πίνακας 14: Περιγραφικά στατιστικά της διαμέτρου και του ύψους των δέντρων.....	119
Πίνακας 15: Χρωμόσωμα, γενετικοί δείκτες, θέση στο χάρτη και τιμές LOD για το γνώρισμα της μορφής της κόμης.....	126
Πίνακας 16: Χρωμόσωμα, γενετικοί δείκτες, θέση τους στο χάρτη και τιμές LOD για το γνώρισμα του ύψους.....	128
Πίνακας 17: Χρωμόσωμα, δείκτες, θέση τους στο χάρτη και τιμές LOD για το γνώρισμα της διαμέτρου.....	130

Πίνακας 18: Χρωμόσωμα, δείκτες, θέση τους στο χάρτη και τιμές LOD για το γνώρισμα της ανθεκτικότητας.....	131
Πίνακας 19: Μέσος όρος, τυπική απόκλιση, συντελεστής διακύμανσης, ελάχιστη και μέγιστη τιμή CG, CG/CNG, CNG μεθυλίωσης στους απογόνους.....	137
Πίνακας 20: Ποσοστά CG, CG/CNG, CNG μεθυλίωσης στους γονικούς γενοτύπους, στους απογόνους και μέση τιμή γονικών γενοτύπων.....	138
Πίνακας 21: Διαφορετικοί τύποι κληρονομησιμότητας των μεθυλιωμένων θέσεων από τους γονείς στους απογόνους.....	140
Πίνακας 22: Μη παραμετρικός έλεγχος Spearman των ακραίων φαινοτύπων με το ύψος και τη διάμετρο σχέση με την CG/CNG, CNG, CG, NM και TM.....	143

Κατάλογος σχημάτων

Σχήμα 1: Απεικόνιση βελόνων σε στερεοσκόπιο.....	30
Σχήμα 2: <i>Cupressus sempervirens</i> L var. <i>horizontalis</i> (αριστερά) var. <i>pyramidalis</i> (δεξιά).....	30
Σχήμα 3: Κυπαρίσσια στον Ιερό βράχο της Ακρόπολης.....	32
Σχήμα 4: Χαρακτηριστικό τοπίο με κυπαρίσσια στην Τοσκάνη.....	32
Σχήμα 5: Προσβεβλημένα άτομα κυπαρισσιών στο νησί της Εύβοιας το 1988 (Graniti, 2014).....	34
Σχήμα 6: Προσβεβλημένος κορμός δέντρου από το <i>S. cardinale</i> (Graniti, 2014)....	34
Σχήμα 7: Κονίδια του μύκητα <i>Seiridium cardinal</i>	35
Σχήμα 8: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας των AFLP δεικτών.....	42
Σχήμα 9: Απεικόνιση δεικτών f-AFLP στο πρόγραμμα Genemapper v.4.0 (Applied Biosystems) σε δείγμα της χαρτογραφικής οικογένειας πρώτης γενιάς.....	42
Σχήμα 10: Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής των SSR μοριακών δεικτών....	44
Σχήμα 11: Διαχωρισμός αλληλομόρφων και προσδιορισμός μήκους βάσεων των f-SSR δεικτών στο πρόγραμμα Genemapper (Applied Biosystems).....	45
Σχήμα 12: Θέσεις κοπής των ισοσχιζομερών ενζύμων MspI και HpaII και προσδιορισμός των διαφορετικών τύπων μεθυλίωσης (CNG, CG and CG/CNG)....	46
Σχήμα 13: Μητρικές ομάδες σύνδεσης (A) και πατρικές ομάδες σύνδεσης (B) που δημιουργήθηκαν (Manescu <i>et al.</i> , 2011).....	47
Σχήμα 14: Χαρτογραφική οικογένεια κυπαρισσιού (Σ8-22ΧΣ1-22) x (R9-31Χ30M9) σε ηλικία ενός έτους.....	69
Σχήμα 15: Η χαρτογραφική οικογένεια κυπαρισσιού σε ηλικία δύο ετών πριν τη μεταφύτευση στο πεδίο σε πείραμα δοκιμής απογόνων.....	70
Σχήμα 16: Φύτευση των κυπαρισσιών στο πεδίο.....	70
Σχήμα 17: Φαινοτυπική κατάταξη των ατόμων κυπαρισσιού σύμφωνα με την δοκιμή Bouroulet, (1993).....	71
Σχήμα 18: Προεπιλεκτική ενίσχυση σε πηκτή αгарόζης όπου διακρίνεται ενίσχυση κάθε δείγματος από 100-500 bp.....	78
Σχήμα 19: Επιλεκτική ενίσχυση δειγμάτων με τον συνδυασμό E-AAG/M-CA.....	80

Σχήμα 20: Βαθμιαία αλλαγή της θερμοκρασίας πρόσφυσης κατά την διάρκεια της PCR για την ανάδειξη της μικροδορυφορικής θέσης Cyp84.....	84
Σχήμα 21: Αφαίρεση φλοιού 3 mm διαμέτρου από πλευρικό κλαδίσκο ατόμου.....	88
Σχήμα 22: Τοποθέτηση μολύσματος σε πλάγιο κλαδίσκο ατόμου.....	89
Σχήμα 23: Κάλυψη του τεχνητού μολύσματος με ταινία.....	89
Σχήμα 24: Απόξεση εξωτερικού φλοιού στην περιφέρεια του έλκους.....	88
Σχήμα 25: Βλαστοί κυπαρισσιού σε θρεπτικό διάλυμα MS.....	93
Σχήμα 26: Βλαστός κυπαρισσιού σε καλλιέργεια in- vitro.....	94
Σχήμα 27: Μητρικός Χάρτης Πλαισίου <i>Cupressus sempervirens</i> var. <i>horizontalis</i>	103
Σχήμα 28: Πατρικός χάρτης Πλαισίου <i>Cupressus sempervirens</i> var. <i>pyramidalis</i>	104
Σχήμα 29: Ενιαίος Χάρτης Πλαισίου του <i>Cupressus sempervirens</i> L.....	106
Σχήμα 30: Ολοκληρωμένος χάρτης του κυπαρισσιού (<i>Cupressus sempervirens</i> L.).....	111
Σχήμα 31: Κανονική κατανομή των μετρήσεων για το γνώρισμα της διαμέτρου....	120
Σχήμα 32: Κανονική κατανομή των μετρήσεων για το γνώρισμα του ύψους.....	120
Σχήμα 33: Νέκρωση πλάγιων κλαδίσκων μικρής διαμέτρου από τον μύκητα <i>Seiridium cardinale</i>	122
Σχήμα 34: Εκροή ρητίνης στο σημείο εμβολιασμού με το μύκητα.....	122
Σχήμα 35: Ακέρβουλα (καρποφορίες του μύκητα στην επιφάνεια του φλοιού)....	123
Σχήμα 36: Κονίδια του μύκητα, απεικόνιση στο μικροσκόπιο.....	123
Σχήμα 37: Μάρτυρας, επουλωτικός ιστός στο σημείο εμβολιασμού.....	124
Σχήμα 38: Επούλωση των μολύνσεων στα δύο πλευρικά κλαδιά στο γενότυπο 270 ανθεκτικότητα 100%.....	124
Σχήμα 39: Απεικόνιση των ανασυνδυασμών του χάρτη πλαισίου σε συνδυασμό με το δεκαδικό λογάριθμο πιθανοφάνειας (LOD)	124
Σχήμα 40: Τιμές LOD και σχηματική αναπαράσταση του QTL που εμφανίζει τιμή 3.3 στο χρωμόσωμα 11.....	127
Σχήμα 41: Σχηματική αναπαράσταση της επίδρασης του δείκτη EAAG_MCATC186.....	127
Σχήμα 42: Τιμές LOD και σχηματική αναπαράσταση του QTL για το ύψος.....	129
Σχήμα 43: Τιμές LOD και σχηματική αναπαράσταση του QTL για τη διάμετρο...130	

Σχήμα 44: Τιμές LOD και σχηματική αναπαράσταση του QTL για την ανθεκτικότητα.....	132
Σχήμα 45: Το ποσοστό επιβίωσης των εκφύτων στα θρεπτικά διαλύματα SH και MS με προσθήκη ενεργού άνθρακα.....	136
Σχήμα 46: Μέσοι όροι CG, CG/CNG, CNG, συνολικής (TM) και μη-μεθυλίωσης (NM) στους γονείς και στους απογόνους.....	138
Σχήμα 47: Ποσοστά των διαφορετικών τύπων κληρονομησιμότητας των μεθυλιωμένων δεικτών ανάμεσα σε γονείς και απογόνους.....	142

1 Εισαγωγή

Οι μοριακοί δείκτες και οι χάρτες σύνδεσης αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της σύγχρονης βιολογίας και γενετικής των φυτών, μελετώντας τα μονοπάτια από τη γονιδιωματική στην βελτίωση και την εξελικτική βιολογία και από τη συστημική στην οικολογία (Jones *et al.*, 1997). Στα δασικά είδη και ειδικότερα στα κωνοφόρα, όπου ο αριθμός χρωμοσωμάτων είναι $2n=24$ και τα γονιδιώματα κυμαίνονται από 18.000 μέχρι 35.000 Mbp (Mackay *et al.*, 2012), η δημιουργία γενετικών χαρτών με τη χρήση μοριακών δεικτών κρίνεται απαραίτητη και έχει σκοπό την εύρεση γνωρισμάτων που ελέγχονται από ένα ή από πολλά γονίδια (Aravanopoulos, 2001; Mackay *et al.*, 2012). Συνοπτικά οι γενετικοί χάρτες:

- αποτελούν απαραίτητο εργαλείο για την εύρεση υποψηφίων γονιδίων που ελέγχουν ποσοτικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά (QTLs),
- διευκολύνουν την επισήμανση των περιοχών του γονιδιώματος με τα επιθυμητά γονίδια ή QTLs και καθιστούν δυνατή την MAS (Marker Assisted Selection)
- επιτρέπουν τη συγκριτική χαρτογράφηση διαφορετικών ειδών έτσι ώστε να αξιολογηθούν οι ομοιότητες της λειτουργικότητας των γονιδίων στο φαινότυπο
- χρησιμοποιούνται ως εκμαγείο για τη σύνδεση γονιδίων με τους φυσικούς χάρτες
- αποτελούν το πρώτο στάδιο για την κλωνοποίηση χαρτογραφημένων γονιδίων που ελέγχουν γνωρίσματα με οικονομική σημασία (Semagn *et al.*, 2006).

Η γενετική χαρτογράφηση των κωνοφόρων ξεκίνησε στις αρχές του 1980 και εξελίχτηκε με την προοδευτική ανακάλυψη και χρήση τριών γενεών μοριακών δεικτών. Οι μοριακοί δείκτες πρώτης γενιάς περιλαμβάνουν τους βιοχημικούς δείκτες (ισοένζυμα) και τους RFLP. Οι δεύτερης γενιάς μοριακοί δείκτες αναφέρονται σε δείκτες που προέκυψαν μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της

πολυμεράσης (RAPDs και AFLPs) και τέλος οι τρίτης γενιάς δείκτες περιλαμβάνουν αυτούς που απαιτούν προηγούμενη μερική γνώση των αλληλουχιών του DNA όπως π.χ. SCAR, SNPs, SSRs και ESTs. Οι μοριακοί δείκτες αποτέλεσαν σημαντικό εργαλείο για τη γενετική χαρτογράφηση πολλών κωνοφόρων δένδρων και οδήγησαν στην εύρεση υποψηφίων γονιδίων που ελέγχουν αυξητικά γνωρίσματα αλλά και γνωρίσματα ποιότητας ξύλου και ανθεκτικότητας σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις (Rittland *et al.*, 2011).

Δεδομένης της οικονομικής σημασίας της μορφής της κόμης και των κλάδων των ξυλωδών πολυετών φυτών (αγγειόσπερμα και κωνοφόρα) για τη δασοπονία και τη γενετική βελτίωση, που έχει ως στόχο μεταξύ άλλων την αύξηση της παραγωγής ξυλώδους όγκου και ιδιαίτερα τεχνικού ξύλου, είναι πολύ σημαντικό να υπάρχει παραγωγή βελτιωμένων γενοτύπων με κύριο κορμό χωρίς διακλαδώσεις για όσο δυνατόν μεγαλύτερο ύψος και πλάγια κλαδιά μικρής διαμέτρου (Zobel and Talbert, 1984). Επίσης η ύπαρξη στενόμορφης κόμης διευκολύνει τη διατήρηση περισσότερων ατόμων ανά μονάδα επιφάνειας, ιδιαίτερα στις φυτείες και τις αναδασώσεις, επομένως είναι δυνατόν να συνεισφέρει επιπλέον στην αύξηση της ξυλοπαραγωγής ανά μονάδα επιφάνειας. Στη γεωργική παραγωγή σε αντίθεση με τη δασική ένας από τους κύριους σκοπούς είναι η συλλογή των καρπών και επιθυμητά γνωρίσματα είναι η διακλάδωση του κύριου κορμού στο χαμηλότερο δυνατό ύψος, η ύπαρξη πολλών και μεγάλων κλάδων οι οποίοι θα αναπτύσσονται με τέτοιο τρόπο ώστε η κόμη να χαρακτηρίζεται σε γενικές γραμμές από μεγάλη διάμετρο και μικρό σχετικά ύψος (Lawson *et al.*, 1995). Η μορφή της κόμης και των κλάδων στα ξυλώδη φυτά ενδέχεται να είναι πολυπαραγοντική. Στην μορφή της κόμης συμβάλλουν γενετικοί και περιβαλλοντικοί (γεωγραφικοί, κλιματικοί, εδαφικοί, δασοκομικοί, δενδροκομικοί) παράγοντες. Ιδιαίτερα το γεωγραφικό πλάτος έχει διαδραματίσει καθοριστικό ρόλο στην εξέλιξη μορφής της κόμης των ξυλωδών φυτών κυρίως διότι σχετίζεται άμεσα με τη γωνία πρόσπτωσης του ηλιακού φωτός στα φύλλα. Κοντά στον ισημερινό συναντούμε είδη με κόμη που ως επί το πλείστον διαμορφώνεται σε επίπεδα κατά το μάλλον ή ήττον μη αλληλοεπικαλυπτόμενα και ως ένα βαθμό παράλληλα με το έδαφος. Αντιθέτως, κοντά στα βόρεια πλάτη απαντώνται είδη με πυραμιδοειδή μορφή της κόμης που σχηματίζει οξείες γωνίες με το έδαφος (Αραβανόπουλος και Ντούλης, 2000). Η διαιώνιση αυτών των γενικών

μορφών μπορεί να θεωρηθεί ως αποτέλεσμα τροχιοδρομημένης επιλογής (canalization) (Waddington, 1942).

Τα υποκείμενα γονίδια που καθορίζουν τη μορφή της κόμης στα ξυλώδη είδη διερευνώνται με μεγάλη δυσκολία εξαιτίας της ευρύτατης φαινοτυπικής ποικιλομορφίας των διαφόρων ειδών και της γενικευμένης ύπαρξης κανονικής κατανομής των τιμών με τις οποίες μπορούν αυτά να προσδιοριστούν. Η δυσκολία αυτή ελαχιστοποιείται με την επιλογή του κυπαρισσιού (*Cupressus sempervirens* L.) ως φυτό – πρότυπο για την εφαρμογή μοριακής βελτίωσης ως προς τη μορφή της κόμης (Αραβανόπουλος και Ντούλης, 2000), καθώς είναι γνωστό από την εποχή του Θεοφράστου (Πανέτσος, 1967) ότι το κυπαρίσσι απαντάται σε δύο μορφές οι οποίες προσομοιάζουν ως ένα βαθμό τους ιδεοτύπους που αναφέρθηκαν παραπάνω: την οριζοντιόκλαδη μορφή (*C. sempervirens* var. *horizontalis*) και την ορθόκλαδη μορφή (*C. sempervirens* var. *pyramidalis*). Η έρευνα που έχει γίνει σχετικά με την αρχιτεκτονική της κόμης του κυπαρισσιού (Bartelemy *et al.*, 1999) οδήγησε στην ανάπτυξη μιας ποσοτικής μεθόδου κατάταξης των διαφόρων φαινοτύπων του είδους ανάλογα με τη μορφή της κόμης (δοκιμή Bouroulet, Bouroulet *et al.*, 1993).

Έως σήμερα μια ερευνητική ομάδα ασχολήθηκε σε βάθος με τη σχετική έρευνα στο κυπαρίσσι (Αραβανόπουλος, 2013; Αραβανόπουλος και Ντούλης, 2000). Η ομάδα αυτή που προχώρησε στην βελτιστοποίηση της διαδικασίας εκχύλισης και απομόνωσης DNA και εφαρμογών PCR στο κυπαρίσσι (Doulis *et al.*, 2000), ανίχνευσε υψηλή γενετική ποικιλότητα σε φυσικούς πληθυσμούς (Ghosn *et al.*, 2000), προχώρησε σε μια πρώτη προσπάθεια σύνταξης γενετικών χαρτών και χαρτογράφησε το ποσοτικό γνώρισμα της μορφής της κόμης χρησιμοποιώντας ένα συνδυασμό της διαζευκτικής ανάλυσης ομαδοποιημένου DNA και της στρατηγικής χαρτογράφησης της ψευδοκριτικής διασταύρωσης (Harfouche *et al.*, 2000; Hamamouch *et al.*, 2002; Manescu *et al.*, 2011). Μια γονιδιωματική περιοχή που συνδέεται με τον προσδιορισμό της μορφής της κόμης και εκτιμάται ότι εμπεριέχει μια κύρια θέση γονιδίου ποσοτικού γνωρίσματος (major QTL), χαρτογραφήθηκε σε απόσταση 5,9 cM από τον δείκτη τυχαία πολλαπλασιασμένου πολυμορφικού DNA (RAPD) OPE-12₅₇₀, ο οποίος στη συνέχεια μετατράπηκε επιτυχώς σε δείκτη πολλαπλασιασμένων περιοχών αλληλουχημένων άκρων (SCAR) (Hamamouch *et al.*, 2002). Δημιουργήθηκαν επίσης δύο γενετικοί χάρτες για το κυπαρίσσι ένας για την

ποικιλία *C. sempervirens* var. *horizontalis* μήκους 758,4 cM και ένας για την ποικιλία *C. sempervirens* var. *pyramidalis*) μήκους 791,1 cM (Manescu *et al.*, 2011). Σε κάθε χάρτη χαρτογραφήθηκαν 7 χρωμοσώματα (ομάδες σύνδεσης) ενώ δεν ήταν δυνατή η γεφυροποίηση των χαρτών λόγω απουσίας συγκυρίαρχων συνδεδεμένων γενετικών δεικτών (Manescu *et al.*, 2011). Οι λόγοι για τη μερική επιτυχία της χαρτογράφησης και η αδυναμία προσέγγισης των QTL που συνδέονται με το συγκεκριμένο γνώρισμα, ήταν η χρήση κυρίως κυρίαρχων μοριακών δεικτών χαμηλής γενετικής πληροφορίας RAPD και το περιορισμένο μέγεθος της διαθέσιμης F₁ γενιάς (N=55).

Οι παραπάνω αδυναμίες κατέστησαν αδύνατη την προσπάθεια για χαρτογράφηση άλλων σημαντικών ποσοτικών γνωρισμάτων στο κυπαρίσσι, όπως η ανθεκτικότητα σε προσβολή του μύκητα *Seiridium cardinale*, η ξηρανθεκτικότητα και τα αυξητικά γνωρίσματα (π.χ. ύψος και διάμετρο).

Ειδικότερα η σοβαρή ασθένεια του έλκους του κυπαρισσιού που προέρχεται από τον μύκητα *Seiridium cardinale* τα τελευταία χρόνια έχει πάρει τεράστιες διαστάσεις, καταστρέφοντας φυσικούς κυπαρισσώνες στην Ελλάδα και σε άλλες μεσογειακές χώρες (Graniti, 1998; Τσόπελας και Ξενόπουλος, 2002). Η εύρεση ανθεκτικών γενοτύπων, η ανίχνευση πιθανών γονιδιακών θέσεων (QTLs) που μπορεί να ευθύνονται για την ανθεκτικότητα και ο επιτυχής πολλαπλασιασμός τους κρίνονται απαραίτητα για την προστασία των γενετικών πόρων του είδους, που πιθανό να καταστεί ακόμη πιο ευάλωτο εξαιτίας της επικείμενης κλιματικής αλλαγής.

Σημειώνεται ότι πέρα από τις εργασίες της συγκεκριμένης ερευνητικής ομάδας δεν είναι σε γνώση μας καμιά αναφορά στην διεθνή βιβλιογραφία αναφορικά με τη γενετική χαρτογράφηση στο κυπαρίσσι. Τις παραπάνω αδυναμίες έρχεται να καλύψει η παρούσα μελέτη με τη χρήση μεγάλου αριθμού δύο νέων ειδών μοριακών δεικτών, των φθοριζόντων μικροδορυφόρων (f-SSR) και των φθοριζόντων ενισχυμένων πολυμορφισμών μήκους θραυσμάτων DNA εκ περιορισμού (f-AFLP) στους 382 απογόνους μιας ελεγχόμενης διασταύρωσης πρώτης γενιάς μεταξύ ενός οριζοντιόκλαδου θηλυκού γονέα και ενός ορθόκλαδου αρσενικού γονέα του *Cupressus sempervirens* L.. Οι δείκτες f-AFLP μπορεί να πυκνώσουν σημαντικά τα χαρτογραφημένα σημεία του γονιδιώματος, ενώ οι δείκτες SSR όντας συγκυρίαρχοι

πέρα από τον εμπλουτισμό του γενετικού χάρτη θα βοηθήσουν ιδιαίτερα, στη γεφυροποίηση των δύο γονειικών χαρτών. Επίσης, καθώς είναι γνωστό ότι το κυπαρίσσι διαθέτει υψηλή γενετική ποικιλότητα (Ghosn *et al.*, 2000; Papageorgiou *et al.*, 2005), είναι πιθανό στη συγκεκριμένη ολοσυγγενική οικογένεια πρώτης γενιάς που αποτελείται από 382 άτομα, οι μοριακοί δείκτες να παρουσιάσουν υψηλή πληροφοριοδοτική ικανότητα, ιδιαίτερα οι συγκυρίαρχοι δείκτες που απαιτούνται για να ερμηνευθεί καλύτερα ο τρόπος δράσης των QTL (Aravanopoulos, 2002).

Για τη χαρτογράφηση του γνωρίσματος της μορφής της κόμης καθώς και άλλων αυξητικών γνωρισμάτων η μελέτη της γενετικής και της επιγενετικής κληρονομησιμότητας αποτελεί προαπαιτούμενο για τη βελτιστοποίηση της δυνατότητας μελέτης της φαινοτυπικής παραλλακτικότητας που είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης της γενετικής ποικιλότητας και του περιβάλλοντος (Richards, 2006). Η μεθυλίωση του DNA κατά την οποία η έκφραση ή αποσιώπηση (silencing) των γονιδίων πραγματοποιείται και κληρονομείται χωρίς καμία αλλαγή σε επίπεδο νουκλεοτιδίων, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην εξέλιξη, όσο και στη διατήρηση της γενετικής ακεραιότητας των φυτών (Richards, 2006).

1.1 Το κυπαρίσσι (*Cupressus sempervirens* L.)

1.1.1 Ιστορικές αναφορές

Η ιστορική αναφορά στο κυπαρίσσι (*Cupressus sempervirens* L.) ξεκινάει από αρχαιοτάτων χρόνων και συγκεκριμένα πριν από 24 αιώνες, από την εποχή του Θεόφραστου.

Σύμφωνα με τη μυθολογία ο Κυπάρισσος ήταν ένας όμορφος νέος από την Κέα, γιος του Τήλεφου και εγγονός του Ηρακλή. Αγαπημένο του σύντροφο είχε ένα εξημερωμένο ιερό ελάφι. Αλλά κάποια καλοκαιρινή μέρα ενώ το ελάφι κοιμόταν ξαπλωμένο στον ίσκιο, ο Κυπάρισσος το σκότωσε από απροσεξία με ένα ακόντιο. Ο νέος γεμάτος απελπισία, θέλησε να πεθάνει. Ζήτησε από τον Απόλλωνα τη χάρη να κυλούν τα δάκρυα του αιώνια. Οι θεοί τον μετέτρεψαν σε κυπαρίσσι, το δέντρο της θλίψης, που αφιερώθηκε στον Πλούτωνα.

Ο φιλόσοφος Πλάτωνας λέγεται ότι όλα τα συγγράμματα του τα αποτύπωσε σε ξύλο κυπαρισσιού διότι πίστευε ότι θα διατηρηθούν στην αιωνιότητα λόγω της ποιότητας του ξύλου. Στον Άγιο Πέτρο του Βατικανού οι κυπαρισσένιες πύλες έχουν διατηρηθεί χωρίς φθορά επί έξι αιώνες. Τα κείμενα των Νόμων του Σόλωνα ήταν χαραγμένα σε πλακίδια από ξύλο κυπαρισσιού. Οι Φοίνικες χρησιμοποιούσαν το ξύλο του κυπαρισσιού για την κατασκευή πλοίων, οι Πέρσες θεωρούσαν το κυπαρίσσι ως ιερό φυτό και το φύτευαν γύρω από θρησκευτικά μνημεία. Στην Κίνα ήταν παράδοση να φυτεύουν στους τάφους των νεκρών κυπαρίσσια για ενδυνάμωση της ψυχής και ως μέσο διατήρησης του σώματος λόγω της υπεροχής του φυτού ως ένα είδος που παραμένει πράσινο για πάντα. Οι Ρωμαίοι που επίσης λάτρευαν το είδος φύτευαν κυπαρίσσια στην αυλή τους για τη γιορτή της ενηλικίωσης της κόρης τους που ήταν πλέον έτοιμη για γάμο.

Σήμερα το κυπαρίσσι θεωρείται αναπόσπαστο είδος του μεσογειακού τοπίου. Στην Ελλάδα αποτελεί απαραίτητο στοιχείο του ελληνικού γαλάζιου τοπίου και της ελληνικής παράδοσης, αφού κυπαρίσσια φυτεύονται δίπλα σε εκκλησίες και νεκροταφεία ως σύμβολα αιώνιας μνήμης των νεκρών.

1.1.2 Βοτανική ταξινόμηση του *Cupressus sempervirens* L.

Το κυπαρίσσι ανήκει στην οικογένεια Cupressaceae που αποτελείται από 19 γένη και στην υποοικογένεια Cupressoideae που περιλαμβάνει 25 είδη. Το κυπαρίσσι μπορεί να φτάσει σε ύψος έως και 35 μ. και η διάμετρος του να είναι άνω του ενός μέτρου. Ο κορμός είναι ευθύς, μεγάλος κιονοειδής και ανώμαλος (Ντούλης κ.α., 2004). Οι κλάδοι του φύονται κυκλικά του κορμού προς όλες τις κατευθύνσεις, έχουν διάμετρο 1 χιλιοστό και έχουν κυκλική ή τετραγωνισμένη μορφή. Τα φύλλα διατάσσονται σταυροειδώς αντίθετα στο ώριμο φυτό, και σε λεπτομερέστερη παρατήρηση τους σε στερεοσκόπιο διακρίνεται η σπονδυλωτή διάταξη τους (Σχήμα 1).

Είναι φυτό μόνικο και φέρει αρσενικούς ωοειδείς ή κυλινδρικούς ιούλους και θηλυκούς ωοειδείς ιούλους. Η άνθηση παρατηρείται από Ιανουάριο έως Απρίλιο. Ο καρπός του είναι στρόβιλος, σφαιροειδής με μικρό ποδίσκο. Τα σπέρματα είναι πολλά μαζί σε κάθε καρπόφυλλο μήκους 2-4 χιλιοστών (Αθανασιάδης, 1986).

Η μορφή του είναι μεταβλητή σαν συνέπεια της διαφορετικής γωνίας των κλάδων, του διαφορετικού βαθμού καμπυλότητας αλλά και του διαφορετικού μήκους της διαφορετικής τάξης τμημάτων των κλάδων. Για αυτό το λόγο η κόμη που έχει σκούρο πράσινο χρώμα, παρουσιάζει μεταβλητές μορφές από τις ορθόκλαδες μέχρι τις πλήρεις αναπτυγμένες οριζοντιόκλαδες μορφές (Ντούλης κ.α., 2004).

Η διάκριση του κυπαρισσιού (*Cupressus sempervirens* L.) σε δύο ποικιλίες βασίζεται αποκλειστικά στην διαφορετική μορφή της κόμης που παρουσιάζει (Σχήμα 2). Η πρώτη ποικιλία η *Cupressus sempervirens* var. *horizontalis* παρουσιάζει κόμη ανεπτυγμένη με κλάδους οριζόντιους σχηματίζοντας γωνία ακόμα και 90° με κορμό ορατό μέχρι την κορυφή. Αντιθέτως στην ποικιλία *Cupressus sempervirens* var. *pyramidalis* διακρίνεται η λεπτή, επιμήκης, οξεία κλειστή κόμη με κλάδους που εκπτύσσονται προς τα άνω αγκαλιάζοντας τον κορμό (Ντούλης κ.α., 2004; Πανέτσος 1967; Papageorgiou *et al.*, 1994).



Σχήμα 1. Απεικόνιση βελόνων σε στερεοσκόπιο.



Σχήμα 2. *Cupressus sempervirens* L. var. *horizontalis* (αριστερά) var. *pyramidalis* (δεξιά).

1.1.3 Φυσική εξάπλωση του είδους

Η φυσική εξάπλωση του είδους παγκοσμίως περιλαμβάνει περιοχές της Μικράς Ασίας και γενικότερα της Δυτικής Ασίας, της Νότιας Αφρικής, της Μεσογείου και της κεντρικής και βόρειας Αμερικής. Στη Μεσόγειο συγκεκριμένα υπάρχουν φυσικοί πληθυσμοί σε περιοχές του Νότιου Ιράν, της Συρίας, του Λίβανου, της Τουρκίας, της Κύπρου και της Ελλάδας (Κρήτη, Ρόδος, Κως, Σάμος, Χίος κ.α.). Επίσης στην Ιταλία, Πορτογαλία, Ισπανία, Γαλλία και πρώην Γιουγκοσλαβία υπάρχουν φυσικές συστάδες του κυπαρισσιού (Strid and Tan, 1997; Ντούλης κ.α., 2004).

Στην Ελλάδα και συγκεκριμένα στην Κρήτη πραγματοποιήθηκε έρευνα γενετικής και μορφολογικής ποικιλότητας (Παπαγεωργίου κ.α., 2004) των φυσικών πληθυσμών. Βρέθηκε υψηλή γενετική ποικιλότητα εντός των προελεύσεων για όλα τα μελετούμενα χαρακτηριστικά και μορφολογικές διαφορές μεταξύ ορεινών και πεδινών πληθυσμών (Παπαγεωργίου κ.α., 2004)

1.1.4 Οικολογική - Αισθητική σημασία του είδους

Το κυπαρίσσι αποτελεί χαρακτηριστικό είδος της μεσογειακής λεκάνης. Είναι δέντρο με μειωμένες απαιτήσεις σε νερό και σε έδαφος. Στην Ελλάδα χρησιμοποιούταν από τα αρχαία χρόνια σε ιερούς χώρους για προστασία από τους ανέμους ως φυσικός ανεμοφράκτης (Ξενόπουλος, 1991). Είναι το μόνο δέντρο που μπορεί να διακριθεί στον ιερό βράχο της Ακρόπολης (Σχήμα 3). Στην Ιταλία, θεωρείται σύμβολο ολόκληρης της Τοσκάνης (Σχήμα 4). Οι Ιταλοί θεωρώντας το κυπαρίσσι ως φυσική κληρονομιά, συστηματικά το αναπαραγάγουν και το προστατεύουν.



Σχήμα 3. Κυπαρίσσια στον Ιερό βράχο της Ακρόπολης.



Σχήμα 4. Χαρακτηριστικό τοπίο με κυπαρίσσια στην Τοσκάνη.

1.2 Έλκος του κυπαρισσιού (*Seiridium cardinale*)

Το έλκος του κυπαρισσιού οφείλεται στον μύκητα *Seiridium spp.* Τρία διαφορετικά είδη *Seiridium* (*S. unicorne*, *S. cardinale*, *S. cupressi*) σχετίζονται με το έλκος του κυπαρισσιού. Η ασθένεια του έλκους του κυπαρισσιού εντοπίστηκε αρχικά στην Καλιφόρνια των Η.Π.Α το 1928, όπου προσέβαλε και κατέστρεψε φυτείες του δασοπονικού είδους *Cupressus macrocarpa*. Στη συνέχεια αναφέρθηκε στην Νέα Ζηλανδία (1933), στη Νότιο Αφρική (1944), στην Αυστραλία (1949) και στην Ευρώπη (1944) όπου προκάλεσε μεγάλες καταστροφές δασών, φυτωρίων και καλλωπιστικών φυτειών. Έκτοτε η ασθένεια που προκαλείται από τον μύκητα *Seiridium cardinale* (έλκος του κυπαρισσιού) με τη συνεχή εξάπλωση της θεωρείται η πλέον καταστροφική ασθένεια του κυπαρισσιού *C. sempervirens* και άλλων κυπαρισσοειδών. Προσβολές έχουν πιστοποιηθεί και σε άλλα είδη της οικογένειας π.χ. *Juniperus foeditissima*, *Juniperus excelsa*, *Juniperus oxycedrus* και *Juniperus phoenicea* (Tsopelas *et al.*, 2007) και αποτελεί σήμερα πανδημία (Graniti 1998; Τσόπελας και Ξενόπουλος, 2002). Στην Ελλάδα πρωτοεμφανίστηκε στη νήσο της Εύβοιας το 1962. Έχει αφανίσει κυπαρισσώνες, ανεμοφράκτες και κυπαρίσσια του αστικού και περιαστικού πρασίνου. Στην Ελλάδα ιδιαίτερες καταστροφές έχει υποστεί η νότια και κεντρική Ελλάδα (Σχήμα 5), ενώ παρουσιάζουν αύξηση οι προσβολές στη Θεσσαλία και Μακεδονία (Τσόπελας και Ξενόπουλος, 2002; Τσόπελας, 2009). Προς το παρόν το πρόβλημα αντιμετωπίζεται με τη φύτευση σχετικώς «ανθεκτικών» ατόμων που έχουν εντοπιστεί (Santini and Di Lonardo, 2000) τα οποία πολλαπλασιάζονται αγενώς, και τη συστηματική κοπή και καύση των προσβεβλημένων ατόμων.

1.2.1 Συμπτώματα

Το πιο εμφανές σύμπτωμα είναι το καφέ χρώμα των κλαδίσκων, κλάδων, ή των κορυφών που είναι δυνατό να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε εποχή κυρίως όμως την άνοιξη και το καλοκαίρι και η εκροή ρητίνης (Σχήμα 6). Αν οι καιρικές συνθήκες είναι ήπιες και υγρές το *S. cardinale* παράγει καρποφορίες του ατελούς

σταδίου, τα ακέρβουλα στον νεκρό φλοιό του έλκους. Από τα ακέρβουλα εκκρίνονται μεγάλοι αριθμοί κονιδίων, ενώ σε *in vitro* καλλιέργεια ο μύκητας παράγει δύο τοξίνες την σειριδίνη και την ισοσειριδίνη (Teissier Du Cross *et al.*, 1999).



Σχήμα 5. Προσβεβλημένα άτομα κυπαρισσιών στο νησί της Εύβοιας το 1988 (www.plantwise.org; Graniti, 2014).



Σχήμα 6. Προσβεβλημένος κορμός δέντρου από το *S. cardinale* (www.plantwise.org; Graniti, 2014).

1.2.2 Βιολογικός κύκλος του *S. Cardinale*

Τα κονίδια (Σχήμα 7) διασκορπίζονται σε μικρή απόσταση με τις σταγόνες της βροχής. Τα κονίδια βλαστάνουν και προκαλούν μόλυνση σε θερμοκρασίες από 5- 34°C, με βέλτιστο γύρω στους 24-25°C. Τα έλκη αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια της αυξητικής περιόδου όμως κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού και μερικές φορές το χειμώνα η επέκταση του έλκους επιβραδύνεται ή σταματά τελείως. Ο κορμός και οι κλάδοι είναι συνήθως τα πρώτα μέρη του δέντρου που προσβάλλονται. Αργότερα τα έλκη συμπεριφέρονται σαν αποθήκες κονιδίων με τη συσσώρευση μολυσμάτων για τα άλλα απρόσβλητα μέρη του δέντρου, ενώ σε μακρινές αποστάσεις η μεταφορά τους γίνεται με έντομα (Teissier Du Cros *et al.*, 1999).



Σχήμα 7. Κονίδια του μύκητα *Seiridium cardinale* (www.plantwise.org; Graniti, 2014)

1.3 Δείκτες

1.3.1 Μορφολογικά γνωρίσματα και δείκτες

Τα μορφολογικά γνωρίσματα ακολουθούν κανονική κατανομή σε πληθυσμούς και οικογένειες και είναι δύσκολο να χαρτογραφηθούν. Ωστόσο οι φυσικές μεταλλάξεις μπορούν να μετατρέψουν ένα μορφολογικό γνώρισμα σε ποιοτικό δείκτη, δηλαδή να δημιουργήσουν ένα μορφολογικό δείκτη, ανάλογο των κλασικών δεικτών της γενετικής επιστήμης (Aravanopoulos, 2014). Τα μορφολογικά γνωρίσματα των φυσικών μεταλλάξεων χαρτογραφούνται σε ένα πληθυσμό, καθορίζεται η σύνδεσή τους με κάποιο επιθυμητό ή ανεπιθύμητο γνώρισμα και στη συνέχεια είναι δυνατή η έμμεση επιλογή χρησιμοποιώντας τη φυσική μετάλλαξη του γνωρίσματος ως γενετικό δείκτη. Υπάρχουν πολλοί ανεπιθύμητοι παράγοντες που σχετίζονται με τους μορφολογικούς δείκτες. Ο πρώτος έγκειται στον βαθμό εξάρτησης από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Συχνά οι συνθήκες στις οποίες αναπτύσσεται ένα φυτό είναι δυνατό να επηρεάζουν την έκφραση των μορφολογικών δεικτών και να οδηγήσουν σε λανθασμένα συμπεράσματα. Δεύτερον, τα γνωρίσματα που δημιουργούνται από φυσικές μεταλλάξεις συχνά έχουν ανεπιθύμητη εικόνα όπως ο νανισμός και αλβινισμός. Τέλος, η πραγματοποίηση βελτιωτικών προγραμμάτων με τους συγκεκριμένους δείκτες είναι χρονοβόρα, και ο μεγάλος πληθυσμός των φυτών απαιτεί μεγάλα πειραματικά τεμάχια και θερμοκήπια για την καλλιέργειά τους (Stuber *et al.*, 1999).

1.3.2 Βιοχημικοί Δείκτες

Τα ισοένζυμα αποτελούν διαφορετικές πρωτεϊνικές αλληλουχίες του ίδιου ενζύμου που κωδικοποιούνται από διαφορετικά αλληλόμορφα ενός δομικού γονιδίου. Τα ένζυμα αποτελούνται από αμινοξέα ηλεκτρικά φορτισμένα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα ένζυμα να έχουν ένα ηλεκτρικό φορτίο που εξαρτάται από τα αμινοξέα που το συνθέτουν. Όταν συμβεί μία μετάλλαξη στο DNA που οδηγεί στην αντικατάσταση ενός αμινοξέος, είναι δυνατό το ηλεκτρικό φορτίο της πρωτεΐνης να τροποποιηθεί και η διαμόρφωση του μορίου να αλλάξει. Οι μεταβολές του

ηλεκτρικού φορτίου και της διαμόρφωσης μπορούν να επιφέρουν αλλαγές στο ρυθμό μετακίνησης των πρωτεϊνών σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Η γενετική ποικιλότητα που προκύπτει μπορεί να ανιχνευθεί με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή και τη χρήση εξειδικευμένων ενζυμικών χρώσεων που περιέχουν το υπόστρωμα για το ένζυμο, συμπαραγόντων και ενός οξειδωμένου άλατος (π.χ. nitro-blue tetrazolium). Συνήθως δύο ή περισσότεροι ζωνότυποι μπορούν να διακριθούν για ένα ένζυμο. Γι' αυτό το λόγο και η ποικιλότητα των ισοενζύμων αναφέρεται και ως ποικιλότητα ισοενζύμων.

Το κύριο πλεονέκτημα των ισοενζύμων είναι η σχετική απλότητα της ανίχνευσης, εφόσον βέβαια είναι διαθέσιμη και εφικτή η κατάλληλη ιστοχημική βαφή. Από τα περισσότερα από 3000 ένζυμα που εκφράζονται κάθε στιγμή σε ένα δασικό είδος, λιγότερα από 100 μπορούν να ανιχνευθούν ηλεκτροφορητικά (Aravanopoulos, 1990). Επειδή η ανάλυση τους δεν απαιτεί την απομόνωση DNA ή τη διαθεσιμότητα γνωστών αλληλουχιών, εκκινητών και ιχνηλατών, είναι γρήγορη και εύχρηστη (Πίνακας 1). Για μερικά είδη, εντούτοις, μπορεί να απαιτείται ιδιαίτερη βελτιστοποίηση των τεχνικών για ορισμένα ένζυμα. Οι απλές αναλυτικές διαδικασίες επιτρέπουν σε μερικά ισοένζυμα να εφαρμοστούν με σχετικά χαμηλότερο κόστος, ανάλογα με το αντιδραστήριο χρώσης του ενζύμου που χρησιμοποιείται.

Το κύριο μειονέκτημα των ισοενζύμων είναι ο σχετικά μικρός αριθμός τους και το χαμηλό επίπεδο πολυμορφισμού τους. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες με την ίδια ηλεκτροφορητική κινητικότητα (ομο-μετανάστευση) μπορούν να μην είναι ομόλογες για σχετικά απομακρυσμένα γονιδιώματα. Τα ισοένζυμα συχνά θεωρούνται ως έμμεσοι μοριακοί δείκτες δεδομένου ότι αντιπροσωπεύουν ενζυμικές παραλλαγές και τα ένζυμα είναι μόρια που αντανακλούν τον πολυμορφισμό που υπάρχει σε επίπεδο DNA. Σε διαφορετικούς ιστούς και στάδια ανάπτυξης εμφανίζουν ποικιλότητα που ενδέχεται σε ορισμένες περιπτώσεις να επηρεαστεί από τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητη η μελέτη Μενδελικής κληρονομησιμότητας πριν από τη χρήση τους ως γενετικούς δείκτες (Aravanopoulos, 1990; Tsaftaris *et al.*, 2012).

