Πανεπιστήμιο Κρήτης

Τμήμα Βιολογίας

Δημογραφική ιστορία του είδους *Salvia fruticosa* Mill. στην Κρήτη σε ένα οικολογικό πλαίσιο βασισμένη σε γενωμικά δεδομένα

Ουρανία Γρηγοριάδου Ζορμπά

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Ηράκλειο, 2019

UniversityofCrete

Biology Department

Demographic history of *Salvia fruticosa* Mill.in Crete based on genomic data within an ecological context

Ourania Grigoriadou-Zormpa

MasterThesis

Heraklion, 2019

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, Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας,ΠΚ

Εξεταστική Επιτροπή:

Στέργιος Αργ. Πυρίντσος, Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας,ΠΚ

Κυριάκος Κοτζαμπάσης, Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας, ΠΚ

Παναγιώτης Σαρρής, Επικουρος Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας, ΠΚ

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Οικολογίας Φυτών & Διαχείρισης Χερσαίων Οικοσυστημάτων του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιολογίας με τίτλο: «Μοριακή και Εφαρμοσμένη Βιολογία Φυτών και Πράσινη Βιοτεχνολογία».

Την επίβλεψη της μεταπτυχιακής μου διατριβής ανέλαβε ο Καθηγητής κ. Στέργιος Πυρίντσος τον οποίο από καρδιάς θα ήθελα να ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την ευκαιρία που μου έδωσε ώστε να μπορέσω να κυνηγήσω τους επιστημονικούς μου στόχους. Η συνεχής καθοδήγηση και οι συμβουλές που μου προσέφερε έπαιξαν καθοριστικό ρόλο στη διεξαγωγή της εργασίας μου αλλά και στη διαμόρφωση της επιστημονικής μου σκέψης. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον ερευνητή κ. Μιχάλη Μπαριωτάκη για την αμέριστη συμπαράσταση, την υπομονή και την καθοριστική βοήθεια που μου προσέφερε.

Ευχαριστώ επίσης τον Καθηγητή κ. Κυριάκο Κοτζαμπάση και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Παναγιώτη Σαρρή για τη συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω στους συμφοιτητές μου Νίκο Γλαμπεδάκη, Νόρα Παπαδήμα και φυσικά στις πολυαγαπημένες μου Αγγελική Σαγιά και Ολυμπία Δρίβα που με στήριξαν με κάθε δυνατό τρόπο.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Μυρτώ Ραμμοπούλου, την Αλεξία Ελευθεριάδου και τον Φώτη Ξυστράκη για την ψυχολογική, και όχι μόνο, υποστήριξη τους!

Τέλος, ευχαριστώ ολόψυχα τους γονείς μου, τον αδερφό μου και τη γιαγιά μου που με πολύ αγάπη και υπομονή ήταν πάντα δίπλα μου καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού.

Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη	5
Abstract	7
1. Εισαγωγή	9
2. Υλικά και Μέθοδοι	16
3. Αποτελέσματα - Συζήτηση	25
4. Συμπεράσματα	32
5. Βιβλιογραφία	33

Περίληψη

Πλαίσιο Το είδος *Salvia fruticosa* ελκύει το ενδιαφέρον για τη βιολογική δραστικότητα των συστατικών του σε διάφορα βιολογικά συστήματα καθώς και για την οικονομική του αξία και προοπτική δεδομένου ότι χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη για την παραγωγή ουσιών που ενδιαφέρουν τη φαρμακοβιομηχανία και τη βιομηχανία τροφίμων. Η μελέτη των γενετικών περιβαλλοντικών και επιγενετικών χαρακτηριστικών του είδους και η χωρική διαφοροποίηση τους αποτελεί προτεραιότητα διότι καθορίζουν τη βιολογική μεταβλητότητα των δραστικών συστατικών που απομονώνονται από αυτό. Η δημογραφική ιστορία του είδους και ο ρόλος της στη διαμόρφωση της χωρικής διαφοροποίησης που παρουσιάζει το είδος έχει ευρέως παραμεληθεί και εδώ επιχειρείται η αξιοποίησή της στην κατανόηση των χωρικών προτύπων που έως τώρα έχουν αναδειχθεί από άλλες μελέτες.

Στόχος Η ανάδειξη της δημογραφικής ιστορίας του είδους *Salvia fruticosa* στην Κρήτη με βάση γενωμικά δεδομένα σε ένα οικολογικό πλαίσιο.

Μεθοδολογία Τα γενωμικά δεδομένα της Κρήτης για το συγκεκριμένο είδος διατέθηκαν από το Εργαστήριο Οικολογίας Φυτών και Διαχείρισης Χερσαίων Οικοσυστημάτων αποκλειστικά για την υλοποίηση της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας. Αφορούσαν μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNPs) που προέκυψαν από ανάλυση του γονιδιώματος με Diversity Arrays Technology (DArT), μια ανοιχτού λογισμικού πλατφόρμα μικροσυστοιχιών. Η επεξεργασία τους έγινε με την Προσέγγιση Διάχυσης για Δημογραφική Συμπερασματολογία με τη χρήση του πακέτου *dadi* μέσω της γλώσσας προγραμματισμού *Python*. Για τη χωρική ανάλυση του θώκου του είδους χρησιμοποιήθηκαν Μοντέλα Μέγιστης Εντροπίας με αξιοποίηση βιοκλιματικών δεδομένων του WorldClim και για το μέλλον χρησιμοποιήθηκαν κλιματικές προβολές για το έτος 2050 με βάση συγκεκριμένο κλιματικό σενάριο.

Αποτελέσματα Αναδείχθηκε ότι από τα μοντέλα μίας διάστασης που ελέγχθηκαν επικρατέστερο ήταν το Μοντέλο αύξησης που προβλέπει εκθετική αύξηση που ξεκινά πριν από κάποιο χρονικό διάστημα. Από τα μοντέλα δύο διαστάσεων που ελέγχθηκαν υπήρξε σύγκλιση στο Μοντέλο δευτερογενούς επαφής με συμμετρική μετανάστευση που προβλέπει διαχωρισμό χωρίς ροή γονιδίων, ακολουθούμενο από δευτερογενή επικοινωνία με συμμετρική μετανάστευση. Επίσης, προέκυψε ότι οι δύο ομάδες πληθυσμών των οποίων η δημογραφική ιστορία μελετήθηκε

εμφανίζουν διαφοροποίηση ως προς την προβλεπόμενη μελλοντική τους κατανομή με βάση συγκεκριμένο σενάριο κλιματικής αλλαγής.

Συμπεράσματα Η γενωμική διαφοροποίηση των πληθυσμών του είδους *Salvia fruticosa* στην Κρήτη που δεν έχει προσαρμοστικό χαρακτήρα φαίνεται να σχετίζεται με τη δημογραφική ιστορία των πληθυσμών. Επίσης, αυτή η διαφοροποίηση, παρά τον μη προσαρμοστικό χαρακτήρα, σχετίζεται με τις προβλεπόμενες αποκρίσεις των πληθυσμών σε σενάρια αλλαγής κλίματος κάτι που δημιουργεί προσδοκίες α) για την μελλοντική διερεύνηση του ρόλου που μπορεί να έχουν οι δημογραφικές ιστορίες των πληθυσμών στην απόκριση στην κλιματική αλλάγη και β) για την εξεύρεση συγκεκριμένων πολυμορφισμών που πιθανότατα εμπλέκονται στις αποκρίσεις των ειδών στην κλιματική αλλαγή.

