



Πανεπιστήμιο Κρήτης
Τμήμα Βιολογίας
Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα:
Μοριακής Βιολογίας & Βιοτεχνολογίας Φυτών

Μελέτη της γενετικής ποικιλότητας του γένους *Limonium* Miller στη ΝΑ Κρήτη

Μαρία Μεγαρίτη

Επιβλέπων Καθηγητής: Στέργιος Πυρίντσος

Ηράκλειο 2015

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Οικολογίας Φυτών και Διαχείρισης Χερσαίων Οικοσυστημάτων του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης και υποβλήθηκε στο Τμήμα Βιολογίας.

Επιβλέπων καθηγητής:

Στέργιος Αργ. Πυρίντσος (Αν. Καθηγητής, Παν. Κρήτης)

Συμβουλευτική Επιτροπή:

Στέργιος Αργ. Πυρίντσος (Αν. Καθηγητής, Παν. Κρήτης)

Ρέα Αρτελάρη (Αν. Καθηγήτρια, Παν. Πατρών)

Κρίτων Καλαντίδης (Αν. Καθηγητής, Παν. Κρήτης)

Ευχαριστίες

Λίγο πριν την ολοκλήρωση της συγγραφής της παρούσας διατριβής, έφτασα στο στάδιο για τις ευχαριστίες όσων συνέβαλαν για την περάτωσή της. Ξεκινώντας, ευχαριστώ ιδιαίτερος τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Στέργιο Πυρίντσο για τη συνεχή καθοδήγηση, τη συμπαράσταση και υποστήριξη σε όλα τα στάδια αυτής της εργασίας, καθώς και για την εμπιστοσύνη που έδειξε στις δυνατότητές μου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην κ. Ρέα Αρτελάρη, Αν. Καθηγήτρια του Πανεπιστημίου Πατρών για τη σημαντική συμβολή της στην αρχική ταξινόμηση των ειδών και για τη συνεχή υποστήριξή της, αλλά και στον κ. Κρίτωνα Καλαντίδη, Αν. Καθηγητή για τις χρήσιμες παρατηρήσεις του.

Τις θερμές μου ευχαριστίες θα πρέπει να εκφράσω στον κ. Χαράλαμπο Σπηλιανάκη, Επίκουρο Καθηγητή για τη φιλοξενία στο εργαστήριό του και για τη συμβολή του στην κατανόηση της MSAP τεχνικής, αλλά και την κ. Μανουέλα Καυετάκη μου με την εμπειρία της έλυσε πολλά προβλήματα που προέκυψαν κατά την εφαρμογή της τεχνικής MSAP.

Πολλά ευχαριστώ οφείλω επίσης στην Κωνσταντίνα Κουτρούμπα, Υποψήφια Διδάκτορα, καθώς μου μετέδωσε τις γνώσεις της για την AFLP τεχνική, για τα χρήσιμα σχόλιά της κατά τη συγγραφή της διατριβής και γενικά για τη βοήθεια που μου προσέφερε, όποτε τη χρειαζόμουν.

Ευχαριστώ επίσης την Ευαγγελία Αβρααμίδου για τη συνεισφορά της στην ανάλυση της τεχνικής των AFLPs και των MSAPs.

Τέλος το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένειά μου, στους γονείς μου Μιχάλη και Ιωάννα και στην αδερφή μου Ελένη για την αγάπη τους, τη στήριξη και την εμπύχωσή τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	5
Abstract	6
Εισαγωγή	7
▪ Μορφολογία	8
▪ Αναπαραγωγή	9
▪ Το γένος <i>Limonium</i> στη ΝΑ Κρήτη	15
▪ Σκοπός	21
Υλικά και Μέθοδοι	21
▪ Συλλογή φυτικού υλικού	21
▪ Μοριακή ανάλυση	24
▪ Μελέτη του τύπου αναπαραγωγής	41
▪ Μορφομετρική μελέτη	42
▪ Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA analysis)	43
Αποτελέσματα	44
Συζήτηση	53
Συμπεράσματα	55
Βιβλιογραφία	55

Περίληψη

Πλαίσιο: Το γένος *Limonium* παρουσιάζει εντυπωσιακή φαινοτυπική ποικιλότητα, γεγονός που δυσχεραίνει την ταξινόμησή του με τη χρήση μορφολογικών χαρακτηριστικών. Η μεγάλη ποικιλομορφία του γένους έχει ερμηνευθεί ως συνέπεια της μεγάλης ικανότητας υβριδισμού των taxa, σε συνδυασμό με την ικανότητα των υβριδίων να παράγουν γόνιμα σπέρματα αγενώς και συνεπώς να διατηρούνται στους πληθυσμούς.

Στόχος: Με δεδομένη την παραπάνω δυσκολία επιχειρείται η μελέτη της γενετικής ποικιλότητας του γένους *Limonium* στη ΝΑ Κρήτης, ούτως ώστε να αναδειχθεί το κατά πόσο συγκλίνουν τα μορφομετρικά με τα γενετικά χαρακτηριστικά στον χαρακτηρισμό των taxa καθώς και ο ρόλος του επιγενετικού παράγοντα.

Μεθοδολογία: Πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες σε 11 περιοχές της ΝΑ Κρήτης και συλλέχθηκαν συνολικά 60 δείγματα από έξι taxa εκ των οποίων τα τέσσερα ενδημικά. Σε όλα τα δείγματα έγινε μελέτη των μορφολογικών τους χαρακτηριστικών και σε 44 δείγματα έγινε απομόνωση DNA. Για την ανάλυση του γενετικού υλικού χρησιμοποιήθηκαν η ανάλυση φθορίζοντων πολυμορφισμών μήκους ενισχυμένων τμημάτων DNA (AFLPs-Amplified Fragment Length Polymorphisms) και η ανάλυση των επιγενετικών τροποποιήσεων με τη χρήση των Πολυμορφισμών ενισχυμένων θραυσμάτων ευαίσθητων στην μεθυλίωση (MSAP-Methyl-Sensitive Amplification Polymorphisms).

Αποτελέσματα: Τα αποτελέσματα ανέδειξαν το κατά πόσο συγκλίνουν τα μορφομετρικά με τα γενετικά χαρακτηριστικά στον χαρακτηρισμό των taxa του γένους στην περιοχή και τον βαθμό στον οποίον ο επιγενετικός παράγοντας επηρεάζει τα taxa.

Συμπεράσματα: Ενώ μορφολογικά ένα μεγάλο ποσοστό μεταβλητότητας εμφανίζεται μεταξύ ενδημικών taxa, γενετικά η μέγιστη μεταβλητότητα εμφανίζεται κυρίως μεταξύ μη ενδημικών και ενδημικών και σε συγκεκριμένες περιπτώσεις μεταξύ μη ενδημικών taxa. Ο επιγενετικός παράγοντας φαίνεται να συγκλίνει ως προς τη μεταβλητότητα με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά ενώ προκύπτει ότι επηρεάζει κυρίως τα μη ενδημικά taxa.

Abstract

Background: The genus *Limonium* is morphologically highly diverse, which complicates its taxonomy. The diversity of the genus has been assigned to the increased capacity of hybridization, in combination with the ability of the hybrids to produce asexually viable seeds and remain in populations.

Targets: Here, the study of the genetic diversity of *Limonium* taxa in SE Crete is attempted, in order to reveal whether the morphometrics converge with the genetic characteristics and the role of the epigenetic factor.

Methodology: Sampling took place in 11 sites of the SE Crete and in total 60 specimens have been collected, including six taxa, four of which were endemics. Morphometric analysis completed for all the specimens, while 44 specimens have been used for DNA extraction. Genetic diversity was analyzed using Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLPs), while epigenetic modifications were analyzed using Methyl-Sensitive Amplification Polymorphisms (MSAP).

Results: The results revealed whether the morphometrics converge with genetic characteristics in the characterization of *Limonium* taxa in the area and the role of epigenetic factor.

Conclusions: Although high morphological variability is presented between endemic taxa, at the genetic diversity level the high genetic variability is presented among non-endemic and endemic taxa or in specific cases between non-endemic taxa. Epigenetics follow similar pattern in variation with morphological characteristics, with non-endemic taxa as the only exception.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Το γένος *Limonium*

Το γένος *Limonium* ανήκει στην οικογένεια Plumbaginaceae και έχει αναφερθεί ότι περιλαμβάνει περισσότερα από 200 είδη (Erben 1978). Ωστόσο, σύμφωνα με νεότερα δεδομένα που ανακαλύπτονται συνεχώς λόγω της ποικιλότητας αναπαραγωγής και της έντονης πολυπλοειδίας που χαρακτηρίζει το γένος, ο αριθμός των ειδών συνεχώς αυξάνει και σήμερα ανέρχεται στα 400 είδη (Kubitzki 1993, Lobin et al. 1995, Brullo et al. 1996, Roselló et al. 1997, Crespo & Ledo 1998, Sáez et al. 1998, Rizzoto 1999, Artelari & Georgiou 1999, Artelari & Kamari 2000, Erben 2001). Αποτελεί μια από τις πιο ενδιαφέρουσες ταξινομικές ομάδες, από γενετικής και φυλογεωγραφικής σκοπιάς, λόγω της αξιοσημείωτης ποικιλομορφίας του και της αναπαραγωγικής του συμπεριφοράς.

Η προηγούμενη ονομασία του γένους ήταν *Statice* (Στατική), ενώ τα κοινά ονόματα των μελών του είναι «λεβάντες της θάλασσας» ή «δεντρολίβανα των βάλτων» χωρίς να είναι συγγενικά με τις λεβάντες ή τα δεντρολίβανα.

Η εξάπλωση του γένους είναι κοσμοπολιτική. Συναντάται και στις πέντε ηπείρους σε παράκτιες περιοχές, αρμυρές στέπες και ερήμους. Ευδοκίμει σε εδάφη αλατούχα ή πλούσια σε μέταλλα, όπου κατά μία άποψη είναι εκτοπισμένο λόγω της μικρής ανταγωνιστικής του ικανότητας. Η πλειοψηφία των ειδών φύεται στη δυτική Μεσόγειο που αποτελεί και το κέντρο εξάπλωσης και εξέλιξης του γένους (Αρτελάρη 1984). Στην Ελλάδα και συγκεκριμένα στην περιοχή του Αιγαίου, όπου υπάρχει μεγάλος αριθμός νησιών και νησίδων, το *Limonium* εκπροσωπείται από σημαντικό αριθμό ειδών, κάποια από τα οποία δεν έχουν ακόμα αποσαφηνιστεί ταξινομικά.

Το γένος παρουσιάζει ιδιαίτερη ποικιλομορφία, γεγονός που δυσχεραίνει την ταξινόμησή του. Η δυσκολία αυτή είναι συνέπεια του μικρού μεγέθους και των πολύ λεπτών μορφολογικών χαρακτηριστικών των διαφόρων taxa. Η μεγάλη διαφοροποίηση του γένους έχει ερμηνευθεί ως συνέπεια της μεγάλης ικανότητας υβριδισμού μεταξύ των taxa, η οποία ακολουθείται από εξειδίκευση ενδαιτημάτων σε συνδυασμό με την ικανότητα των υβριδίων να παράγουν σπέρματα αγενώς. Αυτό το εξελικτικό μοντέλο χρησιμοποιήθηκε για να εξηγήσει την πολλαπλή σειρά συσσωματωμάτων από διπλοειδή είδη που αναπαράγονται εγγενώς και πολυπλοειδή υβριδικά είδη που διακρίνονται μέσω αγενούς αναπαραγωγής.

1.2 Μορφολογία

α) Το κατώτερο τμήμα των *Limonium* είναι ξυλώδες και διακλαδίζεται στους βασικούς βλαστούς (Εικ. 1.1), ενώ τα φύλλα είναι συνήθως συγκεντρωμένα στο κάτω μέρος του φυτού και σχηματίζουν ρόδακα. Τα φύλλα του ρόδακα μαραίνονται από τη βάση προς την κορυφή.

β) Τα φύλλα στα περισσότερα taxa είναι ακέραια και διαφέρουν σε σχήμα και σε μέγεθος. Τα μεγάλα φύλλα (πάνω από 12 cm) απαντώνται σε λιγότερα είδη, έχουν πτεροειδή νεύρωση, σχήμα επίμηκες ή λογχοειδές, με κορυφή οξεία ή αμβλεία, ακιδωτή. Τα μικρά φύλλα που απαντώνται στα περισσότερα είδη έχουν σχήμα από σπατουλόμορφο ως αντιλογχοειδές, με αμβλεία ή ακιδωτή κορυφή και εμφανίζουν τοξοειδή νεύρωση (1-3 νεύρα) (Εικ. 1.1).

γ) Το έλασμα συνήθως περιβάλλεται από στενό, λευκό, μερικές φορές ημιδιαφανές κράσπεδο που είναι επίπεδο ή ελαφρά κυματιστό. Η πάνω επιφάνεια του ελάσματος μπορεί να είναι λεία ή τραχεία, με μικρά κοιλώματα ή φύματα. Ο μίσχος μπορεί να ισούται σε μήκος, αλλά μπορεί να έχει και μικρότερο ή μεγαλύτερο μήκος από το έλασμα. Η αναλογία του μήκους του μίσχου προς το μήκος του ελάσματος αποτελεί ταξινομικό γνώρισμα.

δ) Οι ποώδεις βλαστοί προκύπτουν από τους ξυλώδεις βλαστούς. Αναπτύσσονται προς τα πάνω, διακλαδίζονται και φέρουν τους ανθοφόρους κλάδους. Η διακλάδωση μπορεί να αρχίζει είτε από τη βάση των ποωδών βλαστών, είτε ψηλότερα. Η θέση της διακλάδωσης αποτελεί βασικό ταξινομικό γνώρισμα για τη διάκριση των ειδών. Τα φύλλα των ανθοφόρων κλάδων μετασχηματίζονται σε λέπια, τριγωνικού σχήματος και οξύληκτα, βρίσκονται δε στα γόνατα των κλάδων. Το μέγεθος των λεπίων δεν συνιστάται ως ταξινομικό γνώρισμα, διότι είναι συνάρτηση του μεγέθους του κάθε φυτού.

ε) Η ταξιανθία είναι ένας σύνθετος βότρυς (φόβη), συχνά κορυμβοειδής ή ρομβοειδής. Οι επιμέρους στάχεις βρίσκονται στις άκρες των διακλαδώσεων των ανθοφόρων βλαστών και αποτελούνται από τα σταχύδια, των οποίων το μήκος και η πυκνότητα αποτελούν βασικό ταξινομικό χαρακτηριστικό. Στη διάκριση των ειδών δύναται να συμβάλει επίσης και η γωνία της διχοτομικής ή ζικ-ζακ διακλάδωσης της ταξιανθίας, καθώς και η παρουσία ή απουσία άγονων κλάδων.

στ) Τα σταχύδια είναι η βασική μονάδα της ταξιανθίας (Εικ. 1.2), αποτελούνται από τρία κύρια βράκτια και περιέχουν ένα ή περισσότερα άνθη. Ο αριθμός των ανθέων ποικίλλει και εξαρτάται από το στάδιο στο οποίο βρίσκεται η ανθοφορία. Το εξωτερικό βράκτιο είναι συνήθως το μικρότερο σε μέγεθος, εσωτερικά ποώδες και εξωτερικά μεμβρανώδες. Το μεσαίο βράκτιο είναι πιο μεγάλο και μεμβρανώδες. Το εσωτερικό βράκτιο που περιβάλλει τα άνθη, είναι το μεγαλύτερο από όλα σε μέγεθος, έχει εξωτερικά μεμβρανώδες κράσπεδο και το σχήμα του ποικίλλει στα διάφορα είδη. Σε κάποια είδη μπορεί να φέρει και τρίχωση στην κορυφή του. Το μέγεθος, το σχήμα του εσωτερικού βρακτίου και η παρουσία ή απουσία τρίχωσης συνιστούν κύρια ταξινομικά γνωρίσματα.

ζ) Ακόμη ένας σημαντικός ταξινομικός χαρακτήρας του γένους θεωρείται και ο κάλυκας. Έχει σχήμα κωνικό μέχρι χοανοειδές. Το ανώτερο τμήμα του, το χείλος, διαιρείται σε πέντε ισομήκεις, ελλειψοειδείς, τριγωνικούς ή τοξοειδείς λοβούς. Το κατώτερο τμήμα του, ο σωλήνας, διασχίζεται από πέντε νεύρα που φτάνουν έως τους λοβούς του χείλους και σταματούν κοντά στη βάση τους. Σε κάποια taxa ο κάλυκας φέρει τρίχωση στα νεύρα, ενώ σε άλλα taxa μπορεί να είναι λείος. Επομένως το μήκος του κάλυκα, το σχήμα του, το μήκος των λοβών του, αλλά και η πυκνότητα της τρίχωσής του, βοηθούν στη συστηματική κατάταξη των ειδών.

Αντιθέτως, η στεφάνη δεν αποτελεί ταξινομικό χαρακτηριστικό. Αποτελείται από πέντε ελεύθερα πέταλα σε σχήμα σπάτουλας ή σφήνας που σχηματίζουν εγκόλπωση στο ανώτερο άκρο τους και το χρώμα τους κυμαίνεται από ιώδες έως σχεδόν λευκό.

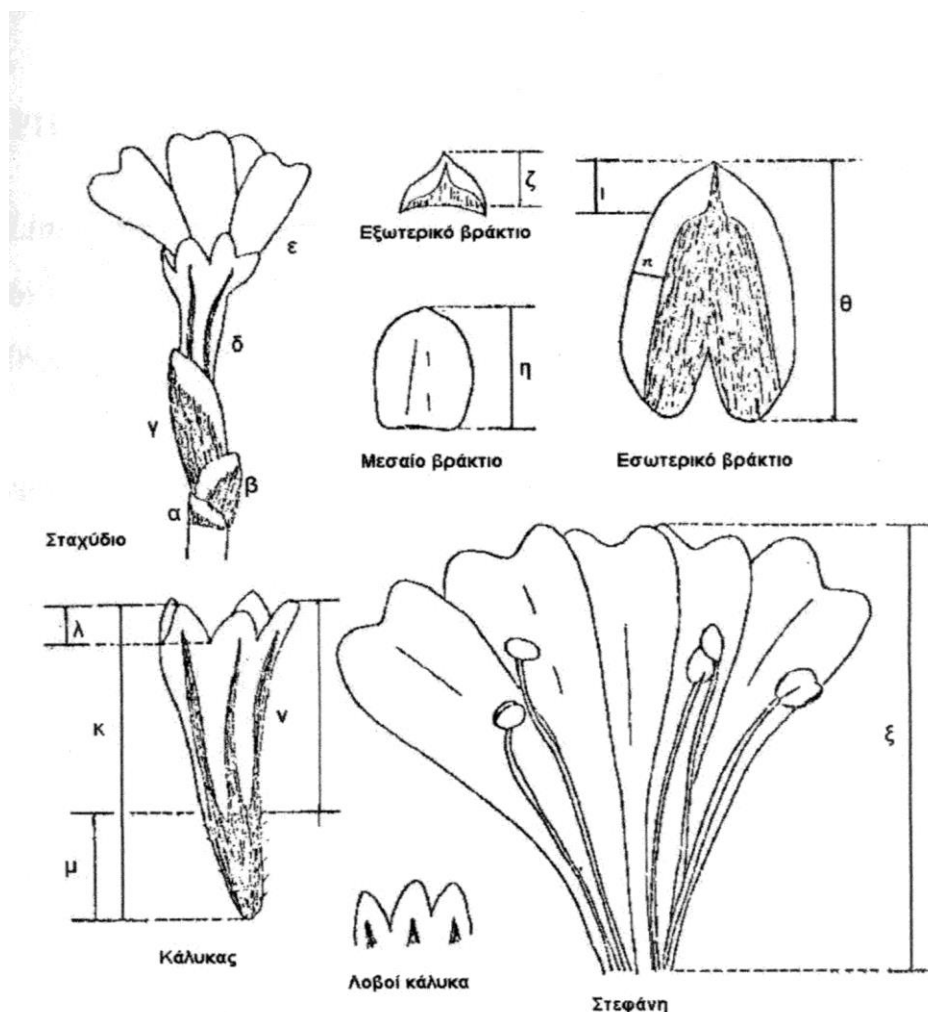
1.3 Αναπαραγωγή

Στο γένος *Limonium* συναντάται εγγενής αναπαραγωγή και απομιξία (μορφή αγενούς αναπαραγωγής), κατά την οποία παράγονται σπέρματα χωρίς να έχει προηγηθεί γονιμοποίηση. Η απομιξία, ως τρόπος αναπαραγωγής είναι συνήθης σε διάφορα είδη του γένους και έχει παρατηρηθεί και σε άλλα γένη π.χ *Potentilla* (Stebbins 1950, Smith 1971) και *Hieracium* (Stebbins 1941, Gustafsson 1947). Για τον συγκεκριμένο αγενή τρόπο αναπαραγωγής έγινε αρχικά λόγος από τον D' Amato (1949). Έπειτα οι Dolcher & Pignatti (1971) και Erben (1978) μελέτησαν αναλυτικά το φαινόμενο σε είδη του γένους της δυτικής και κεντρικής Μεσογείου.



Εικόνα 1.1. Τα βασικά μέρη του φυτού (κατά Αρτελάρη 1984).