1.3.3 Μοριακοί δείκτες

1.3.3.1 Πολυμορφισμός Μεγέθους θραυσμάτων εκ περιορισμού DNA (RFLP)

Το πρώτο σύστημα μοριακών δεικτών, οι δείκτες RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), βασίστηκε σε δυο τεχνικές, την κατεργασία με περιοριστικά ένζυμα και τον υβριδισμό του DNA. Αυτοί είναι οι μόνοι δείκτες που εφαρμόστηκαν βασιζόμενοι στον υβριδισμό και ανιχνεύουν κυρίως μεταλλάξεις σε θέσεις κοπής περιοριστικών ενζύμων και ένθεση, ή απαλοιφή, μιας αλληλουχίας μεταξύ δύο θέσεων κοπής περιοριστικών ενζύμων. Συνοπτικά η μεθοδολογία περιλαμβάνει την κοπή του συνολικού μεγαλομοριακού DNA των κυττάρων ενός ιστού (π.χ. φύλλο) με ένα ή περισσότερα περιοριστικά ένζυμα με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός πληθυσμού μικρότερων μορίων DNA που διαχωρίζονται σύμφωνα με το μήκος τους με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Παρά το γεγονός ότι τα μόρια αυτά είναι ορατά αν βαφτούν με βρωμιούχο αιθίδιο, δεν είναι ευδιάκριτες οι διαφορές τους καθώς υπάρχει μεγάλος αριθμός μορίων με συνεχή κατανομή μήκους, από λίγες δεκάδες μέχρι και πάνω από δέκα χιλιάδες βάσεις, που εμφανίζονται σαν συνεχόμενη φωτεινή περιοχή (smear) στην πηκτή, η οποία ενδεχομένως να περιέχει και κάποιες ευδιάκριτες ζώνες συγκεκριμένων μεγεθών που παράγονται από την πέψη επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών. Αυτή η πληροφορία δεν επαρκεί για τη διαπίστωση αν δυο διαφορετικά άτομα ενός πληθυσμού παρουσιάζουν πολυμορφισμό στην κοπή του συνόλου του DNA τους με ένα ένζυμο. Έτσι επινοήθηκε μια τεχνική ανίχνευσης διαφορών συγκεκριμένων αλληλουχιών που προέρχονται από την κατεργασία με περιοριστικά ένζυμα. Για την ανίχνευση τέτοιων διαφορών χρησιμοποιείται η τεχνική του υβριδισμού με έναν ιχνηλάτη είναι ένα κλωνοποιημένο τμήμα DNA του ίδιου οργανισμού οπότε ανιχνεύεται αν υπάρχει πολυμορφισμός για το συγκεκριμένο τμήμα που είναι ομόλογο του ιχνηλάτη. Τα διαχωρισμένα τμήματα DNA της ηλεκτροφόρησης μεταφέρονται με νότια μεταφορά σε μια μεμβράνη όπου μετουσιώνονται και σταθεροποιούνται. Ο ιχνηλάτης επισημαίνεται με φθορίζουσες ή ραδιενεργές ουσίες, μετουσιώνεται και αυτός, και υβριδίζει με τις συμπληρωματικές του αλυσίδες που είναι σταθεροποιημένες στη μεμβράνη. Ανάλογα με την παρουσία ή απουσία αντίστοιχων θέσεων κοπής με το περιοριστικό ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε, θα εμφανιστούν τα ίδια ή διαφορετικά

επισημασμένα μόρια στα διάφορα γενετικά υλικά που εξετάζονται. Επίσης διαφορές μπορεί να οφείλονται σε προσθήκη/απαλοιφή βάσεων μεταξύ αλληλομόρφων διαφορετικών γενοτύπων. Οι δείκτες (γονιδιακές θέσεις) RFLP κληρονομούνται με συγκυρίαρχο τρόπο και μπορεί να είναι πάρα πολλοί. Επίσης η αλληλουχία του κάθε ιχνηλάτη-δείκτη δεν χρειάζεται να είναι γνωστή. Αποτελούν το πρώτο σύστημα μοριακών δεικτών που χρησιμοποιήθηκε στη βελτίωση των φυτών, αλλά μετά την ανακάλυψη της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) η χρήση δεικτών RFLP είναι περιορισμένη, κυρίως εξαιτίας της μεγάλης ποσότητας συνολικού DNA που απαιτείται για κοπή με περιοριστικά ένζυμα (Πίνακας 1) της δυσκολίας στην εφαρμογή των τεχνικών ανίχνευσής τους και του σημαντικού κόστους (Tsaftaris *et al.*, 2012).

1.3.3.2 Τυχαία Ενισχυμένο Πολυμορφικό DNA (RAPD)

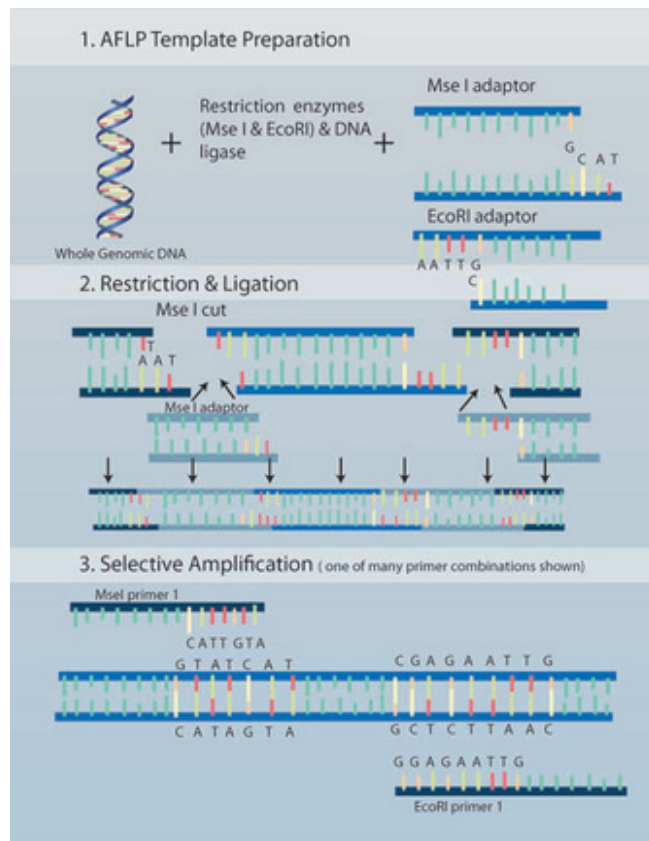
Η ανίχνευση δεικτών RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ήταν η πρώτη εφαρμογή αξιοποίησης της PCR για την ανίχνευση γενετικής παραλλακτικότητας σε επίπεδο DNA. Το σύστημα αυτό βασίζεται στη χρήση ενός μόνο μικρού εκκινητή (συνήθως 10 νουκλεοτιδίων) με τυχαία αλληλουχία, για την ενίσχυση με PCR τυχαίων τμημάτων του DNA των ατόμων ενός πληθυσμού. Για να πολλαπλασιαστεί ένα τμήμα με έναν εκκινητή, θα πρέπει ο εκκινητής αυτός να βρει μια συμπληρωματική αλληλουχία και στα δυο άκρα του τμήματος αυτού, αλλά με αντίθετες κατευθύνσεις (δηλαδή στο ένα άκρο στη μια αλυσίδα του DNA και στο άλλο άκρο στην άλλη). Όταν η περιοχή ανάμεσα στα σημεία υβριδισμού-πρόσδεσης του εκκινητή είναι από 100 έως 3000 βάσεις παράγονται μόρια πολλαπλασιασμένου DNA που εμφανίζονται ως διακριτές ζώνες στην ηλεκτροφόρηση. Ο πολυμορφισμός μεταξύ των διαφορετικών ατόμων που εμφανίζεται ως διαφορά στο πρότυπο ζωνών της ηλεκτροφόρησης μπορεί να οφείλεται σε αλλαγές στη θέση πρόσδεσης του εκκινητή, με αποτέλεσμα αποτυχία πολλαπλασιασμού του τμήματος και εμφάνιση της ζώνης και σε προσθήκη/απαλοιφή βάσεων στο ενδιάμεσο των πολλαπλασιασμένων τμημάτων, που οδηγεί στη διαφοροποίηση του μήκους της αλληλουχίας που ενισχύεται. Σε κάθε αντίδραση μπορεί να ενισχύονται περισσότερες από μια ζώνες, γεγονός που υποδηλώνει ότι μπορεί να αναλύονται

περισσότερα του ενός αλληλόμορφα. Οι δείκτες RAPD συμπεριφέρονται ως κυρίαρχοι χαρακτήρες, δηλαδή ένα αλληλόμορφο που ενισχύεται εμφανίζεται ως μια ζώνη σε ομοζύγωτη και ετεροζύγωτη κατάσταση, ενώ το αλληλόμορφο που δεν ενισχύεται δεν ανιχνεύεται. Για το λόγο αυτό η τεχνική είναι μερικώς αποτελεσματική σε σχήματα βελτίωσης με γενεαλογική επιλογή όπου είναι απαραίτητο να αναγνωρίζονται ετεροζύγωτα άτομα μεταξύ των απογόνων. Ένα ακόμη πρόβλημα των δεικτών αυτών είναι η ευαισθησία της PCR σε αλλαγή συνθηκών της αντίδρασης με αποτέλεσμα να μην έχει καλή επαναληψιμότητα, ιδιαίτερα όταν εφαρμόζεται σε διαφορετικά εργαστήρια (Πίνακας 1). Ωστόσο, η μεθοδολογία των δεικτών RAPD είναι γρήγορη και απλή ενώ απαιτεί ελάχιστες ποσότητες DNA και το κόστος είναι χαμηλό, οπότε μπορεί να εφαρμοστεί στην ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων δίνοντας σημαντική πληροφορία για πολυμορφισμούς χωρίς να χρειάζεται προηγούμενη γνώση της αλληλουχίας των διαφορετικών αλληλομόρφων (Gomez *et al.*, 2003, Tsiftaris *et al.*, 2012).

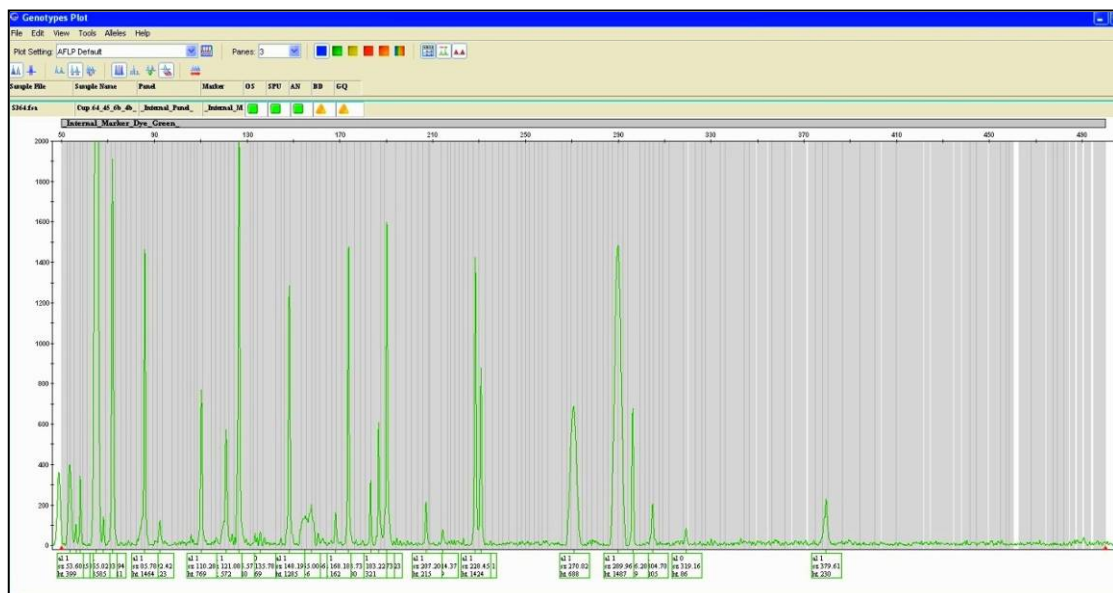
1.3.3.3 Φθορίζων Πολυμορφισμός Μήκους ενισχυμένων θραυσμάτων (f-AFLP)

Το σύστημα δεικτών AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) βασίζεται στον πολυμορφισμό των θραυσμάτων κοπής του συνολικού DNA με περιοριστικά ένζυμα, όπως και οι δείκτες RFLP, με τη διαφορά ότι η αναγνώριση των θραυσμάτων αυτών δεν γίνεται με υβριδισμό αλλά με PCR (Vos *et al.*, 1995). Η τεχνική χρησιμοποιεί προσαρμοστές (adapters) που συνδέονται με τη βοήθεια του ενζύμου λιγάση με τα άκρα των θραυσμάτων που προκύπτουν από κατεργασία με δύο συνήθως περιοριστικά ένζυμα, ένα που αναγνωρίζει θέσεις τεσσάρων και ένα έξι βάσεων (Σχήμα 8). Κατόπιν γίνεται αντίδραση PCR με μήτρα τα τμήματα αυτά και εκκινητές που είναι συμπληρωματικοί με την αλληλουχία των προσαρμοστών. Ο ανάντι εκκινητής της διαγνωστικής PCR σημαίνεται στο 5' άκρο με φθορίζουσα βαφή (φθοριόχρωμα). Τα αμπλικόνια (amplicons) αναλύονται σε αλληλουχητή (π.χ. αλληλουχητής ABI-3730, Applied Biosystems) που αποτελεί τεχνολογία αιχμής για την ανάλυση θραυσμάτων DNA όπως αυτή απαιτείται για την ανάδειξη των παραπάνω δεικτών (Σχήμα 8). Ο αλληλουχητής μέσω τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης αναλύει τα ενισχυμένα θραύσματα και τα αποτελέσματα εξάγονται με κατάλληλο

λογισμικό π.χ. το λογισμικό Genemapper (Αβραμίδου κ.α., 2012). Η τεχνική παράγει μεγάλη πυκνότητα δεικτών αφού στην ηλεκτροφόρηση ξεχωρίζουν 20-80 ζώνες που καθεμιά αντιστοιχεί σε έναν AFLP δείκτη και επισημαίνει τη θέση ενός αλληλομόρφου). Έτσι η τεχνική έχει το πλεονέκτημα να ανιχνεύει μεγάλο αριθμό δεικτών (Σχήμα 9) σε μια αντίδραση χωρίς προαπαιτούμενη γνώση της αλληλουχίας ή τη χρήση ιχνηλάτη (Πίνακας 1). Επίσης είναι πολύ λιγότερο ευαίσθητη από τα RAPDs σε διακυμάνσεις των συνθηκών της PCR με αποτέλεσμα να έχει πολύ καλύτερη επαναληψιμότητα και ακρίβεια. Στα πλεονεκτήματα επίσης των f-AFLP δεικτών συγκαταλέγονται η ακρίβεια και η αντικειμενικότητα της εξαγωγής των αποτελεσμάτων τα οποία προκύπτουν από τη χρήση του αλληλουχητή αντικαθιστώντας την τεχνική της πολυακρυλαμίδης που είναι ιδιαίτερα χρονοβόρα και τοξική (Αβραμίδου κ.α., 2012). Οι δείκτες που ανιχνεύονται είναι κυρίαρχοι και μονοαλληλικοί (το ένα αλληλόμορφο ανιχνεύεται ενώ το άλλο όχι). Ο μεγάλος όγκος πληροφοριών που προκύπτει με μια μόνο αντίδραση PCR στο σύστημα δεικτών f-AFLP, η αποτελεσματικότητα και επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων, έκανε τους δείκτες αυτούς πολύ δημοφιλείς σε μελέτες ανάλυσης της βιοποικιλότητας, ανάλυσης παραλλακτικότητας σε συλλογές τραπεζών γενετικού υλικού και κυρίως γενετικής χαρτογράφησης φυτών με μεγάλα γονιδιώματα (Jones *et al.*, 2009).



Σχήμα 8. Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας των AFLP δεικτών (www.appliedbiosystems.com).

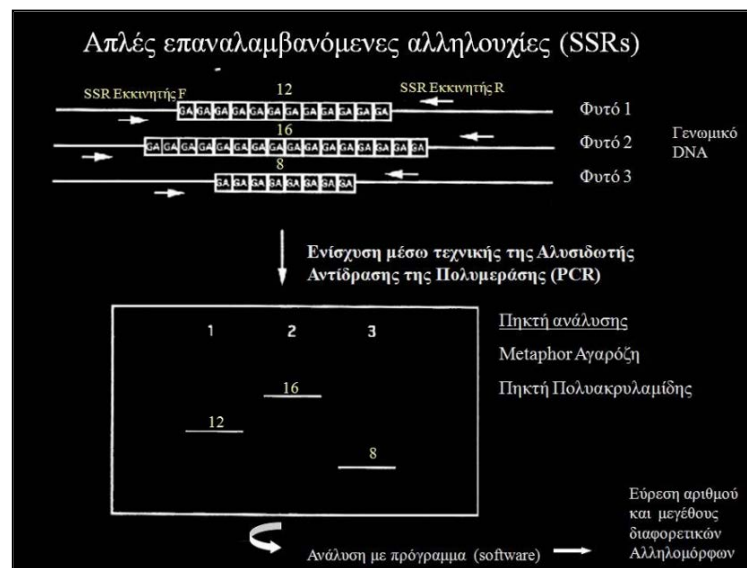


Σχήμα 9. Απεικόνιση δεικτών f-AFLP στο πρόγραμμα Genemapper v.4.0 (Applied Biosystems) σε δείγμα της χαρτογραφικής οικογένειας πρώτης γενιάς.

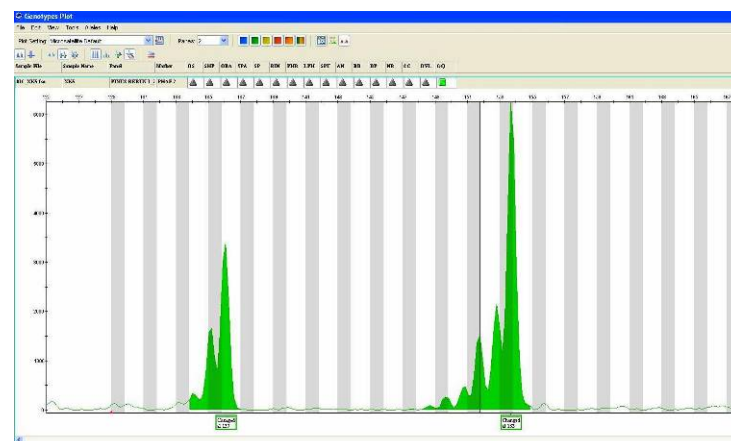
1.3.3.4 Φθορίζοντες Μικροδορυφόροι ή Απλές φθορίζουσες Επαναλαμβανόμενες Αλληλουχίες (f-SSR)

Οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί έχουν πολλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες στο DNA τους. Τέτοιες μικρές επαναλήψεις αλληλουχιών 2-5 νουκλεοτιδίων που επαναλαμβάνονται 5-100 φορές έχουν ονομαστεί με πολλά διαφορετικά ονόματα όπως SSRs, STRs, VNTRs, και αναφέρονται γενικά ως μινι- και μικρο-δορυφόροι (mini-satellites, microsatellites). Αποτελούν εξαιρετική πηγή γενετικών δεικτών καθώς παρουσιάζουν υψηλή παραλλακτικότητα ως προς τον αριθμό επαναλήψεων σε πολλούς οργανισμούς (Πίνακας 1, Σχήμα 10). Για παράδειγμα, μια αλληλουχία ενός δινουκλεοτιδίου AG μπορεί να επαναλαμβάνεται 20 φορές σε συγκεκριμένη θέση στο DNA ενός αλληλομόρφου, ενώ στο άλλο αλληλόμορφο 30 φορές. Η ανίχνευση αυτών των διαφορών μπορεί να γίνει εύκολα με PCR αν ενισχύσουμε την περιοχή των επαναλήψεων χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές ομόλογους με αλληλουχίες εκατέρωθεν της επανάληψης. Τότε, με τη θεώρηση ότι η αλληλουχία της περιοχής είναι η ίδια στα δυο αλληλόμορφα και ότι η μόνη διαφορά οφείλεται στον αριθμό επαναλήψεων του δινουκλεοτιδίου, τα ενισχυμένα τμήματα διαφοράς μήκους 20 νουκλεοτιδίων είναι εύκολο να ανιχνευθούν σε ειδική πηκτική αгарόζης υψηλής διαχωριστικής ικανότητας ή με βάση τη σύγχρονη τεχνολογία αλληλούχισης. Ο ανάντι εκκινητής της αλληλουχίας των μικροδορυφόρων σημαίνεται με ένα φθοριόχρωμα (Fam, Hex, Rox, Tamra) και μετά τα προϊόντα της PCR τοποθετούνται στον αυτοματοποιημένο αλληλουχητή φθορισμού. Κοντά στο σημείο της εξόδου από την τριχοειδή στήλη και κατά την στιγμή της ανίχνευσης των δεικτών τα μόρια αυτά διεγείρονται από μια δέσμη laser. Κάθε χρώμα τότε εκπέμπει σε διαφορετική συχνότητα φωτός και έτσι ανιχνεύονται ταυτόχρονα χωρίς να συγχέονται τα τέσσερα χρώματα. Κάθε διαφορετικό χρώμα μπορεί να αντιπροσωπεύει μία διαφορετική επιλεκτική αντίδραση. Έτσι δίνεται η δυνατότητα για την λεγόμενη πολύπλεξη (multiplexing) κατά την ανάλυση (Αβραμίδου κ.α., 2012). Αυτή η τεχνολογία αιχμής δίνει απλούς συγκυρίαρχους δείκτες (γονιδιακές θέσεις) με μεγάλη παραλλακτικότητα και υψηλή επαναληψιμότητα αντικαθιστώντας την χρήση της ειδικής αгарόζης (π.χ. Metaphor) και της τοξικής πολυακρυλαμίδης (Σχήμα 11). Η αποτελεσματικότητα, η ακρίβεια της εύρεσης του μήκους των

αλληλομόρφων και η επαναληψιμότητα των φθοριζόντων δεικτών f-SSR που αναλύονται ειδικά σε τριχοειδείς αλληλουχητές, υπερέχει έναντι όλων των προηγούμενων μεθόδων που χρησιμοποιούσαν ή όχι φθορισμό για την ανίχνευση των αντιστοιχών θραυσμάτων (Sanchez-Perez *et al.*, 2006). Οι δείκτες SSR χρησιμοποιούνται ευρέως τα τελευταία χρόνια σε μελέτες γενετικής χαρτογράφησης λόγω του συγκυρίαρχου χαρακτήρα που παρουσιάζουν (Jones *et al.*, 2009).



Σχήμα 10. Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής των SSR μοριακών δεικτών.



Σχήμα 11. Διαχωρισμός αλληλομόρφων και προσδιορισμός μήκους βάσεων των f-SSR δεικτών στο πρόγραμμα Genemapper (Applied Biosystems).

1.3.3.5 Πολυμορφισμός ενισχυμένων θραυσμάτων ευαίσθητων στη μεθυλίωση (MSAP- Methylation Sensitive Amplified Polymorphism)

Στα φυτά η μεθυλίωση του DNA πραγματοποιείται στις κυτοσίνες συμμετρικών αλληλουχιών δηλαδή σε θέσεις CpG και CpNpG σε ένα ποσοστό 20-40 % όπου N=A, T, C ή G (Richards, 2006). Η μεθυλίωση του DNA πρόσφατα άρχισε να εξερευνείται στα φυτά με την τεχνική των MSAP. Οι Schrey *et al.*, (2013), εξετάζοντας τη βιβλιογραφία 1999-2012 βρήκαν 39 δημοσιεύσεις που μελετούσαν την μεθυλίωση του DNA σε φυτικούς ιστούς.

Η τεχνική των MSAP μπορεί να εξετάσει αποτελεσματικά την ποικιλότητα της μεθυλίωσης του DNA σε πολλές γονιδιακές θέσεις. Η τεχνική αποτελεί παραλλαγή των AFLP δεικτών που χρησιμοποιεί δυο ισοσχιζομερή ένζυμα, MspI και HpaII, στη θέση του MseI. Τα δύο αυτά ισοσχιζομερή ένζυμα παρουσιάζουν διαφορετική ευαισθησία στην μεθυλίωση της CCGG κυτοσίνης. Το MspI (CG μεθυλίωση) δεν δρα ως περιοριστικό ένζυμο όταν η εσωτερική κυτοσίνη είναι μεθυλιωμένη ενώ το HpaII (CNG μεθυλίωση) δεν δρα ως περιοριστικό ένζυμο όταν μία ή δύο κυτοσίνες παρουσιάζει (-ουν) πλήρη μεθυλίωση, ή ημιμεθυλίωση (Σχήμα 12). Η εφαρμογή του πρωτόκολλου των AFLP (Vos *et al.*, 1995) στο ίδιο γενωμικό DNA του φυτού, ανεξάρτητα όμως για κάθε συνδυασμό ενζύμων (EcoRI/MspI και EcoRI/HpaII), δίνει αποτελέσματα της διαφορετικής κατάστασης μεθυλίωσης, συγκρίνοντας τα δύο διαφορετικά πρότυπα που δημιουργούνται από τους δυο διαφορετικούς συνδυασμούς ενζύμων.

Στα πλεονεκτήματα της τεχνικής περιλαμβάνονται: η επιτυχής εφαρμογή της μεθόδου σε φυτά που το γονιδίωμα τους είναι άγνωστο (Πίνακας 1), η αποτελεσματικότητα εκτίμησης της μεθυλίωσης με χαμηλό κόστος (σε αντίθεση με την μέθοδο του όξινου θειώδους νατρίου, bisulfate treatment), η ευκολία της εφαρμογής της εάν υπάρχει προηγούμενη εμπειρία με τους AFLP δείκτες και η μεγάλη πληροφορία σε επίπεδο μεθυλίωσης που διατίθεται εξαιτίας των πολλών παραγόμενων δεικτών (γονιδιακών θέσεων)– σε κάθε δείγμα (Schrey *et al.*, 2013).

Hpa II	Msp I	αλληλουχία	θέση																								
1	1	<table border="1"> <tr><td>C</td><td>C</td><td>G</td><td>G</td></tr> <tr><td>G</td><td>G</td><td>C</td><td>C</td></tr> </table>	C	C	G	G	G	G	C	C																	
C	C	G	G																								
G	G	C	C																								
1	0	CNG <table border="1"> <tr><td>C</td><td>C</td><td>C</td><td>G</td></tr> <tr><td>G</td><td>G</td><td>C</td><td>C</td></tr> </table>	C	C	C	G	G	G	C	C	<table border="1"> <tr><td>C</td><td>C</td><td>G</td><td>G</td></tr> <tr><td>C</td><td>C</td><td>G</td><td>G</td></tr> </table>	C	C	G	G	C	C	G	G								
C	C	C	G																								
G	G	C	C																								
C	C	G	G																								
C	C	G	G																								
0	1	CG <table border="1"> <tr><td>C</td><td>C</td><td>G</td><td>G</td></tr> <tr><td>C</td><td>C</td><td>G</td><td>G</td></tr> </table>	C	C	G	G	C	C	G	G																	
C	C	G	G																								
C	C	G	G																								
0	0	CG/CNG <table border="1"> <tr><td>C</td><td>C</td><td>G</td><td>G</td></tr> <tr><td>G</td><td>G</td><td>C</td><td>C</td></tr> </table>	C	C	G	G	G	G	C	C	<table border="1"> <tr><td>C</td><td>C</td><td>G</td><td>G</td></tr> <tr><td>G</td><td>G</td><td>C</td><td>C</td></tr> </table> <table border="1"> <tr><td>C</td><td>C</td><td>G</td><td>G</td></tr> <tr><td>G</td><td>G</td><td>C</td><td>C</td></tr> </table>	C	C	G	G	G	G	C	C	C	C	G	G	G	G	C	C
C	C	G	G																								
G	G	C	C																								
C	C	G	G																								
G	G	C	C																								
C	C	G	G																								
G	G	C	C																								
			<table border="1"> <tr><td>C</td><td>C</td><td>G</td><td>G</td></tr> <tr><td>G</td><td>G</td><td>C</td><td>C</td></tr> </table>	C	C	G	G	G	G	C	C																
C	C	G	G																								
G	G	C	C																								
			<table border="1"> <tr><td>C</td><td>C</td><td>G</td><td>G</td></tr> <tr><td>G</td><td>G</td><td>C</td><td>C</td></tr> </table>	C	C	G	G	G	G	C	C																
C	C	G	G																								
G	G	C	C																								
			Όχι 5'-CCGG αλληλουχία																								

"0" ορίζει την υπερμεθυλίωση και "1" ορίζει την πέψη.
 Ορίζει τη μεθυλιωμένη κυτοσίνη.

Σχήμα 12. Θέσεις κοπής των ισοσχιζομερών ενζύμων MspI και HpaII και προσδιορισμός των διαφορετικών τύπων μεθυλίωσης (CNG, CG and CG/CNG).

Πίνακας 1. Συγκριτικός πίνακας μοριακών δεικτών.

	Ισοένζυμα	RFLP	RAPD	AFLP/MSAP	SSR
Αριθμός παραγόμενων δεικτών	Χαμηλή	Μέτρια	Πολύ υψηλή	Πολύ υψηλή	Υψηλή
Τύποι πολυμορφισμού	Αμινοξέα αλλάζουν σε πολυπεπτίδια	Αλλαγή βάσης, εισαγωγή, διαγραφή, αντιμετάθεση	Αλλαγή βάσης, εισαγωγή, διαγραφή, αντιμετάθεση	Αλλαγή βάσης, εισαγωγή, διαγραφή, αντιμετάθεση	Αριθμός επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών
Ποιότητα DNA που απαιτείται	-	Υψηλή	Μέτρια	Υψηλή	Μέτρια
Ύπαρξη γνωστής αλληλουχίας του DNA	-	Δεν απαιτείται	Δεν απαιτείται	Δεν απαιτείται	Απαιτείται
Επίπεδο πολυμορφισμού που παράγεται	Χαμηλό	Μέτριο	Υψηλό	Υψηλό	Υψηλό
Κληρονομικότητα δεικτών	Συγκυριαρχία	Συγκυριαρχία	Κυριαρχία	Κυριαρχία	Συγκυριαρχία
Επαναληψιμότητα δεικτών	Μέτρια	Υψηλή	Χαμηλή	Μέτρια	Υψηλή
Τεχνική δυσκολία	Μέτρια	Υψηλή	Χαμηλή	Μέτρια	Χαμηλή
Κόστος ανάπτυξης	Μέτριο	Υψηλό	Χαμηλό	Χαμηλό	Υψηλό στην αρχή
Δυνατότητα μεταφοράς σε διαφορετικά είδη	Υψηλή	Μέτρια	Υψηλή	Υψηλή	Μέτρια
Αυτοματισμός	Χαμηλός	Χαμηλός	Μέτριος	Μέτριος	Υψηλός

1.4 Γενετικοί χάρτες

1.4.1 Ορισμός Γενετικού Χάρτη

Η έννοια του γενετικού χάρτη αναφέρεται στην εξακρίβωση της θέσης και των αποστάσεων μεταξύ των γονιδίων και δεικτών πάνω σε ένα χρωμόσωμα. Η γενετική απόσταση μεταξύ δύο γονιδίων ορίζεται ως ο μέσος αριθμός των ανασυνδυασμών που αφορούν μια χρωματίδα κατά τη διάρκεια της μείωσης λαμβάνοντας υπόψη και φαινόμενα όπως η χιασματική παρεμπόδιση (Aravanopoulos, 2002; Russel, 2009).

Το πρώτο βήμα στη κατασκευή των γενετικών χαρτών είναι η απόδειξη ότι δύο τουλάχιστον γονίδια είναι συνδεδεμένα (δηλαδή ότι βρίσκονται στο ίδιο χρωμόσωμα). Στη συνέχεια προσδιορίζεται η χαρτογραφική απόσταση μεταξύ των συνδεδεμένων γονιδίων.

Υπάρχουν τρεις βασικοί άξονες στους οποίους η γενετική χαρτογράφηση βρίσκει εφαρμογή: α) στην ανίχνευση υποψήφιων γονιδίων που ελέγχουν σημαντικά γνωρίσματα οικονομικής σημασίας (QTLs), β) στην χαρτογράφηση σημαντικών γονιδίων και στη μελέτη έκφρασής τους και γ) στη χρήση των χαρτογραφημένων γονιδίων και στην επιλογή βοηθούμενη από μοριακούς δείκτες (MAS) (Aravanopoulos, 2002; Cheema and Dicks, 2009).

Ο πρώτος χάρτης κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας μορφολογικούς δείκτες και ουσιαστικά η δημιουργία του ξεκίνησε το 1865 όταν ο Μέντελ παρατήρησε την διαχωρισμό γνωρισμάτων στα μπιζέλια (Mendel, 1867).

1.4.2 Εκτίμηση σύνδεσης και υπολογισμός της συχνότητας ανασυνδυασμών

Για την εκτίμηση της σύνδεσης μεταξύ γονιδίων απαιτείται η φυσική και η στατιστική προσέγγιση. Η φυσική προσέγγιση αναφέρεται στην δημιουργία χιασμάτων και ανασυνδυασμών κατά τη διάρκεια της μείωσης, ενώ η στατιστική προσέγγιση στην εκτίμηση των ανασυνδυασμών που μπορεί να συμβούν ανάμεσα σε γονίδια που δε διαχωρίζονται ανεξάρτητα μεταξύ τους. Για τη σωστή εκτίμηση της σύνδεσης γονιδίων πρέπει να μελετηθούν οι εξής παράμετροι: 1) ότι τα γονίδια δεν είναι συνδεδεμένα αλλά λόγω τυχαίου διαχωρισμού εμφανίζονται να είναι (σφάλματα τύπου I), 2) ότι τα γονίδια είναι πράγματι συνδεδεμένα, και 3) ότι τα γονίδια είναι συνδεδεμένα αλλά η σύνδεση επισκιάζεται από τους ανασυνδυασμούς (σφάλματα τύπου II). Για τους παραπάνω λόγους κρίνεται απαραίτητη η δημιουργία και η χρήση κατάλληλων στατιστικών προγραμμάτων για τον υπολογισμό της σύνδεσης (Aravanopoulos, 2002; Cheema and Dicks, 2009).

Ωστόσο τα δεδομένα των γενετικών διασταυρώσεων είναι ποσοτικά και λόγω της τυχειότητας οι παρατηρούμενες φαινοτυπικές αναλογίες στους απογόνους σπάνια συμπίπτουν απόλυτα με τις αναμενόμενες. Η στατιστική ανάλυση που χρησιμοποιείται για τον σχετικό έλεγχο υποθέσεων είναι η δοκιμή χ^2 . Ο γενικός τύπος είναι:

$$\chi^2 = \sum \frac{(o-e)^2}{e}$$

όπου Σ είναι το άθροισμα και $d^2 = (o-e)^2$ η διαφορά των παρατηρούμενων τιμών (ο) από τις αναμενόμενες τιμές (e). Η τιμή χ^2 και οι βαθμοί ελευθερίας στη συνέχεια χρησιμοποιούνται για να προσδιοριστεί η πιθανότητα (P) να οφείλεται στη τύχη ή απόκλιση των παρατηρούμενων τιμών από τις αναμενόμενες, δηλαδή να αληθεύει η μηδενική υπόθεση. Όταν η πιθανότητα P είναι μεγαλύτερη από 5% τότε η απόκλιση των αναμενόμενων δεδομένων από τα παρατηρούμενα δε θεωρείται στατιστικά σημαντική και η μηδενική υπόθεση δεν απορρίπτεται (Aravanopoulos, 2002, Russel 2009).

Η στατιστική μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των γενετικών αποστάσεων είναι ο δεκαδικός λογάριθμος του λόγου πιθανοφάνειας (LOD, Logarithm Of the Odds, Morton, 1995). Η μέθοδος συγκρίνει την πιθανότητα δυο γενετικές θέσεις να είναι συνδεδεμένες σε σχέση με την πιθανότητα να προκύψουν τα ίδια αποτελέσματα σύνδεσης λόγω τύχης. Ο γενικός τύπος που αναπτύχθηκε βασίζεται στις τιμές LOD (LOD scores) που προκύπτουν από τη διερεύνηση της μηδενικής υπόθεσης που υποστηρίζει τη μη ύπαρξη σύνδεσης ($\theta = 0.5$), έναντι της ύπαρξης σύνδεσης ($\theta < 0.5$) όπου:

$$\text{Odds ratio} = P_{\text{linked}} / P_{\text{unlinked}}$$

$$\text{LOD} = \log (P_{\text{linked}} / P_{\text{unlinked}}) = \log(\text{odds}_1) + \log(\text{odds}_2) + \dots + \log(\text{odds}_n)$$

$$\text{LR} = L(\theta/x) / L(0.5/x) \text{ όπου } \text{LR} = \text{Likelihood Ratio}$$

Μια μέση τιμή του $\text{LOD} \geq 3$ αποτελεί ένδειξη ότι η σύνδεση μεταξύ δύο δεικτών είναι 1000 φορές πιο πιθανή από την πιθανότητα να μην υπάρχει σύνδεση (Aravanopoulos, 2002; Nikaido *et al.*, 2000).

1.4.3 Γενετικοί χάρτες στα κωνοφόρα

Η κλάση των κωνοφόρων αποτελεί μια από τις μεγαλύτερες ταξινομικές ομάδες δέντρων παγκοσμίως. Είναι στη πλειοψηφία τους διπλοειδείς οργανισμοί με αριθμό χρωμοσωμάτων $n=10$ έως $n=13$. Το μέγεθος του γονιδιώματος τους είναι από τα μεγαλύτερα στα δασικά είδη, γεγονός που καθιστά την εύρεση γονιδίων που συνδέονται με σημαντικούς χαρακτήρες δύσκολη και χρονοβόρα (Costa *et al.*, 2000). Με τους γενετικούς χάρτες ωστόσο η εύρεση υποψηφίων γονιδίων που ελέγχουν σημαντικά γνωρίσματα οικονομικής σημασίας (QTLs) βοήθησαν στην επιλογή και αναπαραγωγή σημαντικών ποσοτικών γνωρισμάτων.

Οι πρώτοι γενετικοί χάρτες στα κωνοφόρα κατασκευάστηκαν με τη χρήση ισοενζύμων και φαινοτυπικών δεικτών στην *Pinus taeda* L. (Adams and Joly, 1980), σε άλλα έξι κωνοφόρα (Conkle, 1979) και στην *Pinus muricata* L. (Millar, 1985). Οι δείκτες RFLP χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά στην κατασκευή εκτενούς χάρτη της *Pinus taeda* L. (Devey *et al.*, 1994) μαζί με ισοένζυμα (Πίνακας 2).

Ωστόσο εξαιτίας του υψηλού κόστους των δεικτών και μετά την σημαντική ανακάλυψη της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR Saiki *et al.*, 1988) οι μοριακοί δείκτες DNA αποτέλεσαν τους δείκτες επιλογής για γενετικές αναλύσεις και για γενετική χαρτογράφηση (Πίνακας 2). Οι δείκτες RAPDs χρησιμοποιήθηκαν ευρέως στη συνέχεια με αποτέλεσμα την κατασκευή γενετικών χαρτών για αρκετά κωνοφόρα είδη, όπως στην *Pinus elliotii* (Nelson *et al.*, 1993), στην *Picea abies* (Binelli and Bucci, 1994), στην *Pinus pinaster* (Plomion *et al.*, 1996), στην *Pinus brutia* (Kaya and Neale, 1995) στην *Picea abies* (Skov and Wellendorf, 1998) στην *Pseudotsuga menziesii* (Krutovski *et al.*, 1998), στην *Pinus elliotii* (Kubisiak *et al.*, 2000), στην *Pinus halepensis* (Gomez *et al.*, 2003) κ.α.

Από το 1995 και μετά, δημιουργήθηκαν νέοι χάρτες με χρήση των AFLP δεικτών (Vos *et al.*, 1995) για την *Pinus taeda* (Remigton *et al.*, 1999), την *Larix decidua* (Arcade *et al.*, 2000), την *Cryptomeria japonica* (Nikaido *et al.*, 2000) την *Pinus sylvestris* (Lerceteau *et al.*, 2000), την *Pinus pinaster* (Chagne *et al.*, 2002), την *Picea glauca* (Gosselin *et al.*, 2002), την *Pinus sylvestris* (Yin *et al.*, 2003) κ.α. Στη συνέχεια οι μικροδορυφόροι (SSR) λόγω του συγκυρίαρχου χαρακτήρα τους συνδυάστηκαν με τη χρήση των AFLP μοριακών δεικτών στη γενετική χαρτογράφηση (Πίνακας 2), π.χ. στην *Pinus pinaster* (Ritter *et al.*, 2002) στην *Pinus sylvestris* (Komulainen *et al.*, 2003) στην *Pinus elliotii* (Shepherd *et al.*, 2003) στην *Picea abies* (Achere *et al.*, 2004) κ.α. Τέλος τα τελευταία χρόνια η χαρτογράφηση υποψήφιων γονιδίων με γενετική ποικιλότητα διαφορών ενός νουκλεοτιδίου εφαρμόστηκε ήδη σε λίγα κωνοφόρα είδη όπως στην *Pinus maritima* (Chancerel *et al.*, 2011) στην *Pinus pinaster* (De Miguel *et al.*, 2012) και στην *Cryptomeria Japonica* D.Don (Moriguchi *et al.*, 2012).

Πίνακας 2. Γενετικοί χάρτες στα κωνοφόρα. Είδος, οικογένεια, αριθμός χρωμοσωμάτων, ομάδες σύνδεσης, μέγεθος χάρτη, αριθμός /τύπος δεικτών, λογισμικό κατασκευής των ομάδων σύνδεσης και βιβλιογραφική αναφορά.