Abstract

Background The research interest for the species *Salvia fruticosa* is related to the biological activity of its constituents in various biological systems, as well as to the economic value of the species due to its use as bulk material for the production of compounds that exhibit a high value for the food and drug industry. The study of the genetic environmental and epigenetic characteristics of the species and their spatial differentiation are a priority because they determine the biological variability of the active ingredients isolated from it. The demographic history of the species and its role in shaping spatial diversification of the species has been largely neglected, and here the filling of this gap is attempted.

Target Here, the reveal of the demographic history of *Salvia fruticosa* in Crete, based on genomic data, within an ecological context is attempted.

Methodology The genomic data of Crete for this species were made available by the Laboratory of Plant Ecology and Terrestrial Ecosystems Management exclusively for the implementation of this master thesis.They involved single nucleotide polymorphisms (SNPs) resulting from genome analysis with Diversity Arrays Technology (DArT), an open-source microarray software platform.The Diffusion Approximation for Demographic Inference has been used for data processing, utilizing the *dadi* package through the *Python* programming language. Maximum entropy models using WorldClim bioclimatic data were used for spatial analysis of this species and future projections for 2050 based on a specific climate scenario were used.

Results Of the one-dimensional models tested, it turned out that the growth model that predicts an exponential growth that starts some time ago was the most eligible based on model evaluation criteria. From the two-dimensional models tested, there was convergence in the Secondary contact model with symmetric migration that predicts separation with no gene flow, followed by secondary communication with symmetric migration. It also emerged that the two groups of populations whose demographic history was studied differ in their projected future distribution based on a specific climate change scenario.

Conclusions The genomic differentiation of populations of *Salvia fruticosa*

species in Crete, which has no adaptive character, seems to be related to the demographic history of the populations. Also, this diversification, despite its non-adaptive character, relates to the projected responses of populations to climate change scenarios, which gives rise to expectations of a) future exploration of the role that demographic histories of populations may play in responding to climate change and b) to identify specific polymorphisms that are likely to be involved in species responses to climate change.

1. Εισαγωγή

Το γένος Salvias.l. είναι ένα από τα μεγαλύτερα γένη της Οικογένειας Lamiaceae και περιλαμβάνει περίπου 1.000 είδη που εμφανίζουν παγκόσμια κατανομή (Harleyκαι συν. 2004) με γονιδιακό κέντρο τη Μεσογειακή περιοχή.

Μορφολογικά το γένος Salvia έχει τη μορφή πόας ή θάμνου. Οι ταξιανθίες του είναι μασχαλιαίες. Ο κάλυκας είναι δίχειλος με μη συμφυή οδόντωση. Η στεφάνη είναι επίσης δίχειλη ευθεία ή δρεπανοειδής, το κάτω χείλος είναι τρίλοβο με το μεσαίο να είναι το μεγαλύτερο. Ο σωλήνας της στεφάνης μπορεί να εμφανίζει ή όχι τρίχες στο εσωτερικό του. Οι στήμονες είναι δύο, ενωμένοι αρθρωτά με το νήμα τους εκ των οποίων ο ένας γονιμοποιείται και ο άλλος όχι. Είδη του γένους φύονται συνήθως σε βραχώδεις περιοχές ή στις άκρες των δρόμων, σε ξηρά ποολίβαδα ή σε καλλιεργούμενες εκτάσεις (Tutin 1972).

Πρόσφατες φυλογενετικές μελέτες ανέδειξαν ότι το γένος δεν είναι μονοφυλετικό (Walkerκαι συν. 2004; Walker &Sytsma 2007; Will & Claßen-Bockhoff 2014, 2017; Hu και συν. 2018) και υπάρχουν προτάσεις για το διαχωρισμό του (Will & Claßen-Bockhoff 2017). Προτείνονται τέσσερεις διακριτές εξελικτικές γραμμές CladeI-IV, και το είδος Salviafruticosa (Ελληνικό φασκόμηλο, Greek sage) που αποτελεί το βιολογικό υλικό της παρούσας διατριβής εντοπίζεται στον κλάδο CladeI μαζί με άλλα είδη της Νοτιοδυτικής Ασίας.

Σύμφωνα με τον Κατάλογο Αγγειοφύτων της Ελλάδος (Dimopoulos και συν. 2013) η Ελληνική Χλωρίδα περιλαμβάνει 21 είδη του γένους Salvia τα οποία σύμφωνα με την Karousou και συν. (2000) και με βάση τη διανομή τους (Hedge 1972, 1982; Greuter και συν. 1986) ως ιθαγενή μπορούν να διακριθούν στις παρακάτω κατηγορίες:

- Τάξα με περιορισμένο εύρος και φύονται μόνο στην Ελλάδα (*S. eichleriana* Heldr. ex Halácsy, *S. pomifera* L. subsp. *pomifera* and *S. teddii* Turrill), ή στην Ελλάδα και στην Τουρκία (*S.napifolia* Jacq., *S. pomifera* L. subsp. *calycina* (Sm.) Hayek)

- Τάξα συναντώνται κυρίως στη βαλκανική χερσόνησο και εκτείνονται προς 2 κατευθύνσεις είτε προς τη Μικρά Ασία (*S. amplexicaulis* Lam.) είτε προς την Ιταλία (*S. officinalis* L.)

- Τάξα που έχουν πιο ευρεία κατανομή στην περιοχή της Μεσογείου (όπως *S. argentea* L., *S. fruticosa* Mill.)

- Τάξα που διαθέτουν διαδεδομένη εμφάνιση στον παλαιό κόσμο, ενώ ορισμένα από αυτά έχουν εισαχθεί και ουδετοροποιηθεί στην Αμερική και στην Αυστραλία (πχ *S. aethiopis* L., *S. candidissima* Vahl, *S. glutinosa* L., *S. pratensis* L., *S.ringens* Sm., *S. sclarea* L., *S. tomentosa* Miller, *S. verbenaca* L., *S.verticillata* L. subsp. *verticillata*, *S. virgata* Jacq. and *S. viridis* L.)

Το είδος *S. fruticosa* είναι θάμνος έως 120 cm και τα κλαδιά του είναι χνοώδη και λευκωπά. Τα φύλλα είναι απλά ή πτεροσχιδή με 1-2 ζεύγη από ωοειδή πλευρικά τμήματα και ένα μεγάλο, επιμήκη προς ελλειπτικό ακραίο τμήμα. Επίσης, είναι έμμισχα, χωρίς αδένες αλλά αυλακωτά και η άνω επιφάνεια είναι πρασινωπή ενώ η κάτω γκριζωπή προς λευκή. Οι ταξιανθίες είναι μασχαλιαίες οι οποίες αποτελούνται από δύο έως έξι άνθη. Ο κάλυκας είναι κωδωνοειδής, οδοντωτός, συχνά ιωειδής, αδενώδης ή μη και χνουδωτός. Η στεφάνη έχει μήκος έως 2,5 cm και έχει χρώμα ανοιχτό ιωειδές ή ρόδινο ή σπάνια λευκό (Tutin, 1972).

Η ταξινομική θέση του είδους παρουσιάζεται παρακάτω:

Regnum - Plantae
  Divisio - Tracheophyta
    Subdivisio - Spermatophytina
      Class - Magnoliopsida
        Superordo - Asteranae
          Ordo - Lamiales
            Familia - Lamiaceae Lindl.
              Genus - Salvia L.