Ο εγγενής ή απομικτικός τρόπος αναπαραγωγής σχετίζεται άμεσα με το διμορφισμό ή μονομορφισμό του στίγματος και των γυρεοκόκκων των ανθέων τους. Ο Müller (1868) πρώτος ανακάλυψε το διμορφισμό αυτό σε άνθη ειδών *Limonium* της Βραζιλίας. Ακολούθησε σειρά λεπτομερών εργασιών από τον Baker (1948a, 1948b, 1952, 1953a, 1953b, 1954, 1966), όπου εξετάζονται οι μορφές του στίγματος και των γυρεοκόκκων, και περιγράφεται η ύπαρξη μονομορφισμού ή διμορφισμού σε άλλα γένη της οικογένειας Plumbaginaceae και άλλα είδη του γένους *Limonium* και



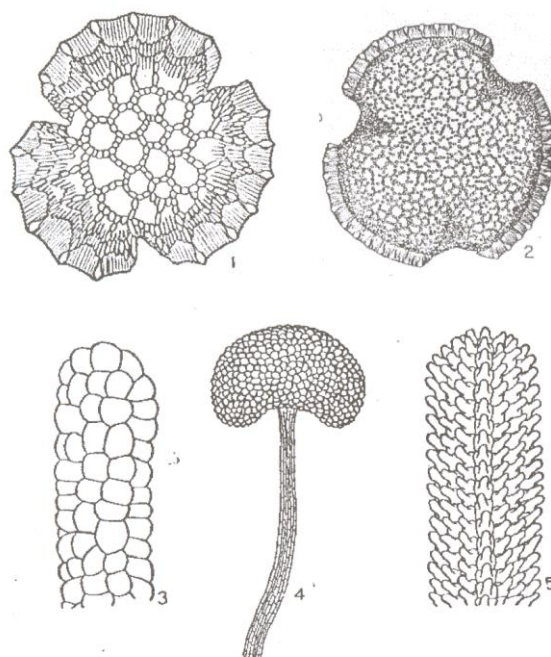
Εικόνα 1.2. Βασικά μέρη της ταξιανθίας. α: εξωτερικό βράκτιο, β: μεσαίο βράκτιο, γ: εσωτερικό βράκτιο, δ: κάλυκας, ε: στεφάνη, ζ: μήκος εξωτερικού βρακτίου, η: μήκος μεσαίου βρακτίου, θ: μήκος εσωτερικού βρακτίου, ι: μήκος αιχμής, π: πλάτος μεμβρανώδους περιθωρίου, κ: μήκος κάλυκα, λ: μήκος λοβών, μ: μήκος σωλήνα, ν: μήκος χείλους, ξ: μήκος στεφάνης (κατά Αρτελάρη 1984).

ακολουθεί ο Erben (1978, 1979), που θεωρεί ότι ο μονομορφισμός ή διμορφισμός στο γένος *Limonium* συνδέεται με τον τρόπο αναπαραγωγής και τον χρωμοσωματικό αριθμό.

Τα είδη *Limonium* της Μεσογείου διαθέτουν ευθύγραμμα στίγματα που ή έχουν μορφή καλαμποκιού ή είναι θηλώδη, σε αντίθεση με τα είδη της Αυστραλίας, της Ν.

Αμερικής, της Αφρικής και της Ασίας που έχουν στίγματα κεφαλόμορφα. Οι γυρεόκοκκοι έχουν σχήμα σφαιρικό ή ελλειψοειδές και είναι τρικολπωτοί, τετρακολπωτοί ή πεντακολπωτοί με αδρό ή λεπτοφυές ανάγλυφο εξίνης.

Ο Erben (1978, 1979) στηριζόμενος στις εργασίες του Baker (1948-1966) διακρίνει τέσσερις δυνατούς τύπους γυρεοκόκκων και στίγματος που παρουσιάζονται στην Εικόνα 1.3 και δίνουν τέσσερις διακριτούς συνδυασμούς που παρουσιάζονται στην Εικόνα 1.4.



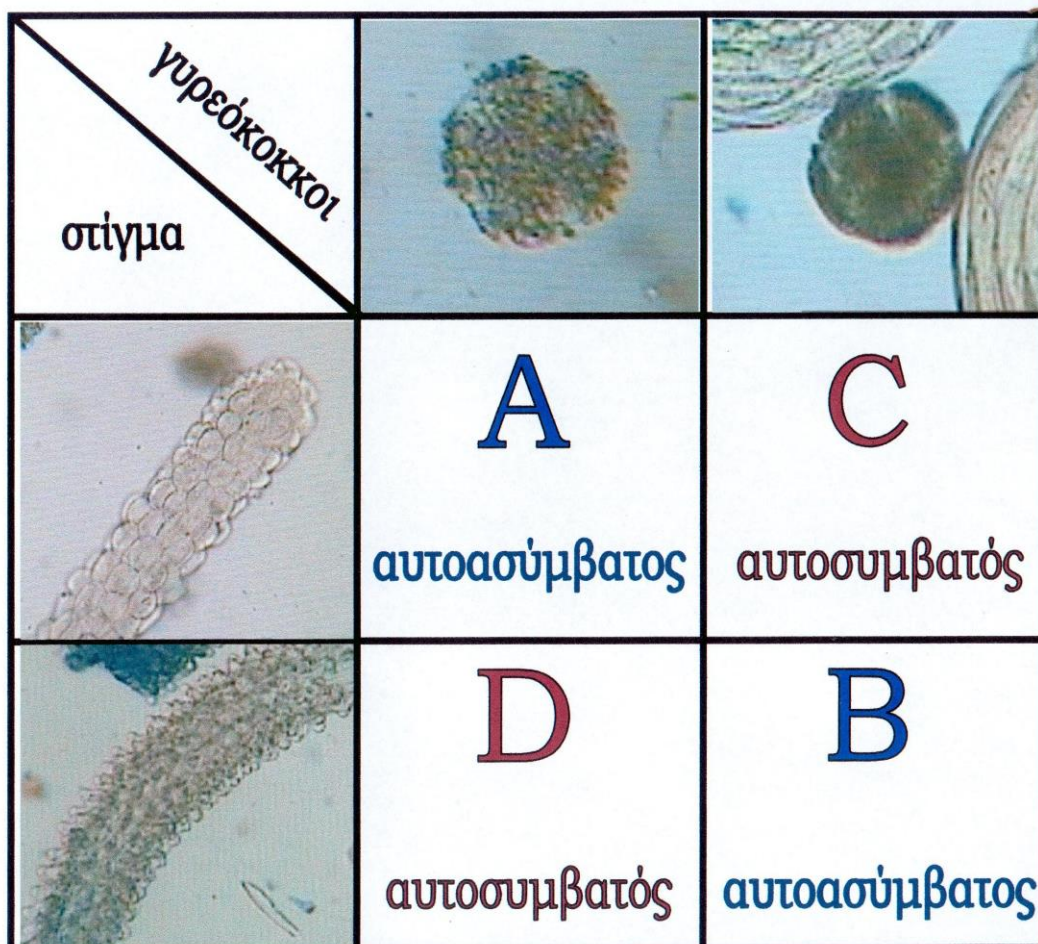
Εικόνα 1.3. 1: Γυρεόκοκκος τύπου Α ($\times 800$), 2: Γυρεόκοκκος τύπου Β ($\times 800$), 3: Τμήμα στίγματος μορφής «καλαμποκιού» ($\times 300$), 4. Στύλος με κεφαλόμορφο στίγμα ($\times 80$), 5. Τμήμα θηλώδους στίγματος ($\times 300$) (από Baker 1953a).

Συνδυασμός Α: Το στίγμα του στύλου έχει αδρό ανάγλυφο μορφής καλαμποκιού και οι γυρεόκοκκοι έχουν επίσης αδρό, πολυγωνικό ανάγλυφο της εξίνης. Ο συνδυασμός αυτός είναι αυτοασύμβατος, δηλαδή οι γυρεόκοκκοι αυτοί δεν βλαστάνουν σε στίγματα αυτής της μορφής.

Συνδυασμός Β: Επίσης αυτοάγονος συνδυασμός. Τα στίγματα είναι θηλώδη και οι γυρεόκοκκοι εμφανίζουν λεπτοφυές ανάγλυφο της εξίνης.

Συνδυασμός Γ: Τα στίγματα έχουν αδρό ανάγλυφο μορφής ώριμου καλαμποκιού, ενώ οι γυρεόκοκκοι έχουν λεπτοφυές ανάγλυφο και είναι τρικολπωτοί έως

πεντακολπωτοί. Είναι αυτοσυμβατός συνδυασμός, διότι αυτού του τύπου οι γυρεόκοκκοι βλαστάνουν σε αυτά τα στίγματα.



Εικόνα 1.4. Δυνατοί συνδυασμοί στίγματος και γυρεοκόκκων (κατά Erben 1978, τροποποιημένο από Μανούσου 2002).

Συνδυασμός D: Επίσης αυτοσυμβατός συνδυασμός. Εδώ τα στίγματα είναι θηλώδη με λεπτοφύες ανάγλυφο, ενώ οι γυρεόκοκκοι έχουν αδρό ανάγλυφο της εξίνης και είναι τρικολπωτοί έως πεντακολπωτοί.

Σύμφωνα με τους παραπάνω πιθανούς συνδυασμούς στίγματος και γυρεοκόκκων, τα είδη *Limonium* ταξινομούνται και ως εξής:

1. Είδη που αναπαράγονται φυλετικά:

- Διμορφικά είδη: Περιλαμβάνουν πληθυσμούς που σχηματίζουν, άτομα με τον αυτοασύμβατο συνδυασμό A και άτομα με τον

αυτοασύμβατο συνδυασμό B. Οι συνδυασμοί αυτοί εμφανίζονται με την ίδια συχνότητα σε αυτούς τους πληθυσμούς, γεγονός που δικαιολογεί τη φυλετική αναπαραγωγή μεταξύ τους. Τα είδη αυτά είναι είτε διπλοειδή, με χρωμοσωματικούς αριθμούς $2n=12, 14, 16$ και 18 , είτε πολυπλοειδή με $2n=32, 34, 36, 54$ και 72 (Erben 1978, 1979, Artelari 1984, Ingrouille & Stace 1985, Artelari & Kamari 1986, 1995, 2000, Artelari & Georgiou 1999, 2002, Georgakopoulou & al. 2006). Σύμφωνα με τον Erben (1978, 1979) η γονιμότητα των γυρεοκόκκων και η παραγωγή σπερμάτων είναι αρκετά υψηλές σε τέτοιους πληθυσμούς.

- Μονομορφικά αυτογονιμοποιούμενα είδη: Σχηματίζουν πληθυσμούς με άτομα που έχουν στα άνθη τους μόνο τον αυτοσυμβατό συνδυασμό C ή μόνο τον αυτοσυμβατό συνδυασμό D. Το ποσοστό γονιμότητας των γυρεοκόκκων τέτοιων ειδών είναι αρκετά υψηλό, αν και η αφθονία τους είναι μειωμένη σε σχέση με άλλα είδη *Limonium*. Μπορεί να είναι διπλοειδή ή πολυπλοειδή (Baker 1953a, Erben 1978, 1979, Ingrouille 1984, Ingrouille & Stace 1985)

2. Είδη που αναπαράγονται αγενώς με απομιξία:

Οι πληθυσμοί τους περιλαμβάνουν άτομα με μόνο τον αυτοασύμβατο συνδυασμό A στα άνθη τους ή με μόνο τον αυτοασύμβατο συνδυασμό B. Οι χρωμοσωματικοί τους αριθμοί είναι τριπλοειδείς, όπως $2n=27$, είτε πολυπλοειδείς, ανευπλοειδείς, όπως $2n=25, 26, 35, 42, 43, 51$ και 52 (Erben 1978, 1979, Ingrouille 1981, Artelari 1989a, b, c, 1992, Sáez & al. 1998a, b, Rosellò & al. 1998, Artelari & Georgiou 1999, 2002). Η υψηλή παραγωγή σπερμάτων σε αυτά τα είδη, σε συνδυασμό με το χαμηλό ποσοστό γονιμότητας των γυρεοκόκκων δικαιολογείται μόνο με το φαινόμενο της απομιξίας. Τις περισσότερες φορές απομιξία παρουσιάζουν υβριδικά είδη *Limonium*, όπως παρατηρείται συνήθως στη φύση (Stebbins 1950).

3. Είδη δυνητικώς απομικτικά:

Τέτοια είδη δύνανται να αναπαράγονται είτε εγγενώς, είτε με απομιξία. Οι πληθυσμοί τους άλλοτε είναι διμορφικοί και περιλαμβάνουν άτομα με τον αυτοάγονο συνδυασμό A και άτομα με τον αυτοάγονο συνδυασμό B (φυλετική αναπαραγωγή) και άλλοτε είναι μονομορφικοί περιλαμβάνοντας άτομα με τον ένα μόνο αυτοάγονο συνδυασμό A ή B (αναπαραγωγή με απομιξία). Το

ποσοστό γονιμότητας των γυρεοκόκκων τους έχει μεγάλο εύρος τιμών (Artelari 1989a, Artelari & Georgiou 2002).

1.4 Το γένος *Limonium* στην ΝΑ Κρήτη

Το γένος *Limonium* στην Νοτιοανατολική Κρήτη περιλαμβάνει τα είδη *L. creticum*, *L. hierapetrae*, *L. cornarianum*, *L. palmare* και *L. virgatum*.

Τα είδη *L. creticum*, *L. hierapetrae*, *L. cornarianum*, είναι ενδημικά της Κρήτης και μαζί με τα *L. ocyimifolium*, *L. runemarkii*, περιλαμβάνονται στην ταξινομική ομάδα (group) του *L. ocyimifolium*, η οποία αποτελείται από συγγενή είδη, που εξαπλώνονται στο κεντρικό και νότιο Αιγαίο, καθώς και στη νότια Πελοπόννησο (Greuter et al 1989, Artelari 1989b, Artelari & Georgiou 1999, 2000).

Το *L. hierapetrae* Rech. fil. ως ενδημικό της Κρήτης, απαντάται στην Ιεράπετρα στο νομό Λασιθίου και σε παραλιακές περιοχές κοντά στην Ιεράπετρα, όπως στα χωριά Νέα Μύρτος, Φέρμα, Μακρύγιαλος, Νέα Ανατολή (Artelari 1989c). Εκεί φύεται κυρίως σε ασβεστολιθικούς παραλιακούς βράχους και παραλιακές μάργες. Είναι φυτό πολυετές ύψους 20-45 cm. Τα φύλλα του είναι επιμήκη-λογχοειδή έως επιμήκη-αντωοειδή με 1-3 νεύρα και οι διαστάσεις τους είναι 1.5-8.0×0.3-1.4 cm, με στρογγυλεμένη ή ελαφρώς μυτερή κατάληξη, δερματώδη έως σαρκώδη, γκριζοπράσινα, με ευδιάκριτο, επίπεδο, χόνδρινο, κυματιστό μερικές φορές περιθώριο εύρους 0.3 mm, που λεπταίνουν σταδιακά σε μίσχο συνήθως μακρύτερο από το έλασμα. Κάποιες φορές τα φυτά διαθέτουν συστάδες από μειωμένα φύλλα στους χαμηλότερους κλάδους. Οι ανθοφόροι βλαστοί του είναι πολυάριθμοι, διακλαδώνονται στο χαμηλότερο 1/3-1/2 του μήκους του, είναι ελαφρώς εύκαμπτοι με εύθραυστους κλάδους, ενώ μη ανθοφόροι κλάδοι είναι ανύπαρκτοι ή 2-4 στο χαμηλότερο μέρος. Η ταξιανθία του είναι κορυμβοειδής. Οι στάχεις του είναι μήκους 1.5-12.0 cm, χαλαροί με (1)-2-3-(4) σταχύδια ανά cm, μονομερείς ή διχοτομημένοι. Τα σταχύδια είναι μήκους 5.5-7.0 mm (συμπεριλαμβανομένου του κάλυκα), απομακρυσμένα μεταξύ τους, σχεδόν ευθεία ή ελαφρώς κυρτά. Το εξωτερικό βράκτιο είναι μήκους 1.5-2.8-(3.0) mm ωοειδές-τριγωνικό, με στενό υαλώδες περιθώριο που επικαλύπτει το 1/3 του εσωτερικού. Το εσωτερικό του βράκτιο έχει διαστάσεις (4.0)-4.2-5.8-(6.0)×3.0-3.5, είναι ελλειψοειδές με στρογγυλεμένη κατάληξη με καφετί και άσπρο υαλώδες περιθώριο εύρους 1 mm (το άσπρο τμήμα του περιθωρίου 0.6 mm), ενώ το ποώδες μέρος του βρακτίου σχηματίζει μια λεπτή μύτη που δεν φτάνει στην

άκρη του. Ο κάλυκας του έχει μήκος 4.2-5.6 mm, είναι ελαφρώς κυρτός και μονομερώς τριχωτός με λεπτές τρίχες, ενώ οι λοβοί του κάλυκα είναι ωοειδείς με στρογγυλεμένη κατάληξη και έχουν μήκος 0.4-0.5 mm. Ο χρωμοσωματικός αριθμός του *L. hierapetrae* είναι $2n=43$ (πενταπλοειδής), αριθμός που είναι ένδειξη ότι το είδος έχει προκύψει μέσω υβριδισμού, αφού είναι συνδυασμός των δύο βασικών χρωμοσωματικών αριθμών του γένους *Limonium* $x=8$ και $x=9$ ($2 \times 8 + 3 \times 9 = 43$).

Το *L. creticum* Artelari έχει εντοπιστεί σε παραλιακές μάργες στο χωριό Μάταλα του νομού Ηρακλείου (Artelari 1989b). Είναι φυτό πολυετές. Τα φύλλα του είναι αντωοειδή-σπατουλόμορφα διαστάσεων 2.0-8.5×0.5-2.0 cm, με 1-3 νεύρα, στρογγυλωμένα ή καταλήγοντα ελαφρώς σε μια προεξοχή, πλατύτερα στη μέση του ελάσματος, δερματώδη, με χρώμα ανοιχτό πράσινο, με δυσδιάκριτο πολύ στενό χόνδρινο περιθώριο εύρους 0.1 mm περίπου, που καταλήγουν απότομα σε μίσχο μακρύτερο από το έλασμα. Οι ανθοφόροι βλαστοί διακλαδίζονται στο χαμηλότερο 1/3-1/2, είναι συνήθως τοξοειδείς, κυρτοί, εύκαμπτοι, με χρώμα ανοιχτό πράσινο, ενώ απουσιάζουν άγονοι κλάδοι ή υπάρχουν 2-3 στο χαμηλότερο μέρος. Η ταξιανθία είναι πυραμιδοειδής. Οι στάχεις μήκους 1.5-4.5 cm είναι τοξοειδείς με 4-6 σταχύδια ανά cm, μονομερώς διατεταγμένα τα περισσότερα. Τα σταχύδια μήκους 6.5-7.0 mm (συμπεριλαμβανομένου του κάλυκα) είναι σχεδόν ευθέα ή ελαφρώς κυρτά. Το εξωτερικό βράκτιο μήκους 2.1-2.6-(2.8) mm είναι ωοειδές-τριγωνικό, με μυτερή κατάληξη και καλύπτει το 1/3 του εσωτερικού βρακτίου. Το εσωτερικό βράκτιο διαστάσεων 6.0-6.8 mm×3.4-3.7 mm είναι ελλειψοειδές με στρογγυλωμένη ή ελαφρώς οδοντωτή κορυφή, με καφετί και άσπρο υαλώδες περιθώριο πλάτους 1 mm περίπου, (το άσπρο μέρος του περιθωρίου έχει πλάτος 0.2 mm). Το πόωδες μέρος του βρακτίου σχηματίζει μια λεπτή προεξοχή μήκους 0.7-1.2 mm που φτάνει στην άκρη του. Ο κάλυκας μήκους (5.6)-6.0-6.2 mm έχει πυκνή τρίχωση με λεπτές μακριές (μήκους 0.5 mm περίπου) τρίχες, ενώ οι λοβοί του είναι ωοειδείς με στρογγυλωμένη κατάληξη και έχουν μήκος 0.6-0.8 mm.

Σε σύγκριση με το *L. hierapetrae*, το *L. creticum* διαφέρει ως προς τα εξής χαρακτηριστικά:

- Έχει αντωοειδή-σπατουλόμορφα φύλλα με στενότερο χόνδρινο περιθώριο
- Έχει πυραμιδοειδή ταξιανθία
- Οι στάχεις του είναι κοντότεροι και πυκνότεροι
- Το εσωτερικό του βράκτιο είναι πιο μακρύ και ελλειψοειδές
- Ο κάλυκας του είναι πιο μακρύτερος και έχει τρίχωση σε όλα τα νεύρα

- Ο χρωμοσωματικός του αριθμός είναι $2n=51$ (εξαπλοειδής) και προκύπτει από συνδυασμό των βασικών χρωμοσωματικών αριθμών του γένους ($3 \times 8 + 3 \times 9 = 51$), στοιχείο που υποδηλώνει υβριδική προέλευση του είδους.