	Είδος	Οικογέν.	1n	Ομάδες σύνδεσης	Μέγεθος χάρτη (bp)	Αριθμός δεικτών	Τύπος Δεικτών	Λογισμικό	Βιβλιογραφία
1	<i>Pinus taeda</i>	Pinaceae	12	20	632	75	RFLP, ισοένζυμα	Gmendel 2.0	Devey <i>et al.</i> , 1994
2	<i>Pinus elliotii</i> <i>var. elliotii</i>	Pinaceae	12	22	782	73	RAPD	Mapmaker 2.0	Nelson <i>et al.</i> , 1993
3	<i>Pinus palustris</i>	Pinaceae	12	22	1635	133	RAPD	Mapmaker 2.0	Nelson <i>et al.</i> , 1994
4	<i>Picea abies</i>	Pinaceae	12	17	3584	185	RAPD	Mapmaker 3.0	Binelli and Bucci, 1994
5	<i>Pinus pinaster</i>	Pinaceae	12	13	1860	463	RAPD, proteins	Mapmaker 3.0	Plomion <i>et al.</i> , 1995
6	<i>Pinus brutia</i>	Pinaceae	12	6 -13	163-661	NA	RAPD	Mapmaker 2.0	Kaya and Neale, 1995
7	<i>Pinus strobus</i>	Pinaceae	12	12	745	69	RAPD,SSR	Mapmaker 2.0	Echt and Nelson, 1997
8	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	Pinaceae	13	16-18	2600-3000	201-238	RAPD	Gmendel, Mapmaker	Krutovskii <i>et al.</i> , 1998
9	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	Pinaceae	13	17	1062	141	RFLP, RAPD	Joinmap 2.0	Jermstad <i>et al.</i> , 1998
10	<i>Picea abies</i>	Pinaceae	12	13	1385	82	RAPD	Mapmaker 3.0	Skov and Wellendorf, 1998
11	<i>Pinus edulis</i>	Pinaceae	12	25	2012	338	AFLP	Mapmaker 3.0	Travis <i>et al.</i> , 1998
12	<i>Picea abies</i>	Pinaceae	12	229	2198	413	AFLP,SAMPL,SSR	Mapmaker 3.0	Paglia <i>et al.</i> , 1998

Πίνακας 2. Συνέχεια

	Είδος	Οικογένεια	1n	Ομάδες σύνδεσης	Μέγεθος χάρτη (bp)	Αριθμός δεικτών	Τύπος Δεικτών	Λογισμικό	Βιβλιογραφία
13	<i>Pinus taeda</i>	Pinaceae	12	20	1395- 1983	106-191	RFLPs, RAPDS, isoenzyme	Mapmaker 2.0, Mapmanager 2.6.1 Joinmap 1.4	Sewell <i>et al.</i> , 1999
14	<i>Pinus radiata</i>	Pinaceae	12	19	1116	172	RAPDS, SSR	Mapmaker 3.0	Kuang <i>et al.</i> , 1999
15	<i>Pinus radiata</i>	Pinaceae	12	14	1223	173	RFLPS,SSR	Mapmaker 1.0,Mapmanager 2.6.5,Joinmap 2.0	Devey <i>et al.</i> , 1999
16	<i>Pinus taeda</i>	Pinaceae	12	20	1281	167	RFLPS,SSR	Mapmaker 1.0,Mapmanager 2.6.5,Joinmap 2.0	Devey <i>et al.</i> , 1994
17	<i>Pinus taeda</i>	Pinaceae	12	12	1528	508	AFLPS	PGRI 1.0, Mapmaker 2.0	Remington <i>et al.</i> , 1999
18	<i>Pinus elliotii</i>	Pinaceae	12	29	NA	129	RAPDS	Joinmap 2.0	Kubisiak <i>et al.</i> , 2000
19	<i>Pinus thunbergii</i>	Pinaceae	12	17	1469	98	RAPDS	Mapmaker 3.0	Kondo <i>et al.</i> , 2000
20	<i>Pinus sylvestris</i>	Pinaceae	12	15	796-1335	94-155	AFLPS	Mapmaker 2.0	Lerceteau <i>et al.</i> , 2000
21	<i>Larix decidua</i>	Pinaceae	12	17	1152	117	AFLPS,RAPDS, ISSR	Mapmaker 3.0	Arcade <i>et al.</i> , 2000

Πίνακας 2. Συνέχεια

α/α	Είδος	Οικογένεια	1n	Ομάδες σύνδεσης	Μέγεθος χάρτη(bp)	Αριθμός δεικτών	Τύπος Δεικτών	Λογισμικό	Βιβλιογραφία
22	<i>Larix kaempferi</i>	Pinaceae	12	21	1206	125	AFLPS,RAPDS, ISSR	Mapmaker 3.0	Arcade <i>et al.</i> , 2000
23	<i>Cryptomeria japonica</i>	Cupressaceae	11	19-23	1266-1992	91-132	AFLPS,CAPS	Mapmaker 3.0	Nikaido <i>et al.</i> , 2000
24	<i>Pinus contorta</i> var. <i>latifolia</i>	Pinaceae	12	16	2285	225	RAPDS	Mapmaker 2.0	Changxi <i>et al.</i> , 2001
25	<i>Pinus pinaster</i>	Pinaceae	12	12	1860-1873	620	AFLPS	Mapmaker 3.0,Joinmap 2.0	Chagné <i>et al.</i> , 2002
26	<i>Picea glauca</i>	Pinaceae	12	19-23	2007-2059	144-165	AFLPS	Mapmaker 3.0,Joinmap 2.0,Gmendel	Gosselin <i>et al.</i> , 2002
27	<i>Pinus pinaster</i>	Pinaceae	12	12	1736-1942	na	AFLPS,SSR,ES T	MAPRF	Ritter <i>et al.</i> , 2002
28	<i>Cryptomeria japonica</i>	Cupressaceae	11	13	1372	444	RAPDS, CAPS,SSR,SNP , isoenzymes	Mapmaker 3.0,Joinmap 3.0	Tani <i>et al.</i> , 2003

Πίνακας 2. Συνέχεια

	Είδος	Οικογένεια	1n	Ομάδες σύνδεσης	Μέγεθος χάρτη (bp)	Αριθμός δεικτών	Τύπος Δεικτών	Λογισμικό	Βιβλιογραφία
29	<i>Pinus halepensis</i>	Pinaceae	12	6	225	13	RAPD	LINKEM	Gomez <i>et al.</i> , 2003
30	<i>Pinus caribaea</i> var. <i>hondurensis</i>	Pinaceae	12	27	1658	109	AFLPS,SSR	Mapmaker 3.0	Shepherd <i>et al.</i> , 2003
31	<i>Pinus pinaster</i>	Pinaceae	12	12	1638	326	ESTP,AFLP	Mapmaker 2.0, Carthagene 0.5, Joinmap 3.0	Chagné <i>et al.</i> , 2003
32	<i>Pinus sylvestris</i>	Pinaceae	12	12 15	1695-1718	188-245	AFLPS	Mapmaker 3.0	Yin <i>et al.</i> , 2003
33	<i>Pinus sylvestris</i>	Pinaceae	12	16-21	929-1452	112-120	ESTP,AFLPS,SSR	Mapmaker 2.0, Joinmap 2.0	Komulainen <i>et al.</i> , 2003
34	<i>Picea abies</i>	Pinaceae	12	16	1792-1920	360-461	AFLPS,SSR,ESTP,5SrDNA	Joinmap 3.0	Acheré <i>et al.</i> , 2004

1.4.4 Γενετικοί χάρτες στο κυπαρίσσι

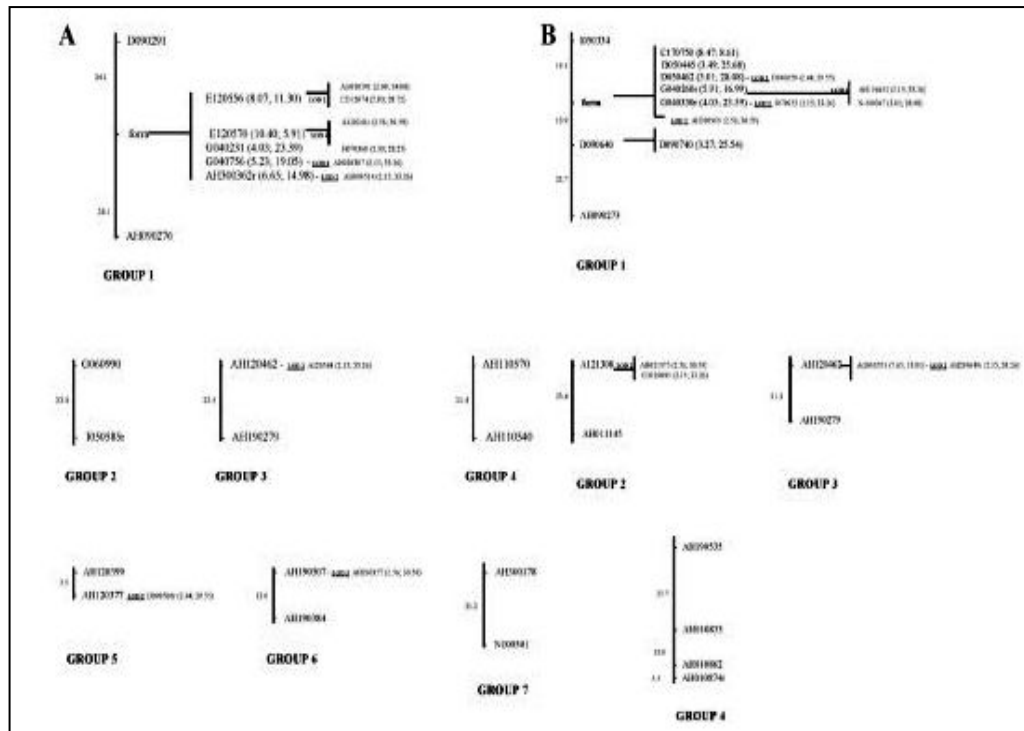
Η προσπάθεια δημιουργίας γενετικών χαρτών στο κυπαρίσσι και η εύρεση των υποψήφιων γονιδίων που ελέγχουν τη μορφή της κόμης ξεκίνησε το 1999 με αρχική προσπάθεια εξαγωγής και βελτιστοποίησης του πρωτοκόλλου για την εκχύλιση DNA από βελόνες κυπαρισσιού καθώς και τη βελτιστοποίηση της μοριακής μεθόδου των RAPDs (Doulis *et al.*, 2000). Στη συνέχεια οι Harfouche *et al.*, (2000) χρησιμοποιώντας την μεθοδολογία της διαζευκτικής ανάλυσης ομαδοποιημένου DNA (Bulk Segregant Analysis) σε μια χαρτογραφική οικογένεια πρώτης γενιάς 55 ατόμων που προήλθε από τη διασταύρωση ενός γονέα οριζοντιόκλαδης μορφής με έναν γονέα ορθόκλαδης μορφής και 198 μοριακούς δείκτες RAPD, ανέλυσαν το διαχωρισμό των δεικτών στους γονείς και σε οκτώ γενότυπους της κάθε μορφής (οριζοντιόκλαδης - ορθόκλαδης). Από τις 198 γονιδιακές θέσεις τρεις ήταν εξειδικευμένες για τον οριζοντιόκλαδο γονέα και το αντίστοιχο δείγμα ομαδοποιημένου DNA και πέντε για τον ορθόκλαδο γονέα και το αντίστοιχο δείγμα ομαδοποιημένου DNA. Για τις οκτώ γονιδιακές θέσεις (πιθανοί μοριακοί δείκτες σύνδεσης με το γνώρισμα της κόμης) ακολούθησε πλήρης ανάλυση διαχωρισμού στους απογόνους. Η διερεύνηση της σύνδεσης έδειξε ότι επτά γονιδιακές θέσεις ήταν συνδεδεμένες με το γνώρισμα της κόμης. Για τρεις θέσεις (OPE-12₅₇₀ OPD-09₆₄₀ και OPD-05₄₄₅) που πληρούσαν τα αυστηρότερα κριτήρια σύνδεσης ($\theta < 0,25$, $p < 0.01$) οι τιμές της χαρτογραφικής απόστασης κατά Kosambi, (1944) ήταν 5.9cM, 13.8cM και 25.6cM, αντίστοιχα (Harfouche *et al.*, 2000).

Στη συνέχεια οι Hamamouch *et al.*, (2002) χρησιμοποίησαν τους τέσσερις πλέον στενά συνδεδεμένους δείκτες ως εκμαγείο για τη δημιουργία εκκινητών πολλαπλασιασμένων περιοχών αλληλουχούμενων άκρων (SCAR). Δύο θέσεις (εκκινητές SC-D05-I και SC-D09-I) διατήρησαν ισχυρή σύνδεση με το γνώρισμα της κόμης.

Η ίδια χαρτογραφική οικογένεια χρησιμοποιήθηκε τέλος στην ανάπτυξη (Maios, 2002) και στη δημιουργία των πρώτων ομάδων σύνδεσης (Manescu *et al.*, 2011). Χρησιμοποιώντας τους μοριακούς δείκτες RAPDs και την τεχνική της ψευδοκριτικής διασταύρωσης η οποία πρωτοεφαρμόστηκε από τους Grattapaglia *et al.*, (1995) δημιουργήθηκαν δύο χάρτες, ένας για την οριζοντιόκλαδη ποικιλία και ένας για την ορθόκλαδη (Manescu *et al.*, 2011). Από τους 425 μοριακούς δείκτες

που εξετάστηκαν οι 274 ήταν πολυμορφικοί (68%), για τους οποίους ελέγχτηκε το πρότυπο του Μενδελικού διαχωρισμού εφαρμόζοντας τη δοκιμή χ^2 . Οι δείκτες αυτοί ομαδοποιήθηκαν σε δύο κατηγορίες σύμφωνα με τον διαχωρισμό που παρουσίασαν στους γονικούς γενότυπους. Προέκυψαν 201 δείκτες που ήταν ομοζύγωτοι για τον έναν γονέα και ετεροζύγωτοι για τον άλλον (αναλογία διαχωρισμού 1:1) και 77 δείκτες που ήταν ετεροζύγωτοι και για τους δύο γονείς (αναλογία διαχωρισμού 3:1). Η μελέτη του διαχωρισμού των δεικτών αυτών με τη δοκιμή χ^2 στην οικογένεια των 55 ατόμων είχε ως αποτέλεσμα την ανίχνευση 188 δεικτών με αναλογία διαχωρισμού 1:1 και 3:1 ενώ οι υπόλοιποι 90 (32%) παρουσίασαν παραμορφωτικό διαχωρισμό (segregation distortion). Στο σύνολο, 142 δείκτες (71 για το μητρικό γονέα και 71 για τον πατρικό), περιλαμβανομένου και του γνωρίσματος μορφής της κόμης, που ακολουθούσαν το πρότυπο Μενδελικού διαχωρισμού χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία ομάδων σύνδεσης με το λογισμικό γενετικής χαρτογράφησης MapMaker (Lander *et al.*, 1987). Προέκυψαν δύο χάρτες ένας για την ποικιλία *C. sempervirens* var. *horizontalis* (μητρικός γονέας) και ένας για την ποικιλία *C. sempervirens* var. *pyramidalis* (πατρικός γονέας) (Σχήμα 13).

Ο μητρικός χάρτης-πλαίσιο (framework genetic map) κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας 29 δείκτες, οι οποίοι σχημάτισαν 7 ομάδες σύνδεσης με έναν μέσο όρο απόστασης μεταξύ των δεικτών 10,67 cM και συνολικό μέγεθος 160,1 cM. Ένας αριθμός δεικτών που ήταν συνδεδεμένοι με το γνώρισμα της μορφής της κόμης και είχαν προκύψει από την ανάλυση διαχωρισμού μεγέθους BSA (Hamamouch *et al.*, 2002), βρέθηκαν στο μητρικό χάρτη και τοποθετήθηκαν ως επιπρόσθετοι δείκτες. Ο πατρικός χάρτης που δημιουργήθηκε χρησιμοποιώντας 27 δείκτες περιείχε 4 ομάδες σύνδεσης με μέση απόσταση μεταξύ των δεικτών 12,04 cM και συνολικό μέγεθος 144.5 cM. Ωστόσο η γεφυροποίηση των δυο χαρτών δεν κατέστη δυνατή κυρίως λόγω της απουσίας συγκυρίαρχων συνδεδεμένων δεικτών. Τέλος, στην ίδια εργασία (Manescu *et al.*, 2011) έγινε εκτίμηση του γονιδιώματος για την οριζοντιόκλαδη (1696 cM) και για την πλαγιόκλαδη ποικιλία του κυπαρισσιού (1534 cM).



Σχήμα 13. Μητρικές ομάδες σύνδεσης (A) και πατρικές ομάδες σύνδεσης (B) που δημιουργήθηκαν (Manescu *et al.*, 2011).

1.5 Χαρτογράφηση γονιδιακών θέσεων ποσοτικών γνωρισμάτων (Quantitative Trait Loci)

Μια από τις σημαντικότερες εφαρμογές των γενετικών χαρτών στη δασοπονία είναι η χαρτογράφηση των QTL. Σκοπός είναι να προσδιοριστούν οι χρωμοσωμικές περιοχές μέσα στις οποίες βρίσκονται ένα ή περισσότερα γονίδια που επηρεάζουν ένα ποσοτικό γνώρισμα (White *et al.*, 2007).

Οι στατιστικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των QTLs είναι τέσσερεις (Manly and Olson, 1999) : α) η προσέγγιση της χαρτογράφησης QTL μέσω ανάλυσης διακύμανσης μοναδιαίου παράγοντα, β) η χαρτογράφηση διαστημάτων (Interval Mapping), γ) η σύνθετη χαρτογράφηση διαστημάτων (Composite Interval Mapping), και η 4) πολλαπλή χαρτογράφηση διαστημάτων QTL (Multiple QTL Mapping).

Η προσέγγιση της χαρτογράφησης QTL μέσω ανάλυσης διακύμανσης μοναδιαίου παράγοντα χρησιμοποιεί βασικά εργαλεία στατιστικής όπως η ανάλυση διακύμανσης, ή η ανάλυση παλινδρόμησης για να δοκιμαστούν οι διαφορές των μέσων όρων του ποσοτικού γνωρίσματος μεταξύ των κλάσεων των γενετικών δεικτών. Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου περιλαμβάνεται η ευκολία εφαρμογής της με απλές στατιστικές μεθόδους και το γεγονός ότι δεν απαιτείται γενετικός χάρτης των δεικτών, ενώ στα μειονεκτήματα η δυσκολία εύρεσης της ακριβούς θέσης του QTL σε σχέση με το γενετικό δείκτη (White *et al.*, 2007).

Η χαρτογράφηση διαστημάτων (interval mapping) αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο για χαρτογράφηση των QTL που ανιχνεύονται με χρήση πληροφοριών από ζευγάρια δεικτών που βρίσκονται σε όλα τα χρωμοσώματα (Lander and Bonstein, 1989). Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι: η εκτίμηση της θέσης του QTL και των δεικτών, η εκτίμηση της επίδρασης των QTL και η δυνατότητα χρήσης της ακόμα και σε ατελή δεδομένα γενετικών δεικτών (Manly and Olson, 1999).

Στα δασικά δέντρα και ειδικότερα στα κωνοφόρα, οι Groover *et al.*, (1994) ήταν οι πρώτοι που ανίχνευσαν QTL για το ειδικό βάρος ξύλου στην *Pinus taeda* με χρήση δεικτών RFLP. Στη συνέχεια μετά την ανακάλυψη των μοριακών δεικτών και τη δημιουργία λεπτομερών γενετικών χαρτών, QTLs για σημαντικά γνωρίσματα όπως ύψος κορμού, διάμετρος κλάδων, πυκνότητα ξύλου κ.α. έχουν βρεθεί για την *Pinus sylvestris* (Lerceteau *et al.*, 2000), για αυξητικά γνωρίσματα στην *Pinus pinaster* (Plomion *et al.*, 1996, Markussen *et al.*, 2003) καθώς και σε ένα πλήθος άλλων κωνοφόρων (Πίνακας 3) όπως την *Pinus radiata* (Devey *et al.*, 2004a), την *Pseudotsuga menziensis* (Jermstad *et al.*, 1998, 2001, 2003), την *Picea abies* (Achere *et al.*, 2004) και την *Cryptomeria Japonica* (Yoshimaru *et al.*, 1998, Kuramoto *et al.*, 2000). Μετά από μια χρονική περίοδο είκοσι χρόνων της χαρτογράφησης QTL σε δέντρα, σημαντική γνώση έχει αποκτηθεί και έχει αποδειχθεί ότι τα ποσοτικά γνωρίσματα στα δέντρα ελέγχονται από πολλά γονίδια των οποίων οι επιδράσεις είναι μικρές στον φαινότυπο (Aravanopoulos, 2014).

Πίνακας 3. Είδη κωνοφόρων, QTLs που ανιχνεύθηκαν και αναφορές.

Είδος	Μοριακοί δείκτες	Ποσοτικά Γνωρίσματα (QTLs)	Αναφορές
<i>Pinus elliottii</i>	RAPDs	Αντοχή σε αλουμίνιο	Kubisiak <i>et al.</i> (2000)
<i>Pinus elliottii</i> χ <i>Pinus caribaea</i>	AFLPs, SSR	Γνωρίσματα ποιότητας και ανάπτυξης ξύλου	Shepherd <i>et al.</i> (2003)
	SSR	Ανορθόδοξη ριζοβολία	Shepherd <i>et al.</i> (2006)
<i>Pinus palustris</i> χ <i>Pinus elliottii</i> χ <i>Pinus elliottii</i>	RAPDs	Γνωρίσματα ανάπτυξης	Weng <i>et al.</i> (2002)
<i>P. pinaster</i>	ESTs, AFLPs	Γνωρίσματα ποιότητας και ανάπτυξης ξύλου	Pot <i>et al.</i> (2006)
	ESTs, AFLPs	Πυκνότητα ξύλου και τα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος	Chagne <i>et al.</i> (2003)
	AFLPs, SSR, ESTS	Γνωρίσματα ποιότητας και ανάπτυξης ξύλου	Markussen <i>et al.</i> (2003)
	RAPDs	Γνωρίσματα ανάπτυξης	Plomion <i>et al.</i> (1996a)
	AFLPs	Αποδοτικότερη χρήση του νερού και ανάπτυξη	Brendel <i>et al.</i> (2002)
<i>P. radiata</i>	RAPD, AFLP, SSR	Γνωρίσματα ποιότητας ξύλου	Ball (2001)
	RAPDs, AFLPs, SSR	Γνωρίσματα ποιότητας ξύλου	Kumar <i>et al.</i> (2000)
	RFLPs, SSR	Γνωρίσματα ποιότητας ξύλου	Devey <i>et al.</i> (2004a)
	RAPDs	Γνωρίσματα ποιότητας και ανάπτυξης ξύλου	Emebiri <i>et al.</i> (1997)
	RAPDs	Ανάπτυξη στελέχους	Emebiri <i>et al.</i> (1998a)
	RAPDs	Γνωρίσματα ανάπτυξης	Emebiri <i>et al.</i> (1998b)

<i>P. sylvestris</i>	RAPDs	Αριθμός οφθαλμών και ανθεκτικότητα στο παγετό	Hurme <i>et al.</i> (2000)
	AFLP	Ανάπτυξη, ποιότητα ξύλου και ανθεκτικότητα στον παγετό	Lerceteau <i>et al.</i> (2000)
	RAPD	Ανάπτυξη και εγκλιματισμός στο κρύο	Yazdani <i>et al.</i> (2003)
<i>P. taeda</i>	RFLP	Γνωρίσματα ποιότητας ξύλου	Groover <i>et al.</i> (1994)
	RFLPs, ESTS	Γνωρίσματα ποιότητας ξύλου	Brown <i>et al.</i> (2003)
	RFLP	Γνωρίσματα ποιότητας ξύλου	Knott <i>et al.</i> (1997)
	RFLPs	Φυσικές ιδιότητες του ξύλου	Sewell <i>et al.</i> (2000)
	RFLP	Γνωρίσματα ποιότητας ξύλου	Sewell <i>et al.</i> (2002)
	SSR	Γνωρίσματα ανάπτυξης	Gwaze <i>et al.</i> (2003)
	RFLPs, RAPDs, Isozymes	Ετήσια αύξηση κατά ύψος και διάμετρο	Kaya <i>et al.</i> (1999)
<i>P. menziesii</i>	AFLPs	Γνωρίσματα ποιότητας και ανάπτυξης ξύλου	Ukrainetz <i>et al.</i> (2008)
	RFLPs	Εκροή οφθαλμών	Jermstad <i>et al.</i> (2001)
	RFLPs	Φαινολογία οφθαλμών	Jermstad <i>et al.</i> (2003)
<i>Cryptomeria Japonica</i>	RAPDs	Αυξητικά χαρακτηριστικά	Yoshimaru <i>et al.</i> (1998)
	RAPDs	Ελαστικότητα ινών του ξύλου	Kuramoto <i>et al.</i> (2000)

1.6 Επιγενετική - «Μεθυλίωση του DNA»

Με τον όρο επιγενετική αναφερόμαστε στη μελέτη κληρονομήσιμων αλλαγών στην έκφραση των γονιδίων, χωρίς να υφίστανται αλλαγές στην αλληλουχία του DNA. Οι τρεις κύριοι επιγενετικοί μηχανισμοί είναι η μεθυλίωση του DNA, οι τροποποιήσεις των ιστόνων και η ύπαρξη μικρών RNA (miRNAs) (Brenner and Fuks, 2006; Tsaftaris and Polidoros, 2000). Οι τρεις μηχανισμοί μπορούν να ρυθμίσουν τη μεταγραφή των γονιδίων τροποποιώντας την πρόσβαση στους υποκινητές γονιδίων (gene promoters) και στις ρυθμιστικές περιοχές. Η μεθυλίωση του DNA, ο επιγενετικός μηχανισμός που έχει μελετηθεί περισσότερο, αφορά στην προσθήκη μεθυλικών ομάδων στις κυτοσίνες με τη δράση ενζύμων, των μεθυλοτρανσφερασών (methyltransferases). Αυτή η προσθήκη έχει ως αποτέλεσμα τη συμπίεση της χρωματίνης και συνεπώς την καταστολή της έκφρασης του γονιδίου. Η μεθυλίωση του DNA συνεισφέρει στη διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος, εμποδίζοντας τη μεταγραφή των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών του DNA και των ενδογενών μεταθετών στοιχείων (transposons) (Brenner and Fuks, 2006).

Η φαινοτυπική παραλλακτικότητα των φυτών προέρχεται από τον συνδυασμό της επίδρασης της γενετικής ποικιλότητας, την επίδραση του περιβάλλοντος και την αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών (Richards, 2006). Η επιγενετική ποικιλότητα μεταξύ ατόμων, όπως π.χ. ποικιλότητα του βαθμού μεθυλίωσης ενός γονιδίου, παράγει νέους εν δυνάμει κληρονομήσιμους φαινότυπους στην επόμενη γενιά (Fujimoto *et al.*, 2012). Στους φυτικούς ιστούς η μεθυλίωση του DNA είναι ένας από τους κύριους μοριακούς μηχανισμούς που αυξάνει την περιεχόμενη πληροφορία των ευκαρυωτικών οργανισμών, επιδρά στην επιγενετική ποικιλότητα και καθορίζει την έκφραση των γονιδίων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης τους (Schrey *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2007). Η κατανομή των μεθυλιωμένων προτύπων του DNA έχει αποδειχθεί ότι οδηγεί σε πλειοτροπικές αποκλίσεις κατά τη διάρκεια ανάπτυξης τους (Kakutani, 2002, Zhang *et al.*, 2007). Η μελέτη της μεθυλίωσης του DNA σε συνδυασμό με τη γενετική διερεύνηση στα φυτά ενδέχεται να αποσαφηνίσει την επίδραση των επιγενετικών φαινομένων στην ανάπτυξη και στην εξέλιξη τους.

1.7 Βλαστικός πολλαπλασιασμός

Με τον όρο «βλαστικό ή αγενή πολλαπλασιασμό» εννοούμε την παραγωγή φυταρίων από βλαστικά τμήματα του μητρικού φυτού. Ειδικότερα, όταν η αναπαραγωγή προκύπτει από κύτταρα, ιστούς ή όργανα του μητρικού φυτού έπειτα από ασηπτική καλλιέργεια σε θρεπτικό υπόστρωμα και φυτοορμόνες μέσα σε δοκιμαστικούς σωλήνες, γυάλινα βάζα ή κωνικές φιάλες λέγεται ιστοκαλλιέργεια. Η τεχνική αυτή είναι γνωστή και ως καλλιέργεια *in vitro*. Η ιστοκαλλιέργεια βασίζεται στην ικανότητα του φυτικού κυττάρου να μπορεί να αναγεννήσει ολόκληρο το φυτό από το οποίο προήλθε, ανεξάρτητα από το βαθμό διαφοροποίησης στον οποίο βρίσκεται εκείνη την στιγμή (George, 2007). Αυτή αποτελεί τη βασική αρχή της ολοδυναμικότητας των κυττάρων (Haberland, 1902), δηλαδή τη δυνατότητα εξέλιξης από ένα κύτταρο σε έναν ολοκληρωμένο νέο οργανισμό. Το καλλιεργούμενο *in vitro* φυτικό τμήμα, ανεξάρτητα από την προέλευση του, ονομάζεται έκφυτο (explant). Οι χειρισμοί του εκφύτου, η σύνθεση του θρεπτικού υποστρώματος αλλά και των παραμέτρων του περιβάλλοντος καλλιέργειας, μπορούν να προκαλέσουν την αποδιαφοροποίηση των κυττάρων και να προσανατολίσουν την οργανογένεση προς ποικίλους δρόμους διαφοροποίησης, ανάλογα με τον επιδιωκόμενο σκοπό.

Ο μικροπολλαπλασιασμός είναι μια από τις τεχνικές της ιστοκαλλιέργειας, κατά τον οποίο πραγματοποιείται αγενής πολλαπλασιασμός των φυτών, χρησιμοποιώντας μικρά φυτικά τμήματα βλαστού που φέρουν τουλάχιστον ένα οφθαλμό. Η αξία του μικροπολλαπλασιασμού έγκειται στην παραγωγή μεγάλου αριθμού φυτών και γενετικά όμοιων με το φυτό δότη. Αποτελεί την πιο ευρεία εφαρμογή της ιστοκαλλιέργειας με πάνω από 500 εκατομμύρια φυτά να παράγονται ετησίως, εκ των οποίων το 90% είναι καλλωπιστικά. Η πιο σημαντική εμπορική τεχνική μικροπολλαπλασιασμού σε μαζική κλίμακα είναι η καλλιέργεια μασχαλιαίων οφθαλμών (bud culture). Ως έκφυτα χρησιμοποιούνται μασχαλιαίοι και επικόρυφοι οφθαλμοί. Υπάρχουν και άλλα είδη μικροπολλαπλασιασμού, όπως καλλιέργεια του ακραίου μεριστώματος των βλαστών (meristem tip culture), που εφαρμόζεται κυρίως στην παραγωγή φυτών απαλλαγμένων από ιούς, η σωματική

εμβρυογένεση (somatic embryogenesis) με την ανάπτυξη εμβρύων από σωματικά κύτταρα διαφόρων ιστών ή οργάνων του φυτού και η δημιουργία, παραγωγή και διαφοροποίηση επίκτητων βλαστών (adventitious shoot induction) είτε άμεσα στο έκφυτο είτε έμμεσα από τον κάλο που σχηματίστηκε από το έκφυτο (explant) (Σκαλτσογιάννης, 1990).

Η διαδικασία παραγωγής νέων φυτών με τη μέθοδο του μικροπολλαπλασιασμού περιλαμβάνει διάφορα στάδια ανάλογα με τις επιμέρους διεργασίες και τις απαιτούμενες συνθήκες θερμοκρασίας, φωτός αλλά και σύστασης θρεπτικού διαλύματος και υποστρώματος. Στα αρχικά στάδια τα έκφυτα εισέρχονται σε καλλιέργεια *in vitro* με σκοπό να σταθεροποιηθούν στο περιβάλλον αυτό και έπειτα να ξεκινήσει η έκπτυξη μασχαλιαίων οφθαλμών (Σκαλτσογιάννης, 1990).

Οι βασικοί παράγοντες που πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν κατά τη συλλογή των εκφύτων είναι το είδος του οργάνου και το μέρος του φυτού από όπου θα αποκοπεί, η ηλικία, η φυσιολογική κατάσταση και η ποιότητα του φυτού – δότη των εκφύτων και η κατάλληλη εποχή συλλογής τους. Η ηλικία του φυτού – δότη είναι σημαντική, διότι από τα νεότερα φυτά προκύπτουν τα πιο ρωμαλέα έκφυτα. Ανάλογα με την εποχή διακρίνεται στα φυτά ένα στάδιο έντονης δραστηριότητας και ένα στάδιο καμψής. Την άνοιξη στα φυτά παρατηρείται αύξηση της συκέντρωσης των ρυθμιστών αύξησης όπως της αυξίνης, των κυτοκινινών και των γιβερελλινών, το καλοκαίρι η συκέντρωση των ουσιών αυτών μειώνεται και το φθινόπωρο εμφανίζονται αναστολές αύξησης (Σκαλτσογιάννης, 1990).

Τα έκφυτα μετά τη συλλογή τους απολυμαίνονται και μεταφέρονται σε θρεπτικό υπόστρωμα κάτω από ασηπτικές συνθήκες. Ο σκοπός της απολύμανσης είναι η καλλιέργεια των φυτικών ιστών σε ασηπτικές συνθήκες. Η κύρια πηγή μόλυνσεων στον μικροπολλαπλασιασμό είναι το φυτό – δότης και οι κυριότεροι μικροοργανισμοί που είναι παρόντες είναι μύκητες και βακτήρια (Σκαλτσογιάννης, 1990).

Τα θρεπτικά υποστρώματα προμηθεύουν τους φυτικούς ιστούς με τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία για την ανάπτυξή τους. Ένα θρεπτικό υπόστρωμα αποτελείται από μακροστοιχεία, και ιχνοστοιχεία. Οι βιταμίνες επίσης ασκούν ευεργετική επίδραση στην καλλιέργεια, βελτιώνοντας την ανάπτυξη και την επιβίωση των φυτικών ιστών και χρησιμοποιούνται από τα φυτικά κύτταρα ως

βασικοί μεταβολικοί καταλύτες. Οι κυριότερες είναι η μυοϊνοσιτόλη (myo-inositol), η θειαμίνη (thiamine), το νικοτινικό οξύ (nicotinic acid), η πυριδοξίνη (pyridoxine-HCL) και η γλυκίνη (glycine) (Σκαλτσογιάννης, 1990).

Οι ρυθμιστές αύξησης είναι οργανικές ενώσεις που ρυθμίζουν τις φυσιολογικές διεργασίες των φυτών, κατευθύνουν την ανάπτυξη των οργάνων και ελέγχουν την ανάπτυξη ολόκληρου του φυτού. Οι σπουδαιότερες ενώσεις είναι οι αυξίνες (IBA, IAA), που χρησιμοποιούνται για τη ριζοβολία, για τον σχηματισμό και την ανάπτυξη κάλου, και για τη σωματική εμβρυογένεση (Barbas *et al.*, 1992). Οι κυτοκινίνες (BAP) χρησιμοποιούνται για τη διέργεση πλάγιων οφθαλμών, τη διαίρεση των κυττάρων και την ανάπτυξη βλαστών, ενώ οι γιββεριλλίνες (GA₃), διεγείρουν την κανονική εξέλιξη των φυταρίων που προέρχονται από σωματικά έμβρυα παραγόμενα *in vitro*, προκαλούν την επιμήκυνση των μεσογονατίων διαστημάτων και την αύξηση των ακραίων οφθαλμών μετά την αποκοπή τους (Σκαλτσογιάννης, 1990).

Τα σάκχαρα αποτελούν πηγή άνθρακα, ενέργειας και έμμεσα ρυθμίζουν την οσμωτική πίεση του θρεπτικού διαλύματος. Το άγαρ είναι ένα αδρανές υλικό, προϊόν κυτταρικών τοιχωμάτων φυκιών, που στερεοποιείται στους 47°C. Προσοχή χρειάζεται στη χρήση του άγαρ, γιατί μπορεί τροποποιήσει τη σύνθεση του θρεπτικού διαλύματος (Barbas *et al.*, 1992). Τα μακροστοιχεία και τα ιχνοστοιχεία προστίθενται στο θρεπτικό διάλυμα με τη μορφή ανόργανων αλάτων. Οι συγκεντρώσεις των θρεπτικών στοιχείων προσφέρονται στα υψηλά, δυνατά επίπεδα χωρίς να προκληθούν συμπτώματα τοξικότητας ή καταπόνηση αλατότητας. Η μείωση της συγκέντρωσης των ανόργανων αλάτων μπορεί να επιφέρει αύξηση του ποσοστού της ριζοβολίας και βελτίωση της ποιότητας του ριζικού συστήματος. Η προσθήκη αυξινών επιδρά σε αυτήν την περίπτωση, διότι συμβάλλει στην έναρξη της ριζοβολίας και στο σχηματισμό πλάγιων και επιγενών ριζών, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις προωθεί τον σχηματισμό κάλλου (Barbas *et al.*, 1992).

Οι κυτοκινίνες χρησιμοποιούνται λόγω της ιδιότητας τους να προωθούν την έκπτυξη πολλαπλών βλαστών. Η αύξηση της συγκέντρωσης τους προκαλεί την διακοπή της κυριαρχίας της κορυφής και προάγει την εκβλάστηση πολλών πλευρικών οφθαλμών. Η αναλογία των ρυθμιστών αύξησης ελέγχει την έκφραση χαρακτήρων και χαρακτηρίζει κάθε φάση του μικροπολλαπλασιασμού. Κατά τον

πολλαπλασιασμό η ποσότητα της κυτοκινίνης κυμαίνεται σε μεγαλύτερα επίπεδα της αυξίνης. Με την αλλαγή της αναλογίας, μεγάλη συγκέντρωση αυξίνης και μικρή έως μηδενική κυτοκινίνης επιτυγχάνεται η αναστολή βλαστογένεσης και ενίσχυση της ριζογένεσης (Barbas *et al.*, 1992).

1.7.1 Βλαστικός πολλαπλασιασμός στο κυπαρίσσι

Τα τελευταία χρόνια πολλά προγράμματα βελτίωσης έχουν εφαρμοστεί στο κυπαρίσσι με σκοπό να βρεθούν εύρωστοι φαινότυποι με υπεροχή στο ύψος και με ανθεκτικότητα στο μύκητα *Seiridium cardinale* (Giovanelli and Carlo, 2007). Ωστόσο τα περισσότερα προγράμματα βελτίωσης εστίασαν στην τεχνική του εμβολιασμού και στην αγενή αναπαραγωγή γενικότερα για τη μαζική παραγωγή επιθυμητών φαινοτύπων (Capuana and Lambardi, 1995; Stankova and Panetsos, 1997). Ο μικροπολλαπλασιασμός του κυπαρισσιού πρωτοαναφέρεται στη βιβλιογραφία το 1991 από τους Capuana *et al.* όπου ώριμης ηλικίας φυτάρια εισήχθησαν σε καλλιέργεια. Η καλύτερη ανταπόκριση των φυτών παρατηρήθηκε σε διάλυμα SH. Στη συνέχεια οι Spanos *et al.* (1997) δοκίμασαν την εισαγωγή φυταρίων κυπαρισσιού σε *in-vitro* καλλιέργεια χρησιμοποιώντας διάλυμα MS με προσθήκη κυτοκινίνης, έχοντας ικανοποιητικά αποτελέσματα. Τέλος οι Giovanelli και Carlo (2007) δημοσίευσαν μια εργασία τους όπου χρησιμοποιώντας πέντε τροποποιημένα πρωτοκόλλα καλλιέργησαν *in vitro* νεαρά και ώριμα φυτά κυπαρισσιού.

2 Σκοπός και στόχοι της διδακτορικής διατριβής

Σκοπός της διδακτορικής διατριβής είναι η δημιουργία αναλυτικού γενετικού χάρτη στο κυπαρίσσι (*Cupressus sempervirens* L.) που θα περιλαμβάνει μοριακούς δείκτες και γονίδια ποσοτικών γνωρισμάτων.

Οι επί μέρους **στόχοι** της διατριβής είναι:

- (1) η δημιουργία αναλυτικού γενετικού χάρτη σύνδεσης της ποικιλίας *C. sempervirens* var. *horizontalis* με τη χρήση μοριακών δεκτών SSR, AFLP
- (2) η δημιουργία αναλυτικού γενετικού χάρτη σύνδεσης της ποικιλίας *C. sempervirens* var. *pyramidalis* με τη χρήση μοριακών δεκτών SSR, AFLP
- (3) η γεφυροποίηση των παραπάνω χαρτών σε κοινό χάρτη μέγιστης πλειοψηφικής συναποδοχής του κυπαρισσιού (*C. sempervirens* L.)
- (4) η επισήμανση ένθεν και ένθεν με μοριακούς δείκτες της γονιδιωματικής περιοχής που εμπλέκεται στη μορφή της κόμης και η ανίχνευση QTLs που συνδέονται με τη μορφή της κόμης
- (5) η εκτίμηση της ανθεκτικότητας της χαρτογραφικής οικογένειας στην ασθένεια του έλκους του κυπαρισσιού που προκαλείται από τον μύκητα *Seiridium Cardinale*, η εύρεση QTLs που συνδέονται με την ανθεκτικότητα και η βελτιστοποίηση *in-vitro* πρωτοκόλλου για τον επιτυχή πολλαπλασιασμό ανθεκτικών γενοτύπων του κυπαρισσιού
- (6) η μελέτη της επιγενετικής κληρονομησιμότητας στην χαρτογραφική οικογένεια καθώς και ο προσδιορισμός του επιπέδου της μεθυλίωσης του DNA στη χαρτογραφική οικογένεια του κυπαρισσιού (*Cupressus sempervirens* L.)

3 Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Δημιουργία φυτείας - Συλλογή φυτικού ιστού

Ως πειραματικό υλικό της φυτείας επιλέχθηκαν ομοθαλείς οικογένειες κυπαρισσιού που προήλθαν από πρόγραμμα γενετικής βελτίωσης του είδους, που είχε σαν στόχο την επιλογή γονικών ατόμων με υπεροχή σε αυξητικά γνωρίσματα και παρουσιάζαν ανθεκτικότητα στην ασθένεια του έλκους του κυπαρισσιού που προκαλείται από το μύκητα *Seiridium cardinale*. Τρεις ομοθαλείς οικογένειες φυτεύτηκαν σε υπόστρωμα τύρφης αναμεμειγμένο με περλίτη σε αναλογία 1:1 (Πίνακας 4). Επιλέχτηκε ως χαρτογραφική η F₁ οικογένεια (Σ8-22xΣ1-22) x (R9-31x30M9), που προήλθε από διασταύρωση οριζοντιόκλαδου θηλυκού γονέα (Σ= προέλευση Σάμος) και ορθόκλαδου αρσενικού γονέα (R= προέλευση Ρόδος και M= προέλευση Μεγαλόπολη) και παρουσίασε το μεγαλύτερο ποσοστό φυτρωτικότητας, δεδομένου ότι για τη δημιουργία αποτελεσματικών χαρτών σύνδεσης το μέγεθος της οικογένειας παίζει πρωταρχικό ρόλο (Σχήμα 14, 15).

Μετά την πάροδο ενός έτους (το έτος 2010) έγινε αρίθμηση των φυταρίων και η συλλογή του φυτικού ιστού. Συνολικά συλλέχθηκαν 450 δείγματα φυτικού ιστού και τοποθετήθηκαν σε ειδικό ερμάριο γέλης πυριτίου, έτσι ώστε να επιτευχθεί η ξήρανση του ιστού. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν για μακρά χρονική περίοδο δύο μηνών σε κώδωνα που περιέχει κόκκους άνδρου οξειδίου του πυριτίου, ώστε να αφυδατωθεί ο φυτικός ιστός πριν την διαδικασία εκχύλισης DNA.

Στη συνέχεια τα φυτά της επιλεγμένης χαρτογραφικής οικογένειας μεταφυτεύτηκαν με φυτευτικό σύνδεσμο 2,5 x 2,5 m σε πείραμα πεδίου δοκιμής απογόνων (Σχήμα 16).

Πίνακας 4. Διασταυρώσεις, βάρος σπερμάτων, αριθμός σπερμάτων και ποσοστό φυτρωτικότητας οικογενειών κυπαρισσιού.

Θηλυκό/ αρσενικό	Διασταύρω ση	Βάρος σπόρων	Αριθμός σπόρων	Σπόροι που φυτεύτηκαν	Αρτίφυ τα που βλάστη σαν	Ποσοστό φυτρωτικό τητας
Δέντρο 1 (Σ8- 22xΣ1-22) x (R9- 31x30M9)	F1	11,36	2273	1800	714	39,67
Δέντρο 2 (Σ8- 22xΣ2-22) x (R931x30M9)	F1	7,82	1305	710	40	5,63
(R9-31x30M9) x R931	BC1	8,97	986	360	244	67,78



Σχήμα 14. Χαρτογραφική οικογένεια κυπαρισσιού (Σ8-22xΣ1-22) x (R9-31x30M9) σε ηλικία ενός έτους.



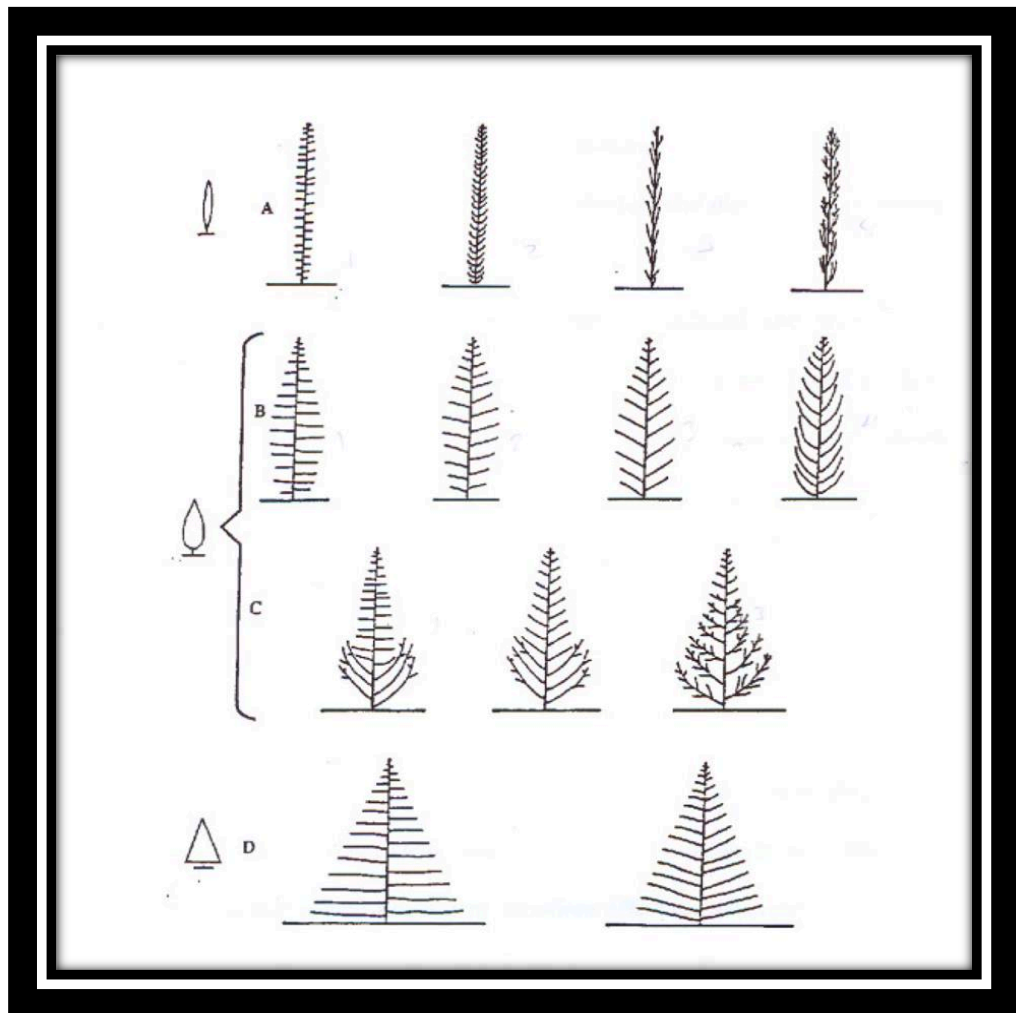
Σχήμα 15. Η χαρτογραφική οικογένεια κυπαρισσιού σε ηλικία δύο ετών πριν τη μεταφύτευση στο πεδίο σε πείραμα δοκιμής απογόνων.



Σχήμα 16. Φύτευση των κυπαρισσιών στο πεδίο.

3.2 Μέτρηση αυξητικών γνωρισμάτων - Δοκιμή Bouroulet

Μετά τη μεταφύτευση των σποροφύτων και την πάροδο τεσσάρων ετών πραγματοποιήθηκαν στα 382 δενδρύλλια της χαρτογραφικής οικογένειας μετρήσεις ύψους και στηθιαίας διαμέτρου, καθώς και καταγραφή της κόμης με δύο προσεγγίσεις: α) ως δυαδικά δεδομένα (οριζοντιόκλαδο, ορθόκλαδο) και β) με την εφαρμογή της δοκιμής Bouroulet ως ποσοτικό γνώρισμα (Bouroulet, 1993), (Σχήμα 17).