Πηγή: Euro+Med Plant Base, Source: World Checklist of Selected Plant Families (2010), copyright © The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew

Επίσης, σύμφωνα με την ίδια πηγή το είδος έχει τα παρακάτω ετεροτοπικά συνώνυμα (heterotypic synonyms):

Salvia baccifera Etl., *Salvia clusii* Jacq., *Salvia cypria* Unger & Kotschy, *Salvia incarnata* Etl., *Salvia libanotica* Boiss. & Gaill., *Salvia lobryana* Azn., *Salvia marrubioides* Vahl, *Salvia ovata* F. Dietr., *Salvia sipylea* Lam., *Salvia subtriloba* Schrank, *Salvia sypilea* Lam., *Salvia thomasii* Lacaita, *Salvia triloba* L. f., *Sclarea triloba* (L. f.) Raf., *Salvia fruticosa* subsp. *cypria* (Unger & Kotschy) Holmboe, *Salvia fruticosa* subsp. *thomasii* (Lacaita) Brullo & al., *Salviatriloba* subsp. *calpeana* (Dautez & Debeaux) P. Silva, *Salvia triloba* subsp. *libanotica* (Boiss. & Gaill.) Holmboe, *Salvia triloba* var. *calpeana* Dautez & Debeaux

Το είδος *S.fruticosa* Miller (Syn.: *S.triloba* L. fil.) είναι ενδημικό φυτό της Ανατολικής Μεσογείου με εξάπλωση από την Ιταλία, Σικελία, Κυρηναϊκή, Βαλκανική χερσόνησο έως και τη Δυτική Συρία. Φύεται κυρίως σε ξηρά, βραχώδη, ασβεστολιθικά εδάφη ή σε διάκενα δασών πεύκης, κοίτες ποταμών, στις άκρες των δρόμων και σε υψόμετρο από 0 έως 900 μ. Στην Κρήτη έχει παρατηρηθεί και σε υψηλότερα σημεία τα οποία ξεπερνούν τα 900 μ, όπως για παράδειγμα αυτό των 1350 μ. (Jahn & Schönfelder 1995). Τέλος, έχει καταγραφεί η παρουσία του στη Μάλτα, στην Ισπανία και στην Πορτογαλία, στις οποίες θεωρείται ότι εισήχθη από τους Φοίνικες και τους Έλληνες με σκοπό την καλλιέργειά του (Karousou & Kokkini, 1997).

Ως είδος ελκύει το ενδιαφέρον για τη βιολογική δραστικότητα των συστατικών του σε διάφορα βιολογικά συστήματα. Αυτό για το φασκόμηλο με την ευρεία έννοια είναι ήδη γνωστό από την Αρχαιότητα, καθώς έχουμε αναφορές σε Αιγυπτιακά κείμενα, στο Θεόφραστο, στον Πλίνιο αλλά και σε μοναστηριακά κείμενα του Μεσαίωνα αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις πρόκειται για το είδος *Salvia officinalis* (Strabao, 1966). Το είδος *S.fruticosa* συγκεκριμένα έχει μελετηθεί και αναλυθεί μεταγενέστερα για τις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες και έχει υποδειχθεί ότι μειώνει το οξειδωτικού στρεσαλλά και ότι αναστέλει την ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού και του παχέως εντέρου (Tundis και συν. 2017). Επίσης, ισχυρή αντιοξειδωτική δράση έχει αναφερθεί για το εκχύλισμα μεθανόλης του καθώς και αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) για το εκχύλισμα διχλωρομεθανίου που σχετίζεται με τη δράση της ακετυλοχολίνης (Ach) (Senol και συν. 2010; Topcu και συν. 2013). Επιπλέον, ουσίες που απομονώθηκαν από το φυτό όπως ursolic acid, carnosol, oleanolic acid, salvigenin, rosmanol, cirsimaritin and hispidulin αναφέρθηκε ότι σχετίζονται με την βελτίωση των μαθησιακών ικανοτήτων (Abdelhalim και συν. 2014).

Το συγκεκριμένο είδος αποτέλεσε το αντικείμενο της παρούσας μελέτης διότι αποτελεί είδος προτεραιότητας στην έρευνα του εργαστηρίου Οικολογίας Φυτών και Διαχείρισης Χερσαίων Οικοσυστημάτων, αλλά και διεθνώς, καθώς είναι ένα από τα τρία είδη εκ των οποίων δευτερογενείς μεταβολίτες σε συγκεκριμένη αναλογία έχουν καταπραϋντικές ιδιότητες κατά των φλεγμονών, της γρίπης, του κρυώματος και των διαφόρων λοιμώξεων του αναπνευστικού, όπως τουλάχιστον έχει τεκμηριωθεί από μια διπλά τυφλή τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη ελεγχόμενη με χορήγηση εικονικού φαρμάκου (Duijker και συν. 2015). Πρόσφατα αναδείχθηκε και η *in vitro* αντιιική δραστικότητα αυτού του μίγματος των δευτερογενών μεταβολιτών στους ιούς influenza A/H1N1 virus strains, influenza B και human rhinovirus 14 (HRV14), ενώ είναι αξιοσημείωτη και η προστατευτική δράση ενάντια στον Respiratory Syncytial Virus (RSV). Επίσης, πρόσφατα αναδείχθηκε ότι ο μηχανισμός αντιιικής δράσης του σχετίζεται με την νουκλεοπρωτεΐνη (NP) του ιού της γρίπης τύπου Α, η οποία προτάθηκε ως ο μοριακός στόχος του μίγματος (Tselioukαι συν. 2019). Αξίζει να σημειωθεί ότι το συγκεκριμένο μίγμα δευτερογενών μεταβολιτών προστατεύεται από διεθνή πατέντα που έχει κατατεθεί από μέλη του Παμεπιστημίου Κρήτης.

Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν αρκετές εργασίες στις οποίες παρέχονται στοιχεία των συστατικών των αιθέριων ελαίων για το είδος στην Κρήτη, και παρά το γεγονός ότι σε κάποιες αναφέρεται γεωγραφική μεταβλητότητα της σύστασης του αιθέριου ελαίου, εξακολουθεί να απουσιάζει μια ολοκληρωμένη προσέγγιση του χημικού αποτυπώματος του είδους η οποία θα βασίζεται στη βιολογική μεταβλητότητα σε χωρική κλίμακα, ούτως ώστε να μπορεί να τυποποιηθεί η παραγωγή προϊόντων φυτικής προέλευσης για τη φαρμακοβιομηχανία και τη βιομηχανία τροφίμων είτε από συλλογή είτε από καλλιέργεια φυτικού υλικού (Katsadoura 2018).

Η βιολογική μεταβλητότητα διαμορφώνεται από τη δράση γενετικών, περιβαλλοντικών και επιγενετικών παραγόντων που στο τέλος διαμορφώνουν και τη χωρική μεταβλητότητα του χημικού αποτυπώματος και κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική καθώς η γνώση αυτής μπορεί να βοηθήσει στη διαχείρισή της ούτως ώστε να μπορεί να διασφαλιστούν τόσο η ποιότητα του προϊόντος (quality assurance) όσο και ο ποιοτικός έλεγχος (quality control).