Το *L. cornarianum* Kypriotakis & Artelari έχει εντοπιστεί σε παραλιακούς ασβεστολιθικούς βράχους στη Μονή Καψά του νομού Λασιθίου (Kypriotakis & Artelari 1998). Είναι πολυετές φυτό, λείο, ύψους μέχρι 60 cm. Τα φύλλα του διαστάσεων (2.7)-3.5-9×1-2 cm είναι αντιλογχοειδή-σπατουλόμορφα, οξύληκτα έως ελαφρώς οξύληκτα, με σκληρή βραχεία απότομη προεξοχή, με το μεγαλύτερο πλάτος τους στο κέντρο του ελάσματος, καταλήγοντα απότομα σε μίσχο μακρύτερο από το έλασμα, με στενό χόνδρινο επίπεδο περιθώριο πλάτους περίπου 0.1 mm, με 1-3 νεύρα και χρώμα ανοιχτό πράσινο. Οι βλαστοί του με ζιγκ-ζαγκ διάταξη είναι διακλαδισμένοι στο ανώτερο 1/3 τους, χωρίς άγονους κλάδους ή σπάνια με 2-3 στο κατώτερο τμήμα τους. Η ταξιανθία του είναι ρομβοειδής φόβη, με το πλατύτερο τμήμα στο κατώτερο ήμισυ. Οι στάχεις του είναι μήκους 1.2-2.5(-3) cm. Τα σταχύδια είναι μήκους 4-4.5 mm (συμπεριλαμβανομένου του κάλυκα), κυρίως δίστιχα (3)-4-6 ανά cm. Το εξωτερικό βράκτιο μήκους 1.3-1.7 mm είναι τριγωνικό-ωοειδές, οξύληκτο. Το εσωτερικό βράκτιο (2.8)-3-3.5(-3.8)×2.7-3 mm, είναι αντσοειδές, αμβλύ έως αποστρογγυλωμένο, με μεμβρανώδες περιθώριο πλάτους 0.5-0.8 mm και με το ποώδες τμήμα του να σχηματίζει προεξοχή μήκους 0.4-0.5 mm που δεν φτάνει μέχρι την άκρη του. Ο κάλυκας μήκους 3.2-3.8 mm, είναι πυκνά τριχωτός κυρίως στη μια πλευρά, με μακρές τρίχες (μήκους περίπου 0.5 mm) με λοβούς μήκους 0.3-0.4 mm, ελλειψοειδείς, αμβλείς. Η στεφάνη μήκους περίπου 5 mm είναι ιώδους χρώματος.

Από τα είδη που φύονται στη Κρήτη είναι περισσότερο συγγενικό με τα *L. hierapetrae* και *L. creticum* αλλά διαφέρει από αυτά στα εξής μορφολογικά χαρακτηριστικά:

- Τα φύλλα του έχουν μια ευδιάκριτη προεξοχή
- Τα εξωτερικά, μεσαία και εσωτερικά βράκτιά του είναι κοντύτερα
- Ο κάλυκας του είναι κοντύτερος και με πυκνότερη τρίχωση

Δεν έχει προσδιοριστεί ακριβώς ο χρωμοσωματικός του αριθμός, ωστόσο έχει υπολογιστεί ότι είναι μεγαλύτερος από 40 (Αρτελάρη, αδημοσίευτα στοιχεία).

Το *L. palmare* Rech. είναι είδος της Ανατολικής Μεσογείου. Εξαπλώνεται κυρίως στην κεντρική και νότια Ελλάδα, στα νησιά του Αιγαίου, στις ακτές της Ανατολίας, στην Κύπρο, στο Λίβανο, στη Συρία, στο Ισραήλ και στην Ιορδανία. Στις περιοχές αυτές φύεται σε Παραθαλάσσιους ασβεστολιθικούς, σχιστολιθικούς και κροκαλοπαγείς βράχους και σε αμμώδεις παραλίες. Το *L. palmare* είναι πολυετές φυτό με ± ευθείς κλάδους. Τα φύλλα του σε ρόδακα, είναι διαστάσεων (10-)20-40 × (2,5-)4-12 mm, σαρκώδη, εμφανώς φυματώδη, γκριζοπράσινα έως γλαυκά, επιμήκη-σπατουλόμορφα, αποστρογγυλωμένα, χωρίς μεμβρανώδες περιθώριο, καταλήγοντα απότομα σε ένα μίσχο, μακρύτερο από το στρογγυλεμένο έως καρδιάσχημο έλασμα. Οι ποώδεις βλαστοί του μήκους (8-)20-40(-50) cm με φύλλα στις διακλαδώσεις, είναι γκρι έως γλαυκοί, φυματώδεις έως τραχείς, διχτομικά διακλαδισμένοι από τη βάση, συνήθως αρθρωτοί, με τμήματα μήκους 1-2(-3) cm και με διάμετρο μεγαλύτερη από 0,7 mm. Οι γόνιμοι κλάδοι του σχηματίζουν γωνίες 20-75(-90)°, ενώ έχει αρκετούς άγονους κλάδους. Η ταξιανθία του είναι κορυμβοειδής ή βοτρυοειδής. Οι στάχεις του είναι χαλαροί, (1-)3-6(-11) cm. Τα σταχύδια του μήκους 8-10 mm (συμπεριλαμβανομένου του κάλυκα), είναι τοποθετημένα μονόπλευρα, (1-)2-3(-4) ανά cm και περιέχουν (1-)2-3(-5) άνθη. Το εξωτερικό βράκτιο 2-3(-3,5) mm, είναι υποτριγωνικό, χωρίς τρίχωση. Το μεσαίο βράκτιο είναι επίσης χωρίς τρίχωση, 2,5 mm, επίμηκες, ωοειδές. Το εσωτερικό βράκτιο διαστάσεων 6-8(-8,5) x 2,8-4,5 mm, είναι λείο, χωρίς τρίχωση, έντονα κοίλο, καφέ, με ένα μεμβρανώδες περιθώριο πλάτους 0,3-0,7 mm. Ο κάλυκας μήκους 6-7 mm είναι αραιά τριχωτός έως σχεδόν λείος, με χείλος ίσου σχεδόν μήκους με το σωλήνα, με λοβούς μυτερούς μήκους έως 0,8 mm. Η στεφάνη 7-8(-10) mm, χρώματος ανοιχτού ιώδους έως σχεδόν λευκού. Ο χρωμοσωματικός αριθμός του $2n=34$ (τετραπλοειδές) προκύπτει από το συνδυασμό $2 \times 8 + 2 \times 9$, στοιχείο που υποστηρίζει την υβριδική καταγωγή του είδους.

Το *L. virgatum* (Willd.) Fourr. εξαπλώνεται σε όλη την περιοχή της Μεσογείου. Στην Ελλάδα απαντάται σε Ήπειρο, Θεσσαλία Στερεά Ελλάδα, Πελοπόννησο, Κρήτη, νησιά Ιονίου και Αιγαίου πελάγους. Οι βιότοποι στους οποίους εντοπίζεται περιλαμβάνουν αμμώδεις παραλίες και αμμοθίνες, ασβεστολιθικούς ή κροκαλοπαγείς βράχους, μάργες, βαλτώδεις περιοχές και αλίπεδα. Είναι πολυετές φυτό, με λεία ή τραχεία επιφάνεια, με πολλούς κατακόρυφους βλαστούς. Τα φύλλα του σε βασικό ρόδακα, είναι ακέραια, διαστάσεων (13-)20-60(-80) x (2-)3-8(-12) mm, με μίσχο ίσου περίπου μήκους με το έλασμα (3-)10-25(-30), γκριζοπράσινα ή ξερά κατά την εποχή της άνθισης, στενά σπατουλόμορφα, αντιλογχοειδή ή σφηνοειδή, με ένα νεύρο,

επίπεδα, με στενό μεμβρανώδες περιθώριο, στην κορυφή στρογγυλά έως αμβλέα ή με μια κοντή ακίδα έως 0,5 mm. Οι βλαστοί του είναι ποώδεις, άκαμπτοι, πολυάριθμοι, με χρώμα γκριζοπράσινο, μήκους (10-)20-40(-60) cm, έντονα διχοτομικά διακλαδισμένοι από τη βάση τους, με κλάδους σκληρούς που σχηματίζουν γωνίες 30-60°, με αρκετούς κατώτερους άγονους κλάδους και ανώτερους γόνιμους. Η ταξιανθία του είναι βοτρυοειδής ή κορυμβοειδής. Οι στάχεις του είναι συμπαγείς, 1-4(-7) cm, τοξοειδείς. Τα σταχύδιά του είναι εμφανώς κυρτά, σε μορφή μπανάνας, τοποθετημένα συνήθως μονόπλευρα, (3-)4-5(-6) ανά cm, μήκους 6-7(-7,5) mm (συμπεριλαμβανομένου του κάλυκα), που περιέχουν τα άνθη, τα οποία περιβάλλονται σφικτά από το εσωτερικό βράκτιο. Το εξωτερικό βράκτιο του σταχυδίου, είναι τριγωνικό και οξύληκτο, μήκους 1,9-2,4(-2,8) mm, με στενό μεμβρανώδες περιθώριο εύρους 0,2 mm περίπου. Το μεσαίο βράκτιο, μήκους 2-2,5 mm, είναι στενά αντωειδές, μεμβρανώδες με δύο ισομήκη νεύρα. Το εσωτερικό βράκτιο διαστάσεων (4,8-)5-6,5(-6,8) x 3-3,5(-4) mm, έχει σχήμα επίμηκες ελλειψοειδές έως επίμηκες αντωειδές, έντονα κυρτό, με τρίπιδα στη ράχη, χρώματος καφέ έως ιώδους, με ένα ευρύ μεμβρανώδες περιθώριο 0,6-0,8 mm. Ο κάλυκας μήκους (5-)5,5-6,5(-7) mm, είναι κυρτός, με τρίχωση στη βάση και στα νεύρα, με χείλος ίσο ή μεγαλύτερο του σωλήνα, με λοβούς από- στρογγυλωμένους, μήκους 0,4-0,7 mm. Η στεφάνη μήκους (7-)8-9(-10) mm, είναι χρώματος ανοιχτού ιώδους. Το είδος είναι τριπλοειδές με χρωμοσωματικό αριθμό $2n=3x=27$.

1.5 Αναπαραγωγικά πρότυπα των ειδών *Limonium* της ΝΑ Κρήτης

Τα αναπαραγωγικά πρότυπα που ακολουθούν τα είδη του γένους *Limonium* της ΝΑ Κρήτης με βάση τα βιβλιογραφικά δεδομένα έχουν ως εξής:

L. hierapetrae: Όλοι οι πληθυσμοί του είδους έχουν βρεθεί μονομορφικοί με τον αυτοσύμβατο συνδυασμό Β. Οι γυρεόκοκκοι ποικίλλουν σε μέγεθος, με τους γόνιμους να είναι πολύ μεγαλύτεροι από τους άγονους και τετρακολπωτοί ή πεντακολπωτοί, ενώ η γονιμότητά τους είναι χαμηλή. Τα παραπάνω στοιχεία σε συνδυασμό με το χρωμοσωματικό αριθμό και την υψηλή παραγωγή σπερμάτων αποδεικνύουν ότι το είδος αναπαράγεται απομικτικώς (Artelari 1989c).

L. creticum: Μελέτη του συνδυασμού στίγματος-γυρεοκόκκων, όπως και η γονιμότητα των γυρεοκόκκων έδειξαν ότι το είδος είναι απομικτικό. Απαντάται μόνο ο αυτοσύμβατος συνδυασμός Α (Baker 1948, Erben 1978) στους πληθυσμούς και η

γονιμότητα των γυρεοκόκκων είναι χαμηλή (11.1% κατά μέσο όρο). Οι γόνιμοι γυρεόκοκκοι είναι πολύ μεγαλύτεροι από τους άγονους και τετρακολπωτοί ή πεντακολπωτοί. Επιπλέον η παραγωγή σπερμάτων όλων των φυτών του είδους είναι υψηλή. Επομένως αναπαράγεται με απομιξία.

L. cornarianum: Δεν βρέθηκαν δημοσιευμένα στοιχεία για το μηχανισμό αναπαραγωγής πληθυσμών του είδους.

L. virgatum: Πληθυσμοί του είδους που εξετάστηκαν, βρέθηκαν μονομορφικοί με τον αυτοσύμβατο συνδυασμό B με χαμηλή γονιμότητα γυρεοκόκκων και υψηλή παραγωγή σπερμάτων. Τα στοιχεία αυτά επιβεβαιώνουν την απομικτική αναπαραγωγή του είδους (Erben 1979, Artelari 1984, Artelari 1989, Artelari & Georgiou 2002).

L. palmare: Πληθυσμοί του είδους που εξετάστηκαν με βάση το συνδυασμό στίγματος και γυρεοκόκκων προέκυψε ότι είναι διμορφικοί ή μονομορφικοί (Georgakopoulou et al. 2006). Σε κάθε διμορφικό πληθυσμό απαντώνται και οι δύο αυτοσύμβατοι συνδυασμοί A και B, ενώ σε κάθε μονομορφικό πληθυσμό απαντάται μόνο ο συνδυασμός A ή μόνο ο συνδυασμός B. Η γονιμότητα των γυρεοκόκκων όλων των πληθυσμών εμφανίζει μεγάλο εύρος τιμών (0-99%), ενώ η παραγωγή σπερμάτων είναι υψηλή. Τα παραπάνω στοιχεία κατατάσσουν το είδος στα δυνητικώς απομικτικά.

1.6. Μορφομετρία, γενετική ποικιλότητα, επιγενετική

Αυτή τη στιγμή στη βιβλιογραφία, παρά τον μεγάλο αριθμό taxa που εμφανίζει το γένος καταγράφεται μια υστέρηση σε σχέση με άλλα taxa στη μελέτη των γενετικών χαρακτηριστικών τους, σε πολλές περιοχές του κόσμου και της Ελλάδος, κυρίως λόγω της ποικιλομορφίας που εμφανίζουν οι μορφολογικοί χαρακτήρες των ειδών και των δυσκολιών ταυτοποίησής τους με κλασικές κλείδες αναγνώρισης. Αυτή η υστέρηση δημιουργεί ένα σημαντικό ερευνητικό κενό, δεδομένου ότι τα είδη του γένους εμπλέκονται σε σημαντικές οικολογικές και εξελικτικές διεργασίες όπως ο υβριδισμός και χαρακτηρίζονται από έναν ιδιόρρυθμο τρόπο αναπαραγωγής που οδηγεί σε γρήγορη ειδογένεση.

Για τα taxa της ΝΑ Κρήτης, μιας περιοχής με υψηλό ενδημισμό του γένους *Limonium*, δεν έχει βρεθεί μέχρι στιγμής κάποια μελέτη που να εξετάζει τη γενετική ποικιλότητα αυτών των taxa ούτως ώστε να δούμε κατά πόσο τα μορφολογικά

συγκλίνουν με τα γενετικά χαρακτηριστικά. Επίσης, δεν έχει εξεταστεί κατά πόσο ο επιγενετικός παράγοντας, συγκεκριμένα αυτός που σχετίζεται με τη μεθυλίωση του DNA και παίζει ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, συμβάλλει στη διαφοροποίηση των σχέσεων μορφολογικών και γενετικών χαρακτηριστικών.

Κάτι τέτοιο κρίνεται ιδιαίτερα σημαντικό στη μελέτη του γένους, αν λάβει κανείς υπόψη του τις ταξινομικές δυσκολίες που υπάρχουν.

1.7 Σκοπός

Στην παρούσα εργασία επιχειρείται η μελέτη της γενετικής ποικιλότητας του γένους *Limonium* στη ΝΑ Κρήτης, ούτως ώστε να αναδειχθεί το κατά πόσο συγκλίνουν τα μορφομετρικά με τα γενετικά χαρακτηριστικά στον χαρακτηρισμό των taxa και διερευνάται ο ρόλος του επιγενετικού παράγοντα.

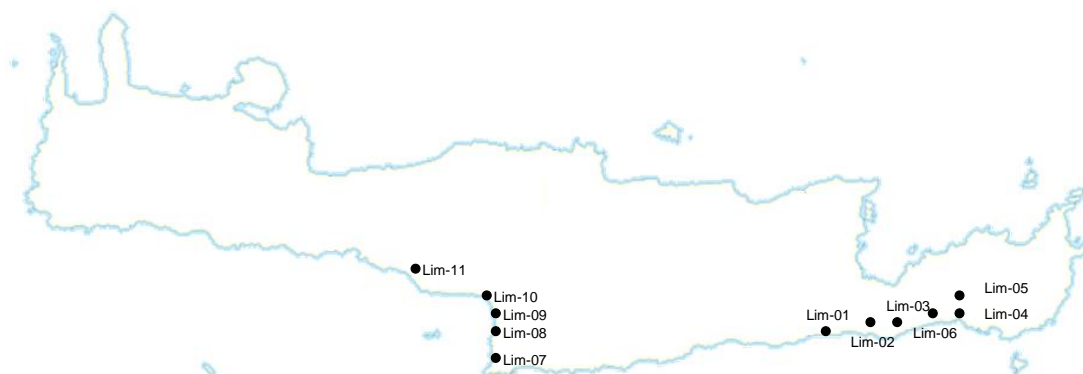
2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Συλλογή φυτικού υλικού

Στο πλαίσιο της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες των taxa *Limonium cornarianum*, *Limonium creticum*, *Limonium hierapetrae*, *Limonium palmare* και *Limonium virgatum* στη ΝΑ Κρήτη. Συγκεκριμένα, συλλέχθηκαν δύο πληθυσμοί *L. hierapetrae*, δύο πληθυσμοί *L. cornarianum*, πέντε πληθυσμοί *L. creticum*, ένας πληθυσμός *L. palmare* και δύο πληθυσμοί *L. virgatum*. Η αναγνώριση των ειδών αυτών στο πεδίο βασίστηκε στη μορφολογία των φύλλων αλλά και της ταξιανθίας. Για το λόγο αυτό οι δειγματοληψίες έγιναν κατά την περίοδο ανθοφορίας του *Limonium*.

Οι δειγματοληψίες, που έγιναν το Σεπτέμβριο του 2013, κάλυψαν μεγάλο μέρος των νοτιοανατολικών παραλιακών περιοχών του νησιού. Συγκεκριμένα συλλέχθηκαν και εξετάστηκαν για τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά συνολικά 60 δείγματα από 12 πληθυσμούς, ενώ 44 από αυτά τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν στη μοριακή ανάλυση (Πίνακας 2.1). Οι πληθυσμοί από τους οποίους συλλέχθηκαν τα άτομα,

χαρτογραφήθηκαν μέσω γεωαναφορών με GPS (Global Positioning System). Στο χάρτη της Εικόνας 2.1 φαίνονται τα ακριβή στίγματα των περιοχών δειγματοληψίας (Lim-01-Lim-11).



Εικόνα 2.1. Περιοχές δειγματοληψίας των φυτών *Limonium* της Ν.Α. Κρήτης

Πίνακας 2.1: Πίνακας των taxa και των περιοχών απ' όπου συλλέχθηκαν δείγματα

Κωδικός	Είδος	Νομός*	Περιοχή	Κωδ. Περιοχής
2013.09.08-01	<i>L. hierapetrae</i>	Λασιθίου	Νέα Μύρτος	Lim-01
2013.09.08-02	<i>L. hierapetrae</i>	Λασιθίου	Νέα Μύρτος	Lim-01
2013.09.08-03	<i>L. hierapetrae</i>	Λασιθίου	Νέα Μύρτος	Lim-01
2013.09.08-04	<i>L. virgatum</i>	Λασιθίου	Ιεράπετρα	Lim-02
2013.09.08-05	<i>L. virgatum</i>	Λασιθίου	Ιεράπετρα	Lim-02
2013.09.08-06	<i>L. virgatum</i>	Λασιθίου	Ιεράπετρα	Lim-02
2013.09.08-07	<i>L. virgatum</i>	Λασιθίου	Ιεράπετρα	Lim-02
2013.09.08-08	<i>L. virgatum</i>	Λασιθίου	Ιεράπετρα	Lim-02
2013.09.08-09	<i>L. virgatum</i>	Λασιθίου	Ιεράπετρα	Lim-02
2013.09.08-10	<i>L. virgatum</i>	Λασιθίου	Ιεράπετρα	Lim-02
2013.09.08-11	<i>L. hierapetrae</i>	Λασιθίου	Παραλία Φερμών	Lim-03
2013.09.08-12	<i>L. hierapetrae</i>	Λασιθίου	Παραλία Φερμών	Lim-03
2013.09.08-13	<i>L. hierapetrae</i>	Λασιθίου	Παραλία Φερμών	Lim-03
2013.09.08-14	<i>L. cornarianum</i>	Λασιθίου	Μονή Καψά	Lim-04
2013.09.08-15	<i>L. cornarianum</i>	Λασιθίου	Μονή Καψά	Lim-04
2013.09.08-16	<i>L. cornarianum</i>	Λασιθίου	Μονή Καψά	Lim-04
2013.09.08-17	<i>L. cornarianum</i>	Λασιθίου	Μονή Καψά	Lim-04