Σχήμα 17. Φαινοτυπική κατάταξη των ατόμων κυπαρισσιού σύμφωνα με την δοκιμή Bouroulet, (1993).

3.3 Εκχύλιση DNA

Η εκχύλιση του DNA σε 384 δείγματα (δύο γονικά άτομα και απόγονοι της χαρτογραφικής οικογένειας) επιτεύχθηκε με τη χρήση του κιτίου DNeasy 6x96 (Qiagen) για φυτικό παγωμένο, ή λειοφυλλοποιημένο ιστό. Η διαδικασία ήταν η εξής :

1. Το δείγμα αφού ζυγίστηκε, τοποθετήθηκε σε κάθε σωληνάριο σε 2 μικροπλάκες συλλογής.
2. Τοποθετήθηκαν σφαιρίδια σε κάθε σωληνάριο και σφραγίστηκαν με τα καπάκια.
3. Οι μικροπλάκες εμβαπτίστηκαν σε υγρό άζωτο για την ψύξη του ιστού.
4. Τα σωληνάρια Qiagen τοποθετήθηκαν στη συσκευή λύσης ιστών (TissueLyser) για ταλάντευση .
5. Έγινε άλεσμα για 1 λεπτό στα 20 Hz. Η διαδικασία επαναλήφθηκε μέχρι την κονιορτοποίηση του ιστού.
6. Τα δείγματα παρέμειναν παγωμένα στους -20°C μέχρι να τοποθετηθεί το πρώτο διάλυμα.
7. Τα διαλύματα AP1, RNease και Reagent Dx αναμίχθηκαν αφού με προσοχή αφαιρέθηκαν τα καπάκια από τα σωληνάρια συλλογής, προστέθηκαν 400 μl από το τελικό διάλυμα σε κάθε σωληνάριο.
8. Έγινε φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές
9. Προστέθηκαν 130 μl ρυθμιστικό διάλυμα AP2 σε κάθε σωληνάριο και αυτά τοποθετήθηκαν για 10 min στους -20°C .
10. Έγινε επαναληπτική φυγοκέντρηση των μικροπλακών για 5 min στις 6000 στροφές
11. Μεταφέρθηκαν με προσοχή 400 μl από κάθε υπερκείμενο σε νέα σωληνάρια, ασφαρίζοντας ότι είναι σε σωστό προσανατολισμό.
12. Προστέθηκε 1.5 όγκος (τυπικά 600 μl) ρυθμιστικό διάλυμα AP3/E
13. Τοποθετήθηκαν 2 μικροπλάκες DNeasy στην κορυφή των S-Blocks και σημαδεύτηκαν για αποφυγή αναγνώρισης των δειγμάτων.

14. Μεταφέρθηκε με προσοχή 1 ml από κάθε δείγμα στις μικροπλάκες DNeasy plates.
15. Οι μικροπλάκες DNeasy ασφαλίστηκαν με τις ταινίες που παρέχονται. Φυγοκεντρήθηκαν για 4 min στις 6000 στροφές.
16. Αφαιρέθηκε η ταινία και προστέθηκαν με προσοχή 800 µl διαλύματος (AW) σε κάθε δείγμα.
17. Οι μικροπλάκες φυγοκεντρήθηκαν για 15 min στις 6000 στροφές, ώστε να στεγνώσουν οι μεμβράνες.
18. Για την τελική έκλυση του DNA προστέθηκαν 100 µl ρυθμιστικό διάλυμα AE σε κάθε δείγμα και παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου (15-25° C) για 1 λεπτό. Στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση για 2 min στις 6000 στροφές. Έγινε επανάληψη της έκλυσης και ο τελικός όγκος του κάθε δείγματος ανήλθε σε 200 µl (Qiagen, Dneasy Plant Handbook σελ: 37-43).

Στο τέλος της διαδικασίας εκχύλισης το DNA αποθηκεύτηκε στους -20° C. Για την ποσοτικοποίηση του DNA τα δείγματα μεταφέρθηκαν και μετρήθηκαν προσεχτικά στο φασματοφωτόμετρο Nanodrop 1000, όπου χρησιμοποιώντας 2µl από το κάθε δείγμα γίνεται η μέτρηση της ποσότητας DNA ανά µl. Στη συνέχεια έγιναν οι απαραίτητες αραιώσεις διότι στην ανάλυση φθορίζοντων πολυμορφισμών μήκους ενισχυμένων θραυσμάτων DNA (f-AFLP) απαιτούνται 200 ng ανά δείγμα, ενώ στην ανάλυση των φθορίζοντων μικροδορυφόρων f-SSR απαιτούνται 20 ng. Κατά συνέπεια οι αραιώσεις έγιναν με τελική συγκέντρωση 10 ng /µl.

3.4 Εκτίμηση Αποτελεσματικότητας της μεθόδου f-AFLP και f-SSR

Δεδομένου ότι η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη προσπάθεια στη χώρα μας, κατασκευής λεπτομερών γενετικών χαρτών σε ανώτερο φυτό αφενός με αυτές τις τεχνικές και αφετέρου με τη χρήση αλληλουχητή, πριν την εφαρμογή των μεθόδων f-AFLP και f-SSR στα 384 δείγματα της χαρτογραφικής οικογένειας, κρίθηκε απαραίτητο να διερευνηθεί η παραγωγή ικανοποιητικού αριθμού δεικτών

στο κυπαρίσσι (*Cupressus sempervirens* L.). Κρίθηκε επίσης αναγκαία η βελτιστοποίηση των υφιστάμενων πρωτοκόλλων και η εκτίμηση της αθροιστικής αποτελεσματικότητας όλων των επιμέρους σταδίων που απαιτούνται για την ολοκλήρωση των μεθόδων των μοριακών δεικτών f-AFLP και f-SSR (Αβραμίδου κ.α., 2011, 2012).

Στην συγκεκριμένη εκτίμηση αναλύθηκαν έξι δείγματα, από τα οποία τα δύο αποτελούσαν τους γονείς της χαρτογραφικής οικογένειας, χρησιμοποιώντας 12 διαφορετικούς συνδυασμούς φθορίζοντων f-AFLP και 8 φθορίζοντων f-SSR. Οι παραπάνω μέθοδοι χρησιμοποιούν φθορίζοντες εκκινητές σημασμένους με φθοροχρώματα χημείας ροδαμίνης / φωσφοραμιτιδίων. Οι παραγόμενοι ζωνότυποι (δείκτες) αναλύθηκαν σε αυτοματοποιημένο αλληλουχητή τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης υπερυψηλής απόδοσης ABI Prism 3730xl (Applied Biosystems).

Εισήχθη μια σειρά βελτιστοποιήσεων των τυπικών πρωτοκόλλων AFLP και SSR μετά από σύγκριση διαφόρων κρίσιμων παραμέτρων που αφορούσαν το μέρος της υγρής χημείας και την βιοπληροφορική επεξεργασία των αποτελεσμάτων (δηλ. μέχρι την παραγωγή της μήτρας δεδομένων για εισαγωγή σε χαρτογραφικά λογισμικά). Αξιολογήθηκε η παραγωγή και η δυνατότητα για ταχεία επεξεργασία μεγάλου όγκου δεδομένων υψηλής επαναληψιμότητας με ταυτόχρονη ελαχιστοποίηση του όγκου των αντιδράσεων υγρής χημείας (πέψη, δεσμοποίηση, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης κλπ.). Ο μέσος όρος του πλήθους των κορυφών (ζωνών) που προέκυψαν από ενισχύσεις με δώδεκα συνδυασμούς εκκινητών f-AFLP - στο σύνολο έξι τυχαίων ατόμων - ήταν 133, δηλ., κατά μέσο όρο ενισχύθηκαν 22 κορυφές ανά γενότυπο και ανά συνδυασμό εκκινητών AFLP. Ο παραπάνω αριθμός θεωρείται ικανοποιητικός σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία για την παραγωγή δεδομένων για χαρτογραφικά λογισμικά (π.χ. OneMap, Mapmaker, CarthaGene) και την δημιουργία αναλυτικού χάρτη σύνδεσης. Αναφορικά με το πρωτόκολλο f-SSR εξακριβώθηκε, για κάθε ξεχωριστή θέση SSR, η βέλτιστη θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών με κλιμακωτή (gradient) PCR, ενώ διαπιστώθηκε ότι η αύξηση του χρόνου στο βήμα της τελικής επιμήκυνσης της PCR αύξησε τον βαθμό διακριτότητας των κορυφών SSR στα ηλεκτροφερογραφήματα του αλληλουχητή (Αβραμίδου κ.α., 2012).

Διαπιστώθηκε ότι η χρήση των δεικτών f-AFLP στον αλληλουχητή παρείχαν ικανοποιητικό αριθμό γονιδιακών θέσεων στο κυπαρίσσι. Μέχρι πρόσφατα, για την ανάλυση των δεικτών AFLP και SSR παρουσιαζόταν στη διεθνή βιβλιογραφία ευρεία χρήση της πηκτής πολυακρυλαμίδης που είναι αρκετά τοξική, χρονοβόρα (Remington *et al.*, 1999; Costa *et al.*, 2000; Achere *et al.*, 2004), ενώ η διάγνωση των αποτελεσμάτων εύκολα μπορούσε να επηρεαστεί από υποκειμενικούς παράγοντες του εκάστοτε ερευνητή (Bovin *et al.*, 2004). Η τεχνολογία αιχμής που χρησιμοποιήθηκε παρέχει τη δυνατότητα ανίχνευσης με ταχύ και επαναλήψιμο τρόπο μεγάλου αριθμού μοριακών γενετικών δεικτών. Ωστόσο η πληροφοριοδοτική ικανότητα των κυρίαρχων γενετικών δεικτών, αν και μεγάλη, δεν επιτρέπει τη γεφύρωση πατρικών και μητρικών γενετικών χαρτών. Το μειονέκτημα αυτό αίρεται με τη συνδυασμένη χρήση συγκυρίαρχων γενετικών μοριακών δεικτών όπως οι SSR. Οι δείκτες SSR χρησιμοποιούνται στα φυτικά είδη για γενοτύπηση ή στη δημιουργία γενετικών χαρτών εδώ και αρκετά χρόνια (Tautz *et al.*, 1986, Semagn *et al.*, 2006). Ωστόσο η ανάλυση των αποτελεσμάτων μέχρι πρόσφατα γινόταν με τη χρήση αгарόζης ειδικής υψηλής ανάλυσης (π.χ. Metaphor) ή σε πηκτή πολυακρυλαμίδης, ενώ σχετικά πρόσφατα χρησιμοποιήθηκαν οι αυτοματοποιημένοι αλληλουχητές φθορισμού. Η εισαγωγή των αυτοματοποιημένων αλληλουχητών δεν παρουσίασε ευρεία διάδοση εξαιτίας του αρχικά υψηλού κόστους χρήσης (Semagn *et al.*, 2006). Η αποτελεσματικότητα, η ακρίβεια της εύρεσης του μήκους των αλληλομόρφων και η επαναληψιμότητα των φθοριζόντων δεικτών f-SSR που αναλύονται ειδικά σε τριχοειδείς αλληλουχητές, υπερέχει έναντι όλων των προηγούμενων μεθόδων που χρησιμοποιούσαν ή όχι φθορισμό για την ανίχνευση των αντιστοίχων θραυσμάτων (Sanchez-Perez *et al.*, 2006).

Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι βελτιστοποιημένες μέθοδοι, τόσο όσον αφορά την μεθοδολογία των f-AFLP, όσο και των f-SSR που εφαρμόστηκαν στη χαρτογραφική οικογένεια.

3.5 Διαδικασία f-AFLP

3.5.1 Πέψη του γενωμικού DNA f-AFLP

Η πέψη του γενωμικού DNA πραγματοποιήθηκε σε 200 ng DNA από κάθε δείγμα χρησιμοποιώντας συνδυασμό περιοριστικών ενζύμων (EcoRI και MseI). Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 30 μ l τα οποία περιείχαν 10x ρυθμιστικό διάλυμα one-for-all [100 mM Tris acetate (pH 7.5), 100mM magnesium acetate και 500 mM potassium acetate (Amersham)], 4U από το κάθε ένζυμο EcoRI και MseI (New England Biolabs), ο υπόλοιπος όγκος συμπληρώθηκε με αραιωμένο DNA των δειγμάτων ανάλογα την συγκέντρωση του κάθε δείγματος έτσι ώστε να έχουμε 200 ng DNA και απιονισμένο νερό μέχρι να συμπληρωθεί ο όγκος των 30 μ l. Η πέψη πραγματοποιήθηκε στους 37°C για 3 ώρες.

3.5.2 Λιγοποίηση των προσαρμοστών (f-AFLP)

Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικοί δίκλωνοι προσαρμοστές οι οποίοι σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να αποφευχθεί η αναδημιουργία των προσαρμοσμένων περιοχών για τα δύο διαφορετικά ένζυμα (Πίνακας 5). Οι δίκλωνοι προσαρμοστές επιδέθηκαν στα κολλώδη άκρα των θραυσμάτων περιορισμού με την T4 DNA λιγάση προσθέτοντας στα προϊόντα της πέψης 10 μ l μίγματος που περιείχε 5 μ M του EcoRI προσαρμοστή, 50 μ M του MseI, 100 mM ATP, 10x one-for-all- buffer (Amersham) και 1U T4 DNA λιγάση (New England Biolabs) και απιονισμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 10 μ l. Η αντίδραση της λιγοποίησης πραγματοποιήθηκε στους 26°C για 3 ώρες και αμέσως μετά στους 65° C ώστε να σταματήσει η δράση της λιγάσης. Τα προϊόντα της λιγοποίησης αραιώθηκαν προσθέτοντας 160 μ l ρυθμιστικό διάλυμα TE στην κάθε αντίδραση (αραίωση 1:5) και αποθηκεύτηκαν στους -20° C.

Πίνακας 5. Προσαρμοστές των δύο διαφορετικών ενζύμων.

Προσαρμοστές	Αλληλουχία (5'→3')
EcoRI forward	CTC GTA GAC TGC GTC C
EcoRI reverse	CTGACGCATGGTTAA
MseI forward	GAC GAT GAG TCC TGA G
MseI reverse	TAC TCA GGA CTC AT

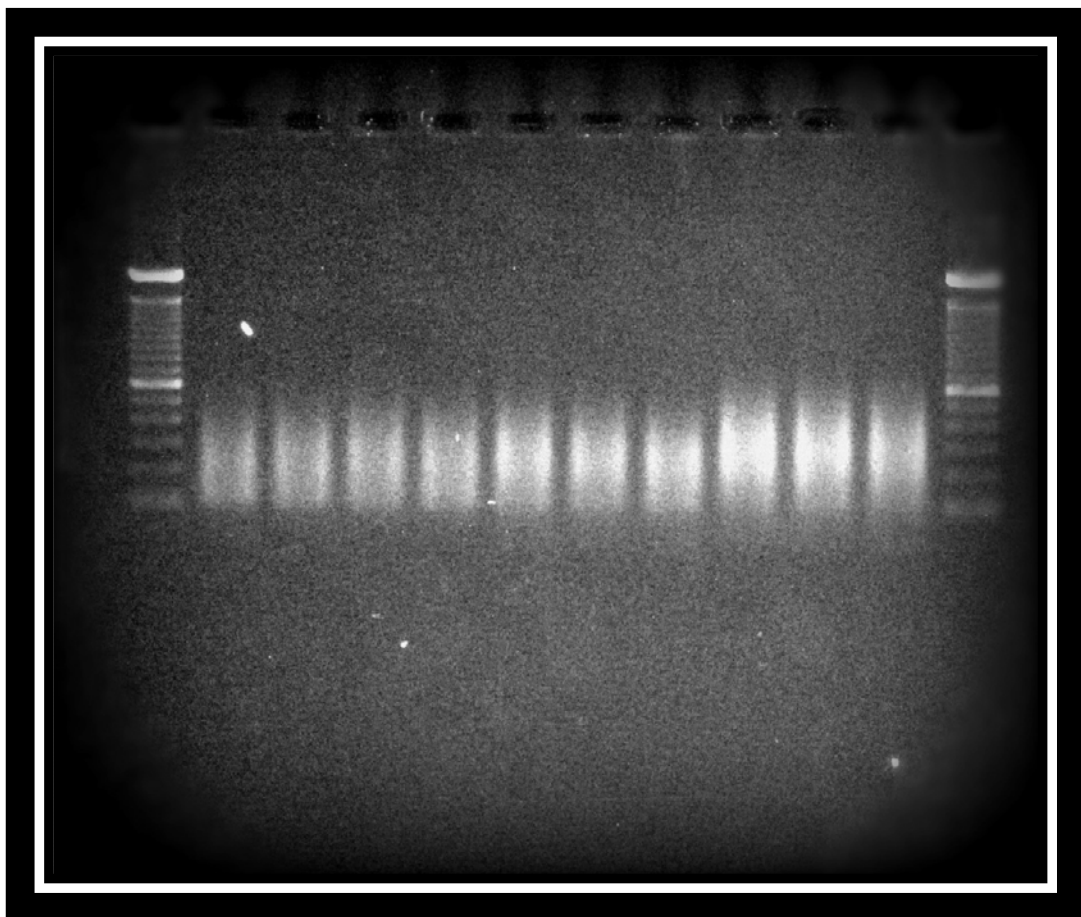
3.5.3 Προεπιλεκτική ενίσχυση (f-AFLP)

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την προεπιλεκτική ενίσχυση περιέχουν τρία τμήματα ακολουθιών DNA: την περιοχή στο 5' άκρο που είναι συμπληρωματική στον προσαρμοστή, την ακολουθία των περιοχών περιορισμού και 1-3 επιλεκτικά νουκλεοτίδια στο 3' άκρο. Χρησιμοποιούνται δύο εκκινητές: ο ένας εκκινητής συμπληρώνει τον προσαρμοστή και την παρακείμενη ακολουθία της περιοχής σπάνιας κοπής με τα 1-3 πρόσθετα νουκλεοτίδια στο 3' άκρο (δηλαδή EcoRI 3'-XXX όπου X δείχνει τα επιλεκτικά νουκλεοτίδια) και ο δεύτερος εκκινητής συμπληρώνει τον προσαρμοστή και την ακολουθία της περιοχής συχνής κοπής με μια πρόσθετη επιλεκτική επέκταση 1-3 βάσεων (εκκινητής MseI 3'-XXX). Τα πρόσθετα νουκλεοτίδια στο 3' άκρο των εκκινητών εξυπηρετούν δύο σκοπούς: επιτρέπουν σε μια ποικιλία υποσυνόλων των περιορισμένων θραυσμάτων να ενισχυθούν και παρέχουν πρόσθετες πιθανότητες για την ανίχνευση πολυμορφισμών πέρα από την ίδια περιοχή περιορισμού. Γενικότερα η χρήση επιλεκτικών εκκινητών μειώνει την πολυπλοκότητα του δείγματος και συγκεκριμένα ο αριθμός των ενισχυμένων θραυσμάτων μειώνεται περίπου τέσσερις φορές για κάθε επιπρόσθετη επιλεκτική βάση σύμφωνα με την τυχαία κατανομή των βάσεων (Blears *et al.*, 1998).

Για την προεπιλεκτική ενίσχυση χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών EcoRI+A – MseI+C με επιλεκτικά νουκλεοτίδια A και C. Η κάθε αντίδραση περιείχε 5 μl λιγοποιημένου DNA, 2 μl 10x Red Taq DNA Polymerase Buffer, 0.8 μl dNTPs 5mM (New England Biolabs), 0.6 μl από τους εκκινητές σπάνιας και συχνής κοπής (EcoRI/ PstI και MseI) συγκέντρωσης 50ng/μl, 1 μl MgCl₂ 50mM, 0.2 μl Red Taq

DNA Polymerase 5U/ μ l (HyTest Ltd Dia TaqDD Polymerase) και αποσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 20 μ l. Η αντίδραση PCR διεξάχθηκε στον θερμοκυκλοποιητή Eppendorf σύμφωνα με το εξής πρόγραμμα: σταθερά στους 94°C για 30 sec, ακολούθησαν 23 κύκλοι στους 94°C για 30 sec, στους 56°C για 30 sec και στους 72°C για 1 min, σταθερά στους 72°C για 30 min και τέλος στους 7°C για απεριόριστο χρονικό διάστημα.

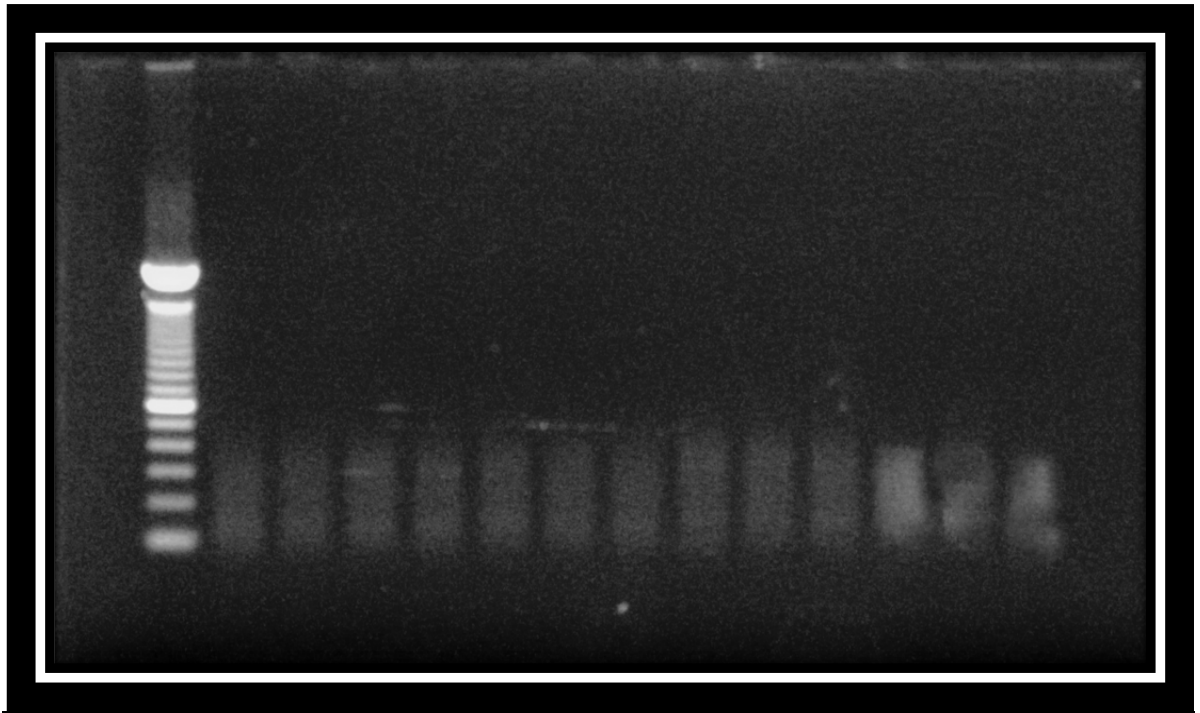
Από τα προϊόντα της προεπιλεκτικής ενίσχυσης, 5 μ l ηλεκτροφορήθηκαν σε διαγνωστικό πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 1.25% και σταθεροποιήθηκαν με 5 μ l βρωμιούχο αιθίδιο (EthBr) για να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα της προεπιλεκτικής ενίσχυσης χρησιμοποιώντας 100 bp DNA δείκτη της Invitrogen (Σχήμα 18). Τα υπόλοιπα 15 μ l αραιώθηκαν με TE σε αναλογία 1:10 και αποθηκεύτηκαν στους -20° C για περαιτέρω χρήση.



Σχήμα 18. Προεπιλεκτική ενίσχυση σε πηκτή αγαρόζης όπου διακρίνεται ενίσχυση κάθε δείγματος από 100-500 bp.

3.5.4 Επιλεκτική Ενίσχυση (f-AFLP)

Η επιλεκτική ενίσχυση πραγματοποιήθηκε με 24 συνδυασμούς εκκινητών (Πίνακας 6). Όπως και για την προ-επιλεκτική ενίσχυση χρησιμοποιήθηκαν δύο ειδών εκκινητές, που καθένας τους ανήκει σε μια ομάδα εκκινητών. Οι ομάδες αυτές είναι ίδιες με αυτές των εκκινητών της προ-επιλεκτικής ενίσχυσης. Η διαφορά των εκκινητών της επιλεκτικής ενίσχυσης από αυτούς της προ-επιλεκτικής έγκειται στο ότι στις αντίστοιχες συντηρημένες περιοχές προστίθενται τρία τη φορά διαφοροποιητικά νουκλεοτίδια. Επίσης, στην επιλεκτική ενίσχυση ο ανάντι εκκινητής (EcoR-I) έχει σημειωθεί στο 5' άκρο του με ένα φθοριόχρωμα. Χρησιμοποιούνται τέσσερα διαφορετικά χρώματα (HEX, FAM, TAMRA, ROX), παράγωγα της ροδαμίνης (rodamine), ή φλουροσκεΐνης (fluorescein). Κοντά στο σημείο της εξόδου από την τριχοειδή στήλη και κατά την στιγμή της ανίχνευσης των δεικτών, τα μόρια αυτά διεγείρονται από μια δέσμη laser. Κάθε χρώμα τότε εκπέμπει σε διαφορετική συχνότητα φωτός και έτσι ανιχνεύονται ταυτόχρονα χωρίς να συγχέονται και τα τέσσερα χρώματα. Κάθε διαφορετικό χρώμα μπορεί να αντιπροσωπεύει μία διαφορετική επιλεκτική αντίδραση. Έτσι δίνεται η δυνατότητα για την λεγόμενη πολύπλεξη (multiplexing) κατά την ανάλυση. Η PCR πραγματοποιήθηκε σε 10 μl τα οποία περιείχαν διάλυμα 10X RedTaq DNA polymerase (Hytest, Finland), 25 mM MgCl₂, 10mM dNTPs, 0,1 μl των εκκινητών EcoRI (50ng/μl), 0,6 μl εκκινητών MseI (50ng/μl), 1U RedTaq polymerase, 5μl από την προ-επιλεκτική ενίσχυση και απεσταγμένο νερό (Σχήμα 19). Οι συνθήκες της PCR ήταν 95°C για 30 sec, ακολουθούμενος από 1 κύκλο (95°C 30 sec, 65°C 30 sec και 72°C για 1min) στη συνέχεια 12 κύκλους (95°C 30 sec, 65°C 30 sec και 72°C για 1min) με βαθμιαία ελάττωση 0,7°C ανά κύκλο, 22 κύκλους (95°C 30 sec, 56°C 30 sec και 72°C για 1min) και τέλος αύξηση του χρόνου της τελικής επιμήκυνσης σε 30min, καθώς με τον τρόπο αυτό παρουσιάστηκε αύξηση του ύψους των ενισχυόμενων κορυφών. Αυτό διευκόλυνε την αυτοματοποιημένη προσμέτρησή τους από το λογισμικό Genemapper 4.0 (Αβραμίδου κ.α., 2012).



Σχήμα 19. Επιλεκτική ενίσχυση δειγμάτων με τον συνδυασμό E-AAG/M-CA.

Πίνακας 6. Συνδυασμοί 24 f-AFLP εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την επιλεκτική ενίσχυση των 384 δειγμάτων κυπαρισσιού.

Φθοριόχρωμα (συζευγμένο στο 5' του ανάντι εκκινητή)			Ανάντι φθορίζοντες εκκινητές (άκρο EcoRI)	Κατάντι εκκινητές (άκρο MseI)
Hex	GACTGCGTACCAATTC- ACT			GATGAGTCCTGAGTAA-CAA
				GATGAGTCCTGAGTAA-CAG
				GATGAGTCCTGAGTAA-CGT
				GATGAGTCCTGAGTAA-CAA
				GATGAGTCCTGAGTAA-CATT
				GATGAGTCCTGAGTAA-CATC
Fam	GACTGCGTACCAATTC- ATG			GATGAGTCCTGAGTAA-CAA
				GATGAGTCCTGAGTAA-CAG
				GATGAGTCCTGAGTAA-CGT
				GATGAGTCCTGAGTAA-CAA
				GATGAGTCCTGAGTAA-CATT
				GATGAGTCCTGAGTAA-CATC
Rox	GACTGCGTACCAATTC- AAC			GATGAGTCCTGAGTAA-CAA
				GATGAGTCCTGAGTAA-CAG
				GATGAGTCCTGAGTAA-CGT
				GATGAGTCCTGAGTAA-CAA
				GATGAGTCCTGAGTAA-CATT
				GATGAGTCCTGAGTAA-CATC
Tamra	GACTGCGTACCAATTC- AAG			GATGAGTCCTGAGTAA-CAA
				GATGAGTCCTGAGTAA-CAG
				GATGAGTCCTGAGTAA-CGT
				GATGAGTCCTGAGTAA-CAA
				GATGAGTCCTGAGTAA-CATT
				GATGAGTCCTGAGTAA-CATC

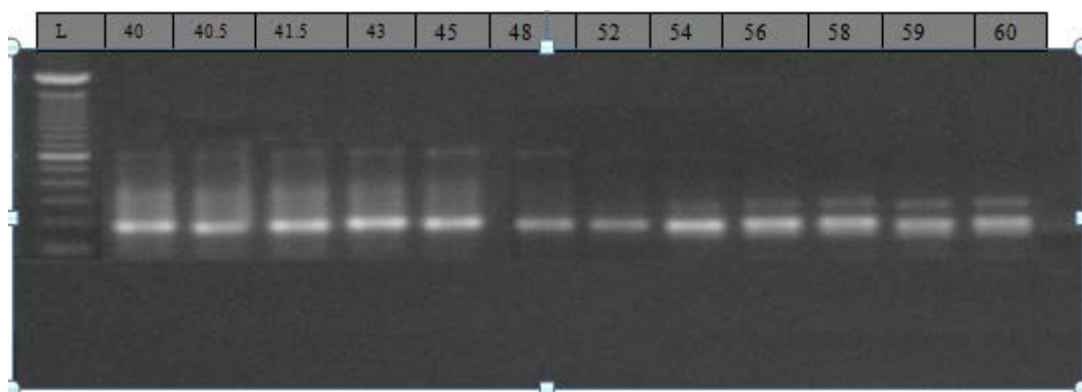
3.6 Μεθοδολογία f-SSR

Χρησιμοποιήθηκαν οκτώ διαθέσιμοι f-SSR εκκινητές (Sebastiani *et al.*, 2005). Οι αλληλουχίες των εκκινητών f-SSR, τα διαφορετικά φθοριόχρωματα και το αναμενόμενο μήκος των αλληλομόρφων παρουσιάζονται στον Πίνακα 7. Για εξοικονόμηση αναλωσίμων ο συνολικός όγκος PCR μειώθηκε στα 10μl και περιείχε 25 ng DNA. Αρχικά, για την διαπίστωση της βέλτιστης θερμοκρασίας πρόσφυσης (υβριδισμού) κάθε εκκινητή κατά την PCR, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές PCR, για κάθε θέση ξεχωριστά, με βαθμιαία αλλαγή της θερμοκρασίας κατά το σχετικό βήμα (gradient PCR). Με βάση τα αποτελέσματα, οι θερμοκρασίες υβριδισμού των εκκινητών επαναπροσδιορίστηκαν για την τελική ενίσχυση των προϊόντων (Σχήμα 20). Οι θερμοκρασίες υβριδισμού βελτιστοποιήθηκαν για τους εκκινητές Cyp52, Cyp139, Cyp84 και Cyp174 από 50°C σε 57°C για τους Cyp52, Cyp139 και 58,5°C για τους Cyp84 και Cyp174 (Αβραμίδου κ.α., 2012). Το πρωτόκολλο της PCR που ακολουθήθηκε ήταν το εξής: 95°C για 5min, 30 κύκλους αποτελούμενους από (95°C για 30 sec, X°C για 30 sec όπου X, η θερμοκρασία υβριδισμού του κάθε γενετικού τόπου και 72°C για 1min και τέλος αύξηση του χρόνου της τελικής επιμήκυνσης από 10 στα 30 min καθώς είχε ως αποτέλεσμα καλύτερη ποιότητα κορυφών (ύψος και διαχωρισμού).

Πίνακας 7. Ζεύγη εκκινητών φθοριζόντων SSR, μήκος βάσεων.

α/α	Ονομασία θέσης	Εκκινητές (άνω ανάντι, κάτω κατάντι)	Φθοριόχρωμα (συζευγμένο στο 5' του ανάντι)	Μήκος περιοχής ενίσχυσης (αλληλομόρφου), (αριθμός βάσεων)
1	Cyp52	CATCCACTGCCAATACTTTT AGCATCTTCCCATTACTTTGA	FAM	146-174
2	Cyp84	CATTTCAATTTCATAAGTTCT GCAATGGGATGACTACAAAA	FAM	226-248
3	Cyp101	AGGCCACACTCAAACCTTATG ATGACAATGGGTGAAGTCAT	FAM	175-209
4	Cyp139	ACAAC TAGAGAGGGAGTGAAAA TGGTTGAAACAATAAAGGAGA	HEX	220-270
5	Cyp174	CAACCCTTCTCTTCGATAGT ACCTTCTTTGTCATCGTCAC	ROX	192-214
6	Cyp257	AACTTGACATTTTAGGGATG TGATGGAATAACATGGACAG	HEX	159-183
7	Cyp258	AATTTGGGCTCATGAAATTA TCTAGACCGATTCTATGGTCA	ROX	224-256
8	Cyp293	GGCAAGTAATGAACTCCAC TACAAACATGCATGGCTAAC	ROX	167-195

Η PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 10μl και περιείχε 1X Kapa Taq Buffer, 25mM MgCl₂, 10mM dNTPs, 0.2μM από κάθε εκκινητή και 1U Kapa Taq DNA polymerase. Από κάθε αντίδραση, 2 μl, μεταφέρθηκαν σε ειδικές μικροπλάκες αραιώθηκαν με απεσταγμένο νερό σε αναλογία 1:5 και προστέθηκε φορμαμίδιο και κλίμακα προτύπων μεγεθών 500Liz (Applied Biosystems). Τα δεδομένα που πρόεκυψαν από τον αλληλουχητή ABI3730xl εισήχθησαν στο λογισμικό Genemapper 4.0 (Applied Biosystems), το οποίο παρέχει τη δυνατότητα αυτοματοποιημένης και γρήγορης ανάλυσης των αποτελεσμάτων.



Σχήμα 20. Βαθμιαία αλλαγή της θερμοκρασίας πρόσφυσης κατά την διάρκεια της PCR για την ανάδειξη της μικροδορυφορικής θέσης Cyp84.

3.7 Πολυμορφισμός ενισχυμένων θραυσμάτων ευαίσθητων στη μεθυλίωση (Methylation Susceptible Amplified Polymorphisms MSAP)

3.7.1 Πέψη DNA για την ανάπτυξη μοριακών δεικτών MSAP

Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκε διπλή πέψη 200 ng γενωμικού DNA, χρησιμοποιώντας τους δύο διαφορετικούς συνδυασμούς ενζύμων EcoRI/HpaII και EcoRI/MspI. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 20 μl που περιείχε 1X One for all Buffer, 4U EcoRI (New England, Biolabs) και 3 U είτε από το HpaII, είτε από το MspI ένζυμο (New England, Biolabs) για 3 ώρες στους 37° C.

3.7.2 Αντίδραση της Λιγάσης για την ανάπτυξη μοριακών δεικτών MSAP

Στα προϊόντα της πέψης προστέθηκαν δύο διαφορετικοί προσαρμοστές, έτσι ώστε να αποτρέψουν τον ανασχηματισμό των θραυσμάτων, ένας για τα κολλώδη άκρα του ενζύμου EcoRI και ένας για τα κολλώδη άκρα των HpaII/MspI (Πίνακας 8). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 25-26° C, προσθέτοντας 5μl διαλύματος που περιείχε 5 pmol και 50 pmol από τον EcoRI και HpaII/MspI προσαρμοστή αντίστοιχα, 1 mM ATP, 1X ρυθμιστικό διάλυμα one-for-all, και 1U T4 DNA λιγάση (Invitrogen). Τα προϊόντα της αντίδρασης της λιγάσης αραιώθηκαν κατά 1/5 με

ρυθμιστικό διάλυμα TE και χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγείο για την αντίδραση της προεπιλεκτικής ενίσχυσης.

Πίνακας 8. Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία των MSAP στα στάδια της λιγάσης, της προεπιλεκτικής και επιλεκτικής ενίσχυσης.

Εκκινητές/Προσαρμοστές	Αλληλουχίες 5'→ 3'
EcoRI προσαρμοστής	CTCGTAGACTGCGTACC
	AATTGGTACGCAGTC
EcoRI+1	GACTGCGTACCAATTC+A
EcoRI+3	+ACT
	+AAC
HpaII/MspI προσαρμοστής	GACGATGAGTCTCGAT
	CGATCGAGACTCAT
HpaII/MspI + 1	ATGAGTCTCGATCGG+A
	ATGAGTCTCGATCGG+T
HpaII/MspI +3	+AAT
	+TCA

3.7.3 Προεπιλεκτική Ενίσχυση για την ανάπτυξη μοριακών δεικτών MSAP

Πραγματοποιήθηκαν δύο διαφορετικά στάδια της προεπιλεκτικής ενίσχυσης, έτσι ώστε να ανιχνευθούν και πιθανές διαφορές ανάμεσα τους (Πίνακας 8). Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 20 μ l και περιείχε 1X Kapa Taq Buffer, 0.2mM dNTPs, 2.5 mM $MgCl_2$, 30 ng από κάθε εκκινητή EcoRI+A, MspI/HpaII+A ή MspI/HpaII+T, 1U Taq DNA πολυμεράση (Kapa Biosystems) και 5 μ l από τα προϊόντα των προηγούμενων βημάτων (πέψης και αντίδρασης της λιγάσης). Οι συνθήκες της PCR για το στάδιο ήταν πανομοιότυπες με το στάδιο της προεπιλεκτικής ενίσχυσης των f-AFLP (βλ. παραπάνω).

3.7.4 Επιλεκτική Ενίσχυση για την ανάπτυξη μοριακών δεικτών MSAP

Για το τελευταίο στάδιο των MSAP η επιλεκτική ενίσχυση ήταν πανομοιότυπη με την διαδικασία της επιλεκτικής ενίσχυσης των f-AFLP, τόσο στο πρωτόκολλο των αντιδράσεων, όσο και στο πρόγραμμα της PCR, με τη διαφορά ότι εφαρμόστηκε σε κάθε συνδυασμό ενζύμων EcoRI/HpaII και EcoRI/MspI ξεχωριστά, έτσι ώστε να υπάρχει η δυνατότητα σύγκρισης και εξαγωγής των αποτελεσμάτων της μεθυλίωσης. Οι συνδυασμοί εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.

3.8 Μόλυνση με τον μύκητα *Seiridium cardinale*

Για την ανίχνευση της ανθεκτικότητας της χαρτογραφικής οικογένειας στην ασθένεια που προκαλείται από τον μύκητα *Seiridium cardinale* πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός με τον μύκητα *Seiridium cardinale* (σε δύο πλευρικούς κλάδους), σε 300 δενδρύλλια της χαρτογραφικής οικογένειας ηλικίας τεσσάρων ετών του κυπαρισσιού τον Δεκέμβριο του 2013. Χρησιμοποιήθηκε μία απομόνωση πιστοποιημένου μύκητα (ATCC 38654) προέλευσης Ιταλίας, από τη συλλογή μυκήτων του Εργαστηρίου Δασικής Παθολογίας Ινστιτούτο Μεσογειακών Δασικών Οικοσυστημάτων (ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ). Ο μύκητας αναπτύχθηκε σε τριβλία Petri (90mm) με θρεπτικό υπόστρωμα εκχυλίσματος πατάτας δεξτρόζης με άγαρ (potato dextrose agar-PDA, Oxoid Ltd.) για διάστημα 3 εβδομάδων σε θερμοκρασία 25 °C.

Με ειδικό εργαλείο (σγρόμπια) αφαιρέθηκε ένα τμήμα φλοιού, διαμέτρου 3mm (Σχήμα 21) από δύο πλάγιους κλάδους σε κάθε δενδρύλλιο και σε απόσταση 8-12 cm από τον κορμό. Συνολικά μολύνθηκαν 300 δενδρύλλια της χαρτογραφικής οικογένειας. Η διάμετρος των κλάδων ήταν 3-11mm. Σε κάθε οπή που δημιουργήθηκε στο φλοιό τοποθετήθηκε ένας δίσκος θρεπτικού υποστρώματος με μυκήλιο του μύκητα (μόλυσμα) της ίδιας διαμέτρου, με το επιφανειακό μυκήλιο σε επαφή με το ξύλωμα (Σχήμα 22) (Xenopoulos 1991; Santini and Di Lonardo, 2000). Τα τεχνητά αυτά μολύσματα καλύφθηκαν με μεμβράνη Parafilm για να αποφευχθεί η ξήρανση τους (Σχήμα 23). Παράλληλα, σε 10 φυτά κυπαρισσιού, τα οποία είχαν επίσης εμβολιαστεί με το μύκητα, τοποθετήθηκαν κύλινδροι με αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα PDA, με τον ίδιο τρόπο και χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

Έξι μήνες μετά τον εμβολιασμό των φυτών με το μύκητα οι κλάδοι κόπηκαν, για να αποφευχθεί η επέκταση του μυκηλίου στον κορμό των φυτών. Το μήκος του έλκους μετρήθηκε σε κάθε κλάδο, αφού προηγουμένως είχε γίνει ελαφρά απόξεση του εξωτερικού φλοιού στην περιφέρεια του έλκους, ούτως ώστε να αποκαλυφθεί ο νεκρωτικός ιστός (Σχήμα 24). Παράλληλα, εκτιμήθηκε ο βαθμός ανθεκτικότητας χρησιμοποιώντας μία κλίμακα από το 1 έως το 3 με διαβαθμίσεις 0,33 (1, 1.33, 1.66, 2, 2.33, 2.66 και 3) που είχε χρησιμοποιηθεί στις αρχικές εκτιμήσεις ανθεκτικότητας των γονέων (προσωπική επικοινωνία με Δρ. Ξερόπουλο). Ο βαθμός 1 αντιπροσώπευε πλήρη επούλωση του έλκους, ο βαθμός 2 μικρά έλκη με

περιορισμένη εκροή ρητίνης (μέτρια ανθεκτικότητα) και ο βαθμός 3 φυτά με μεγάλη ευπάθεια στο παθογόνο, με εκτεταμένα έλκη και άφθονη εκροή ρητίνης (Danti *et al.* 2013).



Σχήμα 21. Αφαίρεση φλοιού 3 mm διαμέτρου από πλευρικό κλαδίσκο ατόμου.



Σχήμα 22. Τοποθέτηση μολύσματος σε πλάγιο κλαδίσκο ατόμου.



Σχήμα 23. Κάλυψη του τεχνητού μολύσματος με ταινία.



Σχήμα 24. Απόξεση εξωτερικού φλοιού στην περιφέρεια του έλκους.

3.9 Βλαστικός Πολλαπλασιασμός στο κυπαρίσσι

3.9.1 Προετοιμασία συλλογή και απολύμανση φυτικού ιστού

Το φυτικό υλικό προήλθε από μοσχεύματα της χαρτογραφικής οικογένειας. Κλαδίσκοι αφαιρέθηκαν προσεκτικά και μεταφέρθηκαν σε πάγο στο εργαστήριο προκειμένου να επιτευχθεί η απολύμανση, πριν την εισαγωγή τους σε ιστοκαλλιέργεια. Αρχικά τα έκφυτα τοποθετήθηκαν κάτω από τρεχούμενο νερό (20 min) και στη συνέχεια απολυμάνθηκαν χρησιμοποιώντας 5% υποχλωριώδες νάτριο (20 min) και 10 min υπεροξείδιο του υδρογόνου (20%, 10 min). Δοκιμάστηκε επίσης η ακόλουθη μέθοδος απολύμανσης: εμποτισμός σε 100% αλκοόλη (10 sec), εμποτισμός σε διάλυμα χλωριούχου υδράργυρου (0,1%, 2 min) και τέλος τρεις διαδοχικές πλύσεις με απεσταγμένο νερό (10 min η καθεμία).

3.9.2 Μικροπολλαπλασιασμός

Οι βλαστοί από οκτώ άτομα μεταφέρθηκαν, για τη φάση του πολλαπλασιασμού σε θρεπτικό μέσο MS (Murashige and Skoog, 1962, Σχήμα 25, Πίνακας 9), που επιπρόσθετα περιείχε MyoInositol (0,05%), σακχαρόζη 20 gr και άγαρ 0,75% (Duchefa), pH= 5,8. Τα έκφυτα τοποθετήθηκαν σε θάλαμο καλλιέργειας (Σχήμα 26) σε θερμοκρασία $25 \pm 1^\circ \text{C}$ και φωτοπερίοδο 16/8 ώρες (φως/σκοτάδι).