Ήδη για το *S.fruticosa*, στο πλαίσιο ενός ευρύτερου ερευνητικού σχεδίου που είναι σε εξέλιξη στο Εργαστήριο Οικολογίας Φυτών και Διαχείρισης Χερσαίων Οικοσυστημάτων έχει μελετηθεί η δράση των περιβαλλοντικών παραγόντων στο χημικό αποτύπωμα του στην Κρήτη, καθώς και η χωρική διαφοροποίηση των αποδόσεων σε αιθέριο έλαιο και του χημικού αποτυπώματος του όπως διαμορφώνονται από τη δράση αυτών των παραγόντων (Katsadoura, 2018). Παρά το γεγονός ότι από τα αποτελέσματα προέκυψε πως οι αποδόσεις των ειδών σε παραγωγή αιθέριων ελαίων σε επίπεδο Κρήτης εμφανίζουν γενικότερη συμφωνία με τα έως τώρα βιβλιογραφικά δεδομένα, προκύπτει στατιστικά σημαντική χωρική διαφοροποίηση από τη δράση περιβαλλοντικών παραμέτρων, η οποία μπορεί να αποδοθεί χαρτογραφικά με τη χρήση Γενικευμένων Γραμμικών Μοντέλων, και η οποία μπορεί να αξιοποιηθεί στο σχεδιασμό παραγωγής πρώτης ύλης για τη φαρμακοβιομηχανία και τη βιομηχανία τροφίμων από συλλογή ή από καλλιέργεια φυτικού υλικού. Το ίδιο προέκυψε ότι ισχύει και για την παραγωγή συγκεκριμένων δευτερογενών μεταβολιτών που περιλαμβάνονται στο αιθέριο έλαιο των υπό εξέταση ειδών.

Επίσης, στο πλαίσιο του ίδου ερευνητικού σχεδίου έχει ήδη μελετηθεί η γενετική ποικιλότητα του στο νησί της Κρήτης, καθώς και το πρότυπο που ακολουθεί η χωρική διαφοροποίησή της (Koufaki, 2018). Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση του γενωμικού γενετικού υλικού του είδους *S. fruticosa*, ονομάζεται Diversity Arrays Technology (DArT) και έχει χαρακτηριστεί ως μια οικονομική, υψηλής ανάλυσης μέθοδος, η οποία εξετάζει απουσία/παρουσία πολυμορφισμών σε μια μόνο δοκιμή (Petroli et al., 2012). Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι υπάρχει σημαντική γενετική ποικιλότητα λόγω της ύπαρξης μεγάλου αριθμού σημειακών πολυμορφισμών. Παράλληλα, προέκυψε ότι αυτή η ποικιλότητα ακολουθεί το πρότυπο της απομόνωσης μέσω απόστασης, δηλαδή όσο απομακρύνονται γεωγραφικά οι πληθυσμοί αυξάνεται και η γενετική τους απόσταση. Η παρατηρούμενη γενετική ποικιλότητα εντοπίζεται κυρίως μεταξύ των διαφορετικών πληθυσμών και όχι ανάμεσα στα άτομα του ίδιου πληθυσμού (ενδοπληθυσμιακά), ενώ αναδεικνύεται ότι διαφοροποιείται και γεωγραφικά κατά μήκος του νησιού από τα δυτικά προς τα ανατολικά. Υπάρχουν ενδείξεις ότι αυτή η διαφοροποίηση σχετίζεται με μορφολογική διαφοροποίηση των ατόμων. Παρά το γεγονός όμως ότι οι πληθυσμοί εμφανίζουν αυτή τη γεωγραφική διαφοροποίηση ως

προς τη γενετική ποικιλότητα, τα οικολογικά μοντέλα θώκου ανέδειξαν ότι αυτή δεν ανακλά διαφοροποίηση της οικοθέσης.

Ένα από τα θέματα που θα είχε ενδιαφέρον να μελετηθεί με δεδομένη την διαθέσιμη γεωγραφική διαφοροποίηση των αποδόσεων και της σύστασης των αιθέριων ελαίων, αλλά κυρίως με δεδομένη τη γενετική διαφοροποίηση των πληθυσμών του είδους στο νησί είναι η δημογραφία των πληθυσμών βασισμένη σε γενωμικά δεδομένα. Οι δημογραφικές μελέτες που βασίζονται σε γενωμικά δεδομένα παίζουν σημαντικό ρόλο στη γενετική πληθυσμών, διαφωτίζοντας προϊστορικά γεγονότα σε οργανισμούς μοντέλα και μη. Υπάρχουν διάφοροι μέθοδοι για την εξαγωγή αυτών των ιστοριών όπως για παράδειγμα η προσέγγιση με τη χρήση της κατανομή της συχνότητας των αλληλομόρφων (AFS) σε πληθυσμούς. Η κατανομή των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) που εμφανίζονται από μία έως πολλές φορές σε άτομα ενός πληθυσμού σχετίζονται άμεσα με την δημογραφική ιστορία των πληθυσμών αυτών (Nielsen, 2000, Sigwart, 2009). Η κατανομή της συχνότητας των αλληλομόρφων είναι μια στατιστική μέθοδος που έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε δημογραφικές μελέτες (Nielsen, 2000; Polanski & Kimmel 2003; Adams & Hudson 2004; Marth και συν. 2004; Keinan και συν. 2007; Gutenkunst και συν. 2009; Gravel και συν. 2011; Excoffier και συν., 2013).

Ιστορικά η παραδοσιακή δημογραφία αποτελούσε μέθοδο προσέγγισης ζωικών κυρίως οργανισμών ενώ στον φυτικό κόσμο παρουσίαζε σημαντική υστέρηση. Σύγχρονες δημογραφικές μελέτες βασισμένες σε γενετικά και γενωμικά δεδομένα έχουν γίνει σε μη φυτικούς οργανισμούς όπως σε ανθρώπους (Gutenkunstκαι συν. 2009b), στο αμφίβιο *Scotobleps gabonicus* (Portik&Leache, 2017), στο λεπιδόπτερο *Euphydryas gillettii* (McCoy και συν. 2014) αλλά και σε σαύρες του γένους Anolisspp.. Παρ όλα αυτά υπάρχουν και σύγχρονες δημογραφικές μελέτες που ασχολήθηκαν με φυτικούς οργανισμούς όπως το είδος *Lupinus angustifolius* (Mousavi-Derazmahalleh και συν. 2018). Έχει μελετηθεί η δημογραφική ιστορία του φυτού μοντέλου *Arabidopsis thaliana* στη νήσο Madeira της Πορτογαλίας στην οποία φάνηκε ότι σε μία χρονική περίοδο έγινε αποικισμός χωρίς αυτό να συσχετιζόταν με την εγκατάσταση των ανθρώπων στο νησί αλλά με μία φυσική διασπορά (Fulgione και συν. 2017). Επίσης, μελέτη δημογραφικής ιστορίας έγινε για τα είδη *Senecio aethnensis* και *S.*

chrysanthemifolius στο όρος Etna της Σικελίας στην οποία τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το μοντέλο που υπερίσχυσε ήταν η απομόνωση λόγω μετανάστευσης και αύξηση του πληθυσμού του *S. aethnensis* (Chapman και συν. 2013). Σχετικά πρόσφατα μάλιστα παρουσιάστηκε η γενετική ποικιλότητα και η δημογραφική ιστορία άγριων και καλλιεργούμενων πληθυσμών του είδους *Salvia officinalis* στην περιοχή κατανομής του που είναι κυρίως οι Δαλματικές ακτές.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι υπάρχει ένα σημαντικό κενό στη μελέτη του είδους *S.fruticosa* το οποίο αφορά την ανάδειξη της δημογραφικής ιστορίας του είδους στην Κρήτη με βάση γενωμικά δεδομένα. Έτσι στην παρούσα εργασία επιχειρείται αυτή η προσέγγιση στη μελέτη του είδους, με στόχο την καλύτερη κατανόηση της χωρικής διαφοροποίησης του είδους στο νησί, που αναμένεται να συμβάλει στην κατανόηση της βιολογικής μεταβλητότητας της περιεκτικότητας σε αιθέρια έλαια και συνεπώς στη διαχείριση αυτής της μεταβλητότητας ώστε να μπορεί να διασφαλιστούν τόσο η ποιότητα (quality assurance), όσο και ο ποιοτικός έλεγχος (quality control) φαρμακευτικών προϊόντων και άλλων προϊόντων υψηλής υπεραξίας που προέρχονται από το συγκεκριμένο είδος.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Περιοχή μελέτης