2013.09.08-18	<i>L. cornarianum</i>	Λασιθίου	Μονή Καψά μπροστά από Περιβολάκια	Lim-05
013.09.08-19	<i>L. cornarianum</i>	Λασιθίου	Μονή Καψά μπροστά από Περιβολάκια	Lim-05
2013.09.08-20	<i>L. cornarianum</i>	Λασιθίου	Μονή Καψά μπροστά από Περιβολάκια	Lim-05
2013.09.08-21	<i>L. palmare</i>	Λασιθίου	Ανάληψη	Lim-06
2013.09.08-22	<i>L. palmare</i>	Λασιθίου	Ανάληψη	Lim-06
2013.09.08-23	<i>L. palmare</i>	Λασιθίου	Ανάληψη	Lim-06
2013.09.08-24	<i>L. palmare</i>	Λασιθίου	Ανάληψη	Lim-06
2013.09.08-25	<i>L. palmare</i>	Λασιθίου	Ανάληψη	Lim-06
2013.09.08-26	<i>L. palmare</i>	Λασιθίου	Ανάληψη	Lim-06
2013.09.08-27	<i>L. palmare</i>	Λασιθίου	Ανάληψη	Lim-06
2013.09.08-28	<i>L. palmare</i>	Λασιθίου	Ανάληψη	Lim-06
2013.09.08-29	<i>L. palmare</i>	Ηρακλείου	Ανάληψη	Lim-06
2013.09.11-01	<i>L. creticum</i>	Ηρακλείου	Μάταλα	Lim-07
2013.09.11-02	<i>L. creticum</i>	Ηρακλείου	Μάταλα	Lim-07
2013.09.11-03	<i>L. creticum</i>	Ηρακλείου	Μάταλα	Lim-07
2013.09.11-04	<i>L. creticum</i>	Ηρακλείου	Μάταλα	Lim-07
2013.09.11-05	<i>L. creticum</i>	Ηρακλείου	Μάταλα	Lim-07
2013.09.11-06	<i>L. creticum</i>	Ηρακλείου	Μάταλα	Lim-07
2013.09.11-07	<i>L. creticum</i>	Ηρακλείου	Μάταλα	Lim-07
2013.09.11-08	<i>L. creticum</i>	Ηρακλείου	Μάταλα	Lim-07
2013.09.11-09	<i>L. creticum</i>	Ηρακλείου	Μεταξύ Ματάλων και Κομού	Lim-08
2013.09.11-10	<i>L. creticum</i>	Ηρακλείου	Μεταξύ Ματάλων και Κομού	Lim-08
2013.09.11-11	<i>L. creticum</i>	Ηρακλείου	Μεταξύ Ματάλων και Κομού	Lim-08
2013.09.11-12	<i>L. creticum</i>	Ηρακλείου	Μεταξύ Ματάλων και Κομού	Lim-08
2013.09.11-13	<i>L. creticum</i>	Ηρακλείου	Μεταξύ Ματάλων και Κομού	Lim-08
2013.09.11-14	<i>L. creticum</i>	Ηρακλείου	Μεταξύ Ματάλων και Κομού	Lim-08
2013.09.11-15	<i>L. creticum</i>	Ηρακλείου	Κομός	Lim-09
2013.09.11-16	<i>L. virgatum</i>	Ηρακλείου	Καλαμάκι	Lim-10

2013.09.11-17	<i>L. virgatum</i>	Ηρακλείου	Καλαμάκι	Lim-10
2013.09.11-18	<i>L. virgatum</i>	Ηρακλείου	Καλαμάκι	Lim-10
2013.09.11-19	<i>L. virgatum</i>	Ηρακλείου	Καλαμάκι	Lim-10
2013.09.11-20	<i>L. virgatum</i>	Ηρακλείου	Καλαμάκι	Lim-10
2013.09.11-21	<i>L. creticum</i>	Ηρακλείου	Καλαμάκι	Lim-10
2013.09.11-22	<i>L. creticum</i>	Ηρακλείου	Καλαμάκι	Lim-10
2013.09.11-23	<i>L. creticum</i>	Ηρακλείου	Καλαμάκι	Lim-10
2013.09.11-24	<i>L. creticum</i>	Ηρακλείου	Καλαμάκι	Lim-10
2013.09.11-25	<i>L. creticum</i>	Ηρακλείου	Καλαμάκι	Lim-10
2013.09.11-26	<i>L. creticum</i>	Ρεθύμνου	Αγία Γαλήνη	Lim-11
2013.09.11-27	<i>L. creticum</i>	Ρεθύμνου	Αγία Γαλήνη	Lim-11
2013.09.11-28	<i>L. creticum</i>	Ρεθύμνου	Αγία Γαλήνη	Lim-11
2013.09.11-29	<i>L. creticum</i>	Ρεθύμνου	Αγία Γαλήνη	Lim-11
2013.09.11-30	<i>L. creticum</i>	Ρεθύμνου	Αγία Γαλήνη	Lim-11
2013.09.11-31	<i>L. creticum</i>	Ρεθύμνου	Αγία Γαλήνη	Lim-11

*σύμφωνα με προηγούμενη διοικητική διαίρεση

Όσον αφορά τη διαδικασία της συλλογής, για κάθε δείγμα φρέσκα φύλλα από τη βάση του βλαστού συλλέχθηκαν και αποθηκεύτηκαν σε Ziploc συσκευασίες με Silica gel (Reactolab SA). Τα φύλλα αυτά αργότερα χρησιμοποιήθηκαν στη μοριακή ανάλυση. Ο υπόλοιπος βλαστός με ολόκληρη την ταξιανθία καθώς και κάποια φύλλα αποθηκεύτηκαν ως υπόδειγμα (δείγμα herbarium) για στερεοσκοπική και μικροσκοπική παρατήρηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών.

2.2 Μοριακή Ανάλυση

- **AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms) – Ανάλυση φθορίζοντων πολυμορφισμών μήκους ενισχυμένων τμημάτων DNA.**

Η τεχνική των AFLPs είναι μια εδραιωμένη τεχνική Μοριακών Δεικτών (Mueller & Wolfenbarger 1999, Meudt & Clarke 2007) που βασίζεται στην επιλεκτική ενίσχυση τμημάτων DNA μέσω PCR. Η τεχνική περιλαμβάνει ένα βήμα πένησης με δύο περιοριστικά ένζυμα (EcoR I και Mse I), ώστε το μέγεθος του γενωμικού DNA να μειωθεί σημαντικά σε περισσότερα και αναγκαστικά μικρότερου μήκους θραύσματα περιορισμού (Εικ. 2.1). Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται πλέον ευρέως στην πληθυσμιακή Γενετική, (Woodhead et al. 2005, Barluenga et al. 2006) στην

καταγραφή της γενετικής ποικιλότητας (Mariette et al. 2002, Nybom 2004), στην αναγνώριση υβριδίων (Goldman et al. 2004) και σε άλλα, καθώς είναι μια ιδιαίτερα ευαίσθητη μέθοδος με μεγάλη επαναληψιμότητα.

Οι δείκτες (markers) που προκύπτουν από αυτή την τεχνική, παρ' όλο που συχνά συγκεντρώνονται στην περιοχή του κεντρομέρους (Alonso-Blanco et al. 1998, Saliba-Colombani et al. 2000), είναι διάσπαρτοι σε ολόκληρο το γονιδίωμα, επιτρέποντας έτσι μια γενική εκτίμηση της γενωμικής ποικιλότητας. Αξιοσημείωτο είναι ότι η τεχνική των AFLPs παράγει κυρίαρχους δείκτες (dominant markers), το οποίο δυσκολεύει τη διάκριση των ομόζυγων από ετερόζυγα άτομα, από το πρότυπο της ηλεκτροφόρησης των θραυσμάτων και μόνο. Συνοψίζοντας, τα AFLPs είναι μια ιδανική επιλογή τεχνικής σε περιπτώσεις όπου δεν υπάρχει εκ των προτέρων πληροφορία για την αλληλουχία του γονιδιώματος, σε ενδοειδικές μελέτες, σε περιπτώσεις υψηλής γενωμικής ετερογένειας, σε καταστάσεις χαμηλής γενετικής ποικιλότητας, σε πολυπλοειδείς, καθώς και σε περιπτώσεις υβριδισμού με σκοπό τη γρήγορη παραγωγή δεδομένων, όπου DNA υψηλής ποιότητας είναι διαθέσιμο και δεν υπάρχουν άλλοι Μοριακοί Δείκτες καλά εδραιωμένοι και κατάλληλοι για τη συγκεκριμένη περίπτωση (Mueller & Wolfenbarger 1999, Bensch & Åkesson 2005, Meudt & Clarke 2007). Η τεχνική αυτή δημοσιεύτηκε από Vos et al. (1995) και οι βασικές αρχές της χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή με λίγες μόνο τροποποιήσεις.

Η τεχνική των AFLP αποτελείται από 6 βασικά στάδια:

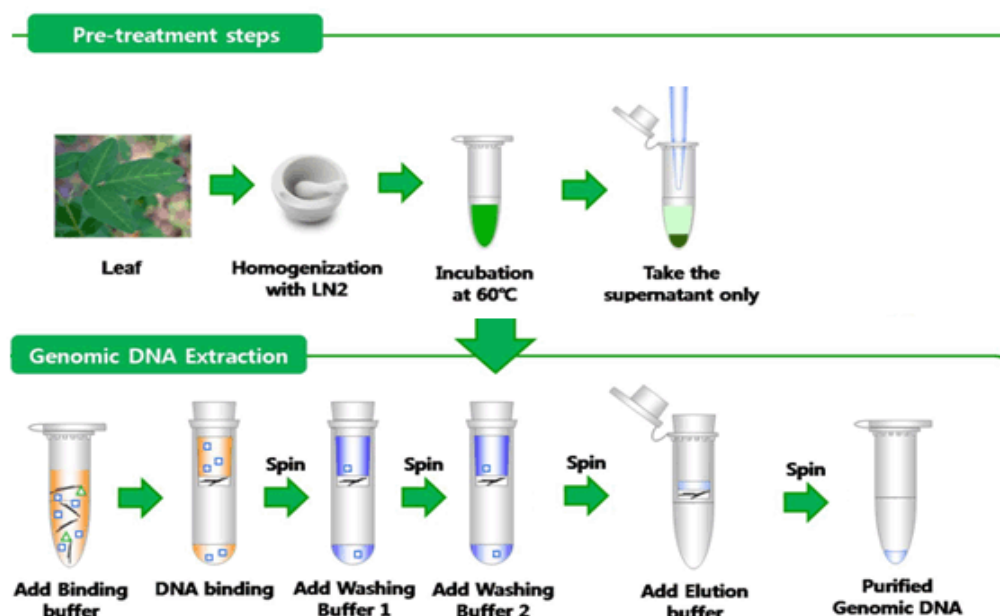
Στάδιο 1^ο: Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση του ολικού DNA των 44 δειγμάτων *Limonium*, χρησιμοποιήθηκαν φύλλα όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Τα φύλλα λυοφιλοποιήθηκαν παρουσία υγρού αζώτου και εν συνεχεία ο ιστός διατηρήθηκε στους -80° C. Η απομόνωση του ολικού DNA έγινε με τη χρήση του kit της Macherey-Nagel, αρχίζοντας με 100 mg φυτικού υλικού και καταλήγοντας σε 60 μ L απομονωμένου DNA, διάφορων συγκεντρώσεων. Η ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης, αλλά και της καθαρότητας (λόγος της απορρόφησης στα 260 nm προς την απορρόφηση στα 280 nm) του απομονωμένου DNA έγινε με τη βοήθεια φωτομέτρου Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific USA). Τέσσερα μ L DNA

ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1.2 % παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (EthBr) και η οπτικοποίηση έγινε κάτω από UV ακτινοβολία (UV box).

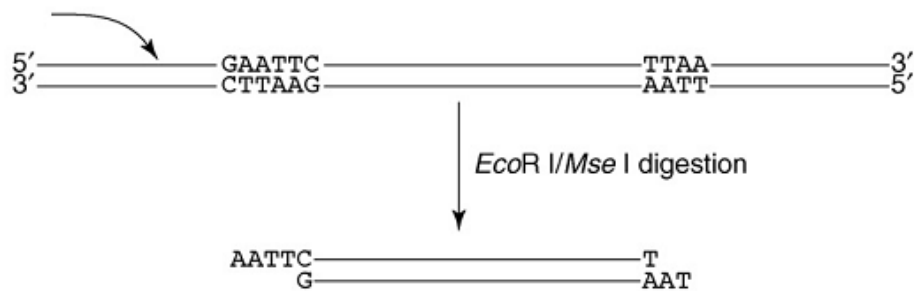
Στάδιο 2^ο: Πέψη του ολικού DNA

Πραγματοποιήθηκε πέψη σε 100 ng από κάθε δείγμα, χρησιμοποιώντας δύο περιοριστικά ένζυμα. Το ένζυμο Mse I, που θεωρείται «συχνός κόπτης», κόβει το DNA σε πολλά σημεία, καθώς η αλληλουχία αναγνώρισής του έχει μήκος 4 βάσεων (5'-T|TAA-3'), ενώ το ένζυμο EcoR I θεωρείται «σπάνιος κόπτης» και κόβει το DNA σε λιγότερες θέσεις, καθώς η αλληλουχία αναγνώρισής του έχει μήκος 6 βάσεων (5'-G|AATTC-3') (Εικ. 2.2).



Εικόνα 2.1. Απομόνωση ολικού DNA.

Γενωμικό DNA



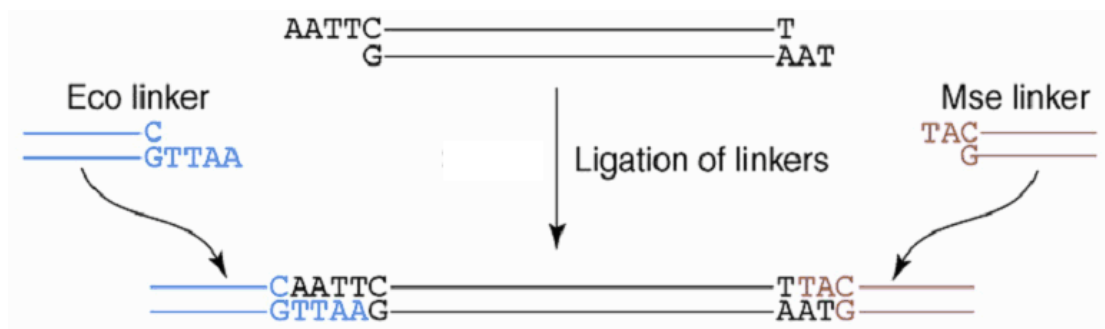
Εικόνα 2.2. Πέψη του DNA με τα ένζυμα περιορισμού EcoRI/MseI.

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης πέψης για κάθε δείγμα ήταν 10.3 μL , τα οποία περιείχαν:

- 100 ng DNA δείγματος (ο όγκος ποικίλλει ανάλογα με τη συγκέντρωση του DNA)
- 2 U EcoR I (New England Biolabs, UK)
- 2 U Mse I (New England Biolabs, UK)
- 10x Reaction Buffer NEB4: 50 mM potassium acetate, 20 mM Tris-acetate, 10 mM magnesium acetate, 1 mM dithiothreitol, pH 7.9 @ 25°C (New England Biolabs, UK).
- DdH₂O (έως τελικού όγκου 10.3 μL)

Η πέψη πραγματοποιήθηκε στους 37°C για 2 h και ακολούθησε η απενεργοποίηση των ενζύμων με επώαση των δειγμάτων στους 70°C για 15 min.

Στάδιο 3^ο: Λιγοποίηση των προσαρμοστών:



Εικόνα 2.3. Λιγοποίηση των προσαρμοστών

Χρησιμοποιήθηκαν στο στάδιο αυτό δύο δίκλωνοι προσαρμοστές (Εικ. 2.3) των οποίων τα άκρα είναι συμπληρωματικά προς τις μονόκλωνες αλληλουχίες που προέκυψαν στα θραύσματα του DNA μετά την πέψη με τα δύο ένζυμα περιορισμού (Mse I & EcoR I). Οι αλληλουχίες 5'→3' των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία των δίκλωνων προσαρμοστών, φαίνονται παρακάτω:

- EcoR I forward:

CTC-GTA-GAC-TGC-GTA-CC

- EcoR I reverse:

AAT-TGG-TAC-GCA-GTC-TAC

- Mse I forward:

GAC-GAT-GAG-TCC-TGA-G

- Mse I reverse:

TAC-TCA-GGA-CTC-AT

Για τη δημιουργία των δύο δίκλωνων προσαρμοστών πραγματοποιήθηκε μια διαδικασία υβριδισμού των παραπάνω ολιγονουκλεοτιδίων σε τελικό όγκο 100 μ L για κάθε προσαρμοστή ως εξής:

A. EcoR I Adapters (5 μ M)

- 5 μ M EcoR I forward
- 5 μ M EcoR I reverse
- 1x TE buffer (10 mM Tris-HCl pH=8, 1 mM EDTA)

B. Mse I Adapters (50 μ M)

- 50 μ M Mse I forward
- 50 μ M Mse I reverse

Για την αντίδραση υβριδισμού χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συνθήκες:

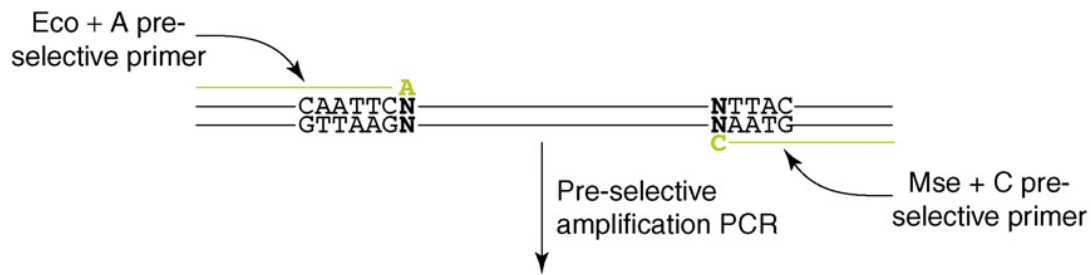
- 95°C για 5 min
- 65°C για 10 min
- 37°C για 10 min

Μετά τον υβριδισμό οι προσαρμοστές έμειναν για λίγο σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα αποθηκεύθηκαν στους -20°C. Οι δίκλωνοι προσαρμοστές επιδέθηκαν στα κολλώδη άκρα των θραυσμάτων περιορισμού με τη χρήση της T4 DNA λιγάσης προσθέτοντας στα προϊόντα της πέψης 10 µL μείγματος που περιείχε:

- 0.5 µM EcoR I Adaptor
- 5 µM Mse I Adaptor
- 2.5 U T4 DNA λιγάση (New England Biolabs, UK)
- 1x T4 DNA Ligase Reaction Buffer: 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, pH 7.5 @ 25°C (New England Biolabs, UK).
- ddH₂O (έως τελικού όγκου 10 µL)

Ο τελικός όγκος του διαλύματος για κάθε δείγμα στο στάδιο της λιγοποίησης ήταν 20.3 µL. Το διάλυμα αυτό επωάστηκε στους 23°C για 2 ώρες, για να γίνει η αντίδραση της λιγοποίησης των προσαρμοστών στο προϊόν της πέψης και αμέσως μετά το προϊόν έμεινε για 10 λεπτά στους 65°C για την απενεργοποίηση του ενζύμου της DNA λιγάσης. Τα προϊόντα της λιγοποίησης αποθηκεύθηκαν στους -20°C.

Στάδιο 4°: Προ-επιλεκτική ενίσχυση



Εικόνα 2.4. Προ-επιλεκτική ενίσχυση.

Στο 4ο στάδιο, ένα υποσύνολο των τμημάτων DNA κάθε δείγματος που προέκυψε από το στάδιο 3, ενισχύεται μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται για την αντίδραση αυτή, είναι συμπληρωματικοί της αλληλουχίας των προσαρμοστών με ένα επιπλέον νουκλεοτίδιο στο 3' άκρο (Eco+A και Mse+C). Πιο συγκεκριμένα η αδενίνη στο 3' άκρο της θέσης EcoR I απαγορεύει την ενίσχυση περίπου του 75% των θραυσμάτων DNA (δηλαδή αυτών που φέρουν στη συγκεκριμένη θέση A, G ή C). Ομοίως λειτουργεί η κυτοσίνη στο 3' άκρο της θέσης Mse I (Εικ. 2.4). Με τον τρόπο αυτό, ο αριθμός των ενισχυόμενων θραυσμάτων DNA των δειγμάτων περιορίζεται περίπου στο 1/16 του αρχικού συνόλου τους (Meudt and Clarke 2007). Οι αλληλουχίες 5'→3' των εκκινητών φαίνονται παρακάτω:

- Eco+A:

GAC-TGC-GTA-CCA-ATT-CA

- Mse+C:

GAT-GAG-TCC-TGA-GTA-AC

Η κάθε αντίδραση της προ-επιλεκτικής ενίσχυσης περιείχε τα εξής:

- 0.5 μL προϊόντος λιγοποίησης
- 0.2 mM dNTPs (Kapa Biosystems, USA)
- 0.24 μM Eco-A primer
- 0.24 μM Mse-C primer
- 5x Buffer B (Kapa Biosystems, USA)
- 1 U Taq DNA polymerase (Kapa Biosystems, USA)

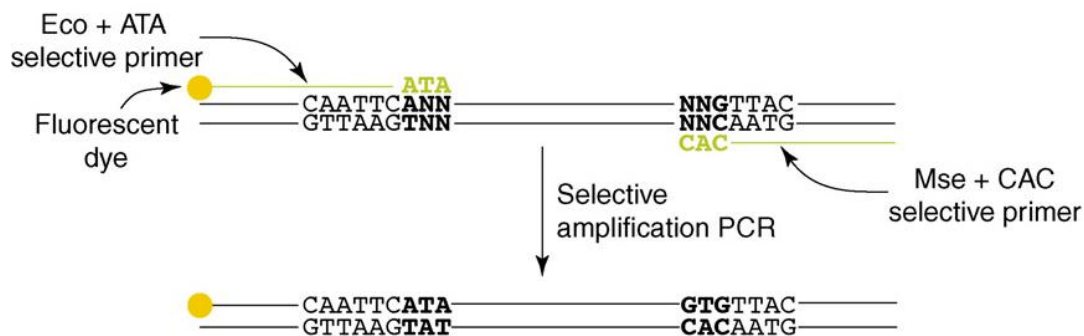
- ddH₂O έως τελικού όγκου αντίδρασης 25 μL

Η PCR διεξήχθη στο θερμοκυκλοποιητή PTC-200 (MJ Research, USA), σύμφωνα με το εξής πρόγραμμα:

- 94°C για 30 s
- 25 κύκλοι, ο καθένας από τους οποίους είναι:
 - 94°C για 30 s
 - 56°C για 1 min
 - 72°C για 1 min
- 72°C για 30 s
- 5°C για απεριόριστο χρονικό διάστημα

Από κάθε προϊόν της προ-επιλεκτικής ενίσχυσης, 4 μL ηλεκτροφορήθηκαν για 15 min σε διαγνωστικό πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 1.2% παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (EthBr). Τα θραύσματα οπτικοποιήθηκαν κάτω από UV ακτινοβολία για να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα της προ-επιλεκτικής ενίσχυσης. Τα υπόλοιπα 21 μL αποθηκεύθηκαν στους -20°C για περαιτέρω χρήση.