Επίσης επιχειρήθηκε ο μικροπολλαπλασιασμός με συνδυασμό μακροστοιχείων από το θρεπτικό διάλυμα SH (Giovanelli and Carlo, 2007) και των μικροστοιχείων από το θρεπτικό διάλυμα MS (Murashige and Skoog, 1962). Τέλος, προστέθηκε μικρή ποσότητα ενεργού άνθρακα (100mg/L) ώστε να δεσμευτούν οι φαινολικές ενώσεις (Πίνακας 10).

Πίνακας 9. Θρεπτικό διάλυμα πολλαπλασιασμού MS (Murashige and Skoog).

Μακροστοιχεία	MS
NH ₄ NO ₃	370.00 mg
CaCl ₂ 2H ₂ O	1650.00 mg
MgSO ₄ 7H ₂ O	1900.00 mg
KH ₂ PO ₄	440.00 mg
K ₂ SO ₄	170.00 mg
Ιχνοστοιχεία	
H ₃ BO ₃	6.20 mg
MnSO ₄ 4H ₂ O	22.30 mg
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.60 mg
KI	0.83 mg
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.25 mg
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.03 mg
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.03 mg
FeSO ₄ 7H ₂ O	10.60 mg
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	22.40 mg
Βιταμίνες	
Θειαμίνη	0.10 mg
Νικοτινικό οξύ	0.50 mg
Πυριδοξίνη	0.50 mg
Γλυκίνη	2.00 mg
My Inositol	50 mg / 1000 ml
Σακχαρόζη	20.000 mg / 1000 ml
Agar Sigma	7.000 mg / 1000 ml
pH	5.8

Πίνακας 10. Συνδυασμός θρεπτικών διαλυμάτων MS (Murashige and Skoog medium) και SH (Schenk and Hilderbrandt).

Μακροστοιχεία	SH
	mg / 1000 ml
NH ₄ H ₂ PO ₄	300.00
CaCl ₂ 2H ₂ O	151.00
MgSO ₄ 7H ₂ O	400.00
KNO ₃	2500.00
Ενεργός Άνθρακας	100.00
Ιχνοστοιχεία	MSM
H ₃ BO ₃	6.20 mg
MnSO ₄ 4H ₂ O	22.30 mg
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.60 mg
KI	0.83 mg
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.25 mg
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.03 mg
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.03 mg
FeSO ₄ 7H ₂ O	10.60 mg
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	22.40 mg
Βιταμίνες	
Θειαμίνη	0.10 mg
Νικοτινικό οξύ	0.50 mg
Πυριδοξίνη	0.50 mg
Γλυκίνη	2.00 mg
My Inositol	50 mg / 1000 ml
Σακχαρόζη	20.000 mg / 1000 ml
Agar Sigma	7.000 mg / 1000 ml
pH	5.8



Σχήμα 25. Βλαστοί κυπαρισσιού σε θρεπτικό διάλυμα MS.



Σχήμα 26. Βλαστός κυπαρισσιού σε καλλιέργεια in- vitro.

3.10 Επεξεργασία δεδομένων

3.10.1 Επεξεργασία δεδομένων f-AFLP και f-SSR και f-MSAP

Τα προϊόντα της επιλεκτικής ενίσχυσης από τους 24 συνδυασμούς εκκινητών f-AFLP και από τους τέσσερεις συνδυασμούς εκκινητών f-MSAP αναλύθηκαν στον αλληλουχητή ABI3730xl με τη βοήθεια του λογισμικού Genemapper 4.0 (Applied Biosystems) χρησιμοποιώντας ως φίλτρο προσδιορισμού παρουσίας ενός αλληλομόρφου κορυφές με ζεύγη βάσεων από 150-500 για να αποφευχθεί το φαινόμενο της ομοπλασίας (Vekemans *et al.*, 2002). Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των γονιδιακών θέσεων στο λογισμικό GeneMapper 4.0 ήταν :

- Εύρος ανάλυσης (analysis range): 50-500bp
- Εύρος αναφοράς δείκτη (bin width) :1bp
- Βάση αναφοράς : 51pts
- Μέθοδος ανίχνευσης μεγέθους: τοπική νότια μέθοδος (local southern method)
- Εξομάλυνση (smoothing): ελαφρά (light)

Τα προϊόντα της PCR για τους οκτώ σημασμένους μικροδορυφόρους (f-SSR) μετά την αραίωση τους, αναλύθηκαν επίσης με το λογισμικό Genemapper 4.0 (Applied Biosystems).

3.10.2 Ανάλυση σύνδεσης – Σχεδιασμός χαρτογράφησης

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν για τους f-AFLP και για τους f-SSR δείκτες ελέγχθηκαν σύμφωνα με τη δοκιμή χ^2 για την ύπαρξη Μενδελικού διαχωρισμού. Η μέθοδος χαρτογράφησης που επιλέχτηκε ήταν η μέθοδος της ψευδοκριτικής διασταύρωσης (Grattapaglia *et al.*, 1995). Οι δείκτες στη συνέχεια κατηγοριοποιήθηκαν σε τέσσερις τάξεις ανάλογα με το μενδελικό διαχωρισμό που παρουσίασαν σύμφωνα με το Wu *et al.*, (2002, Πίνακας 11).

Αρχικά για την κατασκευή των χαρτών πραγματοποιήθηκαν δοκιμές διάφορων χαρτογραφικών προγραμμάτων OneMap (Margarido *et al.*, 2007), CarthaGene (Givry *et al.*, 2005), Mapmaker (Lander *et al.*, 1987) και Mapdisto (Lorieu, 2012) για την επιλογή του καταλληλότερου προγράμματος για την κατασκευή γενετικού χάρτη στο κυπαρίσσι. Επιλέχτηκε το πρόγραμμα OneMap (Margarido *et al.*, 2007) για τη δημιουργία των ομάδων σύνδεσης, διότι είναι το μόνο που έχει σχεδιαστεί για ετερομεικτικές διασταυρώσεις (outcrossing families), παρέχει τη δυνατότητα δημιουργίας ενός κοινού χάρτη μέγιστης πλειοψηφικής συναποδοχής (χρησιμοποιώντας ταυτόχρονα κυρίαρχους και συγκυρίαρχους δείκτες) και λαμβάνει υπόψη τις διαφορετικές φάσεις σύνδεσης μεταξύ των δεικτών (ομόπλευρες και ετερόπλευρες) για την εύρεση ομάδων σύνδεσης και τον υπολογισμό των χαρτογραφικών αποστάσεων.

Οι παράμετροι χαρτογράφησης που χρησιμοποιήθηκαν ($LOD=6,00$ $\theta=0,3$) είχαν υψηλότερες τιμές συγκριτικά με τη διεθνή βιβλιογραφία $LOD=3,00$ και $\theta=0,3$ (Aravanopoulos, 2002). Ο υπολογισμός των χαρτογραφικών αποστάσεων έγινε σύμφωνα με τη συνάρτηση του Kosambi (Kosambi, 1944) Για το σχεδιασμό των γραφικών χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Mapchart (Voorrips, 2002).

Πίνακας 11. Κατάταξη δεικτών σύμφωνα με τον διαχωρισμό τους από το Wu *et al.*,2002.

Γονείς			Απόγονοι				
			Παρατηρούμενα	Αλληλόμορφα		Αριθμός	
Δια/ση			αλληλόμορφα	απογόνων	Διαχωρισμός	φαινοτύπων	
A		1	ab x cd	ab x cd	ac,ad,bc, bd	1:1:1:1	4
		2	ab x ac	ab x ac	a,ac,ba,bc	1:1:1:1	4
		3	ab x co	ab x c	ac,a,bc,b	1:1:1:1	4
		4	ao x bo	a x b	ab,a,b,o	1:1:1:1	4
B	B ₁	5	ab x ao	ab x a	ab,2a,b	1:2:1	3
	B ₂	6	ao x ab	a x ab	ab,2a,b	1:2:1	3
	B ₃	7	ab x ab	ab x ab	a,2ab,b	1:2:1	3
C		8	ao x ao	a x a	3a,o	3:1	2
D	D ₁	9	ab x cc	ab x c	ac,bc	1:1	2
		10	ab x aa	ab x a	a,ab	1:1	2
		11	ab x oo	ab x o	a,b	1:1	2
		12	bo x aa	b x a	ab,a	1:1	2
		13	ao x oo	a x o	a,o	1:1	2
	D ₂	14	cc x ab	c x ab	ac,bc	1:1	2
		15	aa x ab	a x ab	a,ab	1:1	2
		16	oo x ab	o x ab	a,b	1:1	2
		17	aa x bo	a x b	ab,a	1:1	2
		18	oo x ao	o x a	a,o	1:1	2

3.10.3 Εύρεση γονιδιακών θέσεων σημαντικών ποσοτικών γνωρισμάτων (QTLs)

Τα ποσοτικά γνωρίσματα του ύψους και της διαμέτρου των δενδρυλλίων ελέγχθηκαν με το κριτήριο Kolmogorov- Smirnov. Η ύπαρξη κανονικότητας είναι σημαντική στην εφαρμογή μεθόδων παραμετρικής στατιστικής ανάλυσης, υποδηλώνει ωστόσο την ύπαρξη αρκετών γονιδίων ποσοτικών γνωρισμάτων με μάλλον μικρή επίδραση το καθένα στο φαινοτυπικό γνώρισμα. Το γνώρισμα της κόμης μετατράπηκε σε ποσοτικό χαρακτήρα χρησιμοποιώντας εκατοστιαία κλίμακα των διαφόρων τάξεων (A,B,C,D) σύμφωνα με τη δοκιμή Bouroulet (Bouroulet, 1993). Ο βαθμός ανθεκτικότητας των γενοτύπων μετατράπηκε επίσης σε ποσοτικό γνώρισμα με κλίμακα από το 1 έως το 3 με διαβαθμίσεις 0,33. Για τα γνωρίσματα της κόμης και της ανθεκτικότητας εφαρμόστηκε μη παραμετρική χαρτογράφηση διαστημάτων που στηρίζεται στο κριτήριο Kruskal-Wallis.

Η μέθοδος της χαρτογράφησης διαστημάτων (Lander and Bonstein, 1989) χρησιμοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού RQTL (Broman *et al.*, 2003) για την εύρεση των QTL για τα γνωρίσματα του ύψους της διαμέτρου, της ανθεκτικότητας και της κόμης. Το διάστημα ορίστηκε σε 2 cM.

3.10.4 Επεξεργασία δεδομένων f-MSAP

Η ανάλυση που πραγματοποιήθηκε περιελάμβανε την λεπτομερή μελέτη όλων των θέσεων των δύο γονέων σε σχέση με 190 απογόνους που επιλέχθηκαν τυχαία από το σύνολο των απογόνων, για λόγους περιορισμού του κόστους ανάλυσης. Ο σκοπός της ανάλυσης ήταν να εξακριβωθεί ο ακριβής διαχωρισμός των μεθυλιωμένων θέσεων. Οι θέσεις κατηγοριοποιήθηκαν σε έξι ομάδες (Α έως Ζ) ανάλογα με την αλλαγή μεθυλίωσης του κάθε δείκτη στους 190 απογόνους ως προς τους γονικούς γενότυπους. Η ομάδα Α αναφέρεται στην ύπαρξη ενός μονομορφικού προτύπου, το οποίο δηλώνει ότι οι ίδιες CCGG θέσεις βρέθηκαν στους γονείς και στους απογόνους. Η ομάδα Β αναφέρεται στις θέσεις που κληρονομήθηκαν από έναν γονέα στους απογόνους, ενώ η ομάδα Γ στις θέσεις που παρουσίασαν απομεθυλίωση σε σχέση με τους γονικούς γενότυπους. Η ομάδα Δ παρουσιάζει τις θέσεις που

υπήρχε πολυμορφισμός ανάμεσα σε γονείς και στους απογόνους, ενώ η ομάδα E αναφέρεται σε *de novo* μεθυλίωση (σε μεθυλίωση που εμφανίζεται στους απογόνους, ενώ δεν υπήρχε σε αντίστοιχες θέσεις των γονέων). Τέλος, η ομάδα Z αναφέρεται σε υπερμεθυλιωμένες θέσεις που ανιχνεύθηκαν στους απογόνους.

Επιπλέον υπολογίσθηκαν τα ποσοστά CG, CNG, CG/CNG μεθυλίωσης και μη μεθυλίωσης, ως κλάσμα του αριθμού των θέσεων για κάθε μια κατάσταση μεθυλίωσης προς τον συνολικό αριθμό των θέσεων. Ωστόσο τα ποσοστά μεθυλίωσης ήταν σχετικά και ίσως μικρότερα από τα πραγματικά επίπεδα μεθυλίωσης (Xiong *et al.*, 1999), επειδή η μέθοδος μπορεί να υπολογίσει μόνο ένα μικρό ποσοστό των κυτοσινών στο γονιδίωμα (ουσιαστικά μόνο στις θέσεις κοπής των ενζύμων).

Τέλος, δυο αυξητικά χαρακτηριστικά, το ύψος και η διάμετρος μελετήθηκαν με σκοπό να βρεθεί ενδεχόμενη συσχέτιση τους με τη μεθυλίωση του DNA. Για αυτό το λόγο επιλεχτήκαν 60 απόγονοι οι όποιοι παρουσίαζαν ακραίες (τις υψηλότερες και χαμηλότερες) τιμές ύψους και διαμέτρου και πραγματοποιήθηκε μη παραμετρικός έλεγχος συσχέτισης με τη μέθοδο του Spearman.

4 Αποτελέσματα και Συζήτηση

4.1 Ανάπτυξη Γενετικών Χαρτών

4.1.1 Μενδελική κληρονομησιμότητα f-AFLP γονιδιακών θέσεων

Από τους 24 συνδυασμούς f-AFLP εκκινητών που αναλύθηκαν, ανιχνεύθηκαν 1332 μοριακοί γενετικοί δείκτες (γονιδιακές θέσεις) με μέσο όρο 55,5 δεικτών ανά συνδυασμό (Πίνακας 12). Από τις 1332 γονιδιακές θέσεις οι 1264 ήταν πολυμορφικές και χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω ανάλυση. Οι γονιδιακές θέσεις στη συνέχεια ελέγχθηκαν με τη δοκιμή χ^2 και ομαδοποιήθηκαν σύμφωνα με το διαχωρισμό τους στους απογόνους (Πίνακας 11, Wu *et. al.*, 2002). Η ομαδοποίηση ανέδειξε δύο κύριες κατηγορίες :

- Η πρώτη κατηγορία περιελάμβανε 294 γονιδιακές θέσεις που παρουσίασαν ετεροζυγωτία (παρουσία αλληλομόρφου) στον ένα γονέα και ομοζυγία (απουσία αλληλομόρφου) στον άλλον (δείκτες τύπου D, αναλογία διαχωρισμού 1:1). Από τις 294 γονιδιακές θέσεις οι 166 παρουσίασαν ετεροζυγωτία για το μητρικό γονέα και 128 για τον πατρικό.
- Η δεύτερη κατηγορία περιελάμβανε 970 γονιδιακές θέσεις που ήταν ετεροζύγωτες και στους δύο γονείς και ο διαχωρισμός στους απογόνους ήταν 3:1 (δείκτες τύπου C8). Από τις 970 γονιδιακές θέσεις οι 523 παρουσίασαν Μενδελικό διαχωρισμό ($p > 0.05$) ενώ οι υπόλοιπες 447 παρουσίασαν παραμορφωτικό διαχωρισμό ($p < 0.05$).

4.1.2 Μενδελική κληρονομησιμότητα f-SSR γονιδιακών θέσεων

Από τις οκτώ f-SSR (Πίνακας 13) γονιδιακές θέσεις που χρησιμοποιήθηκαν οι επτά ήταν πολυμορφικές, ενώ ο εκκινητής Cyp257 ανέδειξε μια μονομορφική γονιδιακή θέση στους δύο γονείς. Οι f-SSR γονιδιακές θέσεις στη συνέχεια ελέγχθηκαν με τη δοκιμή χ^2 και διαπιστώθηκε ότι καμία δεν παρουσίαζε

παραμορφωτικό διαχωρισμό ($p > 0.05$). Ομαδοποιήθηκαν ανάλογα με την αναλογία διαχωρισμού τους (Πίνακας 11, Wu *et al.*, 2002) στους απογόνους και σημάνθηκαν αναλόγως με σκοπό την εισαγωγή τους στο χαρτογραφικό πρόγραμμα OneMap (Margarido *et al.*, 2007). Παρουσιάστηκαν τρία διαφορετικά πρότυπα διαχωρισμού:

- 1:2:1 αναλογία διαχωρισμού (τύπος B3.7) παρουσίασαν οι δείκτες Cyp174, Cyp139 και Cyp84
- 1:1:1:1 αναλογία διαχωρισμού (τύπος A2) είχαν οι δείκτες Cyp258 και Cyp293
- 1:1 αναλογία διαχωρισμού (τύπος D1.9) είχαν οι Cyp101 και Cyp52

Πίνακας 12. Συνδυασμοί f-AFLP εκκινητών και παραγόμενος αριθμός δεικτών.

α/α	Συνδυασμός εκκινητών	Αριθμός πολυμορφικών δεικτών	Αναλογία διαχωρισμού 1:1	Αναλογία διαχωρισμού 3:1
1	EATG_MCAA	58	19	39
2	EAAC_MCAA	65	12	53
3	EAAG_MCAA	71	21	50
4	EACT_MCAA	45	16	29
5	EAAC_MCATT	63	11	52
6	EAAG_MCATT	56	14	42
7	EACT_MCATT	62	21	41
8	EATG_MCATT	37	11	26
9	EATG_MCATC	36	11	25
10	EAAG_MCATC	62	11	51
11	EACT_MCATC	56	10	46
12	EAAC_MCATC	53	9	44
13	EATG_MCCT	53	14	39

14	EAAC_MCCT	68	17	51
15	EAAG_MCCT	71	23	48
16	EACT_MCCT	77	27	50
17	EATG_MCCA	52	16	36
18	EAAC_MCCA	85	29	56
19	EAAG_MCCA	77	23	54
20	EACT_MCCA	70	17	53
21	EAAG_MCAG	38	6	32
22	EAAC_MCAG	46	10	36
23	EATG_MCAG	14	6	9
24	EACT_MCAG	17	9	8
Σύνολο		1332	294	970

Πίνακας 13. f-SSR δείκτες, αριθμός αλληλομόρφων, διαχωρισμός και τύπος σήμανσης διαχωρισμού κατά Wu *et al.*, 2002.

f-SSR	Αριθμός αλληλομόρφων	Διαχωρισμός	Τύπος δεικτών κατά Wu <i>et al.</i> , 2002
CYP258	4	1:1:1:1	A.2
CYP293	4	1:1:1:1	A.2
CYP101	2	1:1	D1.9
CYP52	2	1:1	D1.9
CYP174	3	1:2:1	B3.7
CYP139	3	1:2:1	B3.7
CYP84	3	1:2:1	B3.7
CYP257	1	-	-

4.1.3 Κατασκευή Μητρικού χάρτη Πλαισίου - Οριζοντιόκλαδη μορφή

Χρησιμοποιήθηκαν 166 f-AFLP (τύπου D1.13) γονιδιακές θέσεις για την κατασκευή του μητρικού χάρτη, επτά f-SSR γονιδιακές θέσεις και το γνώρισμα της κόμης.

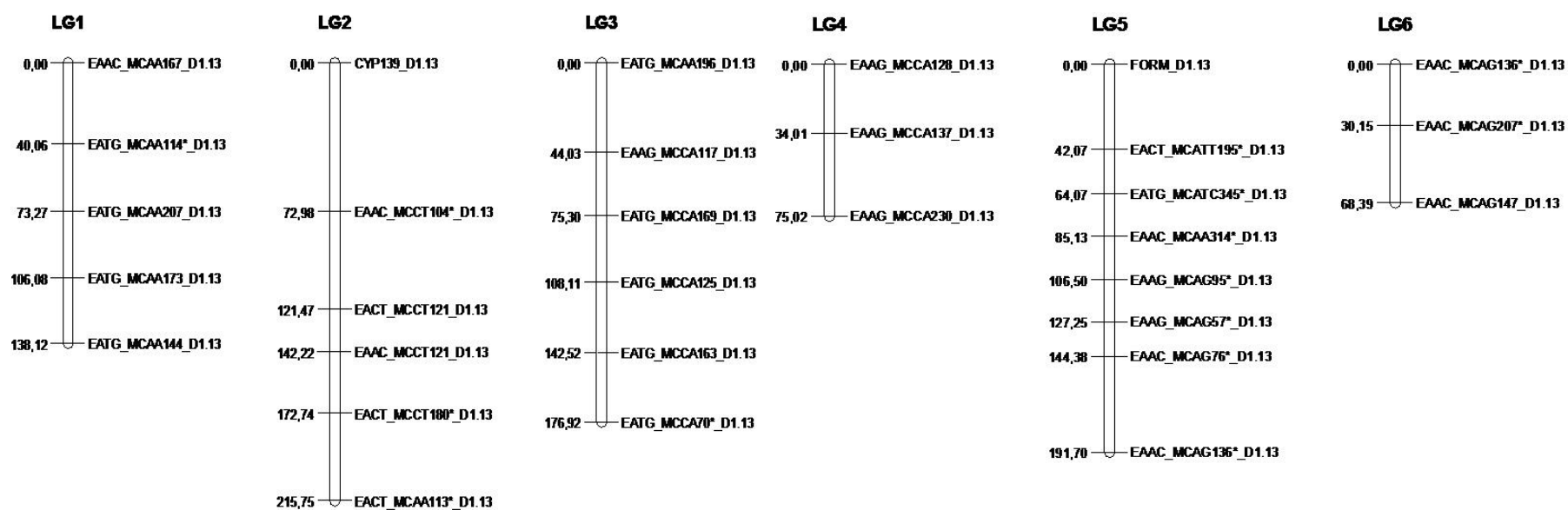
Με κριτήρια (τιμές κατωφλίου) $LOD=6,0$ και $\theta=0,3$ σχηματίστηκαν έξι ομάδες σύνδεσης που περιλάμβαναν 30 γονιδιακές θέσεις, με συνολικό μήκος 818,58 cM και με μέση απόσταση γονιδιακών θέσεων 27.28 cM (Σχήμα 27). Η ονομασία των γονιδιακών θέσεων περιλαμβάνει τον συνδυασμό του εκκινητή, το μήκος βάσεων της γονιδιακής θέσης και το συμβολισμό από την αναλογία διαχωρισμού που εμφάνισαν στους απογόνους. Οι δείκτες που παρουσίασαν παραμορφωτικό διαχωρισμό ($p<0.05$) σημάνθηκαν με αστερίσκο (*).

4.1.4 Κατασκευή Πατρικού χάρτη Πλαισίου - Ορθόκλαδη μορφή

Για την κατασκευή των πατρικών ομάδων σύνδεσης χρησιμοποιήθηκαν 128 γονιδιακές θέσεις τύπου D2.18, επτά γονιδιακές θέσεις f-SSR και το γνώρισμα της κόμης.

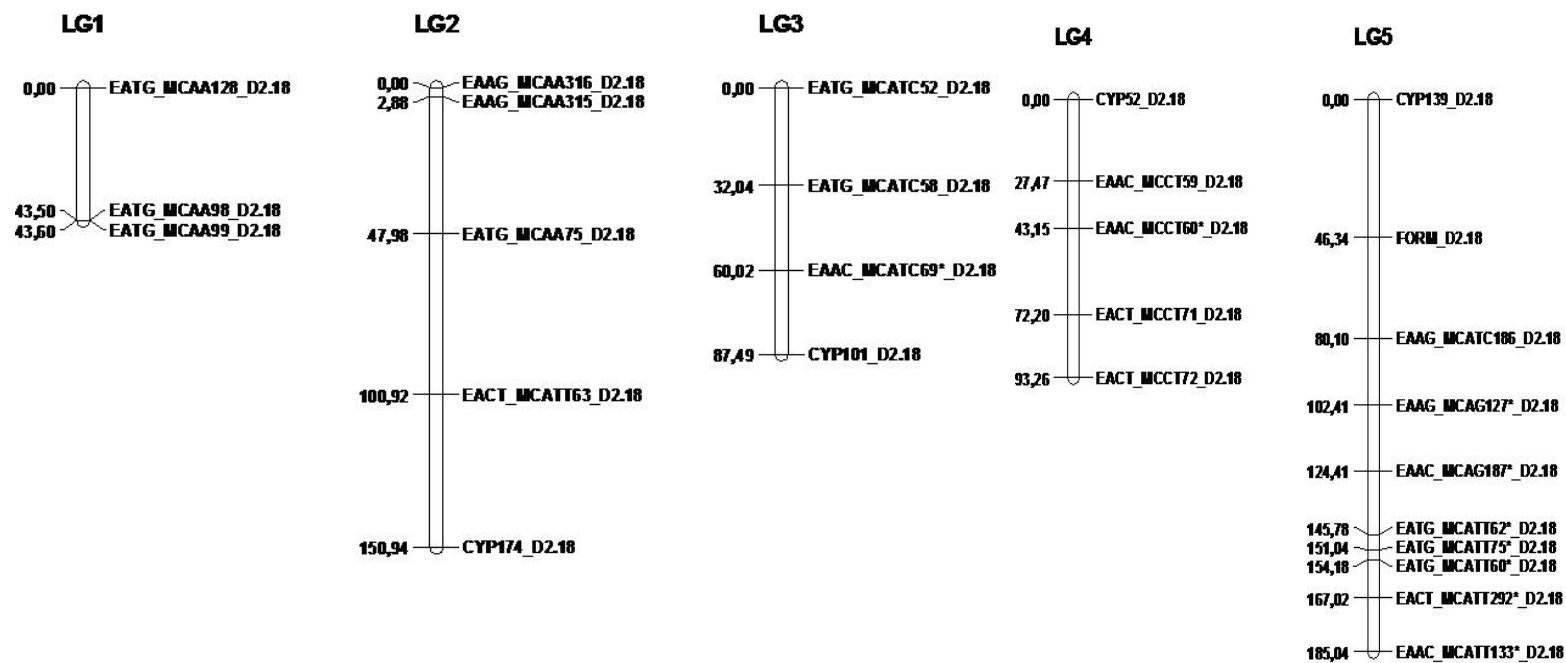
Με κριτήρια $LOD=6,0$ και $\theta=0,3$ δημιουργήθηκαν πέντε ομάδες σύνδεσης που περιελάμβαναν 27 γονιδιακές θέσεις. Το συνολικό μήκος του χάρτη ήταν 560,33 cM με μέση απόσταση γονιδιακών θέσεων 20.75 cM. Οι ομάδες σύνδεσης παρουσιάζονται στο Σχήμα 28.

Μητρικός Χάρτης Πλαισίου



Σχήμα 27. Μητρικός Χάρτης Πλαισίου *Cupressus sempervirens* var. *horizontalis*.

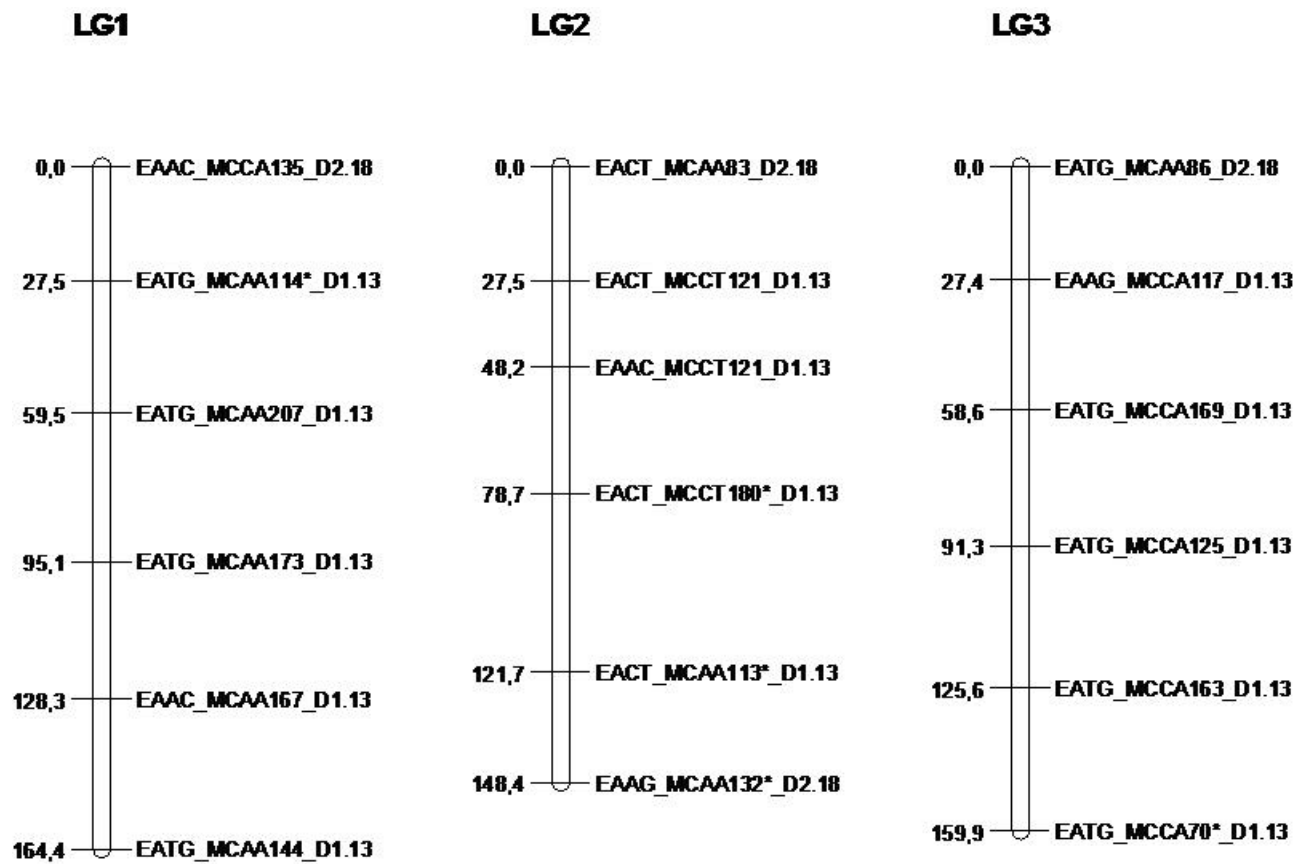
Πατρικός χάρτης Πλαισίου



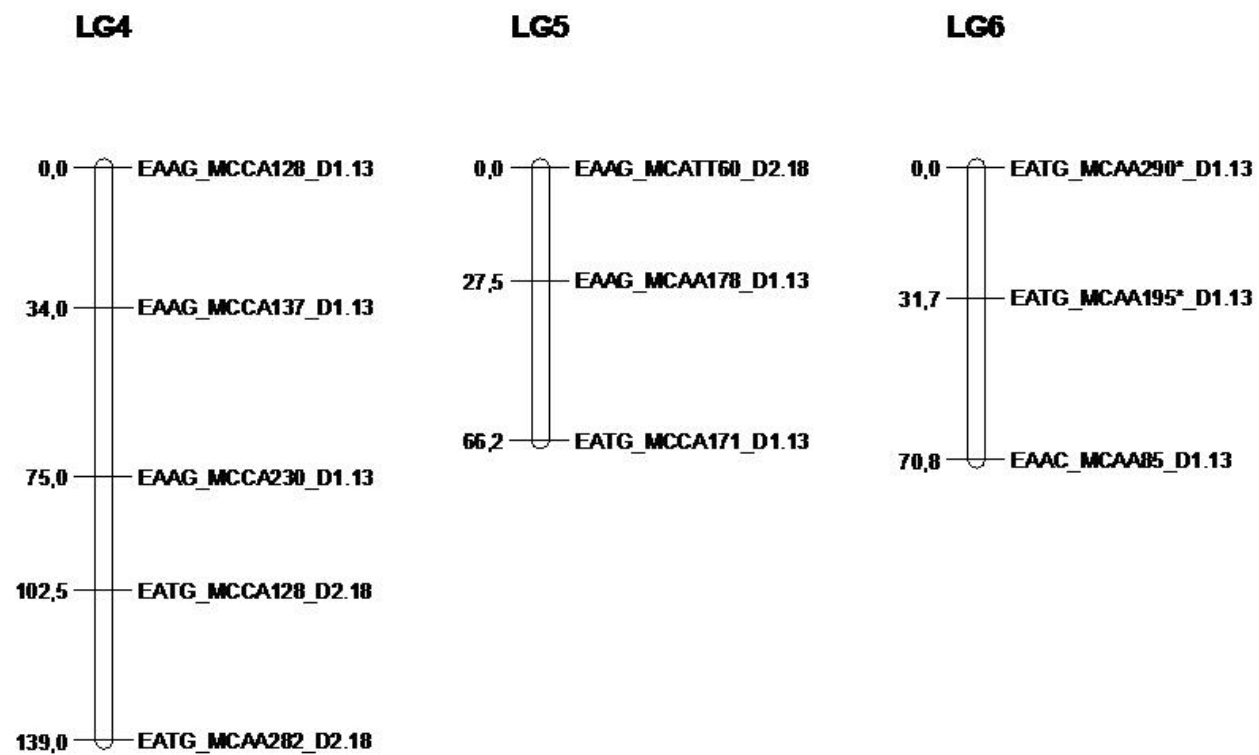
Σχήμα 28. Πατρικός χάρτης Πλαισίου *Cupressus sempervirens* var. *pyramidalis*.

4.1.5 Κατασκευή Ενιαίου Χάρτη Πλαισίου του *Cupressus sempervirens* L.

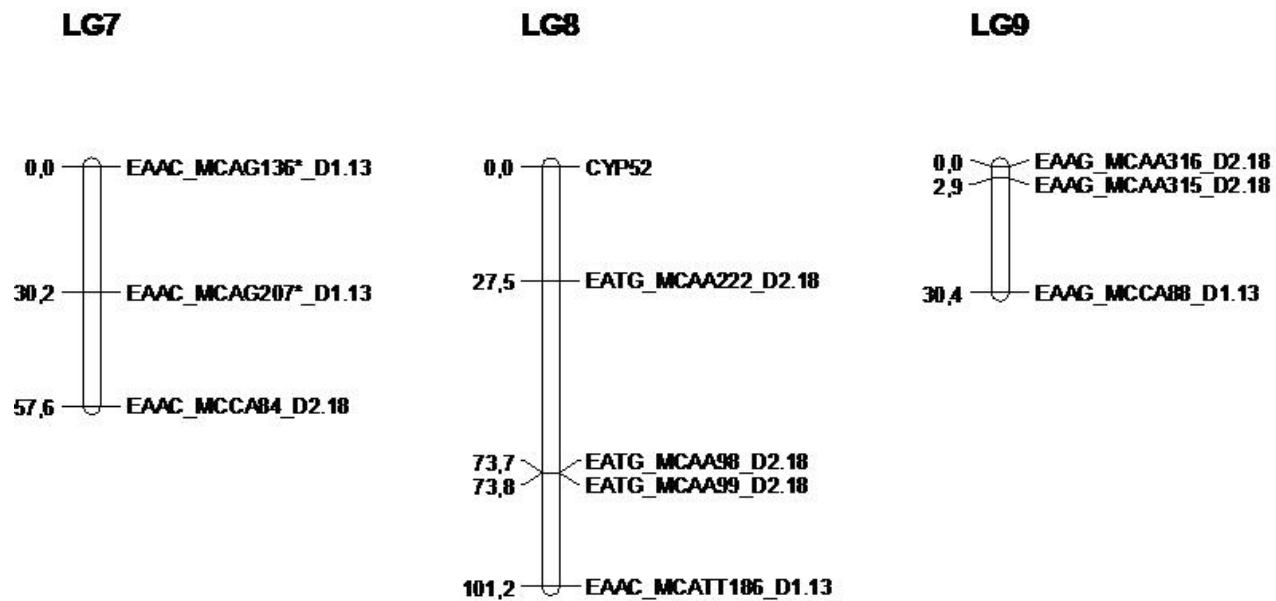
Για την κατασκευή του ενιαίου χάρτη πλαισίου του κυπαρισσιού χρησιμοποιήθηκαν 294 γονιδιακές θέσεις AFLP που ακολουθούσαν 1:1 αναλογία διαχωρισμού, επτά SSR δείκτες (με διαχωρισμό 1:1, 1:2:1 και 1:1:1:1), και το γνώρισμα της κόμης. Ομαδοποιήθηκαν οι δύο επί μέρους χάρτες πλαισίου (μητρικός και πατρικός) με το λογισμικό χαρτογραφικής ανάλυσης Onemap (Margarido *et al.*, 2007) που επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση κυρίαρχων και συγκυρίαρχων δεικτών. Με χρήση των τιμών κατωφλίου $LOD=6,0$ και $\theta=0,3$ προέκυψαν έντεκα ομάδες σύνδεσης. Χαρτογραφήθηκαν 56 γονιδιακές θέσεις και το συνολικό μήκος του χάρτη ήταν 1228.72 cM με μέσο όρο μήκους 111.70 cM ανά ομάδα σύνδεσης και 21.9 cM μέση απόστασης γονιδιακών θέσεων (Σχήμα 29).



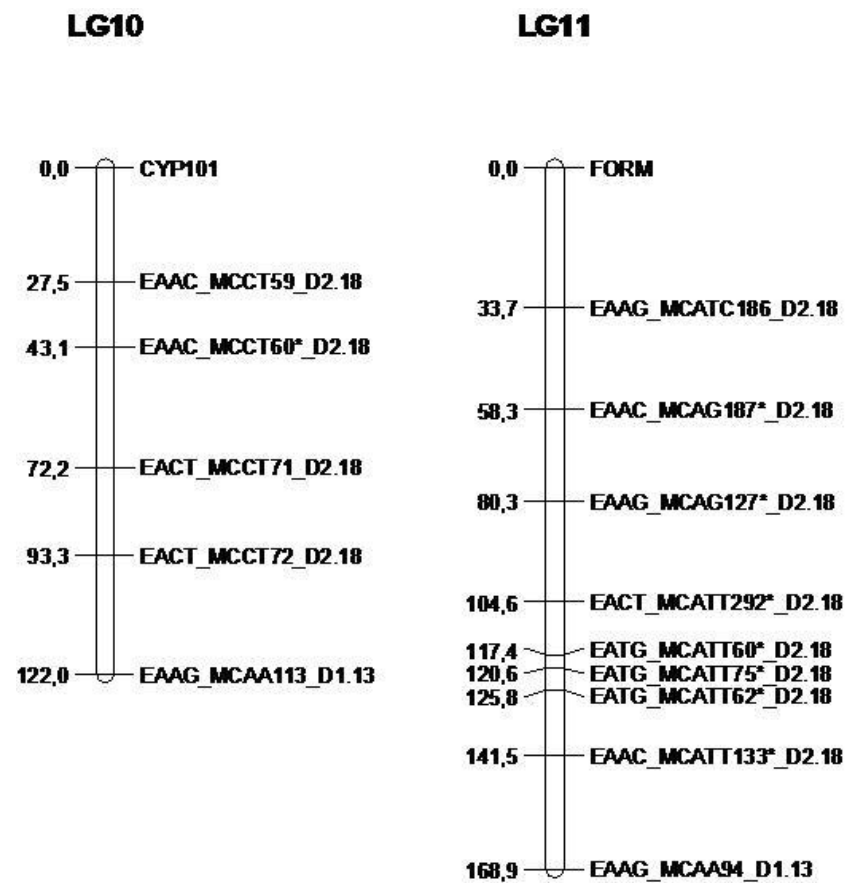
Σχήμα 29. Ενιαίος Χάρτης Πλαισίου του *Cupressus sempervirens* L.



Σχήμα 29. Ενιαίος Χάρτης Πλαισίου του *Cupressus sempervirens* L.



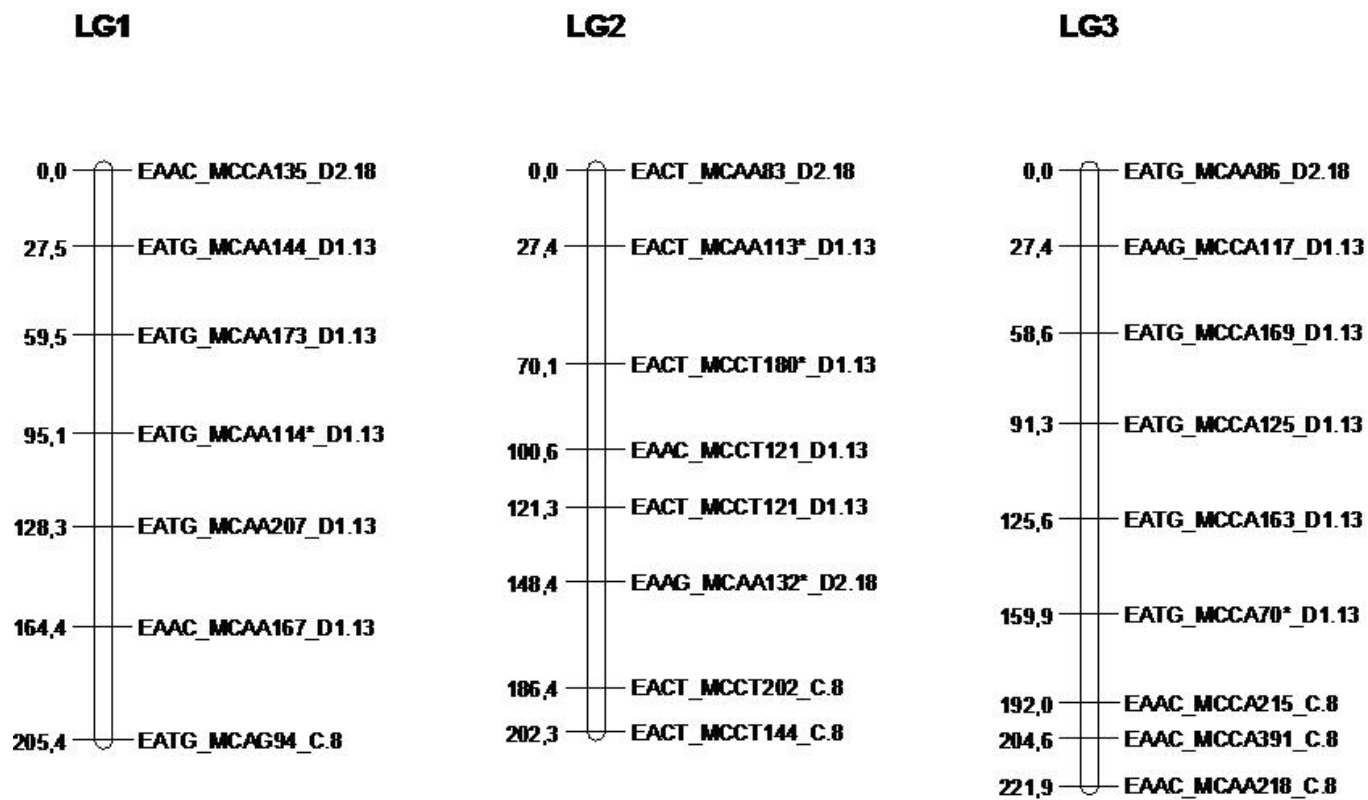
Σχήμα 29. Ενιαίος Χάρτης Πλαισίου του *Cupressus sempervirens* L.