Ως περιοχή μελέτης ορίστηκε η νήσος Κρήτη διότι αποτελεί περιοχή προτεραιότητας για την αξιοποίηση της φαρμακευτικής χλωρίδας της και περιοχή συλλογής και καλλιέργειας φαρμακευτικών φυτών μεταξύ των οποίων και το είδος *S.fruticosa*για την παραγωγή σκευασμάτων από τη φαρμακοβιομηχανία.

Πρόκειται για το πέμπτο μεγαλύτερο νησί της Μεσογειακής Λεκάνης και το μεγαλύτερο της Ελλάδας. Η Κρήτη καλύπτει συνολική έκταση περίπου 8729 km^2 και έχει μήκος περίπου 254 km κατά τη δυτικο-ανατολική διεύθυνση, ενώ κατά τον άξονα βορρά-νότου το πλάτος κυμαίνεται ανάμεσα σε 11 και 56 km. Αποτελεί υπόλειμμα του τόξου που οριοθετούσε την περιοχή του Αιγαίου, και το οποίο συνέδεε τα βουνά της Πελοποννήσου με την οροσειρά του Ταύρου στη Νοτιοδυτική Τουρκία (Fielding και συν. 2005). Η κοινή γεωλογική ιστορία της Κρήτης με τη Μικρά Ασία (Higgins & Higgins, 1996) οδήγησε στην ανταλλαγή πολλών ειδών, όπως φαίνεται και από τις χλωριδικές ομοιότητες. Ενδεικτικά μπορεί να αναφερθούν τα είδη *Datisca cannabina* και *Lecokia cretica*, των οποίων οι ευρωπαικές διανομές περιορίζονται στην Κρήτη, καθώς και τα *Ebenus cretica*, *Ricotia cretica* και *Zelkova abeliceae*, είδη ενδημικά της Κρήτης τα οποία ανήκουν σε γένη με κέντρο διανομής την Ασία.

Το ανάγλυφο της Κρήτης είναι έντονο, με τρείς κύριους ορεινούς όγκους - τα Λευκά Όρη στα Δυτικά με μέγιστο υψόμετρο 2452 μ, την οροσειρά Ίδη στο κεντρικό τμήμα του νησιού με μέγιστο υψόμετρο 2456 μ και το όρος Δίκτη στα Ανατολικά με μέγιστο υψόμετρο 2148 μ. Στις ορεινές περιοχές κυριαρχεί το ασβεστολιθικό υπόστρωμα, ενώ στα χαμηλότερα υψόμετρα επικρατούν κυρίως τα Νεογενή υποστρώματαμε ασβεστόλιθους, ψαμμίτες και μάργες που καλύπτουν μεγάλες εκτάσεις, μαζί μεορθο-χαλαζίτες, φυλλίτες, φλύσχη, Τεταρτογενούς προέλευσης πετρώματα και αλλουβιακές αποθέσεις.

Το κλίμα της περιοχής είναι μεσογειακό, με θερμά, ξηρά καλοκαίρια και ήπιους προς κρύους χειμώνεςμετο μέσο ύψος ετήσιων κατακρημνισμάτων στα 750 mm να εμφανίζει έντονη διαφοροποίηση από τα Ανατολικά προς τα Δυτικά (Vrochidou & Tsanis, 2012).

Οι κυριότεροι τύποι ενδιαιτημάτων στο νησί είναι τα φρύγανα *Sarpcopoterium spinosum* και τα δάση Ελιάς και Χαρουπιάς στα χαμηλά και μεσαία υψόμετρα, ενώ στα υψηλά επικρατούν τα δάση κυπαρίσσου και Ορεινά και Μεσογειακά χέρσα εδάφη με ακανθώδεις θάμνους.

2.2 Γενωμικά δεδομένα

Τα γενωμικά δεδομένα της Κρήτης για το συγκεκριμένο είδος διατέθηκαν από το Εργαστήριο Οικολογίας Φυτών και Διαχείρισης Χερσαίων Οικοσυστημάτων αποκλειστικά για την υλοποίηση της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας.

Πρόκειται για δεδομένα που αφορούσαν συλλογές φυτικού από δειγματοληψίες σε 28 θέσεις της περιοχής μελέτης (τρία άτομα ανά θέση), κατά το διάστημα 10-22/05/2018. Το γενετικό υλικό απομονώθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Dneasy plant mini kit (Giagen) (Walker & Sytsma, 2007), και το γονιδίωμα αναλύθηκε με Diversity Arrays Technology (DArT), μια ανοιχτού λογισμικού πλατφόρμα μικροσυστοιχιών που επιτρέπει την ανάλυση γενετικών πολυμορφισμών (Jaccoud και συν., 2001).

Πρόκειται για μία τεχνολογία που δίνει τη δυνατότητα ανάλυσης εκατοντάδων έως χιλιάδων γενωμικών τόπων και αυτό που κάνει ουσιαστικά είναι να δημιουργεί αποτυπώματα όλου του γονιδιώματος προσμετρώντας και καταγράφοντας την παρουσία ή την απουσία τμημάτων DNA σε γενωμικές αναπαραστάσεις (Jaccoud και συν. 2001; Akbari και συν. 2006). Σύμφωνα με τους Akbari και συν. (2006) είναι μια μέθοδος η οποία ανήκει σε μια πολύ σημαντική υποκατηγορία των τεχνολογιών αλληλούχισης δεύτερης γενιάς που αξιοποιεί συγκεκριμένους μοριακούς δείκτες ως μάρτυρες για την εύρεση σημειακών πολυμορφισμών.

Η μέθοδος αυτή ενέχει πολλά διαφορετικά βήματα (Jaccoud και συν. 2001) που συνοπτικά περιλαμβάνουν a) Δημιουργία απεικονίσεων μέσα από δείγμα DNA, b) Κλωνοποίηση και ενίσχυση τμημάτων από το ολικό δείγμα,c) Εντύπωση του δείγματος στο πάνελ και έναρξη διαδικασίαςd) Σήμανση δείγματος με φθορίζοντα μόρια, e) Υβριδιποίηση τμημάτων και ξέπλυμακαι f) σκανάρισμα, ανάλυση εικόνας και επεξεργασία δεδομένων.