Στάδιο 5^ο: Επιλεκτική ενίσχυση



Εικόνα 2.5. Επιλεκτική ενίσχυση

Στο 5ο στάδιο ο αριθμός των διαφορετικών θραυσμάτων DNA που προέκυψαν στο στάδιο 4, μειώνεται περαιτέρω από ένα δεύτερο κύκλο PCR (επιλεκτική ενίσχυση) και σημαίνεται. Το προϊόν της PCR από την προ-επιλεκτική ενίσχυση, χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα με εκκινητές που έχουν κάθε φορά δύο επιπλέον

νουκλεοτίδια επιλογής στο 3' άκρο (Eco-ANN και Mse-CNN) και μία φθορίζουσα ουσία. Πιο συγκεκριμένα ο Eco-ANN εκκινητής είναι σημασμένος με μια φθορίζουσα χρωστική στο 5' άκρο του, ώστε όλα τα θραύσματα DNA που προκύπτουν από την ενίσχυση με αυτόν τον εκκινητή να φθορίζουν. Συνεπώς διαφορετικά υποσύνολα DNA θραυσμάτων μπορούν να ενισχυθούν με τη χρήση εκκινητών με διαφορετικές νουκλεοτιδικές βάσεις στο 3' άκρο τους. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 4 διαφορετικά ζευγάρια εκκινητών (Πίνακας 2.2), στα οποία ο Eco-ANN εκκινητής ήταν σημασμένος με διαφορετική φθορίζουσα χρωστική στο 5' άκρο του. Αυτά τα 4 ζευγάρια εκκινητών επιλέχθηκαν ανάμεσα από 24 συνδυασμούς εκκινητών (Πίνακας 2.3) που δοκιμάστηκαν για την ποιότητα και το πλήθος των παραγόμενων θραυσμάτων DNA διαφορετικού μεγέθους.

Πίνακας 2.2. Πίνακας ζευγών εκκινητών με φθορίζουσες χρωστικές

Ζεύγος εκκινητών	Φθορίζουσα χρωστική
Eco-AGG + Mse-CAA	FAM
Eco-AAG + Mse-CTA	ROX
Eco-AAG + Mse-CTG	TAMRA
Eco-ACT + Mse-CAA	HEX

Πίνακας 2.3. Πίνακας ζευγών εκκινητών που εξετάστηκαν για την ποιότητα και το πλήθος των παραγόμενων θραυσμάτων DNA διαφορετικού μεγέθους.

Ζεύγη εκκινητών		
1. Eco-AGG + Mse-CAA	9. Eco-AAG + Mse-CAA	17. Eco-ACT + Mse-CAA
2. Eco-AGG + Mse-CAG	10. Eco-AAG + Mse-CAG	18. Eco-ACT + Mse-CAG
3. Eco-AGG + Mse-CAC	11. Eco-AAG + Mse-CAC	19. Eco-ACT + Mse-CAC
4. Eco-AGG + Mse-CAT	12. Eco-AAG + Mse-CAT	20. Eco-ACT + Mse-CAT
5. Eco-AGG + Mse-CTA	13. Eco-AAG + Mse-CTA	21. Eco-ACT + Mse-CTA
6. Eco-AGG + Mse-CTC	14. Eco-AAG + Mse-CTC	22. Eco-ACT + Mse-CTC
7. Eco-AGG + Mse-CTG	15. Eco-AAG + Mse-CTG	23. Eco-ACT + Mse-CTG
8. Eco-AGG + Mse-CTT	16. Eco-AAG + Mse-CTT	24. Eco-ACT + Mse-CTT

Για την επιλεκτική ενίσχυση ακολουθήθηκε η διαδικασία PCR σύμφωνα με Κουτρούμπα Κ (2014) με μικρές τροποποιήσεις:

- 0.25 μL προϊόντος προ-επιλεκτικής ενίσχυσης

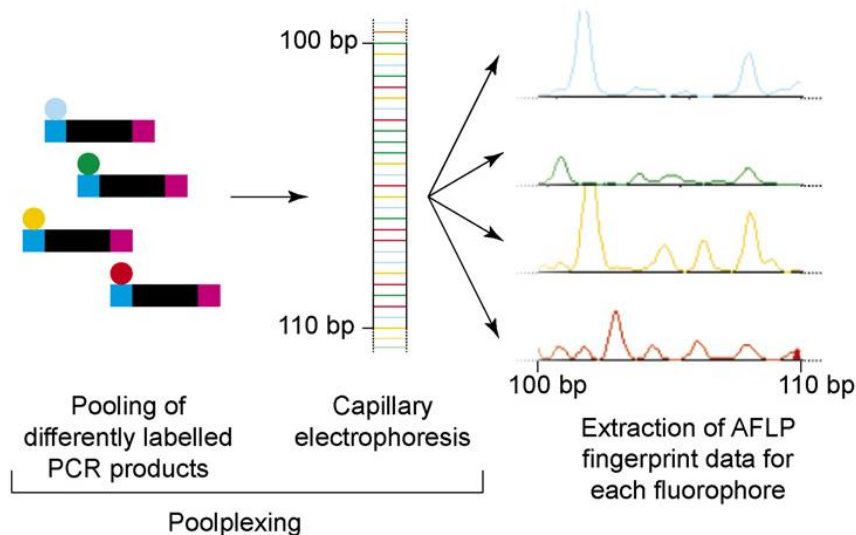
- 0.2 mM dNTPs (Kapa Biosystems, USA)
- 0.25 ng/μL Eco-ANN primer
- 0.2 μM Mse-CNN primer
- 5x Buffer GC (Kapa Biosystems, USA)
- 0.5 U Taq DNA polymerase (Kapa Biosystems, USA)
- ddH₂O έως τελικού όγκου αντίδρασης 10 μL

Το πρόγραμμα PCR που χρησιμοποιήθηκε στο στάδιο αυτό είναι το εξής:

- 94°C για 30 s
- 94°C για 30 s
- 65°C για 30 s
- 72°C για 1 min
- 12 κύκλοι, ο καθένας από τους οποίους περιέχει:
 - 94°C για 30 s
 - 65°C για 30 s, θερμοκρασία που μειώνεται κατά 0.7°C ανά κύκλο
 - 72°C για 1 min
- 23 κύκλοι από:
 - 94°C για 30 s
 - 56°C για 30 s
 - 72°C για 1 min
- 5°C για απεριόριστο χρονικό διάστημα

Μικρή ποσότητα (4 μL) από το προϊόν της επιλεκτικής ενίσχυσης ηλεκτροφορήθηκε για 15 min σε πήκτωμα αγαρόζης 1.2% παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (EthBr). Η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης αξιολογήθηκε από την ένταση και το μέγεθος των ζωνών του πηκτώματος κάτω από UV ακτινοβολία

Στάδιο 6^ο: Κατασκευή πίνακα παρουσίας ή απουσίας σημασμένου θραύσματος (δυναδική μήτρα, binary matrix)



Εικόνα 2.6: Ανάλυση των σημασμένων θραυσμάτων μέσω τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης.

Τα προϊόντα των αντιδράσεων της επιλεκτικής ενίσχυσης για κάθε δείγμα (Εικ. 2.6), αναμείχθηκαν με αναλογία 1:1:1:1 για κάθε HEX, TAMRA, FAM, ROX σημασμένο προϊόν και αποθηκεύθηκαν στους -20°C μέχρι να αναλυθούν μέσω τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (capillary electrophoresis) στον αλληλουχητή Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer (Εικ 2.7).



Εικόνα 2.7. Αλληλουχητής Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer.

Πριν τη διαδικασία αλληλούχισης υπάρχει ένα στάδιο προετοιμασίας των δειγμάτων. Συγκεκριμένα, ετοιμάζεται ένα μείγμα αποτελούμενο από 1.5 mL Hi-Di™ formamide (Applied Biosystems, USA) και 16 μL GS 500 LIZ size standard (Applied

Biosystems, USA), το οποίο χρησιμοποιείται για 96 δείγματα σε πιάτο ανάγνωσης (plate). Έτσι σε κάθε θέση του 96-plate μεταφέρονται 2 μ L από το αναμειγμένο προϊόν των επιλεκτικών ενισχύσεων για κάθε δείγμα στο οποίο προστίθενται 12 μ L από το μείγμα με Hi-Di™ formamide και GS 500 LIZ size standard. Στη συνέχεια τα δείγματα επώαστηκαν για 5 min στους 95°C και ψύχθηκαν αμέσως μετά σε πάγο, ώστε να γίνει η αποδιάταξη των δίκλωνων αλυσίδων των θραυσμάτων DNA. Μετά την αλληλούχιση των δειγμάτων, δημιουργήθηκε ένα αρχείο σε ηλεκτρονική μορφή του τύπου Applied Biosystems format (*.fsa).

Συγκεκριμένα, έτρεξαν 48 AFLP ηλεκτροφορητικά γραφήματα (AFLP profiles), που προήλθαν από την αλληλούχιση 44+4 δειγμάτων. Για 4 δείγματα επαναλήφθηκε η τεχνική των AFLP από το στάδιο 2 και τα αποτελέσματα από αυτά τα δείγματα επέτρεψαν την ποσοτικοποίηση του συστημικού σφάλματος (<10%).

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης (*.fsa) αναλύθηκαν με το λογισμικό GeneMapper® v.4 (Applied Biosystems, USA). Ο αλγόριθμος ταυτοποίησης ζωνών (binning algorithm) που χρησιμοποιήθηκε, λαμβάνει υπ' όψη το μέγεθος των κορυφών φθορισμού AFLP από όλα τα δείγματα και το όριο που τέθηκε για το μέγεθος του bin ήταν 1 bp. Για τις υπόλοιπες παραμέτρους χρησιμοποιήθηκαν οι προεπιλεγμένες ρυθμίσεις του προγράμματος (κατώφλι ανίχνευσης 100 a.u.). Η ανάλυση που έγινε, αφορούσε μεγέθη μεταξύ 50-700 bp. Τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης εξήχθησαν από το πρόγραμμα υπό τη μορφή δυαδικής μήτρας δεδομένων τύπου '1-0', που παρουσίαζε για κάθε δείγμα την παρουσία ή απουσία αντίστοιχα θραυσμάτων DNA συγκεκριμένου μεγέθους (bp).

Τα πολυμορφικά θραύσματα DNA (πολυμορφικοί δείκτες) που παρατηρούνται σχηματίζοντας κορυφές όσον αφορά την ένταση του φθορισμού και είναι παρόντα σε κάποια δείγματα, ενώ απουσιάζουν από άλλα, προκύπτουν είτε από την απόκτηση ή την απώλεια μιας θέσης περιορισμού, είτε από μια μετάλλαξη (πχ. ενός νουκλεοτιδίου, Single Nucleotide Polymorphism-SNP) στη θέση υβριδισμού του εκκινητή της επιλεκτικής ενίσχυσης, είτε από έναν πολυμορφισμό στο μέγεθος του θραύσματος DNA μεταξύ των δύο θέσεων περιορισμού (Vos et al. 1995, Mueller & Wolfenbarger 1999, Bonin et al. 2005).

- **MSAP (Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism)**
Πολυμορφισμός ενισχυμένων θραυσμάτων ευαίσθητων στη μεθυλίωση

Η μέθοδος αυτή έχει ως αρχή την τεχνική AFLP. Κατά την τεχνική MSAP, γίνεται σύγκριση των προϊόντων που δημιουργούνται από δύο ισοσχιζομερή ένζυμα, το ένα εκ των οποίων είναι ευαίσθητο και το άλλο μη ευαίσθητο στη μεθυλίωση. Συγκεκριμένα η τεχνική βασίζεται στη διαφορετική συμπεριφορά δύο ισοσχιζομερών ενζύμων περιορισμού (Msp I και HpaII) στην παρουσία μεθυλιωμένης κυτοσίνης στην αλληλουχία CCGG. Πραγματοποιούνται δύο ξεχωριστές αντιδράσεις AFLP για κάθε δείγμα, χρησιμοποιώντας ως συχνό κόπτη, ένα ζεύγος ισοσχιζομερών ενζύμων περιορισμού με διαφορετική ευαισθησία στη μεθυλίωση. Το ζεύγος ισοσχιζομερών HpaII/MspI αναγνωρίζει την ίδια αλληλουχία DNA (5'CCGG 3'). Αντίθετα από το MspI, το HpaII δε δύναται να κόψει την ενδογενώς μεθυλιωμένη αλληλουχία C^mCCGG. Η σύγκριση μεταξύ των DNA θραυσμάτων που προκύπτουν από τους EcoRI/HpaII και EcoRI/MspI περιορισμούς, επιτρέπει την αναγνώριση της μεθυλιωμένης θέσης στην αλληλουχία CCGG, αλλά και σύγκριση της γενετικής και επιγενετικής ποικιλότητας. Κάποιες αναφορές προτείνουν ότι μόνο η ενδογενής μεθυλίωση στην αλληλουχία CCGG μπορεί να μεταβιβαστεί μεταξύ γενεών και έτσι είναι σημαντική για τη σταθερή προσαρμοστικότητα των ατόμων (Mathieu et al. 2007). Επίσης, πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι η μη μεθυλίωση στην αλληλουχία CCGG μπορεί να μεταβιβαστεί, αλλά μόνο η μεθυλίωση αυτής της αλληλουχίας είναι αντιστρόφως ανάλογη με τη γονιδιακή έκφραση (Tricker et al. 2013). Επειδή μόνο το HpaII επηρεάζεται από τέτοιου είδους μεθυλίωση, θα αναφέρουμε τα προφίλ που προκύπτουν από αυτό το ένζυμο ως επιγενετικά (με την έννοια ότι είναι σταθερά από γενιά σε γενιά και επιγενετικά), ενώ το MspI δεν είναι ευαίσθητο με αυτή την έννοια και μπορεί να ανιχνεύσει μόνο τη γενετική ποικιλότητα από γενιά σε γενιά.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο των Baurens et al. (2008) με κάποιες τροποποιήσεις.

Η τεχνική MSAP αποτελείται από τα εξής στάδια:

Στάδιο 1^ο: Πρώτη πέψη

Πραγματοποιήθηκε πέψη σε 100 ng από κάθε δείγμα με EcoRI. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης για κάθε δείγμα ήταν 20 μ L, τα οποία περιείχαν:

- 100 ng DNA δείγματος (ο όγκος ποικίλλει ανάλογα με τη συγκέντρωση του DNA)
- 2 μ l EcoRI 10 U/ μ l (New England Biolabs, UK)

- 10x Reaction Buffer NEB4: 50 mM potassium acetate, 20 mM Tris-acetate, 10 mM magnesium acetate, 1 mM dithiothreitol, pH 7.9 @ 25°C (New England Biolabs, UK)
- DdH₂O (έως τελικού όγκου 20 μL).

Η πέψη πραγματοποιήθηκε στους 37°C για 2 h και ακολούθησε η απενεργοποίηση των ενζύμων με επώαση των δειγμάτων στους 65°C για 15 min.

Στάδιο 2^ο: Δεύτερη πέψη

Αρχικά, κάθε δείγμα χωρίζεται στα δύο, έτσι ώστε στο μισό προϊόν της πρώτης πέψης να πραγματοποιηθεί δεύτερη πέψη με MspI και στο άλλο μισό με HpaII.

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης για κάθε δείγμα ήταν 50 μL, τα οποία περιείχαν:

- 10 μL προϊόν της πρώτης πέψης
- 1.5 μL (10U/μL) του ενζύμου MspI ή HpaII (New England Biolabs, UK)
- DdH₂O (έως τελικού όγκου 50 μL).

Τα δείγματα επώαστηκαν για μια νύχτα στους 37°C και έπειτα η απενεργοποίηση των ενζύμων πραγματοποιήθηκε στους 65°C για 15 min.

Στάδιο 3^ο: Λιγοποίηση των προσαρμοστών

Χρησιμοποιήθηκαν όπως και στην τεχνική AFLP δύο δίκλωνοι προσαρμοστές. Οι αλληλουχίες 5'→3' των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία των δίκλωνων προσαρμοστών, φαίνονται παρακάτω:

- Hpa II linker 1: GATCATGAGTCCTGCT
- Hpa II linker 2: CGAGCAGGACTCATGA
- EcoR I linker 1: CTCGTAGACTGCGTACC
- EcoR I linker 2: AATTGGTACGCAGTCTAC

Για τη δημιουργία των δύο δίκλωνων προσαρμοστών πραγματοποιήθηκε μια διαδικασία υβριδισμού των παραπάνω ολιγονουκλεοτιδίων. Για προετοιμασία 10 μM διαλύματος κάθε δίκλωνου προσαρμοστή χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:

EcoR I linker (10 μM)

- 100 μL EcoR I linker 1 (100 μM)
- 100 μL EcoR I linker 2 (100 μM)
- 10 μL tris 1M (pH 8.0)
- 50 μL NaCl 5M

- 740 μL dH₂O

Τελικός όγκος: 1000 μL

HpaII linker (10 μM)

- 100 μL HpaII linker 1 (100 μM)
- 100 μL HpaII linker 2 (100 μM)
- 10 μL tris 1M (pH 8.0)
- 50 μL NaCl 5M
- 740 μL dH₂O

Τελικός όγκος: 1000 μL

Η αντίδραση υβριδισμού των προσαρμοστών πραγματοποιήθηκε στους 100⁰C, ενώ τα διαλύματα έμειναν σε θερμοκρασία δωματίου πριν αποθηκευτούν στους -20⁰C.

Οι δίκλωνοι προσαρμοστές επιδέθηκαν στα κολλώδη άκρα των θραυσμάτων περιορισμού με τη χρήση της T4 DNA λιγάσης προσθέτοντας στα προϊόντα της πέψης 50 μL μείγματος που περιείχε:

- 10 μL EcoRI linker 10 μM
- 10 μL HpaII linker 10 μM
- 2 μL T4 DNA ligase 10U/L
- 10 μL 10x T4 DNA Ligase Reaction Buffer: 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, pH 7.5 @ 25⁰C (New England Biolabs, UK).
- 18 μL d H₂O

Ο τελικός όγκος του διαλύματος για κάθε δείγμα στο στάδιο της λιγοποίησης ήταν 100 μL . Το διάλυμα αυτό επωάστηκε στους 23⁰C για 2 ώρες, για να γίνει η αντίδραση της λιγοποίησης των προσαρμοστών στο προϊόν της πέψης.

Στάδιο 4^ο: Προ-επιλεκτική ενίσχυση

Οι αλληλουχίες 5'→3' των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το στάδιο, φαίνονται παρακάτω:

○ HPA + A primer:
ATCATGAGTCCTGCTCGGA

○ ECO + A primer:
GACTGCGTACCAATTCA

Η κάθε αντίδραση της προ-επιλεκτικής ενίσχυσης περιείχε τα εξής:

- 5 μL προϊόντος λιγοποίησης
- 3μL dNTPs 10mM
- 5μL Eco+A primer 2μM
- 5μL Hpa+A primer 2μM
- 5 μL 10x PCR buffer
- 2 μL MgCl₂ 50 mM
- 1 μL Taq DNA polymerase 1U/μL
- 4 μL dH₂O

Η PCR διεξήχθη στο θερμοκυκλοποιητή PTC-200 (MJ Research, USA), σύμφωνα με το εξής πρόγραμμα:

- 94°C για 5 min
- 20 κύκλοι, ο καθένας από τους οποίους είναι:
 - 94°C για 30 s
 - 56°C για 1 min
 - 72°C για 1 min
- 72°C για 5 min
- 5°C για απεριόριστο χρονικό διάστημα

Από κάθε προϊόν της προ-επιλεκτικής ενίσχυσης, 5 μL ηλεκτροφορήθηκαν για 20 min σε διαγνωστικό πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 1.5% παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (EthBr). Τα θραύσματα οπτικοποιήθηκαν κάτω από UV ακτινοβολία για να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα της προ-επιλεκτικής ενίσχυσης. Τα υπόλοιπα 45 μL αποθηκεύθηκαν στους -20°C για περαιτέρω χρήση.

Στάδιο 5^ο: Επιλεκτική ενίσχυση

Χρησιμοποιήθηκαν 2 διαφορετικά ζευγάρια εκκινητών (Πίνακας 2.4), στα οποία ο Eco-AN εκκινητής ήταν σημασμένος με διαφορετική φθορίζουσα χρωστική στο 5' άκρο του. Αυτά τα 2 ζευγάρια εκκινητών επιλέχθηκαν ανάμεσα από 8 συνδυασμούς εκκινητών (Πίνακας 2.5) που δοκιμάστηκαν για την ποιότητα και το πλήθος των παραγόμενων θραυσμάτων DNA διαφορετικού μεγέθους.

Πίνακας 2.4. Πίνακας ζευγών εκκινητών με φθορίζουσες χρωστικές

Ζεύγος εκκινητών	Φθορίζουσα χρωστική
Eco-AC + HPA2-AAC	FAM
Eco-AG + HPA2-AAC	HEX

Πίνακας 2.5. Πίνακας ζευγών εκκινητών που εξετάστηκαν για την ποιότητα και το πλήθος των παραγόμενων θραυσμάτων DNA διαφορετικού μεγέθους.