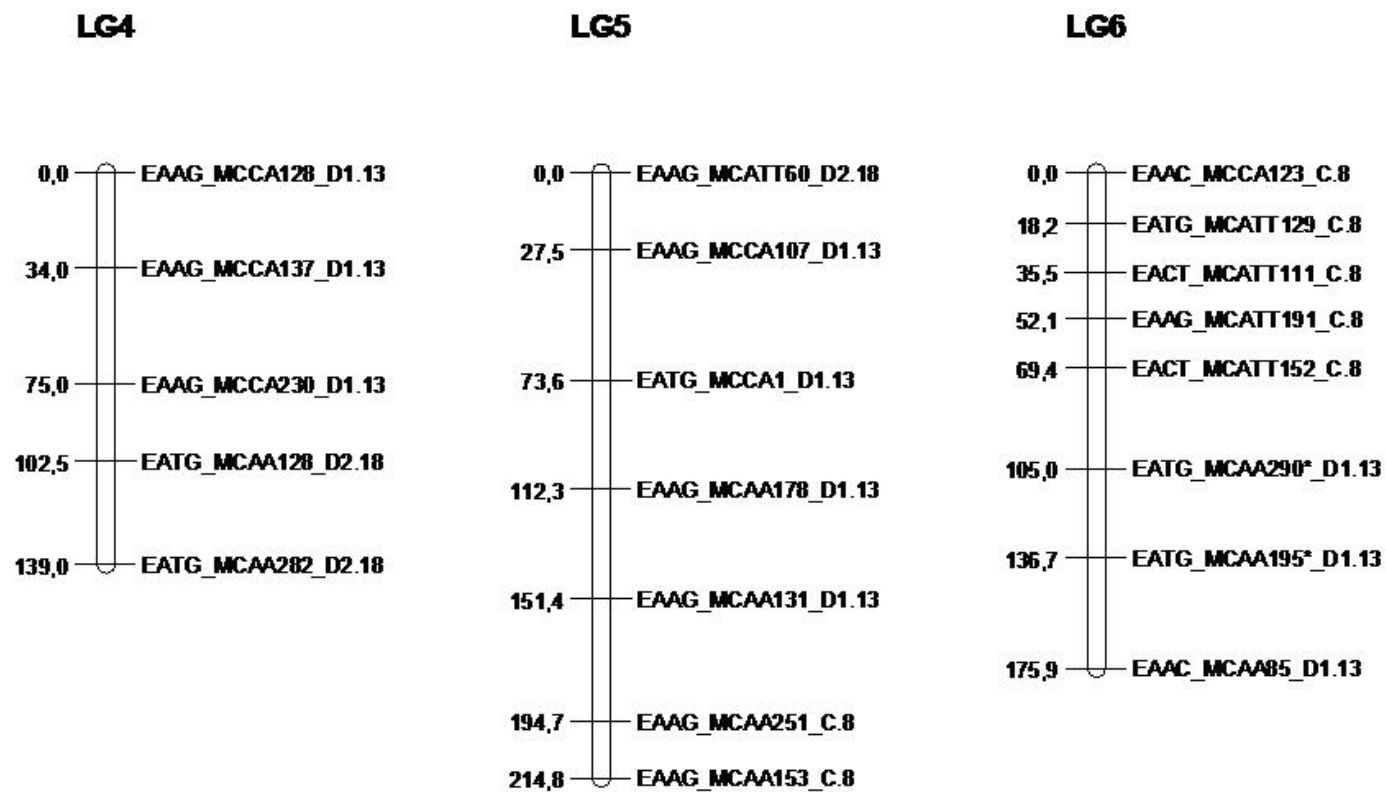
Σχήμα 29. Ενιαίος Χάρτης Πλαισίου του *Cupressus sempervirens* L.

4.1.6 Κατασκευή Ολοκληρωμένου Χάρτη του Κυπαρισσιού (*Cupressus sempervirens* L.)

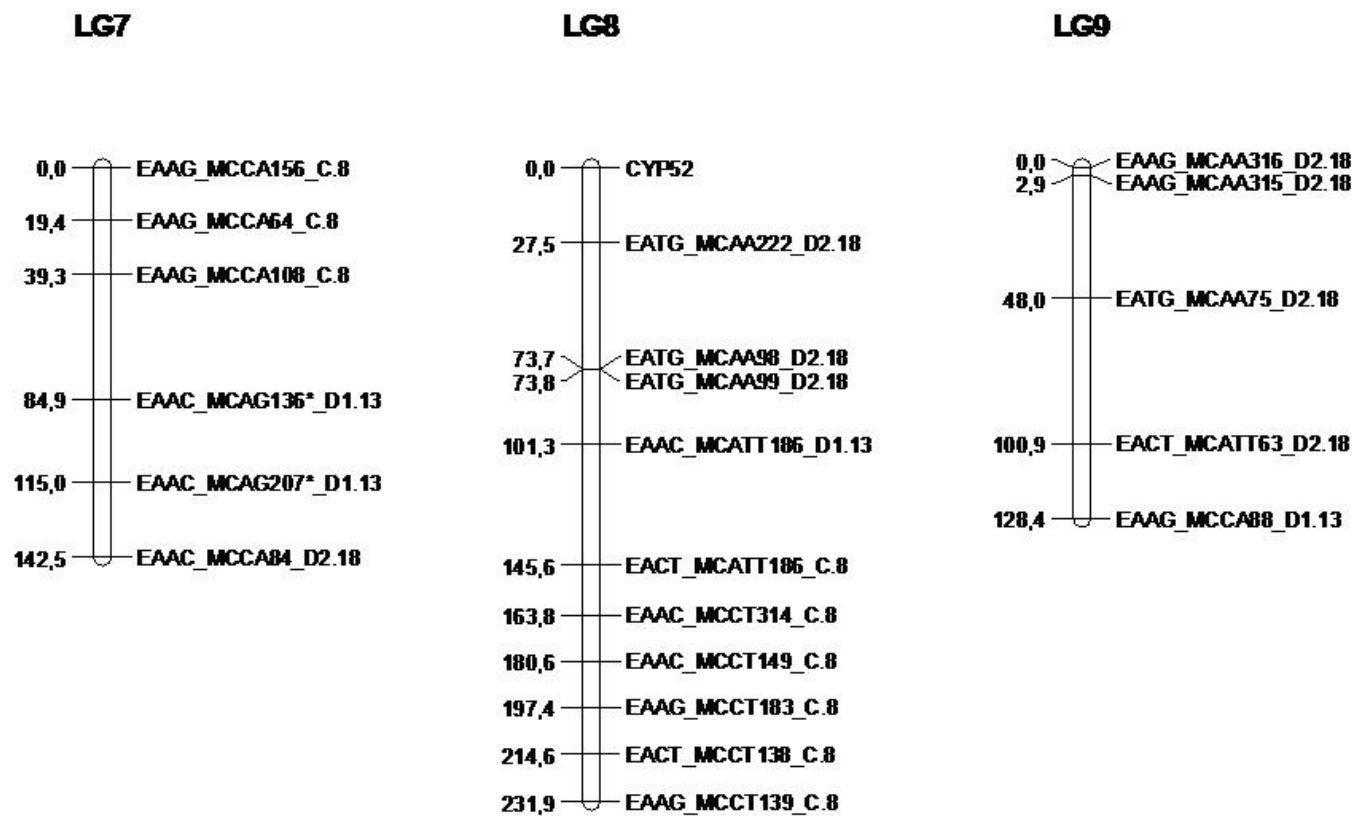
Για την κατασκευή του ολοκληρωμένου χάρτη του κυπαρισσιού οι έντεκα ομάδες σύνδεσης που προέκυψαν από τον χάρτη πλαισίου εμπλουτίστηκαν με τις γονιδιακές θέσεις που παρουσίασαν μεντελικό διαχωρισμό 3:1. Από τη χαρτογραφική προσπάθεια προέκυψε ο ολοκληρωμένος γενετικός χάρτης, που περιελάμβανε 94 γονιδιακές θέσεις μήκους 2146.9 cM με μέση απόσταση γονιδιακών θέσεων 22.8 cM (Σχήμα 30).



Σχήμα 30. Ολοκληρωμένος χάρτης του κυπαρισσιού (*Cupressus sempervirens* L.)

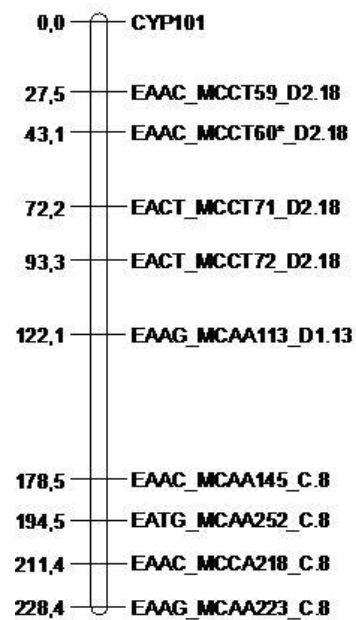


Σχήμα 30. Ολοκληρωμένος χάρτης του κυπαρισσιού (*Cupressus sempervirens* L.)

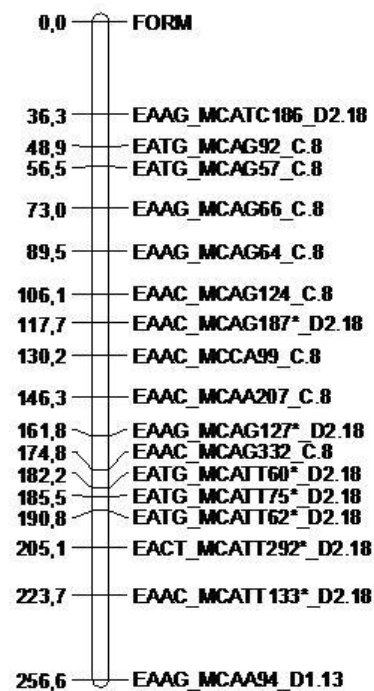


Σχήμα 30. Ολοκληρωμένος χάρτης του κυπαρισσιού (*Cupressus sempervirens* L.)

LG10



LG11



Σχήμα 30. Ολοκληρωμένος χάρτης του κυπαρισσιού (*Cupressus sempervirens* L.)

4.1.7 Ανάπτυξη Γενετικών Χαρτών - Συζήτηση

Οι AFLP και SSR μοριακοί δείκτες έχουν χρησιμοποιηθεί με μεγάλη επιτυχία με σκοπό την δημιουργία γενετικών χαρτών σε πολλά κωνοφόρα (Jones *et al.*, 2009; Aravanopoulos 2014). Η χρήση τους στην παρούσα έρευνα σε συνδυασμό με την ενδεδειγμένη ανάλυση τους στον αλληλουχητή ABI3730xl παρείχε αξιόπιστα και ικανοποιητικά αποτελέσματα για την κατασκευή γενετικών χαρτών στο κυπαρίσσι. Οι 24 συνδυασμοί f-AFLP εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν ανίχνευσαν 1260 πολυμορφικές γονιδιακές θέσεις στους 382 απογόνους της χαρτογραφικής οικογένειας. Ο μέσος όρος πολυμορφικών γονιδιακών θέσεων ανά συνδυασμό εκκινητών ήταν 55.5. Στο είδος *Pinus pinaster* (Chagne *et al.*, 2002) ο μέσος αριθμός πολυμορφικών γονιδιακών θέσεων ανά συνδυασμό εκκινητών ήταν 15, για την *Pinus sylvestris* (Yin *et al.*, 2003) 18 και 19 για την *Pinus elliotti* (Sheperd *et al.*, 2003). Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε μεγαλύτερος αριθμός πολυμορφικών θέσεων ανά συνδυασμό εκκινητών. Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να σχετίζεται με την υψηλή ετεροζυγωτία (Papageorgiou *et al.*, 2005) που υπάρχει στο κυπαρίσσι και τη δημιουργία της χαρτογραφικής οικογένειας από τη διασταύρωση διαφορετικών προελεύσεων.

Συνολικά εντοπίστηκαν 1260 γονιδιακές θέσεις, εκ των οποίων οι 294 παρουσίασαν αναλογία διαχωρισμού απογόνων 1:1. Από αυτές οι 166 ήταν ετεροζύγωτες για το μητρικό γονέα και οι 128 ετεροζύγωτες για τον πατρικό. Στην προηγούμενη προσπάθεια δημιουργίας ομάδων συνδέσεως του κυπαρισσιού με χρήση 32 συνδυασμών εκκινητών RAPD (Manescu *et al.*, 2011) βρέθηκαν 201 γονιδιακές θέσεις με αναλογία διαχωρισμού 1:1. Στην *Cryptomeria japonica* (Nikaido *et al.*, 2000) της ίδιας οικογένειας (Cupressaceae) βρέθηκε παρόμοιος συνολικός αριθμός γονιδιακών θέσεων (305 θέσεις) χρησιμοποιώντας ωστόσο 38 συνδυασμούς AFLP εκκινητών σε δύο F₁ οικογένειες 87 ατόμων, ενώ στην *Pinus sylvestris* ο αριθμός γονιδιακών που βρέθηκε ήταν 277 (Lerceteau *et al.*, 2000) χρησιμοποιώντας 13 συνδυασμούς AFLP εκκινητών σε οικογένεια F₁ αποτελούμενη από 94 άτομα. Στο είδος *Pinus elliotti* (Shepherd *et al.*, 2003) επίσης χρησιμοποιώντας 93 απογόνους F₁ βρέθηκαν 299 γονιδιακές θέσεις με αναλογία διαχωρισμού 1:1 (165 για το μητρικό και 134 για το πατρικό γονέα). Ο αριθμός

γονιδιακών θέσεων με μενδελική αναλογία διαχωρισμού 1:1 στο είδος *Pinus sylvestris* ήταν 320 για το μητρικό και 417 για τον πατρικό γονέα (Yin *et al.*, 2003) χρησιμοποιώντας ωστόσο περισσότερους συνδυασμούς (39) AFLP εκκινητών σε 95 άτομα μια ομοθαλούς οικογένειας πρώτης γενιάς. Συμπερασματικά ο αριθμός των γονιδιακών θέσεων με αναλογία διαχωρισμού 1:1 που βρέθηκε στο κυπαρίσσι χρησιμοποιώντας 24 συνδυασμούς f-AFLP εκκινητών ήταν μεγαλύτερος από αυτούς που βρέθηκε στο είδος *Cryptomeria japonica* (Nikaido *et al.*, 2000), παρόμοιος με αυτόν που βρέθηκε στο είδος *Pinus sylvestris* (Lerceteau *et al.*, 2000) και μικρότερος από αυτόν που βρέθηκε στο είδος *Pinus elliotti* (Shepherd *et al.*, 2003). Ωστόσο οι 294 γονιδιακές θέσεις παρείχαν πληροφοδοτική ικανότητα για την κατασκευή των ομάδων σύνδεσης.

Ο αριθμός των γονιδιακών θέσεων με αναλογία διαχωρισμού απογόνων 3:1 που βρέθηκε (970 γονιδιακές θέσεις) ήταν επίσης υψηλός σε σύγκριση με τη διεθνή βιβλιογραφία, όπου στο είδος *Pinus pinaster* (Chagne *et al.*, 2002) ο αριθμός 3:1 γονιδιακών θέσεων που βρέθηκε από 52 συνδυασμούς AFLP ήταν 523, ενώ στα είδη *Pinus halepensis* (Yin *et al.*, 2003) και *Pinus elliottii* (Shepherd *et al.*, 2003) ο αριθμός των 3:1 γονιδιακών θέσεων ήταν 128 και 329 αντίστοιχα. Η μεγάλη αυτή αναλογία διαχωρισμού απογόνων (3:1) των γονιδιακών θέσεων μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι το κυπαρίσσι παρουσιάζει υψηλή ετεροζυγωτία (Ghosn *et al.*, 2000; Papageorgiou *et al.*, 2005). Συγκεκριμένα η υψηλή ετεροζυγωτία των γονιδιακών θέσεων πρέπει να συνδυαστεί με την γενεαλογία της χαρτογραφικής οικογένειας όπου έχουν συμμετάσχει άριστοι φαινότυποι προερχόμενοι από τρεις φυσικούς πληθυσμούς (Σάμος, Μεγαλόπολη, Ρόδος).

Σε πειράματα διασταυρώσεων που έχουν ως σκοπό τη χαρτογράφηση γονιδιωμάτων με μοριακούς δείκτες η απόκλιση από τους νόμους του Mendel για κάποιους δείκτες είναι συχνό φαινόμενο και αναφέρεται ως παραμορφωτικός διαχωρισμός (segregation distortion, Nikaido *et al.*, 1999). Στο κυπαρίσσι οι δείκτες f-AFLP παρουσίασαν παραμορφωτικό διαχωρισμό σε ένα ποσοστό 42.7% για το μητρικό γονέα και σε ένα ποσοστό 41% για τον πατρικό γονέα ($p < 0.005$) όσον αφορά την αναλογία διαχωρισμού 1:1. Στην εργασία των Manescu *et al.* (2011) στο ίδιο είδος επίσης παρουσιάστηκε παραμορφωτικός διαχωρισμός σε ένα ποσοστό 32%. Στο είδος *Cryptomeria japonica* της ίδιας ταξινομικής οικογένειας (Nikaido *et*

al., 1999%, Tani *et al.*, 2003) βρέθηκε επίσης παραμορφωτικός διαχωρισμός με μέσα έως υψηλά ποσοστά (18-50%). Ο παραμορφωτικός διαχωρισμός στα κωνοφόρα έχει αναφερθεί επίσης στα είδη *Pinus elliotti* σε ποσοστό 35% (Shepherd *et al.*, 2003), *Pinus radiata* 34% (Kuang *et al.*, 1999), *Picea glauca* από 13-19% (Gosselin *et al.*, 2002) και 18% στην *Pseudotsuga menziesii* (Krutovskii *et al.*, 1998). Το φαινόμενο αυτό εμφανίζεται και σε αγγειόσπερμα δασικά είδη όπως στα είδη *Quercus robur* 20% (Barreneche *et al.*, 1998), 14% στην *Populus* (Bradshaw *et al.*, 1994), και 15% στη *Salix exigua* (Aravanopoulos *et al.*, 1993). Ο παραμορφωτικός διαχωρισμός μπορεί να οφείλεται σε έναν μεγάλο αριθμό εμβρυικών υποτελών θανατηφόρων γονιδίων (Manescu *et al.*, 2011; Mukai *et al.*, 1995). Άλλοι λόγοι που συντελούν στο φαινόμενο του παραμορφωτικού διαχωρισμού είναι οι χρωμοσωμικές διαγραφές (Plomion *et al.*, 1995), ή η σύνδεση με άλλες γονιδιακές θέσεις οι οποίες παρουσιάζουν παραμορφωτικό διαχωρισμό εξαιτίας προζυγωτικής ή/και μεταζυγωτικής επιλογής (Manescu *et al.*, 2011; Kuang *et al.*, 1999; Gomez *et al.*, 2002). Η τελευταία εξήγηση ενδεχομένως ισχύει και στην παρούσα διασταύρωση που περιέχει την τυπική μορφή ενός είδους και μιας ποικιλίας η οποία προέκυψε στη φύση από μετάλλαξη και στην συνέχεια καθιερώθηκε και εξαπλώθηκε μέσω τεχνητής επιλογής (Manescu *et al.*, 2011).

Για το κυπαρίσσι (*Cupressus sempervirens* L.) δημιουργήθηκαν δύο ξεχωριστοί χάρτες πλαισίου, ένας για την οριζοντιόκλαδη και ένας για την ορθόκλαδη ποικιλία του κυπαρισσιού. Η δημιουργία των γονικών χαρτών πλαισίου βασίστηκε σε πολύ αυστηρές τιμές κατωφλίου (LOD=6.0 και $\theta=0.3$), σε σχέση με τη διεθνή βιβλιογραφία (LOD=3.0 και $\theta=0.3$). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η θέσπιση πολύ αυστηρών τιμών αυξάνει την αξιοπιστία των δημιουργούμενων ομάδων σύνδεσης (Grattapaglia *et al.*, 1995). Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν γονιδιακές θέσεις f-AFLP με αναλογία διαχωρισμού 1:1 και οι γονιδιακές θέσεις f-SSR που παρουσιάζουν συγκυριαρχία. Το συνολικό μήκος του μητρικού χάρτη πλαισίου ήταν 818.58 cM ενώ του πατρικού ήταν 560.33 cM. Οι ομάδες σύνδεσης που είχαν δημιουργηθεί για την οριζοντιόκλαδη μορφή και για την ορθόκλαδη μορφή (με χαρτογράφηση οικογένειας 55 ατόμων) είχαν συνολικό μήκος μητρικού και πατρικού χάρτη πλαισίου 160.1 και 144.5 cM αντίστοιχα (Manescu *et al.*, 2011). Οι γονιδιακές θέσεις f-AFLP με παραμορφωτικό διαχωρισμό 1:1 ($p<0.005$)

χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των χαρτών, καθώς ο παραμορφωτικός διαχωρισμός των γονιδιακών θέσεων έχει πολύ μικρή επίδραση τόσο στην τοποθέτηση τους στις ομάδες σύνδεσης όσο και στο μήκος του χάρτη, ειδικά όταν το μέγεθος της χαρτογραφικής οικογένειας είναι υψηλό, όπως στην παρούσα περίπτωση (Hackett και Broadfoot 2003). Οι δείκτες με αναλογία παραμορφωτικού διαχωρισμού 1:1 έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς για την κατασκευή γενετικών χαρτών σε οικογένειες μεγάλου μεγέθους, όπως για παράδειγμα στην *Pinus elliotti* var. *elliotti* (Sheperd *et al.*, 2003), στην *Pinus taeda* (Remington *et al.*, 1999) κ.α.

Η δημιουργία του ενιαίου χάρτη πλαισίου παρείχε συνολικό μήκος χάρτη 1228.72 cM, αποτελούμενο από 11 ομάδες σύνδεσης χρησιμοποιώντας τα συγκεκριμένα αυστηρά κριτήρια κατωφλίου (LOD=6, $\theta=0.3$). Στον χάρτη πλαισίου προστέθηκαν οι γονιδιακές θέσεις με αναλογία 3:1 που δεν παρουσίασαν παραμορφωτικό διαχωρισμό ($p>0.05$), με αποτέλεσμα το τελικό μήκος του χάρτη να διαμορφωθεί στα 2.146.9, cM, με έντεκα ομάδες σύνδεσης και μέση απόσταση δεικτών 22.8 cM. Η στρατηγική που ακολουθήθηκε για τη δημιουργία των χαρτών, παρουσιάζει υψηλή αξιοπιστία και είναι η πλέον διαδεδομένη στην διεθνή βιβλιογραφία, όπου τοποθετούνται αρχικά οι δείκτες πλαισίου (framework markers) με αναλογία διαχωρισμού 1:1 σε ομάδες σύνδεσης και έπειτα γίνεται ο περαιτέρω εμπλουτισμός του χάρτη με πρόσθετους δείκτες (additional markers). Η ίδια στρατηγική έχει ακολουθηθεί στη δημιουργία του πρώτου γενετικού χάρτη στο κυπαρίσσι (Manescu *et al.*, 2011), του γενετικού χάρτη της *Pinus taeda* (Sewell *et al.*, 1999), της *Pinus sylvestris* (Yin *et al.*, 2003), της *Picea abies* (Scotti *et al.*, 2005), της *Pinus taeda* (Sewell *et al.*, 1999; Komulainen *et al.*, 2003), της *Pinus pinaster* (Ritter *et al.*, 2002; Chagne *et al.*, 2002) κ.α.

Επιπλέον, ο γενετικός χάρτης που δημιουργήθηκε στο κυπαρίσσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως χάρτης αναφοράς και να εμπλουτιστεί με περισσότερους μοριακούς δείκτες (SNPs, ISSRs, ESTs), παρέχοντας την δυνατότητα κατανόησης και οργάνωσης του γονιδιώματος καθώς και τη δυνατότητα μελέτης QTL γνωρισμάτων, καθώς η χαρτογραφική οικογένεια είναι διατηρήσιμη για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα (perpetual mapping population).

Ένας από τους επιμέρους στόχους της παρούσας έρευνας ήταν να χαρτογραφηθεί και το γνώρισμα της μορφής της κόμης. Με κριτήριο τη φαινοτυπική

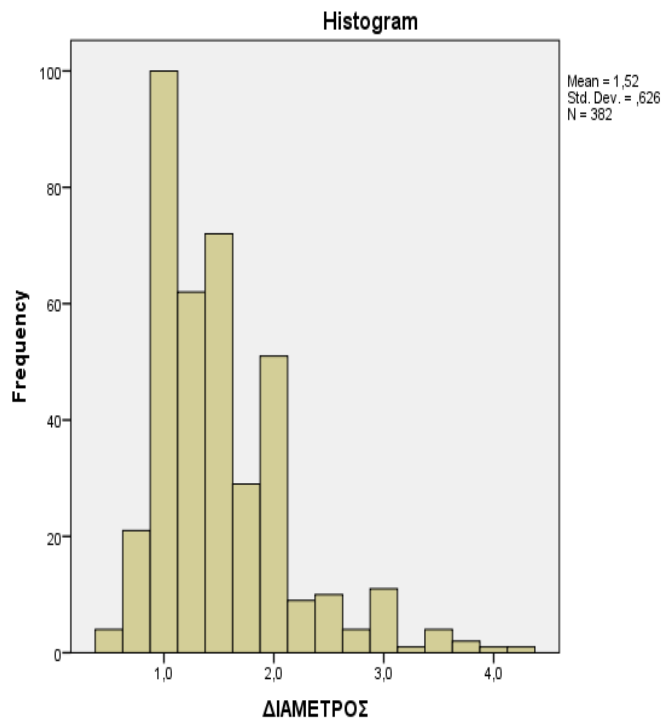
παραλλακτικότητα των απογόνων, σύμφωνα με τη δοκιμή Bouroulet (Bouroulet *et al.*, 1993) που οδηγεί σε ποιοτικό κριτήριο κατάταξης, το γνώρισμα για τη μορφή της κόμης χαρτογραφήθηκε σε απόσταση 36.3 cM στο 11^ο χρωμόσωμα του ενιαίου χάρτη πλαισίου. Σε προηγούμενη χαρτογράφηση ο δείκτης για την μορφή της κόμης βρέθηκε στενά συνδεδεμένος με ένα μοριακό δείκτη RAPD (OPE12-570) σε απόσταση 5.9 cM (Manescu *et al.*, 2011). Σε συνέχεια των παραπάνω αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε ανίχνευση QTL που συνδέονται με το γνώρισμα της κόμης, έτσι ώστε να διερευνηθούν τα υποκείμενα γονίδια που ελέγχουν το γνώρισμα της κόμης.

4.2 Ποσοτικά Γνωρίσματα

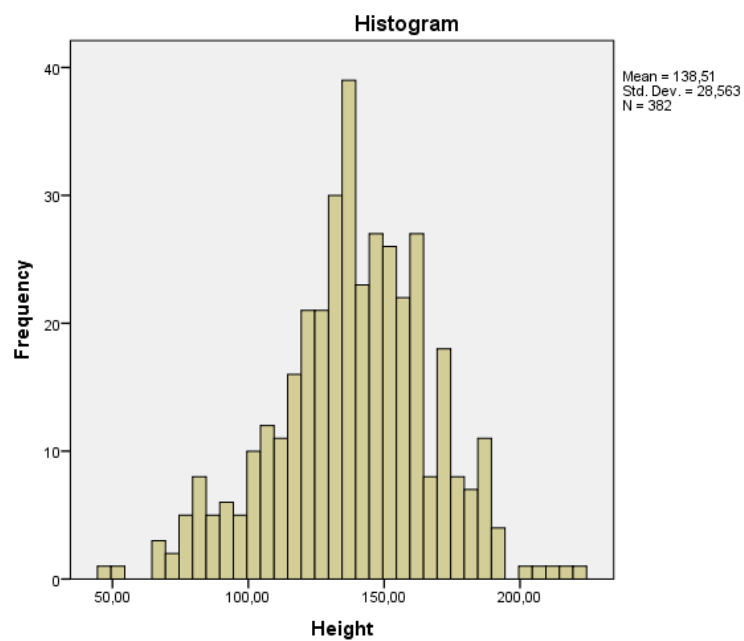
Για τα αυξητικά γνωρίσματα του ύψους και διαμέτρου των τεσσάρων ετών δενδρυλλίων της χαρτογραφικής οικογένειας (N=382), εκτιμήθηκαν αρχικά παράμετροι περιγραφικής στατιστικής. Υπολογίστηκε ο αριθμητικός μέσος όρος, η τυπική απόκλιση, ο συντελεστής διακύμανσης και το τυπικό σφάλμα (Πίνακας 14). Τα ποσοτικά γνωρίσματα, διαμέτρου και ύψους (Σχήμα 31, Σχήμα 32) πληρούσαν τον έλεγχο κανονικότητας.

Πίνακας 14. Περιγραφικά στατιστικά της διαμέτρου και του ύψους των δέντρυλλίων (cm).

Περιγραφικά στατιστικά	Διάμετρος	Ύψος
Μέσος όρος	1.52	138.50
Τυπική απόκλιση	0.62	28.56
Συντελεστής κύμανσης	41.17	20.62



Σχήμα 31. Κατανομή των μετρήσεων για το γνώρισμα της διαμέτρου.

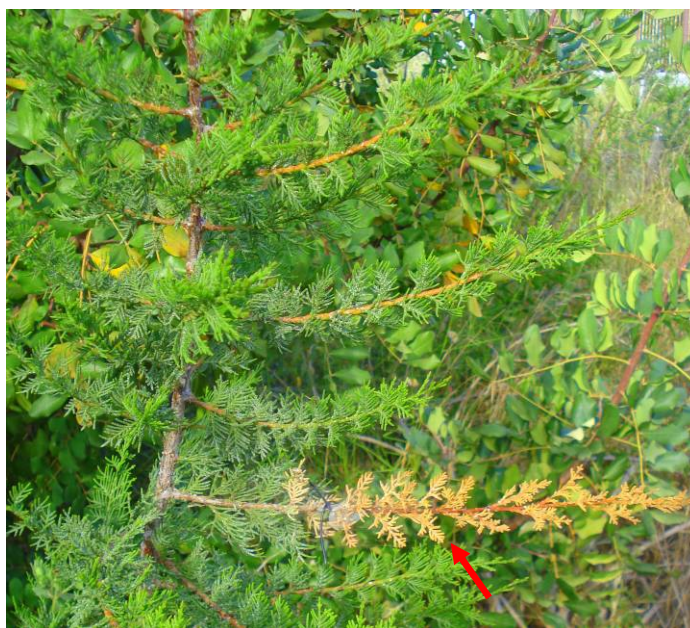


Σχήμα 32. Κατανομή των μετρήσεων για το γνώρισμα του ύψους.

4.2.1 Αποτελέσματα από την ανίχνευση ανθεκτικότητας στο μύκητα *Seiridium cardinale*

Η μόλυνση με το μύκητα *Seiridium cardinale* ήταν επιτυχής στο σύνολο των φυτών που εμβολιάστηκαν (N=300), δηλαδή σε ποσοστό 100%. Σε αρκετούς κλάδους, κυρίως μικρής διαμέτρου (3-6mm), είχε νεκρωθεί το ακραίο τμήμα ως συνέπεια της προσβολής από το μύκητα (Σχήμα 33). Η μόλυνση ήταν εμφανής από τη νέκρωση του φλοιού και τη δημιουργία έλκους γύρω από το σημείο εμβολιασμού με το μύκητα καθώς και από την παρουσία εκροής ρητίνης (Σχήμα 34). Επίσης, με τη χρησιμοποίηση μεγεθυντικού φακού παρατηρήθηκαν καρποφορίες (ακέρβουλα) του μύκητα στην επιφάνεια του προσβεβλημένου φλοιού (Σχήμα 35), στην πλειονότητα των ελκών. Στο εργαστήριο επιβεβαιώθηκε η παρουσία του *Seiridium cardinale* με την εξέταση στο μικροσκόπιο παρασκευασμάτων από καρποφορίες του μύκητα και την παρατήρηση των χαρακτηριστικών σπορίων (κονιδίων) του μύκητα (Σχήμα 36). Επίσης, ο μύκητας *Seiridium cardinale* απομονώθηκε από ακέρβουλα και νεκρωτικούς ιστούς από ορισμένους κλάδους. Σε όλους τους μάρτυρες, που εμβολιάστηκαν με αποστειρωμένο υπόστρωμα, δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός έλκους και καρποφοριών του μύκητα, ενώ είχε δημιουργηθεί επουλωτικός ιστός στο σημείο εμβολιασμού (Σχήμα 37).

Σύμφωνα με την εκτίμηση του βαθμού ανθεκτικότητας χρησιμοποιώντας κλίμακα από το 1 έως το 3 με διαβαθμίσεις 0,33 (1 1,33 1,66 2) υπολογίστηκαν τα ποσοστά ανθεκτικότητας. Το ποσοστό ανθεκτικών ατόμων ανήλθε στο 22.64% (τιμές 1-1.99), των μερικώς ανθεκτικών σε 70.94% (τιμές 2.00-2.33) και των ευπαθών σε 6.42% (2.66 και 3). Ένας γενότυπος παρουσίασε πλήρη επούλωση της πληγής και στα δύο κλαδιά στα οποία πραγματοποιήθηκε ο εμβολιασμός με το μύκητα (Σχήμα 38). Ο γενότυπος αυτός πήρε την τιμή «1» στην κατάταξη της ανθεκτικότητας.



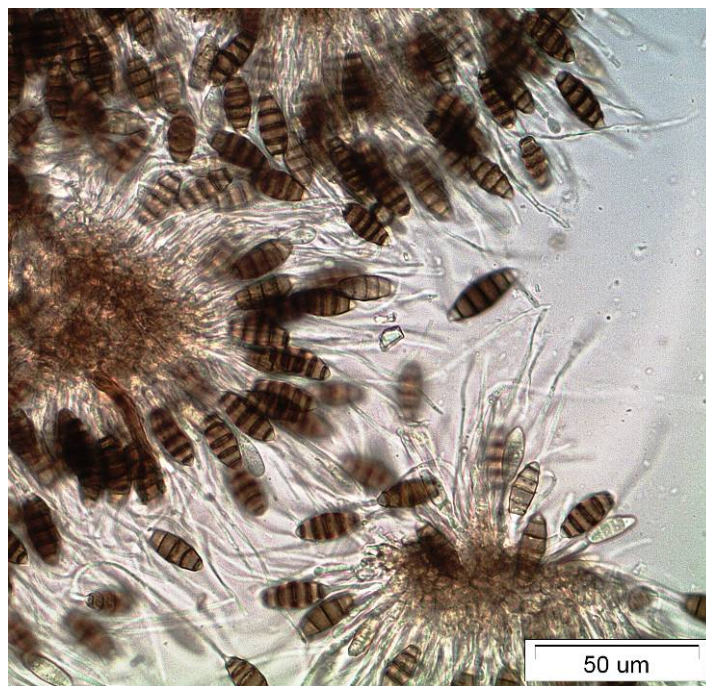
Σχήμα 33. Νέκρωση πλάγιων κλαδίσκων μικρής διαμέτρου από τον μύκητα *Seiridium cardinale*.



Σχήμα 34. Εκροή ρητίνης στο σημείο εμφολιασμού με το μύκητα.



Σχήμα 35. Ακέρβουλα (καρποφορίες του μύκητα στην επιφάνεια του φλοιού).



Σχήμα 36. Κονίδια του μύκητα, απεικόνιση στο μικροσκόπιο.



Σχήμα 37. Μάρτυρας, επουλωτικός ιστός στο σημείο εμβολιασμού.



Σχήμα 38. Επούλωση των μολύνσεων στα δύο πλευρικά κλαδιά στο γενότυπο 270, ανθεκτικότητα 100%.

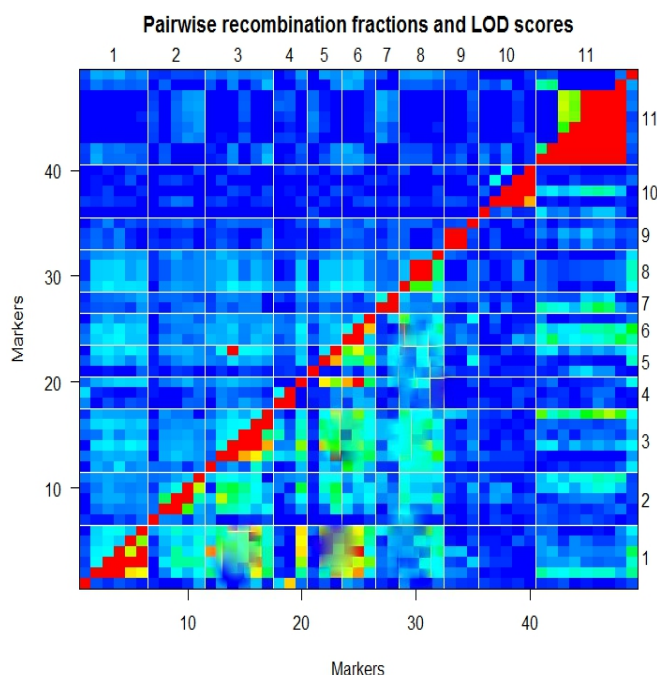
4.2.2 Ανίχνευση γονιδιακών θέσεων Ποσοτικών Γνωρισμάτων QTLs

Τα δεδομένα που προέκυψαν από τον ενιαίο χάρτη πλαισίου του κυπαρισσιού εισήχθησαν στο ειδικό λογισμικό ανάλυσης RQTL (Broman *et al.*, 2003) με σκοπό την εύρεση των χρωμοσωμικών περιοχών και των δεικτών που σχετίζονται με τη μορφή της κόμης, την ανθεκτικότητα στο έλκος του κυπαρισσιού, το ύψος και τη

διάμετρο των δεντρολλίων. Η σχηματική αναπαράσταση όλων των ανασυνδυασμών παρουσιάζεται στο Σχήμα 39.

4.2.3 Διερεύνηση ύπαρξης QTL για το ποσοτικό γνώρισμα της μορφής της κόμης

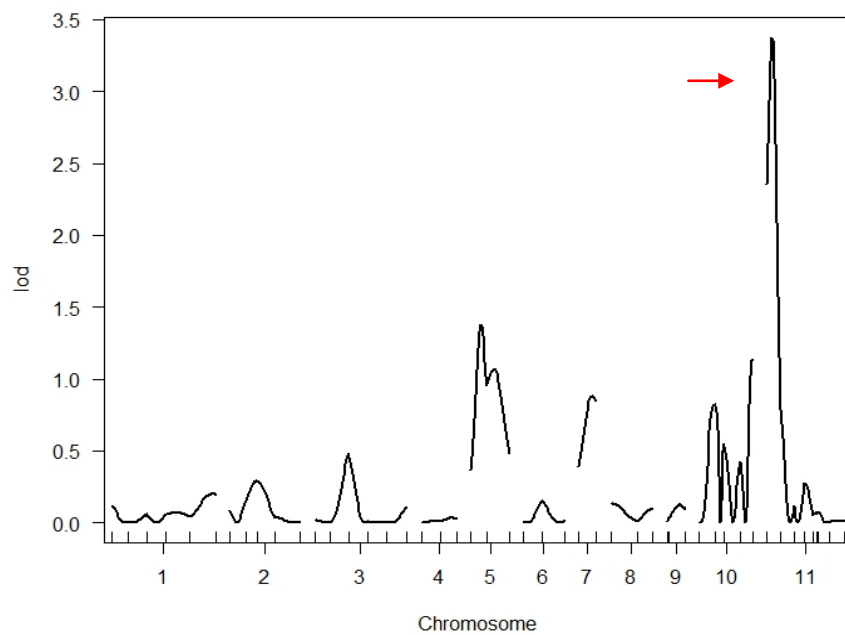
Για τη μορφή της κόμης τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 15 και στο Σχήμα 40. Εντοπίστηκε τουλάχιστον ένα QTL που ελέγχει τη μορφή της κόμης και βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11. Το συγκεκριμένο QTL συνδέεται με ένα δείκτη f-AFLP (EAAG_MCATC186) με υψηλή σημαντικότητα ($LOD=3.3$) και από το Σχήμα 41 φαίνεται ότι η ύπαρξη του αλληλομόρφου B είναι δείκτης της οριζοντιόκλαδης μορφής. Επιπροσθέτως, ένα δεύτερο QTL ανιχνεύθηκε με τιμή $LOD=1.45$ στο χρωμόσωμα 5 ($0.001 < p < 0.004$).



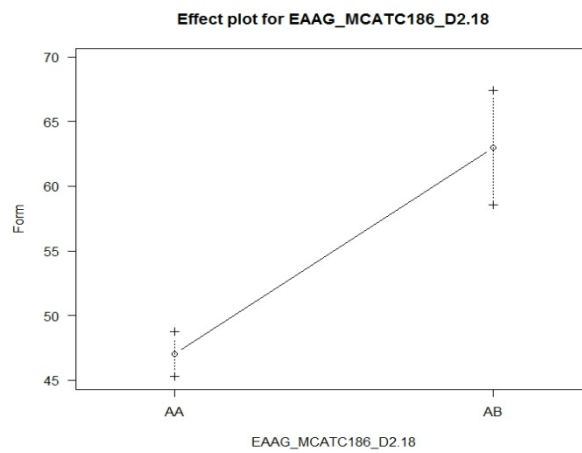
Σχήμα 39. Απεικόνιση των ανασυνδυασμών του χάρτη πλαισίου σε συνδυασμό με το δεκαδικό λογάριθμο πιθανοφάνειας (LOD).

Πίνακας 15. Χρωμόσωμα, γενετικοί δείκτες, θέση στο χάρτη και τιμές LOD για το γνώρισμα μορφή της κόμης.

Χρωμόσωμα	Γενετικός Δείκτης	Θέση στο χάρτη (cM)	LOD
1	EATG_MCAA144_D1.13	172.0	0.42
2	EAAC_MCCT121_D1.13	48.2	0.14
3	EATG_MCCA169_D1.13	58.7	0.64
4	EATG_MCAA128_D2.18	60.0	0.05
5	EAAG_MCAA178_D1.13	16.0	1.45
6	EAAC_MCAA85_D1.13	70.8	0.12
7	EAAC_MCAG207*_D1.13	23.0	0.96
8	EAAC_MCATT186_D1.13	69.0	0.06
9	EAAG_MCCA88_D1.13	22.0	0.19
10	EAAC_MCATC69*_D2.18	52.0	0.84
11	EAAG_MCATC186_D2.18	7.0	3.3



Σχήμα 40. Τιμές LOD και σχηματική αναπαράσταση του QTL που εμφανίζει τιμή 3.3 στο χρωμόσωμα 11.



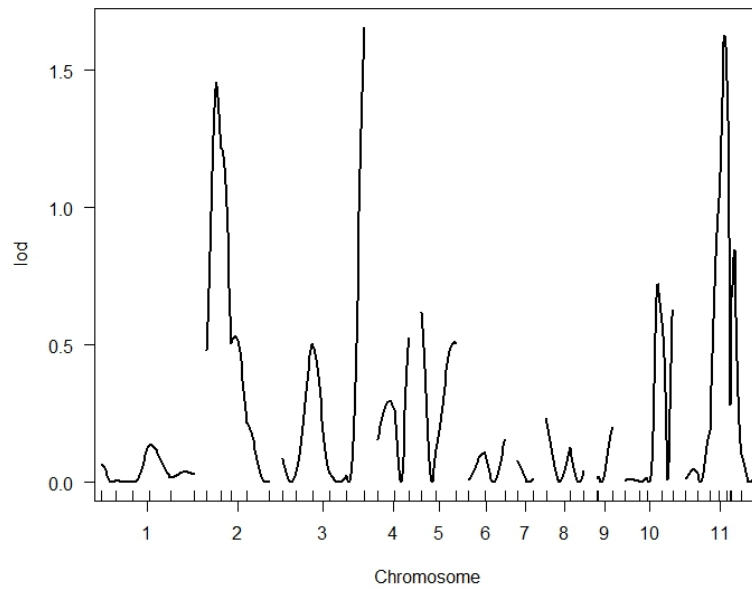
Σχήμα 41. Σχηματική αναπαράσταση της επίδρασης του δείκτη EAAG_MCATC186.

4.2.4 Διερεύνηση ύπαρξης QTL για το ποσοτικό γνώρισμα του ύψους

Για την εύρεση QTL που συνδέονται με το ύψος τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 16. Ανιχνεύθηκαν δύο τουλάχιστον QTL που επηρεάζουν το γνώρισμα του ύψους όπως φαίνεται από το συνδυασμό του Πίνακα 16 και του Σχήματος 42, τα οποία βρίσκονται στα χρωμοσώματα 3 και 11. Τα συγκεκριμένα QTL συνδέονται με δύο δείκτες με τιμές LOD 1.65 και 1.63 αντίστοιχα ($0.001 < p < 0.004$).

Πίνακας 16. Χρωμόσωμα, γενετικοί δείκτες, θέση τους σε μήκος βάσεων και τιμές LOD για το γνώρισμα του ύψους.