Η ομαδοποίηση των πληθυσμών με βάση τα γενωμικά δεδομένα διατέθηκε επίσης από το Εργαστήριο Οικολογίας Φυτών και Διαχείρισης Χερσαίων

Οικοσυστημάτων αποκλειστικά για την υλοποίηση της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας. Βασίστηκε σε μία νέα μέθοδο που αναπτύχθηκε από τους Jombart & Collins (2015), την Ανάλυση Διαχωρισμού των Κύριων Συνιστωσών (Discriminant Analysis of Principal Components, DAPC), που χρησιμοποιεί αλλεπάλληλες εφαρμογές ταξινόμησης k-means σε ένα πίνακα κύριων συνιστωσών που προκύπτει από τα αρχικά δεδομένα, με τελικό αποτέλεσμα την εύρεση ομάδων. Επίσης, βασίστηκε στο λογισμικό fineRADstructure v0.3.2 software package (Malinskyκαι συν. 2018) και στην Μη-σταθμισμένη Ζευγαρωτή Μέθοδος Αριθμητικών Μέσων (Unweighted Pair Group Method with Arithmatic Mean, UPGMA) (Sokal & Michener, 1958).

Ως γενετικοί πολυμορφισμοί στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) που όπως υποδηλώνεται από το όνομά τους αφορούν πολυμορφισμούς ενός μόνο νουκλεοτιδίου του γονιδιώματος. Η διαφορά με τις μεταλλάξεις έγκειται στην συχνότητα τους (Karki και συν. 2015). Τα SNPs χρησιμοποιούνται στην έρευνα δημογραφικών ιστοριών πληθυσμών (Wakeley και συν. 2001) αλλά και ευρύτερα σε μελέτες γενετικής πληθυσμών διότι έχει βρεθεί ότι πολλές φορές συνδέονται με ρυθμιστικές και λειτουργικές περιοχές του γονιδιώματος (Kim et al., 2007). Τέτοιου είδους πολυμορφισμοί υπάρχουν άφθονοι στο γονιδίωμα και δίνουν τη δυνατότητα για τη διαφώτιση εξελικτικών και δημογραφικών ιστοριών των οργανισμών (Tsykun και συν. 2017). Ο αρχικός αριθμός των SNPs στην παρούσα μελέτη ήταν 30.875, αφού αφαιρέθηκαν τα αλληλόμορφα με την χαμηλή συχνότητα έμειναν 11.414 SNPs.

2.3Ανάλυση Δημογραφικής Ιστορίας

Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Προσέγγιση Διάχυσης για Δημογραφική Συμπερασματολογία (Diffusion Approximation for Demographic Inference–DADI, Portik and Leache, 2017) με τη χρήση του πακέτου *dadi* μέσω της γλώσσας προγραμματισμού *Python*.

Η προσέγγιση διάχυσης είναι μια συνεχής προσέγγιση στην γενετική του πληθυσμού ενός διακριτού αριθμού ατόμων που εξελίσσονται σε διακεκριμένες γενιές. Η μέθοδος βασίζεται στην αποτύπωση του κοινού φάσματος συχνοτήτων των αλληλόμορφων (AFS – Allele Frequency Spectrum) μεταξύ έως και τριών αλληλεπιδρώντων πληθυσμών. Βασική παραδοχή, οι αλλαγές στη συχνότητα των αλληλόμορφων ανά γενιά να

είναι μικρές. Συνεπώς, η προσέγγιση της διάχυσης εφαρμόζεται όταν το πραγματικό μέγεθος πληθυσμού N είναι μεγάλο και τα ποσοστά μετανάστευσης και οι συντελεστές επιλογής είναι της τάξεως 1 / N.

Αν έχουμε δείγματα από P πληθυσμούς, ο αριθμός των δειγματοληφθέντων αλληλουχιών από τον κάθε πληθυσμό είναι n1,n2, . . . ,nP, ενώ οι τιμές εισαγωγής d1,d2, . . . ,dP του AFS αποδίδουν τον αριθμό των διαλληλικών πολυμορφικών θέσεων στις οποίες τα προκύπτοντα αλληλόμορφα βρέθηκαν στα d1 δείγματα του πληθυσμού 1, στα d2 δείγματα του πληθυσμού 2 κ.ο.κ.

Στη συνέχεια γίνεται μοντελοποίηση του φ(x1,x2, . . . ,xP,t), δηλαδή της πυκνότητας των προκυπτόντων μεταλλάξεων σε σχετικές συχνότητες x1,x2, . . . ,xP των πληθυσμών 1,2, . . . ,P σε χρόνο t (όπου toχπαίρνει τιμές από 0-1).

Με δεδομένο ένα μοντέλο μεταλλάξεων απεριορίστων θέσεων (Watterson 1975) και το μοντέλο αναπαραγωγής των Wright-Fisher ανά γενιά, η δυναμική του φ για έναν αυθαίρετο αλλά περιορισμένο αριθμό πληθυσμών P διέπεται από την παρακάτω γραμμική εξίσωση διάχυσης.

$$\frac{\partial}{\partial \tau}\phi = \frac{1}{2}\sum_{i=1,2,\ldots,P}\frac{\partial^2}{\partial^2 x_i}\frac{x_i(1-x_i)}{v_i}\phi$$
$$-\sum_{i=1,2,\ldots,P}\frac{\partial}{\partial x_i}\left(\gamma_i x_i(1-x_i)+\sum_{j=1,2,\ldots,P}M_{i\leftarrow j}(x_j-x_i)\right)\phi.$$

Σύμφωνα με τον Gutenkuns και συν. (2009) ο πρώτος όρος της παραπάνω εξίσωσης διάχυσης μοντελοποιεί τη γενετική παρέκκλιση ενώ ο δεύτερος την επιλογή και την μετανάστευση. Ο χρόνος είναι σε μονάδες του $t=t/(2N_{ref})$, όπου t είναι ο χρόνος σε γενιές και N_{ref} ένα δραστικό πληθυσμιακό μέγεθος αναφοράς. Το σχετικό δραστικό πληθυσμιακό μέγεθος του πληθυσμού *i*είναι $n_i=N_i/N_{ref}$. Ο κλιμακούμενος ρυθμός μετανάστευσης είναι $M_{i<-j}=2N_{ref}m_{i<-j}$, όπου $m_{i<-j}$ είναι η αναλογία των χρωμοσωμάτων ανά γενιά στον πληθυσμό *ι* που είναι νέοι μετανάστες από τον πληθυσμό *j*. Τέλος, ο κλιμακωτός συντελεστής επιλογής είναι $\gamma_i=2N_{ref}\,s_i$, όπου s_i είναι το σχετικό επιλεκτικό πλεονέκτημα ή μειονέκτημα των παραλλαγών στον πληθυσμό *i*.

Η *Python* μέσω της οποία τρέχει το πακέτο *dadi* είναι μια γλώσσα προγραμματισμού, ανοικτού κώδικα, απλή και ιδιαίτερα δημοφιλής που αναπτύχθηκε στις αρχές της δεκαετίας του '90 από τον Ολλανδό Guido van Rossum. Ο ανοικτός κώδικας έχει δώσει τη δυνατότητα ύπαρξης πολλών βιβλιοθηκών και έτσι την κάλυψη μεγάλου εύρους αναγκών (Miller2014). Παρόλο που η νεότερη έκδοση είναι η Python 3.7.3 (2019) δεν έχει αντικαταστήσει εντελώς την έκδοση Python 2.7.16 και αυτό λόγω του μεγάλου όγκου των βιβλιοθηκών και του λογισμικού που δεν έχει μεταφερθεί ακόμη στην νεώτερη έκδοση.