Ζεύγη εκκινητών
1. Eco-AC + HPA2-ATT
2. Eco-AC + HPA2-ATG
3. Eco-AC + HPA2-AAC
4. Eco-AC + HPA2-AAG
5. Eco-AG + HPA2-2ATT
6. Eco-AG + HPA2-ATG
7. Eco-AG + HPA2-AAC
8. Eco-AG + HPA2-AAG

Σε κάθε αντίδραση επιλεκτικής ενίσχυσης προστέθηκαν τα εξής:

- 0.25 μ L προϊόντος προ-επιλεκτικής ενίσχυσης
- 0.2 μ L dNTPs 10mM (Kapa Biosystems, USA)
- 0.05 μ L Eco-AN primer 50ng/ μ L
- 0.3 μ L HPA2-ANN primer 50ng/ μ L
- 1 μ L PCR buffer 10x
- 0.1 μ L Taq DNA polymerase 5U/ μ L (Kapa Biosystems, USA)
- ddH₂O έως τελικού όγκου αντίδρασης 10 μ L

Το πρόγραμμα PCR που χρησιμοποιήθηκε είναι το εξής:

- 12 κύκλοι, ο καθένας από τους οποίους περιέχει:
 - 94°C για 5 min
 - 94°C για 30 s
 - 65°C για 1 min, θερμοκρασία που μειώνεται κατά 0.7°C ανά κύκλο
 - 72°C για 1 min
- 23 κύκλοι από:
 - 94°C για 30 s
 - 56°C για 1 min
 - 72°C για 1 min
- 72°C για 5 min
- 16°C για απεριόριστο χρονικό διάστημα

Μικρή ποσότητα (4 μ L) από το προϊόν της επιλεκτικής ενίσχυσης ηλεκτροφορήθηκε για 15 min σε πήκτωμα αγαρόζης 1.2% παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (EthBr). Η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης αξιολογήθηκε από την ένταση και το μέγεθος των ζωνών του πηκτώματος κάτω από UV ακτινοβολία.

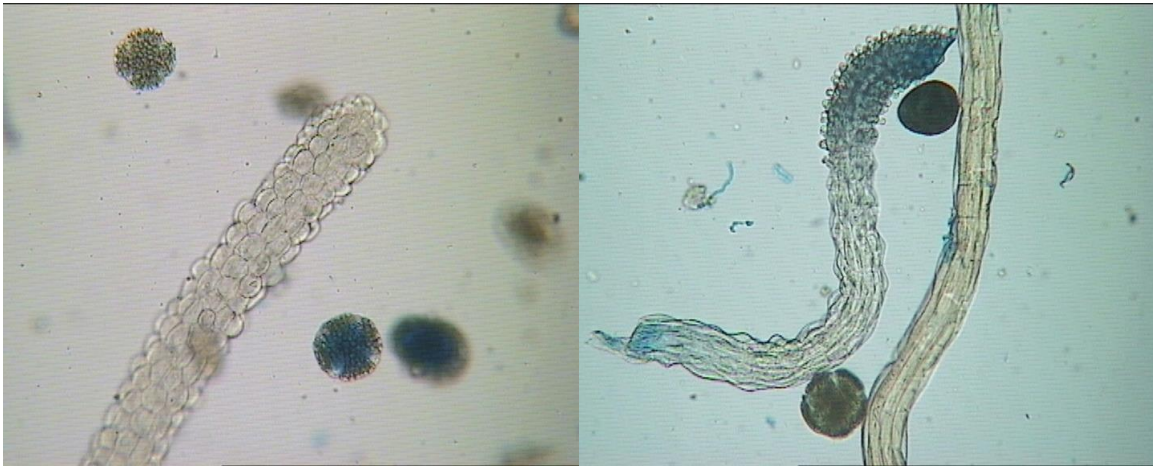
Στάδιο 6^ο: Κατασκευή πίνακα παρουσίας ή απουσίας σημασμένου θραύσματος (δυαδική μήτρα, binary matrix)

Η διαδικασία κατασκευής του πίνακα πραγματοποιήθηκε ακριβώς όπως και στην τεχνική AFLP. Για 8 από τα 88 συνολικά δείγματα που προέκυψαν, η τεχνική πραγματοποιήθηκε ξανά από την αρχή, ώστε να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα της μεθόδου.

2.3 Μελέτη του τύπου αναπαραγωγής

Για τη μελέτη του μηχανισμού αναπαραγωγής, εξετάστηκαν οι μορφές των γυρεόκοκκων και του στίγματος όλων των ατόμων *Limonium* της συλλογής. Ακολουθήθηκε η μέθοδος των Darlington & La Cour (1969), τροποποιημένη αφού χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό αντί για τη χρωστική “cotton blue”, ώστε από την παρατήρηση της μορφολογίας του στίγματος και των γυρεοκόκκων, να διαπιστωθεί ο τύπος αναπαραγωγής. Αρχικά τοποθετούνται τμήματα των ανθέων πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα, στην οποία έχει προηγουμένως προστεθεί μια

σταγόνα νερού. Έπειτα γίνεται λειοτρίβηση των τμημάτων των ανθέων με τη βοήθεια λαβίδας και βελόνας ανατομίας και απομακρύνονται τα περιττά κομμάτια των ανθέων, με σκοπό να παραμείνουν στο νερό τα στίγματα και οι γυρεόκοκκοι. Στη συνέχεια προστίθεται η καλυπτρίδα και τα μικροσκοπικά παρασκευάσματα παρατηρούνται στο μικροσκόπιο (Εικ. 2.8).



Εικόνα 2.8. Μικροφωτογραφίες των αυτοασύμβατων συνδυασμών Α και Β.

2.4 Μορφομετρική μελέτη

Πραγματοποιήθηκε μορφομετρική ανάλυση σε όλα τα δείγματα ερμαρίου της συλλογής. Τα δείγματα είχαν προηγουμένως ταξινομηθεί σε είδη, βάσει των μορφολογικών περιγραφών και βάσει των περιοχών που απαντώνται. Οι 5 διαγνωστικοί χαρακτήρες που επιλέχθηκαν είναι οι εξής:

- Μήκος εξωτερικού βρακτίου
- Μήκος εσωτερικού βρακτίου
- Μήκος κάλυκα
- Μήκος σταχυδίου
- Μήκος λοβών κάλυκα

Η επιλογή των χαρακτήρων βασίστηκε σε προηγούμενες μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκε μορφομετρική ανάλυση για την αποσαφήνιση της ταξινομικής πολυπλοκότητας ειδών του γένους, όπως στην περίπτωση του *L. vulgare* (Cortinhas et al. 2015), και στους ταξινομικούς χαρακτήρες που χρησιμοποιήθηκαν στην αρχική

περιγραφή των ενδημικών taxa. Η μέτρηση των παραπάνω χαρακτήρων έγινε με χρήση στερεοσκοπίου με κάμερα μετά από μετακίνηση των ανθικών μερών των δειγμάτων. Έπειτα οι εικόνες επεξεργάστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος ImageJ, ούτως ώστε να προσδιοριστούν με ακρίβεια οι παραπάνω διαστάσεις. Τέλος, η απεικόνιση των δειγμάτων σε διάγραμμα πραγματοποιήθηκε με Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA- Principal Component Analysis).

2.5 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών

- Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA-Principal Component Analysis)

Η μέθοδος των Κύριων Συνιστωσών είναι μια τεχνική ανάλυσης δεδομένων με σκοπό τη δημιουργία καινούργιων μεταβλητών, οι οποίες είναι γραμμικοί συνδυασμοί των αρχικών μεταβλητών, έτσι ώστε να είναι ασυσχέτιστες μεταξύ τους και να περιέχουν όσο το δυνατόν μεγαλύτερο μέρος της διακύμανσης των αρχικών μεταβλητών.

Οι νέες μεταβλητές που παράγονται ονομάζονται Κύριες Συνιστώσες. Αυτό που επιτυγχάνεται με τη μέθοδο αυτή είναι ότι από ένα σύνολο συσχετισμένων μεταβλητών καταλήγουμε σε ένα σύνολο ασυσχέτιστων μεταβλητών, το οποίο είναι χρήσιμο για αρκετές στατιστικές μεθόδους. Επίσης, οι κύριες συνιστώσες που προκύπτουν μπορούν να ερμηνεύσουν το μεγαλύτερο ποσοστό της διακύμανσης, που σημαίνει πως καταλήγουμε σε ένα πιο μικρό αριθμό μεταβλητών από ότι είχαμε αρχικά, με κόστος ότι χάνουμε ένα μικρό ποσοστό της συνολικής μεταβλητότητας. Αυτό είναι πολύ σημαντικό ιδιαίτερα στις περιπτώσεις που έχουμε λίγες παρατηρήσεις και πολλές μεταβλητές. Συνεπώς, αν σε μια τέτοια περίπτωση θέλαμε να εφαρμόσουμε ένα (γενικευμένο) γραμμικό μοντέλο, η υπερπαραμετροποίηση του μοντέλου μπορεί να ξεπεραστεί χρησιμοποιώντας την παραπάνω μέθοδο. Για την παρούσα εργασία η Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA), καθώς και η κατασκευή του κλαδογράμματος πραγματοποιήθηκαν μέσω του λογισμικού PC-ORD.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι αναπαραγωγικοί τύποι των δειγμάτων που συλλέχθηκαν από τα taxa της Νοτιοανατολικής Κρήτης παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1. Κωδικοποίηση των δειγμάτων και των περιοχών δειγματοληψίας και του αναπαραγωγικού τύπου. Τα δείγματα συλλέχθηκαν το διάστημα 8-11 Σεπτεμβρίου 2013 και μόνο αυτά στα οποία έγινε δυνατή η απομόνωση και ανάλυση DNA περιελήφθησαν στην παρούσα μελέτη. Για διασταύρωση της επαναληψιμότητας της μεθόδου, 4 δείγματα αναλύθηκαν εις διπλούν (συνολικά 48 δείγματα). Ο αναπαραγωγικός τύπος προσδιορίστηκε με οπτική μικροσκοπία.

Κωδικοί δειγμάτων	Φαινότυπος	Νομός*	Περιοχή	Κωδικοί Περιοχής	Αναπαραγωγικός τύπος
9	<i>L. sitiicum</i>	Λασιθίου	Νέα Μύρτος	Lim-01	A
1, 2, 3, 46	<i>L. virgatum</i>	Λασιθίου	Ιεράπετρα	Lim-02	B
4, 5, 6, 7	<i>L. hierapetrae</i>	Λασιθίου	Παραλία Φερμών	Lim-03	B
8, 10, 11	<i>L. cornarianum</i>	Λασιθίου	Μονή Καψά	Lim-04	B
12, 14	<i>L. cornarianum</i>	Λασιθίου	Μονή Καψά μπροστά από Περιβολάκια	Lim-05	B
13, 15, 47	<i>L. palmare</i>	Λασιθίου	Ανάληψη	Lim-06	B
16	<i>L. palmare</i>	Λασιθίου	Ανάληψη	Lim-06	A
17, 18, 19, 20, 21, 22, 23,24	<i>L. creticum</i>	Ηρακλείου	Μάταλα	Lim-07	A
25, 26, 27, 28, 29, 30, 32	<i>L. creticum</i>	Ηρακλείου	Μεταξύ Ματάλων και Κομού	Lim-08	A
31	<i>L. creticum</i>	Ηρακλείου	Κομός	Lim-09	A
33, 34, 35, 36, 37	<i>L. virgatum</i>	Ηρακλείου	Καλαμάκι	Lim-10	B
39, 40, 41, 43, 48	<i>L. creticum</i>	Ηρακλείου	Καλαμάκι	Lim-10	A
38, 42, 44, 45	<i>L. creticum</i>	Ρεθύμνου	Αγία Γαλήνη	Lim-11	A

*σύμφωνα με προηγούμενη διοικητική διαίρεση

Επίσης στον Πίνακα 3.1 παρουσιάζονται τα είδη, όχι όπως προσδιορίστηκαν στο πεδίο, αλλά όπως προσδιορίστηκαν στο εργαστήριο με κριτήριο τις περιγραφές προηγούμενων μελετών (Artelari 1989, Kyriotakis & Artelari 1998, Artelari & Georgiou 2002, Georgakopoulou et al. 2006). Απόκλιση από την αρχική ταυτοποίηση

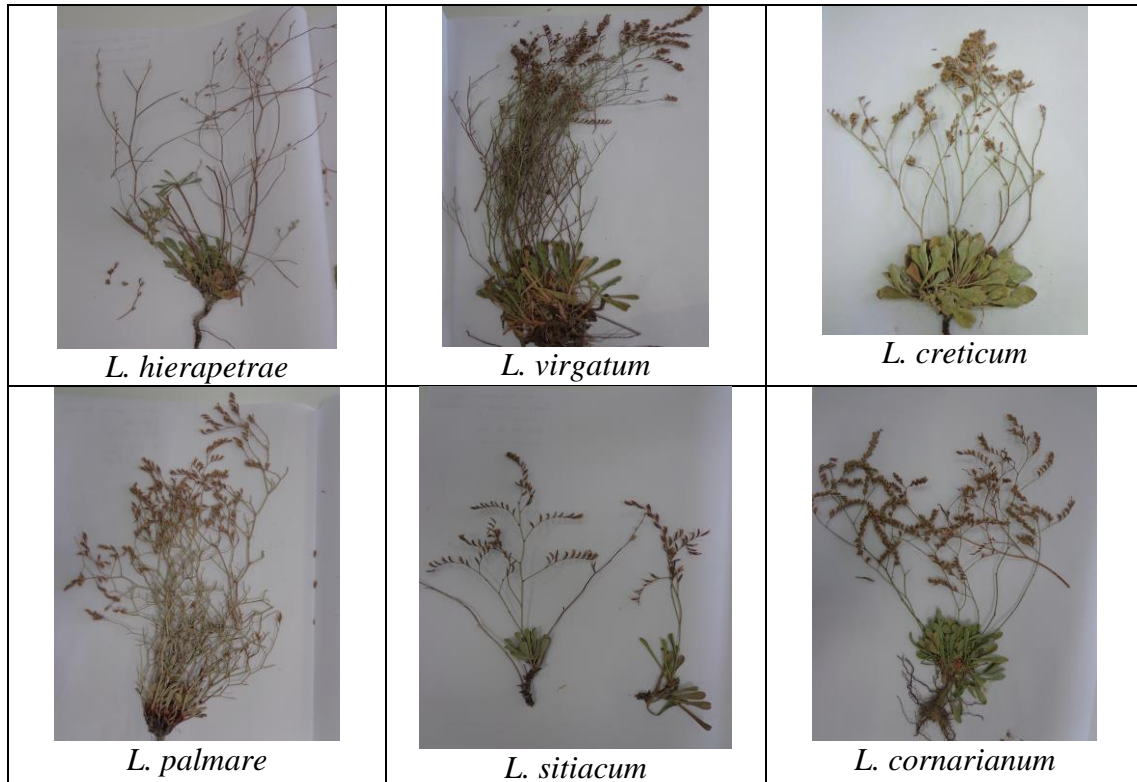
πεδίου εμφανίστηκε μόνο σε μία περίπτωση δείγματος (Κωδικός δείγματος 9). Πιο συγκεκριμένα, το άτομο αυτό στο πεδίο εμφάνιζε μη τυπικά χαρακτηριστικά του *L. hierapetrae*, και με τις κλείδες προσδιορισμού προέκυψε ότι πρόκειται για το είδος *L. sitiicum* το οποίο είναι ενδημικό της Βορειοανατολικής Κρήτης και για πρώτη φορά αναφέρεται στο ΝΑ τμήμα του νησιού. Στην Εικόνα 3.1 παρουσιάζονται τυπικοί φαινότυποι για τα είδη *L. virgatum*, *L. creticum*, *L. hierapetrae*, *L. palmare*, *L. sitiicum*, *L. cornarianum*.

Το *L. sitiicum* Rech. fil. απαντάται στη ΒΑ Κρήτη και εντοπίζεται σε πλαγιές βράχων κοντά στη θάλασσα. Είναι πολυετές φυτό με ευθείς κλάδους μήκους 200-300 mm, τα τμήματα των κλάδων που φέρουν διακλαδώσεις είναι μήκους 20-30 mm, η επιφάνειά τους έχει χρώμα γκρι-γκριζοπράσινο και είναι φυματώδης. Τα φύλλα του βρίσκονται σε βασικό ρόδακα και σταδιακά καταλήγουν στο μίσχο, είναι στενά επιμήκη-σπατουλόμορφα, σαρκώδη, δερματώδη αν αποξηραθούν, σε εγκάρσια τομή μπορεί να σχηματίζουν ν, με περιθώριο μεμβρανώδες και κορυφή που έχει μυτερή κατάληξη, ενώ και οι δύο πλευρές τους είναι γκριζοπράσινες και φυματώδεις και έχουν ένα κεντρικό νεύρο. Η ταξιανθία του είναι ρομβοειδής χωρίς άγονους κλάδους ή με λίγους, με γωνία διακλάδωσης 45⁰-60⁰. Οι στάχεις του είναι μακρείς και χαλαροί μήκους 10-60 mm με 2-3 σταχύδια/cm. Τα σταχύδια του τοποθετούνται κατ' εναλλαγήν, είναι ευθέα έως ελαφρώς καμπυλωτά, με (1)-2 άνθη και γωνία διακλάδωσης 45⁰. Το εσωτερικό βράκτιο έχει μήκος περίπου 9 mm, είναι ελλειπτικό έως ωοειδές, με χρώμα πράσινο έως ιώδες, στρογγυλεμένο ραχιαία του ποώδους μέρους με μεμβρανώδες περιθώριο εύρους 2 mm περίπου. Το μεσαίο βράκτιο έχει μήκος 4 mm περίπου έχει μυτερή κατάληξη και είναι μεμβρανώδες. Το εξωτερικό βράκτιο μήκους περίπου 3 mm είναι ωοειδές-τριγωνικό με μυτερή κατάληξη, χρώματος ανοιχτού καφέ, με μεμβρανώδες περιθώριο. Ο κάλυκας του είναι στενά σωληνοειδής, με 5 λοβούς, αραιά τριχωτός, χρώματος ιώδους που στη βάση πρασινίζει, μήκους 6-7 mm και διαμέτρου 2 mm. Η στεφάνη έχει ιώδες χρώμα.

Ο χρωμοσωματικός αριθμός του είδους δεν έχει προσδιοριστεί.

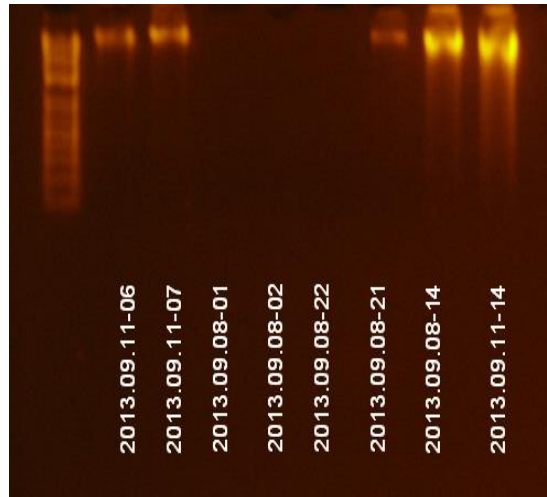
Στους αναπαραγωγικούς τύπους των ειδών που εξετάστηκαν, δεν παρουσιάζονται διαφορές από αυτούς που αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Για πρώτη φορά όμως αναφέρονται οι αναπαραγωγικοί τύποι των *L. sitiicum* και *L. cornarianum*. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο αναπαραγωγικός τύπος των δειγμάτων *L. cornarianum* που εξετάστηκαν ήταν ο αυτοάγονος Β, ίδιος δηλαδή με αυτόν των δειγμάτων *L. hierapetrae*, ενώ του *L. sitiicum* ήταν ο αυτοάγονος Α. Επιπροσθέτως όλοι οι

πληθυσμοί βρέθηκαν μονομορφικοί με κάποιον από τους δύο αυτοάγονους τύπους A ή B, εκτός από αυτόν του *L. palmare* που είναι διμορφικός, αφού εντοπίστηκαν και οι δύο αυτοάγονοι συνδυασμοί. Επομένως όλα τα άτομα, εκτός αυτών του *L. palmare* που είναι δυνητικώς απομικτικά, αναπαράγονται με απομιξία, καθώς παρατηρήθηκε και υψηλή παραγωγή σπερμάτων.



Εικόνα 3.1. Ενδεικτικοί φαινότυποι των ειδών *L. hierapetrae*, *L. virgatum*, *L. creticum*, *L. palmare*, *L. sitiicum*, *L. cornarianum*.

Από τα 60 δείγματα που συλλέχθηκαν, σε 44 δείγματα έγινε δυνατή η απομόνωση DNA (ποσοστό επιτυχίας 73.3%). Σε ορισμένα δείγματα που τα φύλλα είχαν προχωρημένο στάδιο γήρανσης δεν έγινε δυνατή η απομόνωση DNA παρά τις επανειλημμένες προσπάθειες με δύο διαφορετικά kit απομόνωσης (Εικ. 3.2).



Εικόνα 3.2. Πήκτωμα αγαρόζης 1.2 %, στο οποίο ηλεκτροφορήθηκε ολικό DNA που απομονώθηκε από 8 άτομα. Στα 3 από τα 8 δείγματα η απομόνωση του ολικού DNA δεν ήταν δυνατή. Οι κωδικοί (08-01, 08-02 και 08-22) που δεν έδωσαν προϊόν στην PCR προέρχονται από χαμηλής ποιότητας δείγματα (γηρασμένα φύλλα κλπ).