Χρωμόσωμα	Δείκτης	Θέση στο χάρτη	LOD
1	EATG_MCAA173_D1.13	93.5	0.13
2	EACT_MCCT121_D1.13	18.0	1.45
3	EATG_MCCA70*_D1.13	160.4	1.65
4	EATG_MCAA128_D2.18	61.5	0.52
5	EAAG_MCATT60_D2.18	0.0	0.62
6	EAAC_MCAA85_D1.13	70.8	0.15
7	EAAC_MCAG136*_D1.13	0.0	0.07
8	EATG_MCAA222_D2.18	0.0	0.23
9	EAAG_MCCA88_D1.13	30.4	0.20
10	EACT_MCCT71_D2.18	62.0	0.72
11	EATG_MCATT62*_D2.18	76.0	1.63



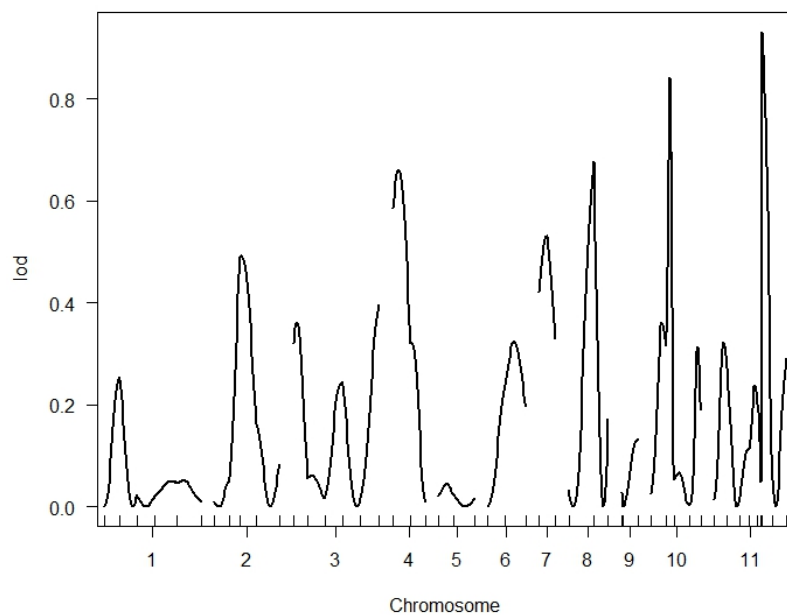
Σχήμα 42. Τιμές LOD και σχηματική αναπαράσταση του QTL για το ύψος.

4.2.5 Διερεύνηση ύπαρξης QTL για το ποσοτικό γνώρισμα της διαμέτρου

Για το γνώρισμα της διαμέτρου, οι τιμές του LOD κυμάνθηκαν σε επίπεδα από 0.04 έως 0.93 (Πίνακας 17, Σχήμα 43). Κατόπιν αυτού του αποτελέσματος δεν έγινε περαιτέρω ανάλυση για το γνώρισμα αυτό.

Πίνακας 17. Χρωμόσωμα, δείκτες, θέση τους στο χάρτη και τιμές LOD για το γνώρισμα της διαμέτρου.

Χρωμόσωμα	Δείκτης	Θέση στο χάρτη	LOD
1	EATG_MCAA114*_D1.13	27.5	0.25
2	EAAC_MCCT121_D1.13	50.0	0.49
3	EATG_MCCA70*_D1.13	160.4	0.39
4	EAAG_MCCA128_D1.13	12.0	0.66
5	EAAG_MCAA178_D1.13	14.0	0.04
6	EATG_MCAA195*_D1.13	50.0	0.32
7	EAAC_MCAG136*_D1.13	12.0	0.53
8	EATG_MCAA98_D2.18	46.2	0.67
9	EAAG_MCCA88_D1.13	28.0	0.13
10	EAAC_MCCT59_D2.18	34.0	0.84
11	EATG_MCATT75*_D2.18	89.2	0.93



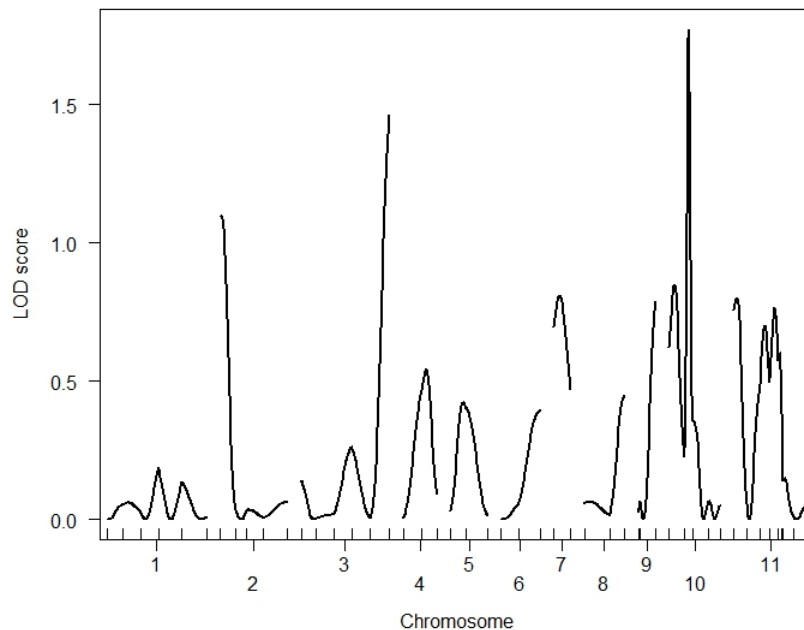
Σχήμα 43. Τιμές LOD και σχηματική αναπαράσταση του QTL για τη διάμετρο.

4.2.6 Διερεύνηση ύπαρξης QTL για το ποσοτικό γνώρισμα της ανθεκτικότητας στο έλκος του κυπαρισσιού

Για την ανθεκτικότητα στην ασθένεια του έλκους του κυπαρισσιού τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 18. Ανιχνεύθηκαν τουλάχιστον δύο QTL που συνδέονται με δύο δείκτες με τιμές $LOD=1.78$ ($0.001 < p < 0.004$) και $LOD=1.48$ ($0.001 < p < 0.004$) στα χρωμοσώματα 10 και 3 αντίστοιχα (Σχήμα 44).

Πίνακας 18. Χρωμόσωμα, δείκτης, θέση τους στο χάρτη και τιμές LOD για το γνώρισμα της ανθεκτικότητας.

Χρωμόσωμα	Δείκτης	Θέση στο χάρτη	LOD
1	EATG_MCAA173_D1.13	93.5	0.19
2	EACT_MCAA83_D2.18	2.0	1.07
3	EATG_MCCA70*_D1.13	160.4	1.48
4	EAAG_MCCA137_D1.13	42.0	0.55
5	EAAG_MCAA178_D1.13	22.0	0.43
6	EAAC_MCAA85_D1.13	70.8	0.40
7	EAAC_MCAG136*_D1.13	10.0	0.81
8	EAAC_MCATT186_D1.13	73.7	0.45
9	EAAG_MCCA88_D1.13	30.4	0.77
10	EAAC_MCCT60*_D2.18	36.0	1.78
11	EAAG_MCATC186_D2.18	6.0	0.80



Σχήμα 44. Τιμές LOD και σχηματική αναπαράσταση του QTL για την ανθεκτικότητα.

4.2.7 Χαρτογράφηση QTL – Συζήτηση

Η χαρτογράφηση QTL γνωρισμάτων στα δασικά δέντρα και ιδιαίτερα στα κωνοφόρα έχει προσφέρει γενικά σημαντικές πληροφορίες για τον εντοπισμό γονιδιακών θέσεων που ελέγχουν ποιοτικά και ποσοτικά γνωρίσματα οικονομικής σημασίας (Ritter *et al.*, 2011). Στην παρούσα εργασία με τα δεδομένα που προέκυψαν από τη χαρτογράφηση, ερευνήθηκαν QTL που συνδέονται με τη μορφή της κόμης, το ύψος, τη διάμετρο και την ανθεκτικότητα στο έλκος του κυπαρισσιού. Ο σκοπός ήταν να βρεθούν οι χρωμοσωμικές περιοχές και πιθανοί γενετικοί δείκτες οι όποιοι είναι συνδεδεμένοι με τα υποκείμενα γονίδια, τα οποία ελέγχουν τα παραπάνω γνωρίσματα.

Ένα από τα πλεονεκτήματα της παρούσας μελέτης ήταν ότι η ανίχνευση των QTLs πραγματοποιήθηκε σε πολύ μεγάλη χαρτογραφική οικογένεια με αριθμό απογόνων $N=382$. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία το μέγεθος της χαρτογραφικής οικογένειας είναι κύριας σημασίας για την ανίχνευση χρωμοσωμικών περιοχών που

ελέγχουν σημαντικά ποσοτικά γνώρισμα (Darvasi *et al.*, 1993; Plomion *et al.*, 1995).

Όσον αφορά τη μορφή της κόμης ανιχνεύθηκε ένα QTL που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11 και συνδέεται με υψηλή στατιστική σημαντικότητα με ένα δείκτη AFLP (LOD=3.3). Ουσιαστικά βρέθηκε ότι η παρουσία του αλληλομόρφου B στη γονιδιακή θέση EAAG_MCATC186 αποτελεί δείκτη παρουσίας της οριζοντιόκλαδης μορφής και μπορεί να αποτελέσει μοριακό δείκτη πρόωμης επιλογής, θέτοντας σε εφαρμογή την υποβοηθούμενη από γονίδια σημάσεως επιλογή (marker assisted selection, MAS). Είναι μια από τις ελάχιστες φορές στη διεθνή βιβλιογραφία όπου το γνώρισμα της κόμης έχει χαρτογραφηθεί και ανιχνεύθηκε ένα QTL που φαίνεται να ελέγχει τη μορφή της κόμης. Πέραν των αποτελεσμάτων αυτών, είναι απαραίτητη η συνέχιση της σχετικής έρευνας με περισσότερους μοριακούς δείκτες και η επαλήθευση του συγκεκριμένου QTL. Σε προηγούμενη έρευνα από τους Manescu *et al.* (2011), είχε βρεθεί σύνδεση με έναν δείκτη RAPD και το γνώρισμα είχε χαρτογραφηθεί σε απόσταση 5.9 cM. Στο είδος *Picea abies* f. *pendula* (Lehner *et al.*, 1995) βρέθηκε ότι η ύπαρξη στενόκομων ατόμων και η κυριαρχία κορυφής ελέγχεται από ένα μόνο γονίδιο. Επειδή τα QTLs ποικίλλουν στην έκφραση τους και επηρεάζονται από το περιβάλλον, το πείραμα θα ήταν χρήσιμο να επαναληφθεί σε διαφορετικό περιβάλλον έτσι ώστε να εξακριβωθεί η έκφραση του QTL στο χρόνο και στο χώρο. Παρόμοιες εργασίες σε QTL ως προς τη σταθερότητα έκφρασης έχουν γίνει για γνώρισμα αύξησης στο είδος *Pinus pinaster* (Plomion *et al.*, 2006) και για γνώρισμα ποιότητας ξύλου στο είδος *Pinus taeda* (Sewell *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2003).

Για το γνώρισμα του ύψους βρέθηκαν δύο QTL στα χρωμοσώματα 3 και 11. Τα συγκεκριμένα QTL συνδέονται με δύο μοριακούς δείκτες AFLP με τιμές LOD 1.65 και 1.63 αντίστοιχα ($0.001 < p < 0.004$). Σε αντίστοιχη έρευνα των Markussen *et al.* (2003) στο είδος *Pinus pinaster* και στο είδος *Pinus sylvestris* (Lerceteau *et al.*, 2000) βρέθηκαν τρία QTL και στα δύο είδη. Στην *Pinus palustris* Mill. × *P. elliottii* Engl. οι Weng *et al.* (2000) βρήκαν 5 QTL για τα ύψος με τιμές LOD που κυμαινόταν από 2.0-4.0. Το ενδεχόμενο το γνώρισμα του ύψους να ελέγχεται από πολλά γονίδια με μικρές επιδράσεις, οδηγεί σε δυσκολία ανίχνευσης QTL είτε λόγω του μικρού μεγέθους του χαρτογραφημένου πληθυσμού, είτε λόγω μεγάλων

χαρτογραφικών αποστάσεων μεταξύ των δεικτών στο χάρτη (Markussen *et al.*, 2003; Lerceteau *et al.*, 2000), όπως φαίνεται να ισχύει και στην παρούσα περίπτωση. Ωστόσο οι τιμές LOD που βρέθηκαν στην παρούσα εργασία παρόλο που παρουσιάζουν στατιστική σημαντικότητα, δεν εμφανίζουν υψηλές τιμές LOD. Για το λόγο αυτό επιβάλλεται περαιτέρω ανάλυση στη μόνιμη χαρτογραφική οικογένεια, όταν θα είναι διαθέσιμοι, περισσότεροι μοριακοί δείκτες (π.χ. ESTs, ISSR, SNPs).

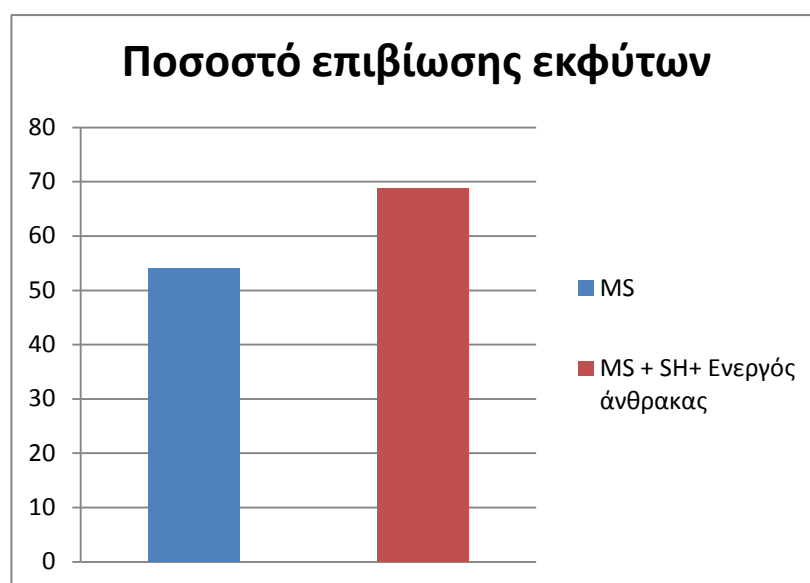
Για το γνώρισμα της διαμέτρου ωστόσο δεν ανιχνεύθηκε στατιστικά σημαντική τιμή LOD που να συνδέει κάποιο εν δυνάμει QTL με χαρτογραφημένο γενετικό δείκτη. Τα αποτελέσματα αυτό ενδεχομένως να οφείλεται στο γεγονός ότι και οι γονικοί γενότυποι δεν παρουσίαζαν σημαντικές διαφορές όσον αφορά το γνώρισμα της διαμέτρου, με αποτέλεσμα το γνώρισμα αυτό να μην παρουσιάσει επαρκή φαινοτυπικό διαχωρισμό στους απογόνους. Επίσης, καθώς η καταγραφή του ποσοτικού γνωρίσματος έγινε σε νεαρή ηλικία όπου δεν υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση των ατόμων της χαρτογραφικής οικογένειας για το γνώρισμα της διαμέτρου, το γνώρισμα πρέπει να επανα-καταγραφεί και στη συνέχεια να χαρτογραφηθεί σε μεγαλύτερη ηλικία. Στα κωνοφόρα δεν υπάρχει εκτεταμένη βιβλιογραφία όσον αφορά την εύρεση QTL για το ποσοτικό γνώρισμα της διαμέτρου. Ωστόσο στην *Pinus pinaster*, οι Markussen *et al.* (2003) αναφέρουν την ανίχνευση επτά κύριων QTL για το γνώρισμα της διαμέτρου.

Τέλος για το γνώρισμα της ανθεκτικότητας στο έλκος του κυπαρισσιού χρησιμοποιήθηκε η φαινοτυπική κατάταξη με κλίμακα από 1 έως το 3 και με διαβαθμίσεις 0.33 για την ανίχνευση QTL που συνδέεται με την ανθεκτικότητα. Η μεθοδολογία αυτή χρησιμοποιείται ευρέως στη βιβλιογραφία για ανίχνευση της ανθεκτικότητας (Tsopelas *et al.*, 2007; Xenopoulos, 1991). Στην παρούσα έρευνα βρέθηκαν δύο QTL που είναι ασθενώς συνδεδεμένα με δύο δείκτες με τιμές LOD = 1.78 ($0.001 < p < 0.004$) και LOD = 1.48 ($0.001 < p < 0.004$) στα χρωμοσώματα 10 και 3 αντίστοιχα. Παρόλο που η πιθανότητα σύνδεσης είναι στατιστικά σημαντική η τιμή LOD δεν είναι υψηλή. Ωστόσο σημειώνεται ότι τα παραπάνω αποτελέσματα είναι από τα ελάχιστα που είναι διαθέσιμα στη διεθνή βιβλιογραφία και είναι η πρώτη φορά που ανιχνεύονται QTL ανθεκτικότητας σε μέλος της ταξινομική οικογένειας Cupressaceae και μια από τις λίγες φορές που παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάζονται για ένα κωνοφόρο είδος. Γενικά, καθώς οι περισσότερες αναφορές

στη διεθνή βιβλιογραφία για τα κωνοφόρα έχουν εστιάσει στην ανίχνευση QTL που σχετίζονται με την αύξηση και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του ξύλου (Rittland *et al.*, 2011), η βιβλιογραφία που σχετίζεται με την ανίχνευση QTL για ανθεκτικότητα σε παθογόνα είναι πολύ περιορισμένη. Μια από τις λίγες αναφορές που υπάρχουν στη βιβλιογραφία αφορά την ανθεκτικότητα στο *Cronartium quercuum* του είδους *Pinus taeda* (Li *et al.*, 2006) και αναφέρει την ύπαρξη 1-2 κυρίων γονιδίων που την ελέγχουν. Στο είδος *Pinus radiata* (Devey *et al.*, 2004b) επίσης, χρησιμοποιώντας ανάλυση μοναδιαίου παράγοντα ανιχνεύθηκαν τέσσερα QTL. Παρόμοιες έρευνες διερεύνησης της ανθεκτικότητας ως ποσοτικό γνώρισμα έχουν πραγματοποιηθεί κυρίως σε γεωργικά είδη, όπως στο αμπέλι (*Vitis vinifera*) (Fischer *et al.*, 2004; Welter *et al.*, 2007) όπου ανιχνεύθηκαν QTL για ανθεκτικότητα σε μύκητες, στο ρύζι (*Oryza sativa*) (Sallaud *et al.*, 2003) όπου ανιχνεύθηκαν πέντε QTL που ελέγχουν την ανθεκτικότητα στον παθογόνο μύκητα *Magnaporthe grisea*, στο κριθάρι (Toojinda *et al.*, 2000) κ.α.

4.3 Αποτελέσματα Ιστοκαλλιέργειας του κυπαρισσιού

Ως θρεπτικό υπόστρωμα επιλέχθηκε ο συνδυασμός των θρεπτικών διαλυμάτων SH (Giovanelli and Carlo, 2007) για τα μακροστοιχεία και MS για τα μικροστοιχεία με προσθήκη μικρής ποσότητας ενεργού άνθρακα (100mg/L). Ο πολλαπλασιασμός πραγματοποιήθηκε με τη μεταφορά τμημάτων του βλαστού με οφθαλμό σε νέο θρεπτικό υπόστρωμα. Στο MS υπόστρωμα παρουσιάστηκε μικρότερο ποσοστό επιβίωσης των εκφύτων (54%) συγκριτικά με το υπόστρωμα, στο οποίο προστέθηκε ο ενεργός άνθρακας όπου οι βλαστοί προσαρμόστηκαν και αναπτύσσονταν κανονικά. Το ποσοστό επιβίωσης ανήλθε σε 68,75 % (Σχήμα 45).



Σχήμα 45. Το ποσοστό επιβίωσης των εκφύτων στα θρεπτικά διαλύματα SH και MS με προσθήκη ενεργού άνθρακα.

4.4 Επιγενετική ανάλυση – Κληρονομησιμότητα των μεθυλιωμένων περιοχών του DNA και συσχέτιση με ποσοτικά γνωρίσματα

4.4.1 Εκτίμηση της σχετικής CG, CNG, CG/CNG μεθυλίωσης και απομεθυλίωσης του DNA στο κυπαρίσσι

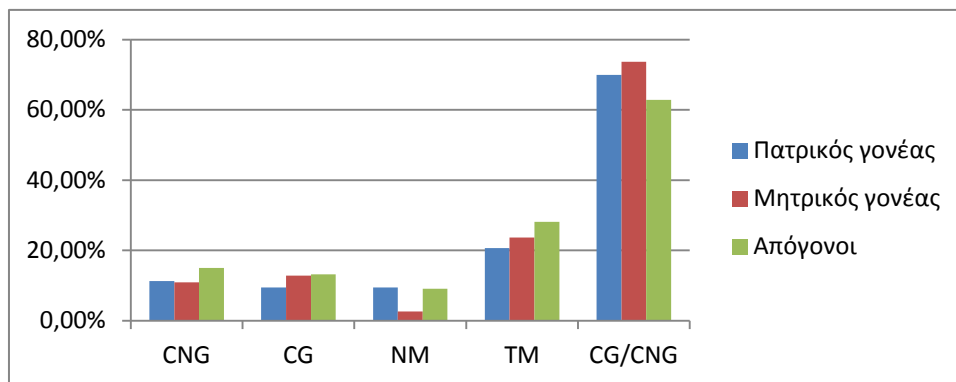
Η συνολική μεθυλίωση που ανιχνεύθηκε στους απογόνους κυμάνθηκε από 0.13-0.44, με μέσο όρο 0.282 και ήταν υψηλότερη από τη μέση τιμή των γονέων (Πίνακας 19, 20). Η CG μεθυλίωση που ανιχνεύθηκε ήταν $0.15 \pm 0.05\%$ ενώ η CNG μεθυλίωση στους απογόνους βρέθηκε να είναι $0.13 \pm 0.03\%$. Η μεθυλίωση CNG είχε μέσο όρο 0.62% στους απογόνους. Η συνολική μη-μεθυλίωση του DNA κυμάνθηκε από 0.02-0.18, με μέσο όρο 0.09 για τους απογόνους και διέφερε από τη μέση τιμή των γονέων (Πίνακας 20, Σχήμα 46). Τέλος, τα ποσοστά CG/CNG, CG, CNG μεθυλίωσης, μη-μεθυλίωσης, και συνολικής μεθυλίωσης, ήταν για τον πατρικό γενότυπο 9.40, 20.68, 9.40, 11.28 και 69.92%, ενώ για το μητρικό γενότυπο ήταν 2.63, 23.68, 12.78, 10.90, και 73.68%, αντίστοιχα.

Πίνακας 19. Μέσος όρος, τυπική απόκλιση, συντελεστής διακύμανσης ελάχιστη και μέγιστη τιμή CG, CG/CNG, CNG, μη μεθυλίωσης και συνολικής μεθυλίωσης στους απογόνους.

Τύποι Μεθυλίωσης	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση	CV	Min	Max
CG/CNG	0.62	0.06	0.005	0.46	0.80
CG	0.15	0.05	0.004	0.04	0.28
CNG	0.13	0.03	0.001	0.04	0.22
Μη μεθυλίωση	0.09	0.03	0.001	0.02	0.18
Συνολική μεθυλίωση	0.28	0.06	0.004	0.13	0.44

Πίνακας 20. Ποσοστά CG, CG/CNG, CNG μεθυλίωσης στους γονικούς γενότυπους, στους απογόνους και μέση τιμή γονικών γενοτύπων.

Τύποι Μεθυλίωσης	Μητρικός γενότυπος	Πατρικός γενότυπος	Μέση τιμή απογόνων	Μέση τιμή γονικών τύπων
CG/CNG	73.68%	69.92%	62.81%	71.8%
CG	10.90%	11.28%	15.03%	11.09%
CNG	12.78%	9.40%	13.03%	11.24%
Μη μεθυλίωση	2.63%	9.40%	9.04%	6.01%
Συνολική μεθυλίωση	23.68%	20.68%	28.16%	22.18%



Σχήμα 46. Μέσοι όροι CG, CG/CNG, CNG, συνολικής (TM) και μη-μεθυλίωσης (NM) στους γονείς και στους απογόνους.

4.4.2 Διαφορές μεθυλίωσης DNA μεταξύ γονέων και απογόνων

Συνολικά βρέθηκαν 30 διαφορετικοί τύποι μεθυλίωσης του DNA όταν εξετάστηκαν οι αλλαγές των δεικτών MSAP μεταξύ γονέων και απογόνων (Πίνακας 21, Σχήμα 47). Εξετάζοντας την αλλαγή της απουσίας/παρουσίας των δεικτών που προέκυψαν από την κοπή με τα ένζυμα HpaII/MspI μεταξύ των γονικών τύπων και των απογόνων μελετήθηκε ένας εξαιρετικά υψηλός αριθμός θέσεων, συγκριμένα 41.570 θέσεις, οι οποίες κατηγοριοποιήθηκαν σε έξι ομάδες (Α'-ΣΤ').

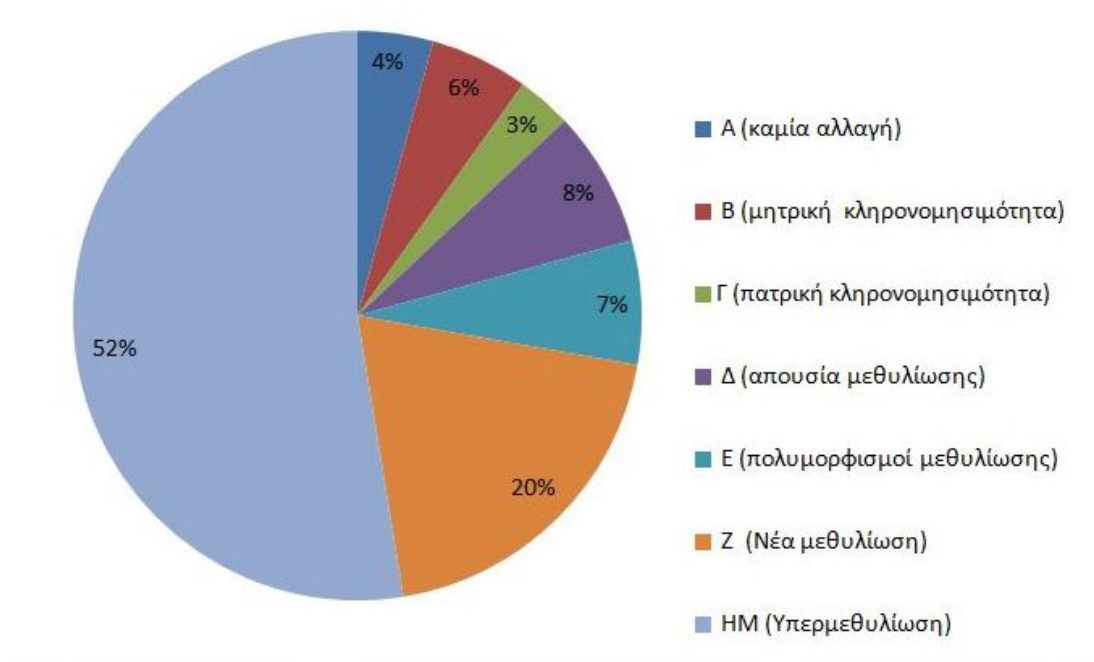
Στην ομάδα Α βρέθηκαν 1787 (4.29%) θέσεις με Μενδελικό διαχωρισμό των CCGG θέσεων από τους γονείς στους απογόνους. Η μητρική κληρονομησιμότητα των θέσεων ήταν υψηλότερη (Β1-Β6) από την πατρική (Β6-Β8), καθώς εμφανίστηκε σε 2350 θέσεις έναντι 1252 θέσεων. Η απομεθυλίωση εντοπίστηκε σε 3217 θέσεις (Γ1-Γ7) με ποσοστό (7.73%). Πολυμορφισμοί, επίσης σε μεθυλιωμένες θέσεις, ανιχνεύθηκαν ανάμεσα στους γονείς και στους απογόνους σε ποσοστό 7.04% (Δ1-Δ11). Τέλος *de novo* μεθυλίωση παρατηρήθηκε σε 8169 θέσεις (ομάδα Ε'). Η *de novo* μεθυλίωση αναφέρεται στη διαδικασία κατά την οποία μη-μεθυλιωμένες κυτοσίνες μεθυλιώνονται με αποτέλεσμα να εισάγουν νέα ποικιλότητα. Το ποσοστό *de novo* μεθυλίωσης που βρέθηκε στο κυπαρίσσι ήταν 19.6.

Το μεγαλύτερο ποσοστό βρέθηκε σε 21868 υπερμεθυλιωμένες θέσεις (52.60%, ομάδα Ζ'). Οι υπερμεθυλιωμένες θέσεις ανιχνεύθηκαν σε υψηλό ποσοστό στους απογόνους αλλά είχαν μικρότερη τιμή από τη μέση τιμή των δύο γονέων (71.80%).

Πίνακας 21. Διαφορετικοί τύποι κληρονομησιμότητας των μεθυλιωμένων θέσεων από τους γονείς στους απογόνους.

Τάξεις	Μητρικός γονέας		Πατρικός γονέας		Απόγονοι		Αριθμός θέσεων που ανιχνεύθηκαν
	HpaII	MspI	HpaII	MspI	HpaII	MspI	
• Καμία αλλαγή ανάμεσα σε γονείς και απογόνους							
A1	1	1	1	1	1	1	531
A2	0	1	0	1	0	1	849
A3	1	0	1	0	1	0	407
Σύνολο							1787
• Μητρική κληρονομησιμότητα θέσεων							
B1	0	1	0	0	0	1	335
B2	1	0	0	0	1	0	506
B3	0	1	1	0	0	1	1128
B4	1	0	0	1	1	0	96
B5	1	1	1	0	1	1	285
Σύνολο							2350
• Πατρική κληρονομησιμότητα θέσεων							
B6	0	0	0	1	0	1	371
B7	0	0	1	0	1	0	595
B8	1	1	1	0	1	0	286
Σύνολο							1252
• Απουσία μεθυλίωσης σε απογόνους-παρουσία μεθυλίωσης σε γονείς							
C1	0	1	0	1	1	1	308
C2	0	1	0	0	1	1	312
C3	1	0	0	0	1	1	294
C4	0	0	0	1	1	1	131
C5	0	0	0	0	1	1	2172

Σύνολο							3217
• Πολυμορφισμοί μεθυλίωσης							
D1	1	1	1	1	0	1	359
D2	0	1	0	1	0	0	765
D3	1	1	1	1	1	0	198
D4	1	1	0	0	0	1	38
D5	1	1	0	1	0	1	49
D6	1	1	0	0	1	0	142
D7	0	1	0	1	1	0	350
D8	0	0	0	1	1	0	357
D9	0	0	1	0	0	1	258
D10	1	0	0	0	0	1	118
D11	0	1	0	0	1	0	293
Σύνολο							2927
• <i>De novo</i> μεθυλίωση							
E1	0	0	0	0	1	0	4227
E2	0	0	0	0	0	1	3942
Σύνολο							8169
• Υπερμεθυλίωση							
F1	0	0	0	0	0	0	21868
Σύνολο							41570



Σχήμα 47. Ποσοστά των διαφορετικών τύπων κληρονομησιμότητας των μεθυλιωμένων δεικτών ανάμεσα σε γονείς και απογόνους.

4.4.3 Συσχέτιση αυξητικών γνωρισμάτων ύψους και διαμέτρου με τη μεθυλίωση του DNA

Διερευνήθηκαν τα αποτελέσματα συσχέτισης με μη παραμετρικό έλεγχο Spearman των 60 πλέον ακραίων φαινοτύπων, που βρίσκονται στα άκρα της κατανομής του γνωρίσματος του ύψους, ως προς τη μεθυλίωση τους. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η συνολική μεθυλίωση/TotalMethylation ($p=0.025$), η CG ($p=0.003$) και η CG/CNG ($p<0.001$) μεθυλίωση παρουσίασαν θετικές τιμές συσχέτισης με το ύψος ενώ αρνητική τιμή συσχέτισης βρέθηκε μεταξύ του ύψους και των μη-μεθυλιωμένων περιοχών $p<0.001$ (Πίνακας 22). Όσον αφορά το αυξητικό γνώρισμα της διαμέτρου, θετική τιμή συσχέτισης βρέθηκε για την CG/CNG μεθυλίωση ($p<0.001$) και αρνητική για τη μη-μεθυλίωση/Non-Methylation ($p<0.001$) ενώ οι υπόλοιποι τύποι μεθυλίωσης δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις.

Πίνακας 22. Μη παραμετρικός έλεγχος Spearman των 60 ακραίων φαινοτύπων με το ύψος και τη διάμετρο σε σχέση με την CG/CNG, CNG, CG, NM και TM

Spearman's		Ύψος	Διάμετρος	CG/CNG	CNG	CG	NM	TM
Ύψος	Συντελεστής συσχέτισης	1.00	0.85	0.68	0.063	0.37	-0.76	0.28
	Sig. (2-tailed)		<0.001	<0.001	.63	.003	<0.001	.025
	N	60	60	60	60	60	60	60
Διάμετρος	Συντελεστής συσχέτισης	0.85	1.00	0.66	-.062	0.16	-0.84	0.099
	Sig. (2-tailed)		<0.001	<0.001	0.637	.20	<0.001	0.45
	N	60	60	60	60	60	60	60

4.4.4 Επιγενετική ανάλυση – Συζήτηση

Η συνολική μεθυλίωση που ανιχνεύθηκε στους απογόνους κυμάνθηκε από 0.13-0.44, με μέσο όρο 0.28 και ήταν υψηλότερη από τη μέση τιμή των γονέων (0.22). Στην *Populus tomentosa*, όπου μελετήθηκε η συνολική μεθυλίωση στους απογόνους, βρέθηκε χαμηλότερο εύρος τιμών που κυμάνθηκε από 13.56-21.76% και μέση συνολική τιμή μεθυλίωσης χαμηλότερη (17.87%), αλλά χωρίς σημαντική διαφοροποίηση από τη μέση τιμή των γονέων (17.19%, Ma *et al.*, 2012). Στην *Larix kaempferi* η συνολική μεθυλίωση ήταν χαμηλότερη από τη μέση τιμή των γονέων, αναδεικνύοντας το φαινόμενο της απομεθυλίωσης στους απογόνους (Li *et al.*, 2013).

Στο κυπαρίσσι βρέθηκε CG μεθυλίωση υψηλότερη από την CNG μεθυλίωση στους απογόνους. Η μεθυλίωση σε CG περιοχές είναι υψηλή στα φυτά, ενώ η CNG μεθυλίωση παρουσιάζει υψηλή ποικιλότητα ανάμεσα στα είδη (Kovarick *et al.*, 1997). Η μεθυλίωση CNG είχε μέσο όρο 0.62% στους απογόνους του κυπαρισσιού ενώ στην λεύκη η αντίστοιχη τιμή ήταν χαμηλότερη (0.30%, Ma *et al.*, 2013). Η συνολική μη-μεθυλίωση του DNA κυμάνθηκε από 0.02-0.18, με μέσο όρο 0.09 για τους απογόνους και διέφερε από τη μέση τιμή των γονέων (0.60). Συγκριτικά στη λάρικα (Li *et al.*, 2013) και στη λεύκη (Ma *et al.*, 2012) οι τιμές της μη-μεθυλίωσης ήταν υψηλότερες με ποσοστά 60% και 72% αντίστοιχα.

Το ποσοστό μητρικής κληρονομησιμότητας μεθυλιωμένων θέσεων στο κυπαρίσσι ήταν υψηλότερο από το ποσοστό της πατρικής κληρονομησιμότητας. Παρόμοια αποτελέσματα υψηλότερης μητρικής κληρονομησιμότητας μεθυλιωμένων θέσεων βρέθηκαν και στη *Larix kaempferi* μελετώντας την μεθυλίωση σε υβρίδια (Li *et al.*, 2013). Σε υβρίδια ρυζιού (Peng *et al.*, 2013) και καλαμποκιού (Zhao *et al.*, 2008) παρουσιάστηκε επίσης υψηλή μητρική κληρονομησιμότητα που υποδηλώνει μητρικές επιδράσεις. Στην αραβίδωση, οι Autran *et al.* (2011) έδειξαν ότι η μεταγραφή γονιδίων κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης ελέγχεται από ένα μητρικό επιγενετικό μονοπάτι που οδηγεί στην κυριαρχία της μεταγραφής από μητρικά αλληλόμορφα. Πολυμορφισμοί, επίσης σε μεθυλιωμένες θέσεις, ανιχνεύθηκαν ανάμεσα στους γονείς και στους απογόνους σε ποσοστό 7.04% και παρουσίασαν χαμηλότερο ποσοστό σε σχέση με την τιμή που οι Peng *et al.*, (2013) βρήκαν στο ρύζι (20.95%).

Το ποσοστό *de novo* μεθυλίωσης που βρέθηκε στο κυπαρίσσι ήταν υψηλό συγκριτικά με μια παρόμοια μελέτη που αναφέρεται στην έγκριτη διεθνή βιβλιογραφία μόνο μια φορά ακόμη και συγκεκριμένα στα φασόλια και ήταν 6.11% (Abid *et al.*, 2011). Στον καπνό επίσης βρέθηκε *de novo* μεθυλίωση, η οποία συνδέθηκε με την περιβαλλοντική καταπόνηση των φυτών (Kovarick *et al.*, 1997).

Οι υπερμεθυλιωμένες θέσεις μελετήθηκαν διότι, όπως έχει αποδειχτεί, ένα σημαντικό ποσοστό αυτών των θέσεων στην πραγματικότητα παρουσιάζει επιγενετική ποικιλότητα και όχι γενετική (Zang *et al.*, 2007). Υπερμεθυλιωμένες θέσεις ανιχνεύθηκαν σε υψηλό ποσοστό στο κυπαρίσσι αλλά είχαν μικρότερη τιμή από τη μέση τιμή των δύο γονέων (71.80%). Στην *Larix* οι υπερμεθυλιωμένες θέσεις για τα υβρίδια είχαν μέσο όρο 24.36% που ήταν χαμηλότερος από το μέσο όρο των γονέων (Li *et al.*, 2013).

Τέλος υπήρξε θετική συσχέτιση ανάμεσα στους 60 ακραίους γενότυπους αναφορικά με το ύψος. Βρέθηκε ότι το ύψος σχετίζεται θετικά με τη συνολική μεθυλίωση, την CG και την CG/CNG μεθυλίωση. Σε αντίστοιχη έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Ma *et al.*, (2012) βρέθηκαν θετικές συσχετίσεις μεταξύ της συνολικής και της CNG μεθυλίωσης με τη διάμετρο και το ύψος. Επιγενετικοί δείκτες βρέθηκαν να είναι συνδεδεμένοι με λειτουργικά γονίδια που καθορίζουν φωτοσυνθετικά χαρακτηριστικά και κατά συνέπεια επηρεάζουν και τα αυξητικά γνωρίσματα (Ma *et al.*, 2012). Ένας παρόμοιος μηχανισμός φαίνεται να υπάρχει και στο κυπαρίσσι που χρειάζεται ωστόσο περαιτέρω διερεύνηση.

5 Γενική Ανασκόπηση και Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν 24 συνδυασμοί f-AFLP εκκινητών και 8 f-SSR εκκινητές σε 382 απογόνους μιας ελεγχόμενης διασταύρωσης του κυπαρισσιού (οριζοντιόκλαδος θυληκός γονέας x ορθόκλαδος αρσενικός γονέας). Προέκυψαν 1267 γονιδιακές θέσεις. Ο μέσος αριθμός πολυμορφικών γονιδιακών θέσεων ήταν 55.5. Επιβεβαιώθηκε η αποτελεσματικότητα της τεχνικής των κυρίαρχων δεικτών f-AFLP για κατασκευή χαρτών σύνδεσης σε φυτικά είδη όπου το γονιδίωμα είναι άγνωστο και ιδιαίτερα μεγάλο. Οι γονιδιακές θέσεις παρείχαν ικανή πληροφοριοδοτική ικανότητα για τη σύνταξη γενετικών χαρτών στο κυπαρίσσι. Συνολικά δημιουργήθηκαν τέσσερις χάρτες σύνδεσης για το κυπαρίσσι. Ένας χάρτης πλαισίου για την οριζοντιόκλαδη ποικιλία (*C. sempervirens* var. *horizontalis*), ένας χάρτης πλαισίου για την ορθόκλαδη ποικιλία (*C. sempervirens* var. *pyramidalis*), ένας συνολικός χάρτης πλαισίου και ένας ολοκληρωμένος χάρτης σύνδεσης για το είδος *Cupressus sempervirens*.

Είναι η πρώτη φορά όπου ένας πλήρης χάρτης σύνδεσης παρουσιάζεται για το είδος *Cupressus sempervirens* L., καθώς αποτελείται από 11 ομάδες σύνδεσης, όσο και ο αριθμός των χρωμοσωμάτων του είδους (Murray 1998). Αυτός ο χάρτης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως χάρτης αναφοράς, και να εμπλουτιστεί με περισσότερους δείκτες (ESTs, SNPs, ISSRs) παρέχοντας περισσότερη πληροφορία κατανόησης και εύρεσης γονιδίων που ελέγχουν γνωρίσματα οικονομικής σημασίας, ιδιαίτερα καθώς η χαρτογραφική οικογένεια που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί μόνιμο χαρτογραφικό πληθυσμό. Δεδομένου ότι η γωνία κλάδων και η διάμετρος κλάδων επηρεάζουν την ποιότητα ξύλου, τα γνωρίσματα αυτά είναι δυνατόν να μελετηθούν στο μέλλον (οπότε και θα είναι πιο διακριτή η φαινοτυπική έκφραση τους) και να χαρτογραφηθούν με στόχο την εύρεση QTL.

Επιπρόσθετα πρωτοποριακά ερευνήθηκαν QTL με τη μέθοδο χαρτογράφησης διαστημάτων (Lander and Botstein, 1989) που αφορούσαν το ύψος, τη διάμετρο, τη μορφή της κόμης και την ανθεκτικότητα στο μύκητα *Seiridium cardinale* στο κυπαρίσσι. Η εύρεση QTL με αυτήν την προσέγγιση θεωρείται το πρώτο αξιόπιστο βήμα για την ανίχνευση γονιδίων που ελέγχουν ποσοτικά και ποιοτικά γνωρίσματα στα δασικά δέντρα (Ritland *et al.*, 2011). Ο προσδιορισμός της ακριβούς χρωμοσωμικής θέσης των QTL στα γονιδιώματα είναι σημαντικός για την πιθανή

μελλοντική χρήση της διαγονιδιακής τεχνολογίας στη γενετική βελτίωση των δέντρων. Στην παρούσα εργασία σημαντικό είναι επίσης το γεγονός ότι για το γνώρισμα της κόμης χαρτογραφήθηκε και ανιχνεύθηκε ένα QTL με υψηλή σημαντικότητα ($LOD=3.3$) που είναι συνδεδεμένο με ένα δείκτη f-AFLP στο 11^ο χρωμόσωμα. Ο δείκτης αυτός ενδέχεται να αποτελέσει εν δυνάμει μοριακό δείκτη πρώιμης επιλογής της μορφής, μπορεί δηλαδή να εφαρμοστεί η υποβοηθούμενη από γονίδια σημάσεως επιλογή (MAS) και η διερεύνηση ύπαρξης αντίστοιχων QTL σε άλλα είδη όπου δεν υπάρχουν είτε μεγάλες χαρτογραφικές οικογένειες από ελεύθερη επικονίαση, είτε φαινοτυπικός διαχωρισμός των ποσοτικών γνωρισμάτων στους απογόνους, είτε και τα δύο. Καθώς η συγκριτική ανάλυση γενετικών χαρτών έχει δείξει ότι υφίσταται διατήρηση των ομάδων σύνδεσης πάνω από ταξινομικό επίπεδο του είδους σε πολλά ανώτερα φυτά, η ύπαρξη ομόλογων ή και συνταϊνικών γονιδίων που σχετίζονται με τη μορφή της κόμης μπορεί να οδηγήσει στην ταχεία επισήμανση τους και σε άλλα είδη, προσφέροντας μεγάλο πλεονέκτημα σε φυτείες και σε δενδρώδεις καλλιέργειες όπου είναι προτιμότερη η οριζοντιόκλαδη μορφή για την εύκολη συλλογή των καρπών. Μια άλλη δυνατότητα που παρουσιάζεται είναι η κλωνοποίηση της θέσης του QTL για τη μορφή της κόμης που βρέθηκε (ή κλωνοποίηση μέσω χάρτη σύνδεσης), όπου ως πρώτο βήμα θεωρείται η ταυτοποίηση ενός μεγάλου τμήματος κλωνοποιημένου γονιδιωματικού DNA που περιέχει δύο χαρτογραφημένους γενετικούς δείκτες, οι οποίοι περικλείουν το QTL ή το γονίδιο που κωδικοποιεί ένα απλό Μενδελικό γνώρισμα. Ωστόσο επειδή τα QTL επηρεάζονται σημαντικά από το περιβάλλον μελλοντική έρευνα θα πρέπει να εστιάσει σε επανάληψη του πειράματος σε διαφορετικά περιβάλλοντα και χρονικές περιόδους για να επαληθευθεί και να κατανοηθεί πλήρως με ποιο τρόπο το συγκεκριμένο QTL προσδιορίζει ποσοτικά το φαινότυπο.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε επίσης η κληρονομησιμότητα της μεθυλίωσης του DNA για πρώτη φορά σε 190 απογόνους της χαρτογραφικής οικογένειας ελεγχόμενης επικονίασης του κυπαρισσιού. Χρησιμοποιώντας τέσσερεις συνδυασμούς f-MSAP εκκινητών πρόεκυψαν 266 πολυμορφικές γονιδιακές θέσεις που μελετήθηκαν περαιτέρω για να ανιχνευθεί η κληρονομησιμότητα των μεθυλιωμένων θέσεων στους απογόνους. Ανιχνεύθηκε μεγαλύτερη μητρική επιγενετική κληρονομησιμότητα μεθυλιωμένων θέσεων στους απογόνους, ενώ

σημαντικό ήταν και το υψηλό ποσοστό *de novo* μεθυλίωσης που βρέθηκε. Βρέθηκε επίσης ότι η συνολική και η CG μεθυλίωση παρουσίασαν θετική συσχέτιση με το γνώρισμα του ύψους. Περαιτέρω μελέτη κρίνεται ωστόσο απαραίτητη και στην συγκεκριμένη περιοχή έρευνας αιχμής, έτσι ώστε να ανιχνευθούν οι αλληλουχίες και οι πολυμορφισμοί που εδράζονται στις θέσεις αυτές και να διερευνηθούν τα γονίδια που ελέγχουν τα επιγενετικά μονοπάτια. Σε δεύτερη φάση οι επιγενετικές θέσεις που προέκυψαν θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στην κατασκευή ενός χάρτη σύνδεσης ο οποίος θα περιλαμβάνει γενετική και επιγενετική πληροφορία για το γονιδίωμα του κυπαρισσιού, καθώς σε αντίστοιχη εργασία των Long *et al.*, (2011) στη *Brassica napus* βρέθηκαν μεθυλιωμένες θέσεις που χαρτογραφήθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για εύρεση QTL στον γενετικό, επιγενετικό και συνδυαστικό τελικό (γενετικό και επιγενετικό) χάρτη. Μια παρόμοια προσέγγιση παρέχει μεγάλα πλεονεκτήματα στην κατανόηση της οργάνωσης του γονιδιώματος και στη μελέτη έκφρασης γονιδίων στο κυπαρίσσι σε γενετική και επιγενετική βάση.