Το δυναμικό της Python στηρίζεται στο ότι είναι μια διαδραστική γλώσσα προγραμματισμού. Ειδικότερα, μπορούν να διερευνηθούν πολλά στάδια μιας έρευνας όπως για παράδειγμα ο έλεγχος των δεδομένων αλλά και διαφόρων μοντέλων.Το *dadi* είναι ένα πακέτο της *Python* μέσω του οποίου είναι δυνατή η εξαγωγή δημογραφικών μοντέλων έπειτα από μια σειρά βελτιστοποιήσεων. Το πακέτο προσαρμόζεται στο κάθε δημογραφικό μοντέλο και σύμφωνα με το φάσμα συχνότητας αλληλομόρφων από έναν έως τρεις πληθυσμούς (Portik and Leache, 2017). Στην επεξεργασία των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε επίσης καιτο R studio version 3.5.2 (R DevelopmentCoreTeam, 2018).

2.4 Μοντέλα Δημογραφικής Ιστορίας

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η ομαδοποίηση των πληθυσμών με βάση τα γενωμικά δεδομένα που έδιδε δύο μεγάλες ομάδες πληθυσμών που διαφοροποιούνται γεωγραφικά (δυτικά – ανατολικά, cluster 1 και cluster 2 αντίστοιχα) (Koufaki 2018). Τα μοντέλα δημογραφικής ιστορίας που ελέγχθηκαν αφορούσαν την κάθε μία από τις δύο ομάδες ξεχωριστά (1D models) καθώς και τις δύο ομάδες ταυτόχρονα (2D models).

Συγκεκριμένα από τα μοντέλα μίας διάστασης (1D) ελέγχθηκαν τα παρακάτω:

Μοντέλα αύξησης (Growth models)

Εκθετική αύξηση που ξεκινά πριν από κάποιο χρονικό διάστημα (nu: η αναλογία του σύγχρονου προς το προγονικό πληθυσμιακό μέγεθος, T: ο παρελθοντικός χρόνος στον οποίον ξεκίνησε η αύξηση του πληθυσμού)

Μοντέλα αύξησης τύπου φιάλης (Bottlegrowth models)

Ακαριαία αύξηση του πληθυσμιακού μεγέθους ακολουθούμενη από εκθετική αύξηση (nuB: η αναλογία του πληθυσμιακού μεγέθους μετά την ακαριαία αλλαγή προς το προγονικό πληθυσμιακό μέγεθος, nuF: η αναλογία του σύγχρονου προς το προγονικό πληθυσμιακό μέγεθος, T: ο παρελθοντικός χρόνος στον οποίον έλαβε χώρα η ακαριαία αλλαγή και ξεκίνησε η αύξηση).

Μοντέλα δύο εποχών (Two Epoch Models)

Ακαριαία αύξηση του πληθυσμιακού μεγέθους πριν από κάποιο χρονικό διάστημα (nu: η αναλογία του σύγχρονου προς το προγονικό πληθυσμιακό μέγεθος, T: ο παρελθοντικός χρόνος στον οποίον συνέβη η αλλαγή πληθυσμιακού μεγέθους).

Μοντέλα τριών εποχών (Three Epoch Models)

Ακαριαία αύξηση του πληθυσμιακού μεγέθους πριν από κάποιο χρονικό διάστημα (nuB: η αναλογία του πληθυσμιακού μεγέθους κατά τη στενωπό προς το προγονικό πληθυσμιακό μέγεθος, nuF: η αναλογία του σύγχρονου προς το προγονικό πληθυσμιακό μέγεθος, TB: διάρκεια της στενωπού, TF: χρόνος από την ανάκαμψη μετά τη στενωπό)

Επίσης από τα μοντέλα δύο διαστάσεων (2D) ελέγχθηκαν τα κάτωθι:

Μοντέλα χωρίς μετανάστευση (No mig ration models)

Διαχωρισμός σε δύο πληθυσμούς, χωρίς μετανάστευση.

Μοντέλα με συμμετρική/ασύμμετρη μετανάστευση (Models with symmetric/asymmetric migration)

Διαχωρισμός σε δύο πληθυσμούς με συμμετρική μετανάστευση ή διαφορετικό ρυθμό μετανάστευσης

Μοντέλα με ακαριαία μεταβολή μεγέθους (Models with instantaneous size change)

Διαχωρισμός χωρίς μετανάστευση, έπειτα μεταβολή του μεγέθους των πληθυσμών χωρίς μετανάστευση.

Διαχωρισμός με συμμετρική/ασύμμετρη μετανάστευση, έπειτα μεταβολή του μεγέθους των πληθυσμών με συμμτερική/ασύμμετρη μετανάστευση.

Μοντέλα αρχαίας μετανάστευσης ή δευτερογενούς επαφής (Ancient migration or secondary contact models)

Διαχωρισμός σε δύο πληθυσμούς με συμμετρική/ασύμμετρη μετανάστευση ακολουθούμενου από απομόνωση των πληθυσμών

Διαχωρισμός χωρίς ροή γονιδίων ακολουθούμενου από μία περίοδο συμμετρικής/ασύμμετρης ροής γονιδίων.

Μοντέλα αρχαίας μετανάστευσης ή δευτερογενούς επαφής με ακαριαία μεταβολή μεγέθους (Ancient migration or secondary contact plus instantaneous size change)

Διαχωρισμός με συμμετρική/ασύμμετρη ροή γονιδίων, ακολουθούμενος από μεταβολή του μεγέθους των πληθυσμών χωρίς ροή γονιδίων.

Διαχωρισμός χωρίς ροή γονιδίων, ακολουθούμενος από αλλάγη του μεγέθους των πληθυσμών με συμμετρική/ασύμμετρη ροή γονιδίων.

Μοντέλα δύο εποχών με συνεχή μετανάστευση (Two epoch models with continuous migration)

Διαχωρισμός σε δύο πληθυσμούς με συμμετρική/ασύμμετρη μετανάστευση. Έπειτα, εμφάνιση δεύτερης περιόδου συμμετρικής/ασύμμετρης μετανάστευσης με διαφορετικούς ρυθμούς. Το μέγεθος των πληθυσμών παραμένει σταθερό.

Μοντέλα τριών εποχών με μετανάστευση και ακαριαίες μεταβολές μεγέθους (Three epoch models with migration and instantaneous size change variations)

Διαχωρισμός χωρίς ροή γονιδίων, ακολουθουμένου από μια περίοδο συμμετρικής/ασύμμετρης μετανάστευσης και έπειτα απομόνωση πληθυσμών.

Διαχωρισμός χωρίς ροή γονιδίων, ακολουθουμένου από μεταβολή του μεγέθους των πληθυσμών με συμμετρική/ασύμμετρη μετανάστευση και έπειτα απομόνωση.

Η αξιολόγηση των μοντέλων για την επιλογή του επικρατέστερου έγινε με τη μέθοδοτης μέγιστης πιθανοφάνειας και με το κριτήριο Akaike information criterion (AIC) μέσω του λογισμικού R (Wagenmakers and Farrell, 2004).