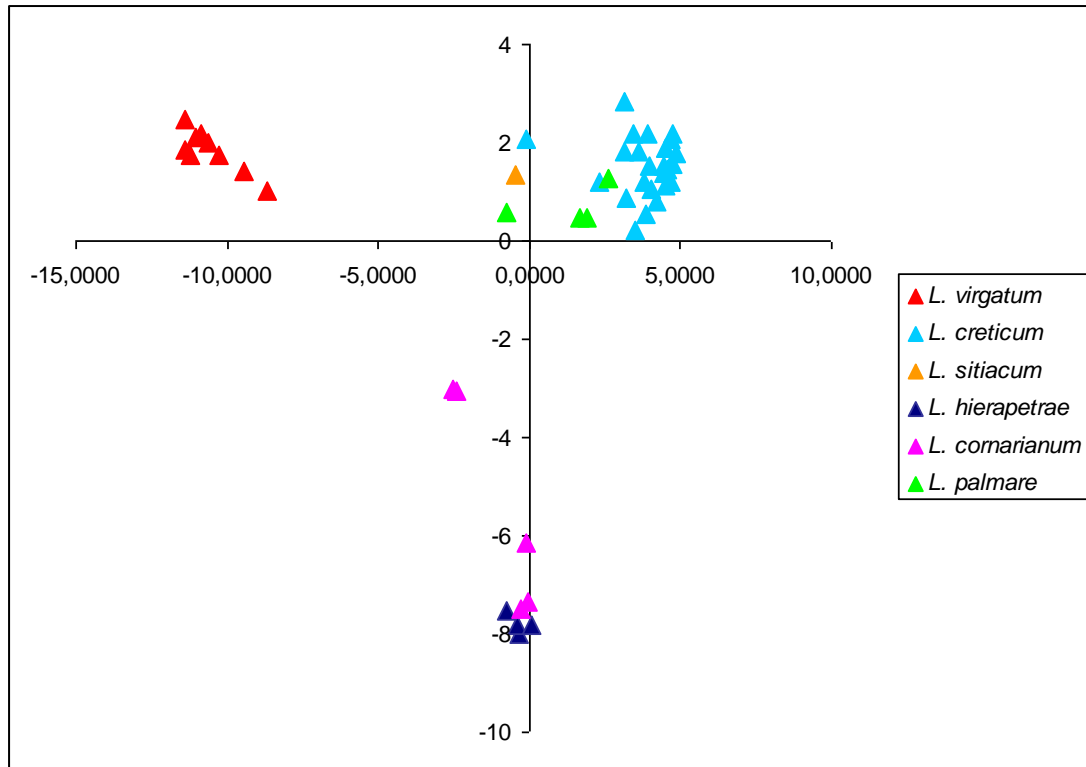
Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε η AFLP ανάλυση (μέθοδος Vos et al. 1995 όπως τροποποιήθηκε από την Κουτρούμπα 2014) και προσδιορίστηκαν 1594 πολυμορφικοί δείκτες (Πίνακας 3.2).

Πίνακας 3.2. Οι μοριακοί δείκτες στους πληθυσμούς *Limonium* που προέκυψαν από την AFLP ανάλυση. Συνολικά 1594 πολυμορφικοί δείκτες προέκυψαν και μελετήθηκαν για την ανάλυση της γενετικής ποικιλότητας του *Limonium* της ΝΑ Κρήτης.

Ζεύγος εκκινήτων	Φθορίζουσα χρωστική	Πολυμορφικοί δείκτες
Eco-AGG + Mse-CAA	FAM/Blue	271
Eco-AAG + Mse-CTA	ROX/Red	445
Eco-AAG + Mse-CTG	TAMRA/Yellow	484
Eco-ACT + Mse-CAA	HEX/Green	394

Η ταξιθέτηση των δειγμάτων των 6 διαφορετικών ειδών *Limonium* που μελετήθηκαν, με βάση τα αποτελέσματα των AFLPs, όπως προκύπτει από την Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA-Principal Component Analysis) φαίνεται στην Εικόνα 3.3. Με διαφορετικά χρώματα εμφανίζονται τα δείγματα από κάθε είδους όπως προσδιορίστηκαν στο εργαστήριο σύμφωνα με τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά. Ο πρώτος άξονας εκφράζει ένα ποσοστό 22.1% της συνολικής μεταβλητότητας των δεδομένων και ο δεύτερος άξονας ένα ποσοστό 7.9%. Παρατηρούμε ότι η μέγιστη μεταβλητότητα κατά μήκος του πρώτου άξονα αφορά κυρίως τα ζεύγη ειδών *L. virgatum* με *L. creticum* και *L. virgatum* με *L. sitiicum*. Αξιοσημείωτο είναι ότι τα δείγματα του *L. palmare* ταξιθετούνται πλησίον του *L.*

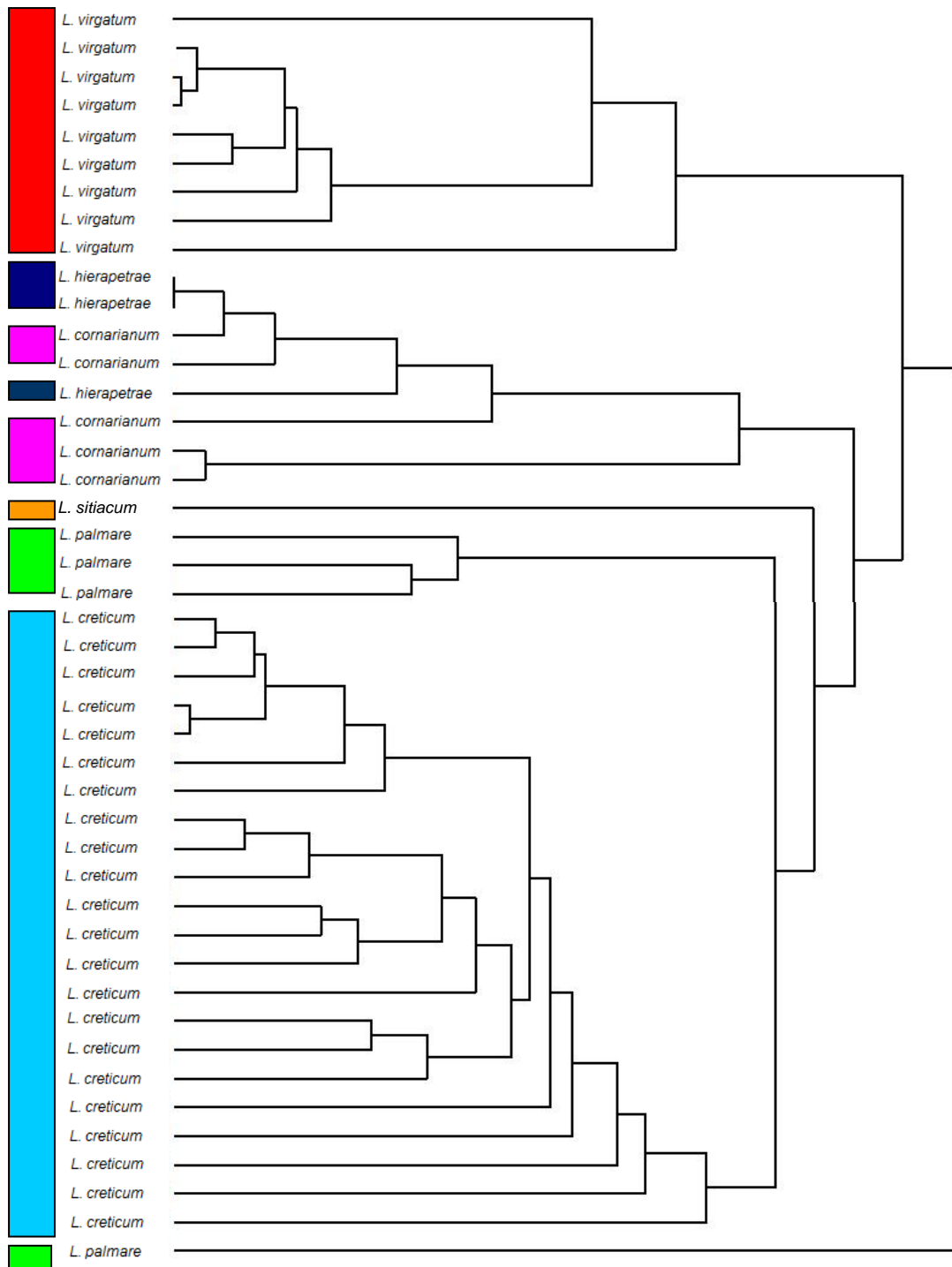
creticum. Στο κάτω άκρο του δεύτερου άξονα ταξιθετούνται τα ενδημικά είδη *L. hierapetrae* και *L. cornarianum* και η μέγιστη μεταβλητότητα εκφράζεται μεταξύ αυτών των ειδών και των taxa που προαναφέρθηκαν. Η γεωγραφική θέση των πληθυσμών των ειδών που μελετήθηκαν απεικονίζεται στην Εικόνα 3.4.



Εικόνα 3.3. Ταξίθεση των δειγμάτων του *Limonium* με βάση την Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA-Principal Component Analysis) των θραυσμάτων της AFLP από πληθυσμούς της ΝΑ Κρήτης. Μελετήθηκαν πληθυσμοί έξι διαφορετικών ειδών (*L. virgatum*, *L. creticum*, *L. hierapetrae*, *L. palmare*, *L. cornarianum*, *L. sitiacum*). Ο χαρακτηρισμός του κάθε δείγματος ως προς το είδος που ανήκει αναφέρεται στους μορφολογικούς χαρακτήρες.



Εικόνα 3.4. Θέση των πληθυσμών των ειδών *L. virgatum*, *L. creticum*, *L. hierapetrae*, *L. palmare*, *L. cornarianum*, *L. sitiacum* που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία.



Εικόνα 3.5. Κλαδόγραμμα των taxa του γένους *Limonium* της ΝΑ Κρήτης με βάση τα αποτελέσματα της PCA.

Με βάση την ανάλυση ομαδοποίησης (cluster analysis) των AFLPs κατασκευάστηκε κλαδόγραμμα για τα taxa του γένους *Limonium* της ΝΑ Κρήτης (Εικόνα 3.6). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει το ότι τα δείγματα του *L. palmare*, παρ' όλο που δεν είναι ενδημικό taxon της περιοχής, ομαδοποιούνται μαζί με τα ενδημικά taxa.

Όσον αφορά στην επιγενετική προσέγγιση, από την MSAP ανάλυση προέκυψαν συνολικά 287 πολυμορφικοί δείκτες, όπως φαίνεται στον πίνακα 3.3.

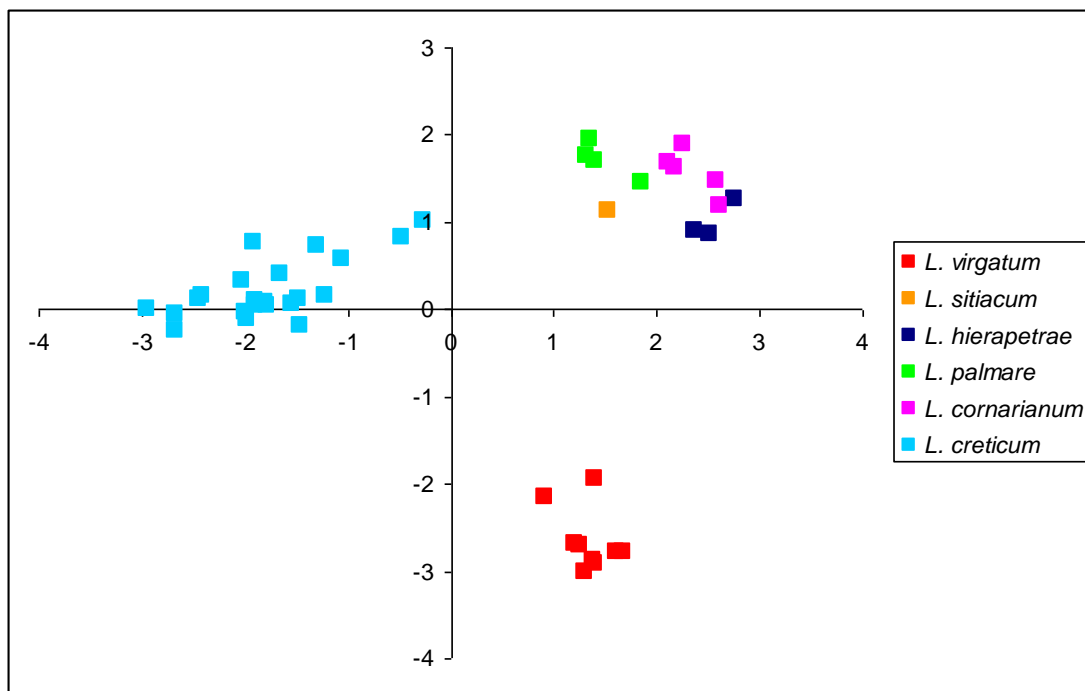
Πίνακας 3.3. Μοριακοί δείκτες στους πληθυσμούς *Limonium*, όπως προέκυψαν από την MSAP ανάλυση. Συνολικά 287 πολυμορφικοί δείκτες μελετήθηκαν για την ανάλυση της γενετικής και της επιγενετικής ποικιλομορφίας του *Limonium* της ΝΑ Κρήτης.

Ζεύγος εκκινητών	Φθορίζουσα χρωστική	Πολυμορφικοί δείκτες
Eco-AC + HPA2-AAC	FAM/Blue	158
Eco-AG + HPA2-AAC	HEX/Green	129

Από τους 158 δείκτες που σημάνθηκαν με FAM/Blue χρωστική, 69 προέκυψαν ύστερα από πέψη με Msp I και 89 ύστερα από πέψη με Hpa II, ενώ από τους 129 με HEX/Green χρωστική, 71 προέκυψαν από το Msp I και 58 από το Hpa II. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου υπολογίστηκε γύρω στο 85 %.

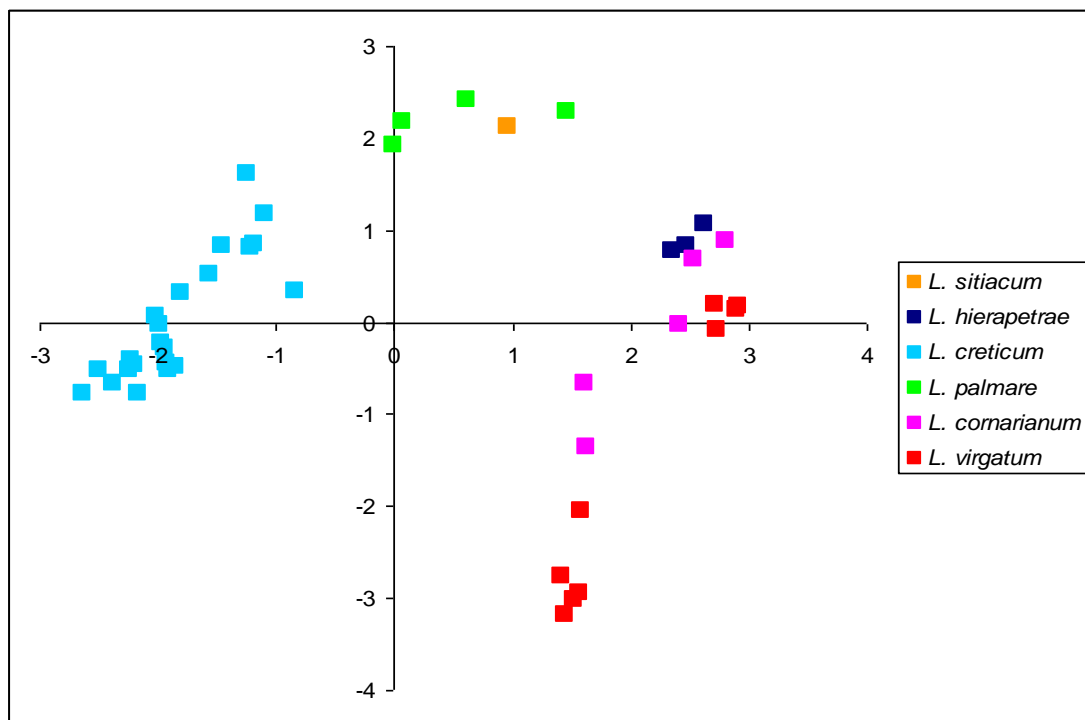
Η ταξιθέτηση των MSAPs των έξι πλέον διαφορετικών ειδών *Limonium*, όπως προκύπτει από την PCA ανάλυση, χρησιμοποιώντας ως συχνό κόπτη το ένζυμο περιορισμού Msp I, το οποίο δεν είναι ευαίσθητο στη μεθυλίωση, φαίνεται στην εικόνα 3.6. Με διαφορετικά χρώματα εμφανίζονται τα είδη στα οποία αποδίδονται τα δείγματα, όπως προσδιορίστηκαν στο εργαστήριο σύμφωνα με τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά. Ο πρώτος άξονας εκφράζει ποσοστό 26.4% της συνολικής μεταβλητότητας των δεδομένων και ο δεύτερος άξονας ποσοστό 16.6%. Παρατηρούμε ότι σχηματίζονται τρεις μεγάλες ομάδες. Οι πληθυσμοί των *L. virgatum* και *L. creticum* είναι σαφώς διαχωρισμένοι σε δύο ομάδες δειγμάτων, ενώ η τρίτη ομάδα είναι ετερογενής και περιλαμβάνει δείγματα τεσσάρων ειδών *L. hierapetrae*, *L. cornarianum*, *L. sitiicum* και *L. palmare*.

Η ταξιθέτηση των MSAPs των έξι πλέον διαφορετικών ειδών *Limonium*, όπως προκύπτει από την PCA ανάλυση χρησιμοποιώντας το ένζυμο HpaII, το οποίο είναι ευαίσθητο στη μεθυλίωση, φαίνεται στην εικόνα 3.7. Ο πρώτος άξονας εκφράζει ποσοστό 25.1% της συνολικής μεταβλητότητας των δεδομένων και ο δεύτερος άξονας ποσοστό 11.8%. Οι διαφορές από το προηγούμενο διάγραμμα είναι οι εξής:



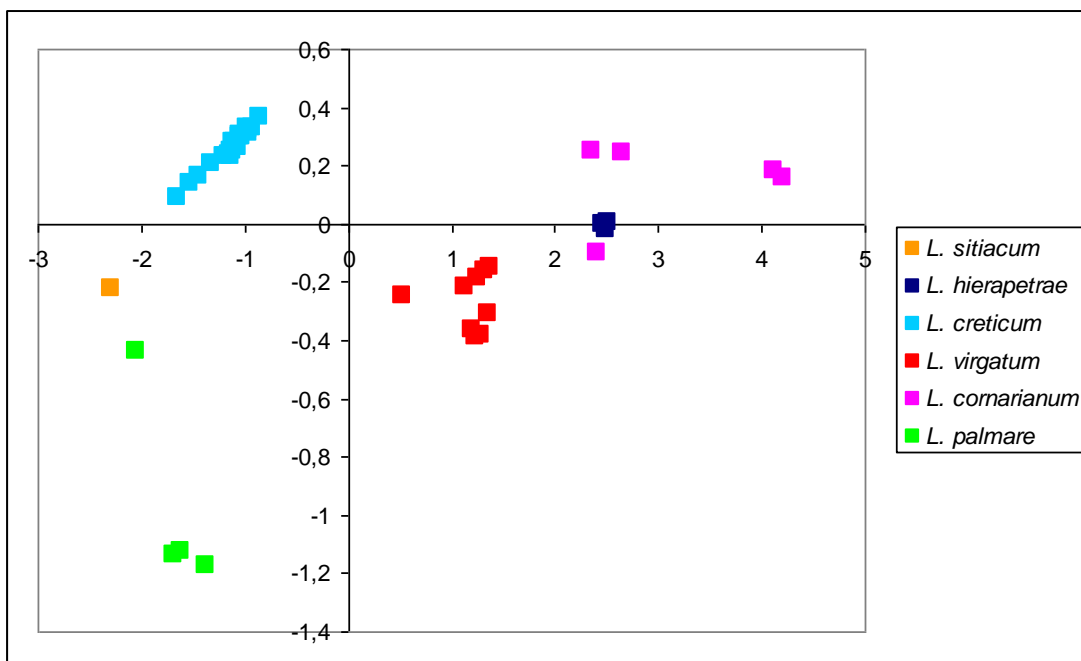
Εικόνα 3.6. Ταξινότηση των δειγμάτων με βάση την Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA-Principal Component Analysis) από πληθυσμούς *Limonium* της νοτιοανατολικής Κρήτης. Μελετήθηκαν πληθυσμοί 6 διαφορετικών ειδών (*L. virgatum*, *L. creticum*, *L. hierapetrae*, *L. palmare*, *L. cornarianum*, *L. sitiacum*). Η ανάλυση PCA βασίστηκε στην παρουσία ή απουσία σκοραρίσματος από τους πολυμορφικούς γενετικούς τόπους που προέκυψαν από τα MSAP προφίλ των δειγμάτων. Χρησιμοποιήθηκε ως συχνός κόπτης το ένζυμο MspI, που δεν είναι ευαίσθητο στη μεθυλίωση. Ο χαρακτηρισμός του κάθε δείγματος ως προς το είδος που ανήκει αναφέρεται στους μορφολογικούς χαρακτήρες.