Τέλος ανιχνεύθηκε η ανθεκτικότητα της οικογένειας στο μύκητα *Seiridium cardinale* που προκαλεί την ασθένεια του έλκους του κυπαρισσιού μετά από τεχνητή μόλυνση με το στέλεχος. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ποσοστό των ανθεκτικών γενοτύπων ήταν 22.64%, των μερικώς ανθεκτικών 70.94 % και των ευπαθών 6.42%. Σημαντικό ήταν ότι βρέθηκε ένας γενότυπος που παρουσίασε πλήρη (100%) ανθεκτικότητα δημιουργώντας επουλωτικό ιστό στο σημείο εμβολιασμού. Στη συνέχεια αναπτύχθηκε επιτυχώς πρωτόκολλο για τον πολλαπλασιασμό με ιστοκαλλιέργεια του κυπαρισσιού χρησιμοποιώντας το συνδυασμό δύο διαλυμάτων (MS+ SH). Με την ολοκλήρωση του πρωτοκόλλου (ριζοβολία) θα είναι δυνατός ο μαζικός πολλαπλασιασμός του ανθεκτικού κλώνου που βρέθηκε στη φυτεία καθώς και η μαζική αναπαραγωγή του. Η αγενής αναπαραγωγή του γενοτύπου αυτού με καλλιέργεια *in-vitro* θα επιτρέψει τη χρήση του σε περιοχές όπου η ασθένεια έχει πάρει μεγάλες διαστάσεις (π.χ. στη νότια Πελοπόννησο, στην Εύβοια και αλλού).

6 Βιβλιογραφία

1. Abid G., Muhoviski Y., Jacquemin J. M., Mingeot D., Sassi K., Toussaint A. and Baudoin J. P. 2011. Changes in DNA methylation during zygotic embryogenesis in interspecific hybrids of beans (*Phaseolus* spp.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 105: 383-393.
2. Αβραμίδου Ε., Ντούλης Α. Γ. και Αραβανόπουλος Φ. Α. 2011. Ανάπτυξη λεπτομερούς μοριακού χάρτη σύνδεσης στο κυπαρίσσι (*Cupressus sempervirens* L.) με τη χρήση κυρίαρχων (AFLP) και συγκυρίαρχων (SSR) γενετικών δεικτών και εστίαση στη γονιδιωματική περιοχή που ελέγχει τη μορφή της κόμης. Πρακτικά 12^{ου} Πανελλήνιου Συνεδρίου της Ελληνικής Επιστημονικής Βοτανικής Εταιρείας, 29 Σεπτεμβρίου – 2 Οκτωβρίου, Ρέθυμνο, σελ. 35.
3. Αβραμίδου Ε. Β., Ντούλης Α. Γ. και Αραβανόπουλος Φ. Α. 2012. Αποτελεσματικότητα των μεθοδολογιών φθορίζοντων κυρίαρχων f-AFLP και συγκυρίαρχων f-SSR μοριακών γενετικών δεικτών στην κατασκευή γενετικού χάρτη του γονιδιώματος του κυπαρισσιού (*Cupressus sempervirens* L.). Πρακτικά 14^{ου} Πανελλήνιου Συνεδρίου Ελληνικής Επιστημονικής Εταιρείας Γενετικής Βελτίωσης των Φυτών, 10-12 Οκτωβρίου, Θεσσαλονίκη, σελ. 258-265.
4. Αθανασιάδης Ν. (1986). Δασική Βοτανική (Δέντρα και θάμνοι των δασών της Ελλάδος) Μέρος II. Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Γιαχούδη
5. Achere V., Faivre - Rampant P., Jeandroz S., Besnard G., Markussen T., Aragones A., Fladung M., Ritter E. and Favre J. M. 2004. A full saturated linkage map of *Picea abies* including AFLP, SSR, ESTP, 5S rDNA and morphological markers. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 1602-1613.
6. Adams W. T. and Joly R. J. 1980. Linkage relationships among twelve allozyme loci in loblolly pine. *Journal of Heredity* 71: 199–202.
7. Aravanopoulos F. A. 2014. Genomics of Trees. *In*: Ramawat KG, Merillon JM, Ahuja MR (eds). *Tree Biotechnology*, CRC Press, Boca Raton, USA, 656 pp., ISBN 9781466597143.

8. Aravanopoulos F. A. 2002. Analysis of genetic linkage and genome mapping. In: Tsiftaris, A.S. and A.N. Polidoros (eds). Genome Sequencing and Comparative Analysis, University Studio Press, Thessaloniki, pp. 9-26.
9. Aravanopoulos F. A. 1990. Biochemical evidence for maternal effects in *Salix exigua* (Nutt.). In: Proc. IUFRO XIX World Congress, S2.01-05 Session on Biotechnology, Montreal, Canada, August 5-11 1990, pp. 121-130.
10. Aravanopoulos A. F., Zsuffa L. and Chong X. K. 1993. The genetic basis of enzymatic variation in *Salix exigua*. Hereditas 119: 77-88.
11. Αραβανόπουλος Φ. Α. 2013. Χαρτογράφηση της περιοχής του γονιδιώματος που συνδέεται με τη μορφή της κόμης στα δενδρώδη είδη. Συνέδριο Καινοτομίας «Το ΑΠΘ στο Νόησις», 18-20 Ιανουαρίου, Θεσσαλονίκη.
12. Αραβανόπουλος Φ. Α. και Ντούλης Α. Γ. 2000. Η μοριακή βελτίωση της κόμης και των κλάδων στα ξυλώδη πολυετή φυτά και η χρήση του κυπαρισσιού (*Cupressus sempervirens* L.) ως φυτού – προτύπου. Πρακτικά 8ου Πανελληνίου Συνεδρίου Ελληνικής Επιστημονικής Εταιρείας Γενετικής Βελτίωσης Φυτών, Άρτα, σελ. 248-253.
13. Arcade A., Anselin F., Rampant P. F., Lesage M. C., Paques L. E. and Prat D. 2000. Application of AFLP, RAPD and ISSR markers to genetic mapping of European and Japanese larch. Theoretical and Applied Genetics 100: 299–307.
14. Autran D., Baroux C., Raissig M. T., Lenormand T., Wittig M., Grob S., Steimer A., Barann M., Klostermeier C. U., Leblanc O., Vielle – Calzada J. P., Rosenstiel P., Grimanelli D. and Grossniklaus U. 2011. Maternal epigenetic pathways control parental contributions to Arabidopsis early embryogenesis. Cell 145: 707–719.
15. Ball R. D. 2001. Bayesian methods for quantitative trait loci mapping based on model selection: approximate analysis using the Bayesian information criterion. Genetics 159: 1351-1364.
16. Barbas E., Jay-Allemand C., Doumas P., Chaillou S. and Cornu D. 1993. Effects of gelling agents on growth, mineral composition and naphthoquinone content of in vitro explants of hybrid walnut trees (*Juglans nigra* x *Juglans regia*). Annals of Forest Science 50: 177-186.

17. Barreneche T., Bodenes C., Lexer C., Trontin F. J., Fluch S., Streiff R., Plomion C., Roussel G., Steinkellner H., Burg K., Favre M. J., Glossl J. and Kremer A. 1998. A genetic linkage map of *Quercus robur* L. (pedunculate oak) based on RAPD, SCAR, microsatellite, minisatellite, isozyme and 5S rDNA markers. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 1090-1103.
18. Barteley F., Grosfeld J., Bouroullet – Hallard F. and Ducatillion C., 1999. Biology, growth and development of *Cupressus sempervirens* L. In: Teissier du Cros (ed) *Cypress a Practical Handbook*.
19. Binelli G. and Bucci G. 1994. A genetic linkage map of *Picea abies* Karts based on RAPD markers, as tool in population genetics. *Theoretical and Applied Genetics* 88: 283-288.
20. Bird A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes and Development* 16: 6–21.
21. Blears M. J., De Grandis S.A., Lee H. and Trevors J.T., 1998. Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 21: 99-114.
22. Bouroullet F., Barthelemy D., Ducatillion C., Liminamna J.M. and De Reffye P., 1993. Etude de la croissance et de la ramification de différentes formes de cypress: *Cupressus sempervirens* L. (Cupressaceae). *Architecture des arbres fruitiers et forestiers Montpellier (France)* 23-25 November Ed. INRA (Les Colloques, no 74).
23. Bovin A., Bellemain E., Bronken-Eidesen P., Pompanon F., Brochmann C. and Taberlet P. 2004. How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Molecular Ecology* 13: 3261-3273.
24. Bradshaw H. D. and Stettler F. R. 1994. Molecular genetics of growth and development in *Populus*. II. Segregation distortion due to genetic load. *Theoretical and Applied Genetics* (in press).
25. Brendel O., Pot D., Plomion C., Rozenberg P. and Guehl J. M. 2002. Genetic parameters and QTL analysis of d13 in maritime pine. *Plant Cell Environment* 25: 945-953.

26. Brenner C. and Fuks F., 2006. DNA Methyltransferases: Facts, clues, mysteries. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 301: 45 – 66, Springer – Verlag Berlin Heidelberg.
27. Broman K.W., Wu H., Sen S. and Churchill G.A., 2003. R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* 19: 889 – 890.
28. Brown G. R., Bassoni D. L., Gill G. P., Fontana J. R., Wheeler N. C. Megraw R. A., Davis M. F., Sewell M. M., Tuskan G. A. and Neale D. B. 2003. Identification of quantitative trait loci influencing wood property traits in loblolly pine (*Pinus taeda*, L.). III. QTL verification and candidate gene mapping. *Genetics* 164: 1537-1546.
29. Chagne D., Lalanne C., Madur D., Kumar S., Frigerio J. M., Krier C., Decroocq S., Savoure A., Bou – Dagher - Kharrat M., Bertocchi E., Brach J. and Plomion C. 2002. A high density genetic map of maritime pine based on AFLPs. *Annals of Forest Science* 59: 627–636.
30. Chagne D., Brown G., Lalanne C., Madur D., Pot D., Neale D., and Plomion C. 2003. Comparative genome and QTL mapping between maritime and loblolly pines. *Molecular Breeding* 12: 185–195.
31. Chancerel E., Lepoittevin C., Le Provost G., Lin Y. C., Jaramillo - Correa J. P., Eckert A. J., Wegrzyn J. L., Zelenika D., Boland A., Frigerio J. M., Chaumeil P., Garnier - Géré P., Boury C., Grivet D., González - Martínez S. C., Rouzé P., Van de Peer Y., Neale D. B., Cervera M. T., Kremer A. and Plomion C. 2011. Development and implementation of a highly-multiplexed SNP array for genetic mapping in maritime pine and comparative mapping with loblolly pine. *BMC Genetics* 12: 368.
32. Changxi L., 2001. Construction of a framework map in *Pinus contorta* subsp. *latifolia* using random amplified polymorphic DNA markers. *Genome*, Vol.44, no. 2, pp. 147-153.
33. Cheliak W. M. and Aravanopoulos F. A. 1991. "Tree-Form" Catalogue. IEA/BA Biotechnology Development and Tree Ideotype Activities, International Energy Agency/Bioenergy Agreement and Faculty of Forestry, University of Toronto, Toronto, Canada, pp. 55.

34. Conkle M. T. 1979. Isozyme variation and linkage in six conifer species. *In* Proceedings of the Symposium on Isozymes of North American Forest Trees. USDA Forest Service General Technical Report pp. 11–18.
35. Costa P., Pot D., Dubos C., Frigerio J. M., Pionneau C., Bodenes C., Bertocchi E., Cerver M. T., Remington D. L. and Plomion C. 2000. A genetic map of maritime pine based on AFLP, RAPD and protein markers. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 39–48.
36. Γαλανοπούλου Σ., Γούλας Χ., Καλτσίκης Π., Μιχαηλίδης Ζ., Ρουπακιάς Δ., Σκαλτσογιάννης Α., Τσαντάρης Α. και Φωτιάδης Ν. 1994. Λεξικό Ελληνικής Επιστημονικής Εταιρείας Γενετικής Βελτίωσης των Φυτών. Θεσσαλονίκη.
37. Darvasi A., Weinreb. A., Minke V., Weller J.I. and M. Soller 1993 Detecting marker-QTL linkage and estimating QTL gene effect and map location using a saturated genetic map. *Genetics* 134:943–951
38. Danti R., Di Lonardo V., Pecchioli A. and Della Rocca G. 2013. ‘Le Crete 1’ and ‘Le Crete 2’: two new *Seiridium cardinale* canker-resistant cultivars of *Cupressus sempervirens*. *Forest Pathology* 43: 204-210.
39. Du Cross Teissier E., Ducrey M., Barthelemy D., Pichot C., Giannini R., Raddi P., Roques A., Sales Luis J. and Thibaut B. 1999. Κυπαρίσσι ένα πρακτικό εγχειρίδιο. Eds: Studio Leonardo, Florence, Italy. ISBN 88-87585-05-9.
40. Devey M. E., Fiddler T. A., Liu B. H., Knapp S. J. and Neale B. D. 1994. An RFLP linkage map for loblolly pine based on a three-generation outbred pedigree. *Theoretical and Applied Genetics* 88: 273-278.
41. Devey M. E., Delfinomis A., Kinloch B. B. and Neale D.B. 1995. Random amplified polymorphic DNA markers tightly linked to a gene for resistance to white-pine blister rust in sugar pine. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92: 2066-2070.
42. Devey M. E., Sewell M. M., Uren T. L. and Neale D. B. 1999. Comparative mapping in loblolly and radiata pine using RFLP and microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics* 99: 656-662.

43. Devey M. E., Carson S. D., Nolan M. F., Matheson A. C., Te Riini C. and Hohepa J. 2004a. QTL associations for density and diameter in *Pinus radiata* and the potential for marker-aided selection. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 516-524.
44. Doulis A. G., Harfouche A. L. and Aravanopoulos F.A. 2000. Rapid high quality DNA from Cypress (*Cupressus sempervirens* L.) needles and optimization of the RAPD marker technique. *Plant Molecular Biology Reporter* 14: 411-412.
45. Echt C. S. and Nelson C. D. 1997. Linkage mapping and genome length in eastern white pine (*Pinus strobus* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 94: 1031-1037.
46. Eckert A. J., Pande B., Ersoz E. S., Nicolet C. M. and Neale D. B. 2009. High-throughput genotyping and mapping of single nucleotide polymorphisms in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Tree Genetics and Genomes* 5: 225-234.
47. Eichten S. R., Swanson - Wagner R. A., Schnable J. C., Waters A. J., Hermanson P. J., Liu S., Yeh C. T., Jia Y., Gendler K., Freeling M., Schnable S. P., Vaughn W. M. and Springer M. N. 2011. Heritable epigenetic variation among maize inbreds. *PLoS Genetics* 7(11):e1002372.
48. Emebiri L. C., Devey M. E., Matheson A. C. and Slee M. U. 1997. Linkage of RAPD markers to NESTUR, a stem growth index in radiata pine seedlings. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 119-124.
49. Emebiri L. C., Devey M. E., Matheson A. C. and Slee M. U. 1998a. Age-related changes in the expression of QTLs for growth in radiata pine seedlings. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 1053-1061.
50. Emebiri L. C., Devey M. E., Matheson A. C. and Slee M. U. 1998b. Interval mapping of quantitative trait loci affecting NESTUR, a stem growth efficiency index of radiata pine seedlings. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 1062-1068.
51. Fischer B.M., Salakhutdinov I., Akkurt M., Eibach R., Edwards K.J., R. Topfer and E. M. Zyprian 2004. Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine. *Theoretical Applied Genetics* 108: 501-515.

52. Fujimoto R., Sasaki T., Ishikawa R., Osabe K., Kawanabe T. and Dennis S. E. 2012. Molecular mechanisms of epigenetic variation in plants. *International Journal of Molecular Sciences* 13: 9900-9922.
53. Ghosn D. R., Aravanopoulos F. A. and Doulis A.G. 2000. An investigation of provenance molecular variation in *Cupressus sempervirens* L., based on individual and bulk DNA analysis. *In: Gozukirmizi N., (ed) Proc. 2nd Balkan Botanical Congress, May 14-18, Istanbul, Turkey, Vol. 2: 259-266.*
54. Giovanelli A. and De Carlo A. 2007. Micropropagation of Mediterranean cypress (*Cupressus sempervirens* L.). Protocols for micropropagation of woody trees and fruits. Chapter 9 pp.93-102.
55. Givry S., Bouchez M., Chabrier P., Milan D. and Schiex T. 2005. CarthaGene: multipopulation integrated genetic and radiation hybrid mapping. *Bioinformatics* 21(8): 1703-1704.
56. Gomez A., Aravanopoulos F. A., Bueno M. A. and Alia R. 2003. Linkage of random amplified polymorphic DNA markers in *Pinus halepensis* Mill. *Silvae Genetica* 51(5-6): 196-201.
57. Gosselin I., Zhou Y., Bousquet J. and Isabel N. 2002. Megagametophyte - derived linkage maps of white spruce (*Picea glauca*) based on RAPD, SCAR and ESTP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 104: 987-997.
58. Graniti A. 1998. Cypress canker: a pandemic in progress. *Annual Review of Phytopathology* 36: 91-114.
59. Graniti A. 2014. Empowering farmers, powering research – delivering improved food security. www.plantwise.org (Τελευταία πρόσβαση στις 29-3-2014).
60. Grattapaglia D., Bertolucci F. L. G and Sederoff R. 1995. Genetic mapping of QTLs controlling vegetative propagation in *Eucalyptus grandis*, and *E. urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 90: 933-947.
61. Groover A., Devey M., Fiddler T., Lee J., Megraw R., Mitchelolds T., Sherman B., Vujcic S., Williams C. and Neale D. 1994. Identification of quantitative trait loci influencing wood specific gravity in an outbred pedigree of loblolly pine. *Genetics* 138: 1293–1300.

62. Gwaze D. P., Zhou Y., Reyes-Valdes M. H., Al-Rababah M. A. and Williams C. G. 2003. Haplotypic QTL mapping in an outbred pedigree. *Genetics Research* 81: 43-50.
63. Hackett C. A. and Broadfoot L. B. 2003. Effects of genotyping errors, missing values and segregation distortion in molecular marker data on the construction of linkage maps. *Heredity* 90: 33-38.
64. Hamamouch L. N., Aravanopoulos F. A. and Doulis A. 2002. Fine mapping and development of SCAR markers linked to a genomic region associated with crown form in *Cupressus sempervirens*. *In Vitro Journal* 38: 1131.
65. Harfouche A. L., Aravanopoulos F. A., Doulis A. G. and Xenopoulos S. 2000. Identification of RAPD markers associated with crown form in *Cupressus sempervirens* by bulked segregant analysis. *Forest Genetics* 7 (3): 171-178.
66. Hurme P., Sillanpaa M. J., Arjas E., Repo T. and Savolainen O. 2000. Genetic basis of climatic adaptation in Scots pine by Bayesian quantitative trait locus analysis. *Genetics* 156: 1309-1322.
67. Jermstad K. D., Bassoni D. L., Wheeler N. C. and Neale D. B. 1998. A sex – averaged genetic linkage map in coastal Douglas – fir (*Pseudotsuga menziesii* [Mirb.] Franco var ‘*menziesii*’) based on RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 762-770.
68. Jermstad K. D., Bassoni D. L., Jech K. S., Wheeler N. C. and Neale D. B. 2001. Mapping of quantitative trait loci controlling adaptive traits in coastal Douglas-fir: I. Timing of vegetative bud flush. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 1142–1151.
69. Jermstad K. D., Bassoni D. L., Jech K. S., Ritchie G. A., Wheeler N. C. and Neale B. D. 2003. Mapping of quantitative trait loci controlling adaptive traits in coastal Douglas fir. III. Quantitative trait loci-by-environment interactions. *Genetics* 165: 1489–1506.
70. Jones N., Ougham H., Thomas H. and Pasakinskiene I. 2009. Markers and mapping revisited: finding your gene. *New Phytologist* 183: 935-966.
71. Kakutani T. 2002. Epi-alleles in plants: inheritance of epigenetic information over generations. *Plant and Cell Physiology* 43: 1106–1111.

72. Kaya Z. and Neale D. B. 1995. Utility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for linkage mapping in Turkish red pine (*Pinus brutia* Ten.). *Silvae Genetica* 44: 110–116.
73. Kaya Z., Sewell M. M. and Neale D. B. 1999. Identification of quantitative trait loci influencing annual height- and diameter-increment growth in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 98: 586-592.
74. Knott S., Neale D. N., Sewell M. M. and Haley C. 1997. Multiple marker mapping of quantitative trait loci in an outbred pedigree of loblolly pine. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 810-820.
75. Komulainen P., Brown G.R., Mikkonen M., Karhu A., Garcia-Gil M.R., O' Malley D., Lee B., Neale D. B. and Savolaine O. 2003. Comparing EST-based genetic maps between *Pinus sylvestris* and *Pinus taeda*. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 667-678.
76. Kondo T., Terada K., Hayashi E., Kuramoto N., Okamura M. and Kawasaki H. 2000. RAPD markers linked to a gene for resistance to pine needle gall midge in Japanese black pine (*Pinus thunbergii*). *Theoretical and Applied Genetics* 100: 391-395.
77. Kosambi D. D. 1944. The estimation of map distances from recombination values. *Annals of Eugenics London* 12: 172-175.
78. Kovařík A, Koukalová B, Bezděk M. and Opatrný Z. 1997. Hypermethylation of tobacco heterochromatic loci in response to osmotic stress. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 301-306.
79. Krutovskii K. V., Vollmer S. S., Sorensen F. C., Adams W. T., Knapp S. J. and Strauss S. H. 1998. RAPD genome maps of Douglas-fir. *Journal of Heredity* 89: 197–205.
80. Kuang H., Richardson T., Carson S., Wilcox P. and Bongarten B. 1999. Genetic analysis of inbreeding depression in plus tree 850.55 of *Pinus radiata* D. Don. I. Genetic map with distorted markers. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 697-703.
81. Kubisiak T. L., Nelson C. D., Nowak J. and Friend A. L. 2000. Genetic linkage mapping of genomic regions conferring tolerance to high aluminum in slash pine. *Journal of Sustainable Forestry* 10: 69-78.

82. Kumar S., Spelman R., Garrick D., Richardson T. E. and Wilcox P. L. 2000. Multiple marker mapping of quantitative trait loci on chromosome three in an outbred pedigree of radiata pine. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 926-933.
83. Kuramoto N., Kondo T., Fujisawa Y., Nakata R., Hayashi E. and Goto Y. 2000. Detection of quantitative trait loci for wood strength in *Cryptomeria japonica*. *Canadian Journal of Forest Research* 30: 1525-1533.
84. Lander E., Green P., Abrahamson J., Barlow A., Daly M., Linkon S. and Newburg L. 1987. MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-181.
85. Lander E. S. and Bonstein D. 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121: 185-199.
86. Lawson D. M., Hemmat M. and Weeden N. F. 1995. The use of molecular markers to analyze the inheritance of morphological and developmental traits in apple. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 120: 532-537.
87. Lehner A., Campbell M. A., Wheeler N. C., Poykko T., Glossl J., Kreike J. and Neale D. B. 1995. Identification of a RAPD marker linked to the pendula gene in Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst. f. *pendula*). *Theoretical and Applied Genetics* 91: 1092-1094.
88. Lepointevin C., Harvengt L., Plomion C. and Garnier-géré P. 2012. Association mapping for growth, straightness and wood chemistry traits in the *Pinus pinaster* Aquitaine breeding population. *Tree Genetics and Genomes* 8: 113-126.
89. Lerceteau E., Plomion C. and Bengst A. 2000. AFLP mapping and detection of quantitative trait loci (QTLs) for economically important traits in *Pinus sylvestris*: a preliminary study. *Molecular Breeding* 6: 451-458.
90. Li A., Song W. Q., Chen C. B., Zhou Y. N., Qi L. W. and Wang C. G. 2013. DNA methylation status is associated with the formation of heterosis in *Larix kaempferi* intraspecific hybrids. *Molecular Breeding* 31: 463-475.

91. Li H., Ghosh S., Amerson H. and Li B. 2006. Major gene detection for fusiform rust resistance using Bayesian complex segregation analysis in loblolly pine. *Theoretical and Applied Genetics* 113: 921-929.
92. Long Y., Xia W., Li R, Wang J., Shao M., Feng J., King J. G. and Meng J. 2011. Epigenetic QTL mapping in *Brassica napus*. *Genetics* 189: 1093-1102.
93. Lorieux M. 2012. MapDisto: fast and efficient computation of genetic linkage maps. *Molecular Breeding* 30: 1231-1235.
94. Ma K., Song Y., Jiang X., Zhang Z., Li B. and Zhang D. 2012. Photosynthetic response to genome methylation affects the growth of Chinese white poplar. *Tree Genetics and Genomes* 8: 1407–1421.
95. Ma K, Song Y, Yang X, Zhang Z. and Zhang D. 2013. Variation in genomic methylation in natural populations of Chinese white poplar. *PLoS One* 8 (5): e63977.
96. Mackay J., Dean J. F. D., Plomion C., Peterson D. G., Cánovas F. M., Pavy N., Ingvarsson P. K., Savolainen O., Guevara M. A., Fluch S., Vinceti B., Abarca D., Diaz – Sala C. and Cervera M. T. 2012. Towards decoding the conifer giga-genome. *Plant Molecular Biology Reporter* 80: 555-569.
97. Maios C. 2002. Development of molecular linkage map for *Cupressus sempervirens* L.: Emphasis on the genomic region associated with crown form. MSc Thesis, Mediterranean Agronomic Institute of Chania, Chania. Greece.
98. Manescu C., Maios C., Hamamouch N., Harfouche A., Doulis A. and Aravanopoulos F. A. 2011. Linkage mapping in *Cupressus sempervirens* L. based on molecular and morphological markers. *Genetics and Molecular Research* 10(3): 1891-1909.
99. Manly K. F. and Olson M. J. 1999. Overview of QTL mapping software and introduction to Map Manager QT. *Mam. Genetics* 10: 327-334.
100. Margarido G. R. A., Souza A. P. and Garcia A. A. F. 2007. OneMap: software for genetic mapping in outcrossing species. *Hereditas* 144: 78 – 79.
101. Markussen T., Fladung M., Achere V., Favre M. J., Faivre – Rampant P., Aragonés A., Da Silva Perez D., Harvengt L., Espinel S. and Ritter E. 2003. Identification of QTLs controlling growth, chemical and physical wood properties traits in *Pinus pinaster* (Ait.). *Silvae Genetica* 52, 1: 8-15.

102. De Miguel M., De Maria N., Guevara M. A., Diaz L. L., Sáez - Laguna E., Sánchez - Gómez D., Chancerel E., Aranda I., Collada C., Plomion C., Cabezas J. A. and Cervera M. T. 2012. Annotated genetic linkage maps of *Pinus pinaster* Ait. from a central Spain population using microsatellite and gene based markers. BMC Genomics 13: 527.
103. Millar C. I. 1985. Inheritance of allozyme variants in Bishop pine (*Pinus muricata* D. Don). Biochemical Genetics 23: 933–946.
104. Mollinari M., Margarido G. R. A., Vencovsky R. and Garcia A. A. F. 2009. Evaluation of algorithms used to order markers on genetic maps. Heredity 103: 494 – 502.
105. Moriguchi Y., Ujino-Ihara T., Uchiyama K., Futamura N., Saito M., Ueno S., Matsumoto A., Tani N., Taira H., Shinohara K. and Tsumura Y. 2012. The construction of a high-density linkage map for identifying SNP markers that are tightly linked to a nuclear-recessive major gene for male sterility in *Cryptomeria japonica* D. Don. BMC Genomics 13: 95.
106. Morton E. N. 1995. LODs past and present. Genetics 140:7-12.
107. Murashige T. and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Plant Physiology 15: 473-497.
108. Murray B. G. 1998. Nuclear DNA amounts in gymnosperms. Annals of Botany, 82: 3-15.
109. Nelson C. D., Nance W. L. and Doudrick R. L. 1993. A partial genetic linkage map of slash pine (*Pinus elliottii* [engelm.] var. *elliottii*) based on random amplified polymorphic DNA. Theoretical and Applied Genetics 87: 145-151.
110. Nelson C. D., Kubisiak T. L., Stine M. and Nance W. L. 1994. A genetic linkage map of longleaf pine (*Pinus palustris* Mill.) based on random amplified polymorphic DNA. Journal of Heredity 85: 433-439.
111. Nelson C. D., Nance W. L. and Doudrick R. L. 2008. A partial genetic linkage map of slash pine (*Pinus elliottii* Engelm. var. *elliottii*) based on random amplified polymorphic DNAs. Theoretical and Applied Genetics 87: 145-151.
112. Nikaido A. M., Ujino T., Iwata H., Yoshimura K., Yoshimura H., Suyama Y., Murai M., Nagasaka K. and Tsumura Y. 2000. AFLP and CAPS linkage maps of *Cryptomeria japonica*. Theoretical and Applied Genetics 100: 825–831.

113. Ντούλης Α., Indini M. και Raddi P. 2004. Τα φυσικά δάση του κυπαρισσιού στην Κρήτη. Eds Centro Promozione Pubblicita-Firenze-Italia ISBN 88-88228-14-4.
114. Paglia G. P., Olivieri A. M. and Morgante M. 1998. Towards second-generation STS (sequence-tagged sites) linkage maps in conifers: a genetic map of Norway spruce (*Picea abies* K.). Molecular and General Genetics 258: 466-478.
115. Πανέτσος Κ. Π. 1967. Κληρονομικαί διαφοραί μεταξύ πληθυσμών και ατόμων του είδους *Cupressus sempervirens* L. Εκδ. Ινστιτούτο Δασικών Ερευνών Αθηνών No 17, σελ. 19.
116. Papageorgiou A.C., Panetsos K.P and Hattemer H.H (1994). Genetic differentiation of natural Mediterranean cypress (*Cupressus sempervirens* L.) population in Greece. Forest Genetics 1: 1-12.
117. Papageorgiou A.C., Finkeldey R., Hattemer H.H and S. Xenopoulos (2005). Genetic differences between autochthonous and breeding populations of common cypress (*Cupressus sempervirens* L.) in Greece. European Journal of Forest Research 124: 119-124.
118. Παπαγεωργίου Α., Ντούλης Α. και Φ.Α. Αραβανόπουλος (2004). Γενετική ποικιλότητα προελεύσεων αυτοφυούς κυπαρισσιού στην Κρήτη. Τα φυσικά δάση κυπαρισσιού στην Κρήτη. Σελ 56-69.
119. Pelgas B., Bousquet J., Meirmans G. P., Ritland K. and Isabel N. 2011. QTL mapping in white spruce: gene maps and genomic regions underlying adaptive traits across pedigrees, years and environments. BMC Genomics 12: 145.
120. Peng H., Jiang G., Zhang J., Zhang W. and Zhai W. 2013. DNA methylation polymorphism and stability in Chinese *indica* hybrid rice. Science China Life Sciences 56: 1097-1106.
121. Plomion C., Bahrman N., Durel C. E. and O'Malley D. M. 1995. Genomic mapping in *Pinus pinaster* (Maritime pine) using RAPD and protein markers. Heredity 74: 661-668.
122. Plomion C., Durel C. E. and O'Malley D. M. 1996. Genetic dissection of height in maritime pine seedlings raised under accelerated growth conditions. Theoretical and Applied Genetics 93: 849-858.

123. Plomion C., Bousquet J. and Kole C. 2011. Genetics, genomics and breeding of conifers. Published by Science Publishers. USA. ISBN 978-1-57808-719-8.
124. Pot D., Rodrigues J. C., Rozenberg P., Chantre G., Tibbits J., Cahalan C., Pichavant F. and Plomion C. 2006. QTLs and candidate genes for wood properties in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *Tree Genetics and Genomes* 2: 10-24.
125. Remington D. L., Whetten R. W., Liu B. H. and O'Malley D. M. 1999. Construction of an AFLP genetic map with nearly complete genome coverage in *Pinus taeda*. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 1279-1292.
126. Richards E. J. 2006. Inherited epigenetic variation – revisiting soft inheritance. *Nature Reviews Genetics* 7: 395-402.
127. Ritter E., Aragonés A., Markussen T., Achere V., Espinel S., Fladung M., Wrobel S., Faivre - Rampant P., Jeandroz S. and Favre J. M. 2002. Towards construction of an ultra high density linkage map for *Pinus pinaster*. *Annals of Forest Science* 59: 637–643.
128. Russell J. P. 2009. iGenetics – Μια Μεντελική Προσέγγιση. Εκδ. Οίκος: Ακαδημαϊκές Εκδόσεις. Αλεξανδρούπολη.
129. Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B. and Erlich H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* Vol. 239, no. 4839, pp. 487-491.
130. Sallaud C., Lorieux M., Roumen E., Tharreau D., Berruyer R., Svestasrani P., Garsmeur O., Ghesquiere A. and J.-L. Notteghem 2003. Identification of five new blast resistance genes in the highly blast-resistant rice variety IR64 using a QTL mapping strategy. *Theoretical Applied Genetics* 106:794-803.
131. Sánchez - Pérez R., Ballester J., Dicenta F., Arús P. and Martínez –Gómez P. 2006. Comparison of SSR polymorphisms using automated capillary sequencers, and polyacrylamide and agarose gel electrophoresis: Implications for the assessment of genetic diversity and relatedness in almond. *Scientia Horticulturae* 108: 310–316.

132. Santini A. and Di Lonardo V. 2000. Genetic variability of the bark canker resistance character in several natural provenances of *Cupressus sempervirens*. Forest Pathology 30: 87- 96.
133. Schrey W. A., Alvarez M., Foust M. C., Kilvitis J. H., Lee D. J., Liebl L. A., Martin B. L., Richards L. C. and Robertson M. 2013. Ecological Epigenetics: Beyond MS-AFLP. Integrative and Comparative Biology, Vol. 53, pp. 340-350.
134. Scotti I., Burelli A., Cattonaro F., Chagne D., Fuller J., Hedley E. P., Jansson G., Lalanne C., Madur D., Neale D., Plomion C., Powell W., Troggio M. and Morgante M. 2005. Analysis of the distribution of marker classes in a genetic linkage map: a case study in Norway spruce (*Picea abies* Karst). Tree Genetics and Genomes 1: 93-102.
135. Sebastiani F., Buonamici A., Fineschi S., Racchi M. L., Raddi P. and Vedramin G. G. 2005. Novel polymorphic nuclear microsatellites in *Cupressus sempervirens* L. Molecular Ecology Notes 5: 393-394.
136. Semagn K., Bjørnstad A. and Ndjiondjop M. N. 2006. An overview of molecular marker methods for plants. African Journal of Biotechnology 5: 2540-2568.
137. Sewell M. M., Sherman B. K. and Neale D. B. 1999. A consensus map for loblolly pine (*Pinus taeda* L.). I. construction and integration of individual linkage maps from two outbred three - generation pedigrees. Genetics 151: 321-330.
138. Sewell M. M., Bassoni D. L., Megraw R. A., Wheeler N. C. and Neale D. B. 2000. Identification of QTLs influencing wood property traits in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). I. Physical wood properties. Theoretical and Applied Genetics 101: 1273-1281.
139. Sewell M. M., Davis M. F., Tuskan G. A., Wheeler N. C., Elam C. C., Bassoni D. L. and Neale D. B. 2002. Identification of QTLs influencing wood property traits in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). II. Chemical wood properties. Theoretical and Applied Genetics 104: 214-222.

140. Shepherd M., Cross M., Dieters M. J. and Henry R. 2003. Genetic maps for *Pinus elliottii* var. *elliottii* and *P. caribaea* var. *hondurensis* using AFLP and microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 1409–1419.
141. Shepherd M., Huang S., Eggler P., Cross M., Dale G., Dieters M. and Henry R. 2006. Congruence in QTL for adventitious rooting in *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea* hybrids resolves between and within-species effects. *Molecular Breeding* 18: 11-28.
142. Σκαλτσογιάννης Β. Α. 1990. Εφαρμογή της ιστοκαλλιέργειας στη βελτίωση δασοπονικών δέντρων . Επιστημονική ημερίδα του Τμήματος Δασολογίας και Φυσικού Περιβάλλοντος. Τόμος ΛΓ/2 Αριθμ.4 Νο.4 σελ. 67-78.
143. Skov E. and Wellendorf H. 1998. RAPD markers in haploid megagametophytes. *Silvae Genetica* 47: 273-282.
144. Spanos A. K., Pirrie A. and Woodward S. 1997. Micropropagation of *Cupressus sempervirens* L. and *Chamaecyparis lawsoniana* (A. MURR.) PAR. *Silvae Genetica* 46: 291-295.
145. Stankova T. and Panetsos K. 1997. Vegetative propagation of *Cupressus sempervirens* L. of Cretan origin by softwood stem cuttings. *Silvae Genetica* 46: 137-144.
146. Stuber C. W., Polacco M. L. and Senior M. L. 1999. Synergy of empirical breeding, marker assisted selection and genomics to increase crop yield potential. *Crop Science* 39: 1571-1583.
147. Tani N., Takahashi T., Iwata H., Mukai Y., Ujino-Ihara T., Matsumoto A., Yoshimura K., Yoshimaru H., Murai M., Nagasaka K. and Tsumura Y. 2003. A consensus linkage map for sugi (*Cryptomeria japonica*) from two pedigrees based on microsatellites and expressed sequence tags. *Genetics* 165: 1551–1568.
148. Tautz D., Trick M. and Dover G. 1986. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature* 322: 652–656.
149. Toojinda T., Broers L.H., Chen X.M., Hayes P.M., Kleinhofs A., Korte J., Kudrna D., Leung H., Line R.F., Powell W., Ramsay L., Vivar H. and R. Waugh 2000. Mapping quantitative and qualitative disease resistance genes in

- a doubled haploid population of barley (*Hordeum vulgare*). Theoretical Applied Genetics 101:580–589.
150. Travis S. E., Ritland K., Whitham T. G. and Keim P. 1998. A genetic linkage map of Pinyon pine (*Pinus edulis*) based on amplified fragment length polymorphisms. Theoretical and Applied Genetics 97: 871-880.
 151. Tsaftaris A., Polidoros A. and Nianiou-Obeidat I. 2012. Plant Breeding. Thessaloniki.
 152. Tsaftaris S. A. and Polidoros N. A. 2000. DNA methylation and plant breeding. Plant Breeding Reviews 18: 87-176.
 153. Tsopelas P., Barnes I., Wingfield M. J. and Xenopoulos, S. 2007. *Seiridium cardinale* on *Juniperus* species in Greece. Forest Pathology 37: 338-347.
 154. Τσόπελας Π. 2009. Μια καταστρεπτική ασθένεια των κυπαρισσιών. Διαθέσιμο από: www.ellinikietairia.gr (πρόσβαση Φεβρουάριος 2009).
 155. Τσόπελας Π. και Ξενόπουλος Σ. 2002. Το έλκος του φλοιού του κυπαρισσιού. Γεωργία – Κτηνοτροφία 8: 31-34.
 156. Ukrainetz N. K., Ritland K. and Mansfield S. D. 2008. Identification of quantitative trait loci for wood quality and growth across eight full-sib coastal Douglas-fir families. Tree Genetics and Genomes 4: 159-170.
 157. Vekemans X., Beauwens T., Lemaire M. and Roldan – Ruiz I. 2002. Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. Molecular Ecology 11: 139-151.
 158. Voorrips R.E. 2002. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. The Journal of Heredity 93 (1): 77-78.
 159. Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. and Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research 23 (21): 4407-4414.
 160. Waddington C. H. 1942. Canalization of development and the inheritance of acquired characters. Nature 150: 563-565.
 161. Welter L.G., Baydar N.G., Akkurt M., Maul E., Eibach R., Topfer R. and Eva M. Zyprian 2007. Genetic mapping and localization of quantitative trait loci

- affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Molecular Breeding* 20:359-374.
162. Weng C., Kubisiak T. L., Nelson C. D. and Stine M. 2002. Mapping quantitative trait loci controlling early growth in a (longleaf pine x slash pine) x slash pine BC1 family. *Theoretical and Applied Genetics* 104: 852-859.
 163. White T. L., Adams W. T. and Neale D. B. 2007. *Forest Genetics*. CABI Publishing.
 164. 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.
 165. Wu, R. and Chang-Xing, M., 2002. Simultaneous Maximum Likelihood Estimation of Linkage and Linkage Phases in Outcrossing Species. *Theoretical Population Biology* 61:349-363.
 166. Xenopoulos G. S. 1991. Pathogenic variability of various isolates of *Seiridium cardinale*, *S. cupressi* and *S. unicorn* inoculated on selected *Cupressus* clones and seedlings. *European Journal of Forest Pathology* 21: 129-135.
 167. Xiong L. Z., Xu C. G., Saghai M. M. A. and Zang Q. 1999. Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. *Molecular Genetics and Genomics* 261: 439–446.
 168. Yazdani R., Nilsson J. E., Plomion C. and Mathur G. 2003. Marker trait association for autumn cold acclimation and growth rhythm in *Pinus sylvestris*. *Scandinavian Journal of Forest Research* 18: 29-38.
 169. Yin T. M., Wang X. R., Andersson B. and Lerceteau - Kohler E. 2003. Nearly complete genetic maps of *Pinus sylvestris* L. (Scots pine) constructed by AFLP marker analysis in a full-sib family. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 1075–1083.
 170. Yoshimaru H., Ohba K., Tsurumi K., Tomaru N., Murai M., Suyama Y., Tsumura Y., Kawahara T., and Y. Sakamaki. 1998. Detection of quantitative trait loci for juvenile growth, individual flower bearing and root ability based on a linkage map of sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don). *Theoretical and Applied Genetics* 97: 45–50.

171. Zhang M. S., Yan H. Y., Zhao N, Lin X. Y., Pang J.S., Xu K.Z., Liu L.X. and B. Liu (2007) Endosperm-specific hypomethylation, and meiotic inheritance and variation of DNA methylation level and pattern in sorghum (*Sorghum bicolor* L.) inter-strain hybrids. *Theoretical and Applied Genetics* 115:195–207
172. Zhao X., Chai Y. and Liu B. 2007. Epigenetic inheritance and variation of DNA methylation level and pattern in maize intra-specific hybrids. *Plant Science* 172: 930–938.
173. Zhao Y., Yu S., Xing C, Fan S. and M. Song (2008) Analysis of DNA methylation in cotton hybrids and their parents. *Molecular Biology* 42:169–178.
174. Zobel B. and Talbert J. 1984. *Applied forest tree improvement*. John Wiley. New York, 505.

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος II. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.