- Τα δείγματα του *L. palmare* διαχωρίζονται σαφώς από τα δείγματα των υπόλοιπων ειδών.
- Το δείγμα που αρχικά είχε προσδιοριστεί ως *L. hierapetrae* χωρίς να εμφανίζει τα τυπικά χαρακτηριστικά και τελικά προέκυψε ότι είναι το *L. sitiacum*, διαχωρίζεται από τα υπόλοιπα δείγματα *L. hierapetrae* και ταξιθετείται κοντά στα άτομα *L. palmare*.
- Τα δείγματα από τον πληθυσμό *L. virgatum* που συλλέχθηκαν από την περιοχή της Ιεράπετρας ταξιθετούνται κοντά στα δείγματα που συλλέχθηκαν από κοντινές περιοχές και διαχωρίζονται από τα δείγματα του πληθυσμού *L. virgatum* που συλλέχθηκε από το Καλαμάκι. Τα τελευταία ταξιθετούνται κοντά στο κάτω άκρο του δεύτερου άξονα.



Εικόνα 3.7. Ταξιθέτηση των δειγμάτων με βάση την Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA-Principal Component Analysis) από πληθυσμούς *Limonium* της νοτιοανατολικής Κρήτης. Μελετήθηκαν πληθυσμοί 6 διαφορετικών ειδών (*L. virgatum*, *L. creticum*, *L. hierapetrae*, *L. palmare*, *L. cornarianum*, *L. sitiacum*). Η ανάλυση PCA βασίστηκε στην παρουσία ή απουσία σκοραρίσματος από τους πολυμορφικούς γενετικούς τόπους που προέκυψαν από τα MSAP προφίλ των δειγμάτων. Χρησιμοποιήθηκε ως συχνός κόπτης το ένζυμο Hpa II, που είναι ευαίσθητο στη μεθυλίωση. Ο χρωματικός κώδικας είναι ίδιος με την εικόνα 3.5. Αυτή η ταξινόμηση είναι με βάση τις μορφολογικές περιγραφές των ειδών, ενώ η θέση των σημείων (άξονες 1 και 2) προκύπτει από τη μοριακή ανάλυση MSAP.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε μορφομετρική ανάλυση των δειγμάτων της συλλογής, όπου εξετάστηκαν 5 μορφολογικοί χαρακτήρες: μήκος εξωτερικού βρακτίου, μήκος εσωτερικού βρακτίου, μήκος κάλυκα, μήκος σταχυδίου, μήκος λοβών κάλυκα. Η ταξιθέτηση με βάση την Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA) αυτής της μήτρας δεδομένων φαίνεται στην εικόνα 3.8. Ο πρώτος άξονας εκφράζει ποσοστό 92.7% της συνολικής μεταβλητότητας των δεδομένων και ο δεύτερος άξονας ποσοστό 4.7%, κατά συνέπεια στην ανάγνωση των αποτελεσμάτων αρκεί να περιοριστούμε στην μεταβλητότητα κατά μήκος του πρώτου άξονα. Έτσι, στα δύο άκρα του άξονα, δηλαδή στο αριστερό και δεξιό άκρο βλέπουμε να ταξιθετούνται τα ενδημικά *L. creticum* και *L. sitiacum* ως μία ομάδα και τα *L. cornarianum* και *L. hierapetrae* ως μία άλλη ομάδα αντίστοιχα.



Εικόνα 3.12. Ταξιθέτηση των δειγμάτων με βάση την Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA-Principal Component Analysis) από πληθυσμούς *Limonium* της νοτιοανατολικής Κρήτης. Μελετήθηκαν πληθυσμοί 6 διαφορετικών ειδών (*L. virgatum*, *L. creticum*, *L. hierapetrae*, *L. palmare*, *L. cornarianum*, *L. sitiicum*) και η ανάλυση PCA βασίστηκε στον προσδιορισμό 5 διαγνωστικών χαρακτηριστικών (μήκος εξωτερικού βρακτίου, μήκος εσωτερικού βρακτίου, μήκος κάλυκα, μήκος σταχυδίου, μήκος λοβών κάλυκα).

Από τα μη ενδημικά είδη, το *L. palmare* ταξιθετείται πλησίον του αριστερού άκρου του άξονα και το *L. virgatum* στο κέντρο του άξονα.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε η μελέτη της γενετικής ποικιλότητας του γένους *Limonium* στη ΝΑ Κρήτης, ούτως ώστε να αναδειχθεί το κατά πόσο συγκλίνουν τα μορφομετρικά με τα γενετικά χαρακτηριστικά στον χαρακτηρισμό των ταξα και διερευνήθηκε ο ρόλος του επιγενετικού παράγοντα.

Με βάση την έως τώρα γνώση στην περιοχή μελέτης είχαν καταγραφεί πέντε ταξα, *L. virgatum*, *L. palmare*, *L. creticum*, *L. hierapetrae*, *L. cornarianum* εκ των οποίων τα τρία τελευταία είναι ενδημικά της Κρήτης (Artelari 1989, Kyriotakis and Artelari 1998; Artelari and Georgiou 2002; Georgakopoulou et al. 2006). Από τον ταξινομικό προσδιορισμό των συλλεχθέντων δειγμάτων στο εργαστήριο προέκυψε ως νέο στοιχείο ότι στην περιοχή υπάρχει και ένα άλλο ενδημικό είδος της Κρήτης, συγκεκριμένα το *L. sitiicum*, το οποίο ενσωματώθηκε στην παρούσα μελέτη και το

οποίο έως τώρα ήταν γνωστό μόνο από την ΒΑ Κρήτη. Αξιίζει όμως να τονιστεί ότι οι μορφολογικοί χαρακτήρες ήταν σε πολλές περιπτώσεις στα όρια των προηγούμενων περιγραφών των ειδών (πχ. περιπτώσεις *L. palmare*, προσωπική επικοινωνία καθ. Αρτελάρη) και αυτό εμπόδιζε την κατηγορηματική ταξινόμηση όλων των δειγμάτων, κάτι που αποτελεί έναν συνήθη περιορισμό των μελετών του γένους *Limonium*.

Επίσης προέκυψε ότι το μεγαλύτερο μέρος της μορφολογικής μεταβλητότητας που αναδείχθηκε από τη μορφομετρία παρατηρείται μεταξύ των ενδημικών taxa. Μεταξύ των μη ενδημικών taxa εκφράζεται ένα μικρότερο μέρος της συνολικής μεταβλητότητας συγκριτικά με αυτό που εκφράζεται μεταξύ μη ενδημικών και ενδημικών.

Σε επίπεδο γενετικής ποικιλότητας με βάση τα αποτελέσματα των AFLPs προέκυψε ότι το μεγαλύτερο μέρος της μεταβλητότητας παρατηρείται μεταξύ μη ενδημικών και ενδημικών taxa. Αντίστοιχα όμως προέκυψε ότι πολύ μεγάλο μέρος της μεταβλητότητας παρατηρείται και μεταξύ των μη ενδημικών taxa.

Ως προς τον επιγενετικό παράγοντα προέκυψε ότι το μεγαλύτερο μέρος της μεταβλητότητας που δεν επηρεάζεται από την ενδογενή μεθυλίωση της κυτοσίνης παρατηρείται μεταξύ των ενδημικών taxa. Μικρότερο είναι το μέρος της μεταβλητότητας που παρατηρείται μεταξύ μη ενδημικών και ενδημικών taxa, καθώς και μη ενδημικών μεταξύ τους. Επίσης το μέρος της μεταβλητότητας που αφορά στα μη ενδημικά taxa και επηρεάζεται από την ενδογενή μεθυλίωση της κυτοσίνης εμφανίζει διαφοροποίηση τόσο εντός των taxa όσο και σε σχέση με ενδημικά taxa. Προέκυψε ότι στο *L. virgatum* ο επιγενετικός παράγοντας, όπως εξετάστηκε με βάση την ενδογενή μεθυλίωση της κυτοσίνης, διαφοροποιείται στους πληθυσμούς του είδους με βάση τη χωρική προέλευση τους.

Συγκρίνοντας τα μορφομετρικά με τα γενετικά χαρακτηριστικά των υπό μελέτη δειγμάτων για τον χαρακτηρισμό των taxa προκύπτει μια σαφής σύγκλιση. Αντίστοιχη σύγκλιση παρατηρείται και στην περίπτωση του επιγενετικού παράγοντα με μόνη διαφοροποίηση το ότι ο επιγενετικός παράγοντας φαίνεται να επηρεάζει σε κάποιο βαθμό τα μη ενδημικά taxa.

Τέλος αν δεχθούμε ότι η μορφολογική ταξινόμηση των δειγμάτων που προσδιορίστηκαν ως *L. cornarianum* είναι ασφαλής, και δεν εμπίπτει σε κάποια όρια υψηλής ενδοειδικής ποικιλότητας από πλευράς του *L. hierapetrae* μπορούμε να πούμε ότι τα δύο taxa θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως ένα, δεδομένης της σταθερής

σύγκλισης που αναδείχθηκε στην παρούσα εργασία σε μορφολογικό, γενετικό και επιγενετικό επίπεδο.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ενώ μορφολογικά ένα μεγάλο ποσοστό μεταβλητότητας εμφανίζεται μεταξύ ενδημικών taxa, γενετικά η μέγιστη μεταβλητότητα εμφανίζεται κυρίως μεταξύ μη ενδημικών και ενδημικών και σε συγκεκριμένες περιπτώσεις μεταξύ μη ενδημικών taxa. Ο επιγενετικός παράγοντας φαίνεται να συγκλίνει ως προς τη μεταβλητότητα με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά, ενώ προκύπτει ότι επηρεάζει κυρίως τα μη ενδημικά taxa.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική βιβλιογραφία

Αρτελάρη Π. 1984: Βιοσυστηματική μελέτη του γένους *Limonium* (Plumbaginaceae) στην περιοχή του Ιονίου Πελάγους. – Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών.

Αρτελάρη Ρ. & Γεωργίου Ο. 2000: Το γένος *Limonium* (Plumbaginaceae) στη Νότια Πελοπόννησο. – Πρακτικά 8^{ου} Συνεδρίου Ελληνικής Βοτανικής Εταιρείας, Πάτρα.

Κουτρούμπα Κ. 2014: Γενετική σύσταση πληθυσμών του υβριδίου ρίγανης *Origanum x intercedens* Rech. στην Κρήτη. – Μεταπτυχιακή διατριβή, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Μανούσου Σ. 2002: Συμβολή στη μελέτη του είδους *Limonium graecum* (Poiret) Rech fil. (Plumbaginaceae) στην Ελλάδα. – Διπλωματική εργασία. Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα.

Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

Alonso-Blanco C., Peeters A. J., Koornneef M., Lister C., Dean C., van den Bosch N., Pot J., Kuiper M. T., 1998: Development of an AFLP based linkage map of Ler, Col and Cvi *Arabidopsis thaliana* ecotypes and construction of a Ler/Cvi recombinant inbred line population. *The Plant Journal*, 14(2), 259-271.

- Artelari R. & Kamari G. 1986:** A karyological study of ten *Limonium* species (Plumbaginaceae) endemic in the Ionian area. – Willdenowia 15: 497-513.
- Artelari R. 1989a:** Biosystematic study of the genus *Limonium* (Plumbaginaceae) in the Aegean area (Greece) I. Some *Limonium* species from the Kikladhes islands. – Willdenowia 18: 399-408.
- Artelari R. 1989b:** *Limonium creticum* (Plumbaginaceae), a new species from Kriti island (Aegean sea) Greece. – Candollea 44: 415-421.
- Artelari R. 1989c:** Biosystematic study of the genus *Limonium* (Plumbaginaceae) in the Aegean area (Greece). II. *Limonium hierapetrae* Rech. Fil. from Kriti island. – Webbia 43 (1): 33-40.
- Artelari R. 1992:** Reports 51-55. In Kamari G., Felder F. & Garbari F. (eds.), “Mediterranean chromosome numbers reports” 2. – Flora Mediterranea 2: 229-232.
- Artelari R. & Kamari G. 1995:** *Limonium kardamylii* (Plumbaginaceae), a New Species from S Peloponnisos (Greece). – Phytion (Horn, Austria) 35(1): 131-137.
- Artelari R. & Georgiou O. 1999:** Two new species of *Limonium* (Plumbaginaceae) from the island of Kithira (Greece). – Bot. J. Linn. Soc. 131: 399-415.
- Artelari R. & Kamari G. 2000:** *Limonium messesiacum* (Plumbaginaceae), a new species from S Peloponnisos (Greece). – Bot. Chron. 13: 45-49.
- Artelari R. & Georgiou O. 2002:** Biosystematic study of the genus *Limonium* (Plumbaginaceae) in the Aegean area, Greece. III. *Limonium* on the islands Kithira and Antikithira and the surrounding islets. – Nord. J. Bot. 22: 483-501.
- Baker H. G. 1948a:** Relationships in the Plumbaginaceae. – Nature 161:400.
- Baker H. G. 1948b:** Dimorphism and Monomorphism in the Plumbaginaceae I. A survey of the Family. – Ann. Bot. 12: 207-219.
- Baker H. G. 1952:** Cytotaxonomic and Monomorphism in the Plumbaginaceae. – Heredity 6: 279-280.
- Baker H. G. 1953a:** Dimorphism and Monomorphism in the Plumbaginaceae II. Pollen and stigmata in the Genus *Limonium*. – Ann. Bot. 17: 433-445.
- Baker H. G. 1953b:** Dimorphism and Monomorphism in the Plumbaginaceae III. Correlation of the Geographical Distribution Patterns with Dimorphism and Monomorphism in *Limonium*. – Ann. Bot. 17: 615-627.

- Baker H. G. 1954:** Dimorphism and incompatibility in the Plumbaginaceae. – Rap. Et comm. Seme Congr. Int. de Bott., sect. 10: 133-134.
- Baker H. G. 1966:** The evolution, functioning and breakdown of heteromorphic incompatibility systems I. The Plumbaginaceae. – Evolution 20: 349-368.
- Barluenga M., Stölting K. N., Salzburger W., Muschick M., Meyer A., 2006:** Sympatric speciation in Nicaraguan crater lake cichlid fish. Nature, 439(7077), 719-723.
- Baurens F.C., Causse S., Legavre T., 2008:** Methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) protocol to assess CpG and CpNpG methylation in the banana genome. Fruits 63:117–123.
- Bensch S., Åkesson S., Irwin D. E., 2002:** The use of AFLP to find an informative SNP: genetic differences across a migratory divide in willow warblers. Molecular Ecology, 11(11), 2359-2366.
- Bonin A., Pompanon F., Tableret P., 2005:** Use of amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers in surveys of vertebrate diversity. Methods in enzymology, 395, 145-161.
- Brullo S. & Guarino R. 2000:** Contribution to the knowledge of flora and vegetation Khrisi islet (Crete, SE Mediterranean sea). – Flora Mediterranea 10: 265-282.
- Cortinhas A., Erben M., Paes A. P., Santo D. E., Guara-Requena M., Caperta A. D. 2015:** Taxonomic complexity in the halophyte *Limonium vulgare* and related taxa (Plumbaginaceae): insights from analysis of morphological, reproductive and karyological data. Annals of Botany, 115(3), 369-383.
- Crespo M. B. & Lledo M. D. 1998:** El género *Limonium* Mill. (Plumbaginaceae) en la Comunidad Valenciana. Valencia.
- Darlington C. D. & La Cour L. 1969:** The handling of chromosomes. – London.
- Dolcher T. & Pignatti S. 1971:** Un' ipotesi sull'evoluzione dei *Limonium* del bacino del Mediterraneo. – Giornale Botanico Italiano 105: 95-107.
- Erben M. 1978:** Die Gattung *Limonium* im südwestmediterranen Raum.– Mitt. der Bot. Staat. München 14: 361-631.

- Erben M. 1979:** Karyotype differentiation and its consequences in Mediterranean *Limonium*. – *Webbia* 34: 409-417.
- Erben 2001:** Bemerkungen zur Taxonomie der Gattung *Limonium* VII. *Sendtnera* 7: 53-87.
- Georgakopoulou A., Manousou S., Artelari R. & Georgiou O. 2006:** Breeding systems and cytology in Greek populations of five *Limonium* species (Plumbaginaceae). *Wildenowia* 36: 741-750. Mogie, M. 1992 *The evolution of asexual reproduction in plants*.
- Goldman D. H., Jansen R. K., van den Berg C., Leitch I. J., Fay M. F., Chase M. W., 2004:** Molecular and cytological examination of *Calopogon* (Orchidaceae, Epidendroideae): circumscription, phylogeny, polyploidy, and possible hybrid speciation. *American Journal of Botany*, 91(5), 707-723.
- Greuter W. & Burdet H. M. & Long G. (eds) 1989:** Med-Checklist Vol. 4. – Genève.
- Greuter W. & Raus Th. (ed) 1989:** Med- Checklist Notulae, 15. – *Willdenowia* 19: 27-48.
- Gustafsson A., 1947:** Apomixis in higher plants II. The casual aspect of apomixis. – *Lunds Univ. Arsskr. N. F. Avd. 2*, 43 (2): 71-178.
- Ingrouille M. J. 1981:** A newly discovered *Limonium* in East Sussex. – *Watsonia* 13: 181-184.
- Ingrouille M. J. 1984:** A taxometric analysis of *Limonium* (Plumbaginaceae) in Western Europe. – *Pl. Syst. Evol.* 147: 103-113.
- Ingrouille M. J. & Stace C. A. 1985:** Pattern of variation of agamosperous *Limonium* (Plumbaginaceae) in the British Isles. – *Nord. J. Bot.* 5: 113-125.
- Kubitzki K. 1993:** Plumbaginaceae. Pp. 523-530 in: Kubitzki K., Rohwer J. G. & Bittrich V (eds), *The Families and Genera of Vascular Plants*, 2. – Berlin.
- Kypriotakis Z., Artelari R., 1998:** *Limonium cornarianum* (Plumbaginaceae), a New Species from Crete (Aegean Area, Greece). *Phyt - Ann Rei Bot.* 38:143–7.
- Li, H. L., 1978:** Plumbaginaceae, Flora of Taiwan. Editorial Committee of the Flora of Taiwan, vol. IV, pp. 90–93. Edited, & Published, Taipei.

- Lobin W., Leyens T., Killian N., Erben M. & Leweiöhamm K., 1995:** The genus *Limonium* (Plumbaginaceae) on the Cape Verde islands, W. Africa. *Willdenowia* 25: 197-214.
- Mariette S., Le Corre V., Austerlitz F., Kremer A., 2002:** Sampling within the denome for measuring within-population diversity: trade-offs between markers. *Molecular Ecology*, 11(7), 1145-1156.
- Mathieu O., Reinders J., Čaikovski M., Smathajitt C., Paszkowski J., 2007:** Transgenerational stability of the Arabidopsis epigenome is coordinated by CG methylation. *Cell*, 130:851–862.
- Meudt H. M., Clarke A. C., 2007:** Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends Plant Sci* [Internet]. 12(3):106–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17303467>
- Mueller U. G., Wolfenbarger L. L., 1999.** AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology & Evolution*, 14(10), 389-394.
- Müller F., 1868:** Notizen über die Geschlechtverhältnisse brasilianischer Pflanzen. – *Bot. Zeit.* 26.
- Nybom H., 2004.** Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*, 13(5), 1143-1155.
- Rizzoto M., 1999:** Research on the genus *Limonium* (Plumbaginaceae) in the Tuscan Archipelago (Italy). – *Webbia* 53: 241-282.
- Rosselló J. A., Sáez L. & Carvalho A. C., 1998:** *Limonium carvalhoi* (Plumbaginaceae), a new endemic species from the Balearic Islands. – *Anales Jard. Bot. Madrid* 56(1): 23-31.
- Rosselló R., Stübing A. Peris J. B. & Cirujano S., 1997:** *Limonium cordovillense* y *L. pinillense*: (Plumbaginaceae), a new endemic species from the Balearic islands. – *Anales Jard. Bot. Madrid* 56 (1): 2-31.
- Sáez L., Carvalho A. C. & Rosselló J. A., 1998a:** *Limonium marisolii* L. Llorens (Plumbaginaceae) revisited. – *Anales Jard. Bot. Madrid* 56(1): 33-41.

- Sáez L., Curcó A. & Rosselló J. A. 1998b:** *Limonium vigoii* (Plumbaginaceae), a new tetraploid species from the northeast of the Iberian Peninsula. – *Anales Jard. Bot. Madrid* 56(2): 269-278.
- Saliba-Colombani V., Causse M., Gervais L., Philouze J., 2000:** Efficiency of RLFP, RAPD, and AFLP markers for the construction of an intraspecific map of the tomato genome. *Genome*, 43(1), 29-40.
- Smith J. L., 1971:** Studies in *Potentilla* L. *New Phytol.* 7: 607-618.
- Stebbins, G. L., 1941:** Apomixis in the angiosperms. – *Bot. Rev.* 7: 507-542.
- Stebbins G. L., 1950:** Variation and Evolution in plants. Chapter X, P. 380-396, 405-414.
- Tricker P., Rodríguez López C.M., Gibbings G., Hadley P., Wilkinson M.J., 2013:** Transgenerational, dynamic methylation of stomata genes in response to low relative humidity. *Int J Mol Sci*, 14(4):6674–6689.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M., 1995.** AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 11, 4407–4414.
- Woodhead M., Russell J., Squirrell J., Hollingsworth P. M., Mackenzie K., Gibby M., Powell W., 2005:** Comparative analysis of population genetic structure in *Anthyrium distentifolium* (Pteridophyta) using AFLPs and SSRs from anonymous and transcribed gene regions. *Molecular Ecology*, 14(6), 1681-1695.