2.5 Μοντέλα Περιβαλλοντικού Θώκου και Μελλοντική προβολή

Η χωρική ανάλυση του θώκου του είδους έλαβε χώρα με τη χρήση Μοντέλων Μέγιστης Εντροπίας (MaximumEntropyModels, Philips και συν. 2006). Η γενική αρχή της μέγιστης εντροπίας, όταν προσπαθούμε να προσεγγίσουμε μια άγνωστη κατανομή, εκφράζει πως η καλύτερη προσέγγιση είναι να εξασφαλίσουμε ότι η προσέγγισή μας πληροί όλους τους γνωστούς περιορισμούς της άγνωστης κατανομής και, με βάση αυτούς, η κατανομή θα πρέπει να έχει τη μέγιστη εντροπία (Jaynes 1957). Σύμφωνα με τον Bariotakis (2015) η άγνωστη κατανομή π είναι η πιθανότητα παρουσίας είδους επί ενός πεπερασμένου συνόλου, X, το οποίο στην ουσία αποτελείται από όλα τα κελιά της περιοχής μελέτης. Η κατανομή π αναθέτει μια μη αρνητική πιθανότητα $\pi(x)$ σε κάθε κελί x, και αυτές οι πιθανότητες αθροίζουν στο 1. Η προσέγγισή μας για το π είναι και αυτή μια κατανομή πιθανοτήτων, την οποία ονομάζουμε $\hat{\pi}$. Η εντροπία της συγκεκριμένης κατανομής είναι:

$$H(\hat{\pi}) = -\sum_{x \in X} \hat{\pi}(x) ln\, \hat{\pi}(x)$$

Η μέθοδος στην οποία βασίζεται η μεγιστοποίηση της εντροπίας για τη συγκεκριμένη κατανομή ανήκει στις τεχνικές εκμάθησης μηχανών (Machine Learning Techniques). Ουσιαστικά, ξεκινάει θέτοντας μια ομοιόμορφη κατανομή πιθανοτήτων σε όλα τα κελιά, και εν συνεχεία μέσω επαναλαμβανόμενων βημάτων προσπαθεί να αποδώσει διαφορετικά βάρη σε κάθε κελί με σκοπό τη μεγιστοποίηση της εντροπίας.

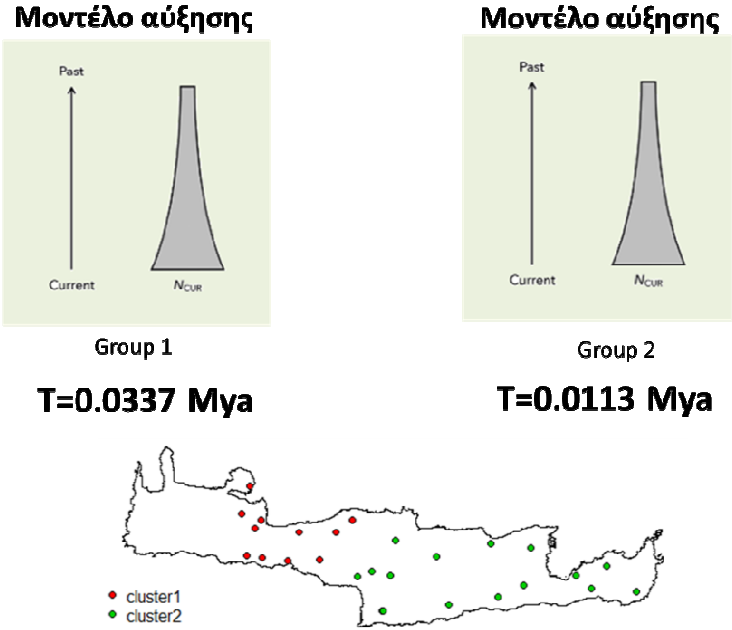
Η συγκεκριμένη μέθοδος επιλέχθηκε για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας λόγω συγκεκριμένων πλεονεκτημάτων που σχετίζονται με τους στόχους της παρούσας μελέτης και αναφέρονται από τον Bariotakis (2015).. Πρώτον, μπορεί να λειτουργήσει καλύτερα από άλλες μεθόδους και να δώσει ακριβή αποτελέσματα ακόμα και όταν ο αριθμός των σημείων δειγματοληψίας είναι εξαιρετικά χαμηλός (Wisz και συν. 2008). Δεύτερον, χρησιμοποιεί μόνο δεδομένα παρουσίας και όχι απουσίας, με συνέπεια τα αποτελέσματα να είναι πιο άμεσα συνδεδεμένα με την δυνητική διανομή (potential distribution) των taxa και όχι την πραγματική διανομή τους (realized distribution) (Philips και συν. 2006). Τέλος, επιτρέπει τον ορισμό ενός περιβαλλοντικού "φόντου" (environmental background) αντί για τη

χρήση απουσιών, το οποίο επιτρέπει τον ακριβέστερο προσδιορισμό του περιβάλλοντος που είναι διαθέσιμο στο είδος

Τα βιοκλιματικά δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν ελήφθησαν από την επίσημη ιστοσελίδα του WorldClim (www.worldclim.org) και για το μέλλον χρησιμοποιήθηκαν κλιματικές προβολές για το έτος 2050 με βάση το κλιματικό σενάριο RCP6.0 (Representative Concentration Pathway 6.0).

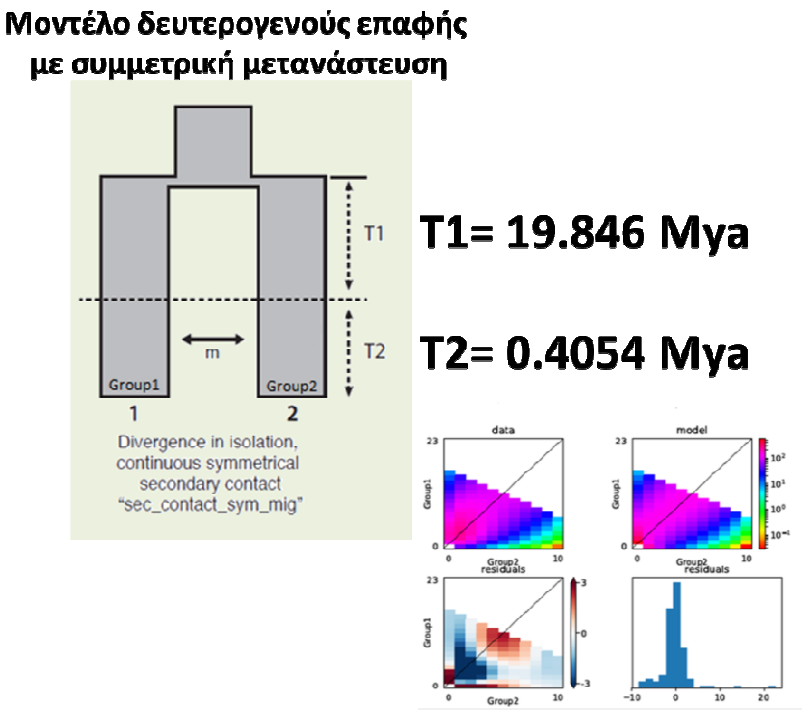
3. Αποτελέσματακαι Συζήτηση

Τα αποτελέσματα από τα μοντέλα μίας διάστασης που ελέγχθηκαν με την Προσέγγιση Διάχυσης για Δημογραφική Συμπερασματολογία μέσω του πακέτου *dadi* και έπειτα από αξιολόγιση με την μέγιστη πιθανοφάνεια και το κριτήριο AICανέδειξαν σύγκλιση και για τις δύο ομάδες στο Μοντέλο αύξησης (Growth model). Το συγκεκριμένο μοντέλο (Σχήμα 1) προβλέπει εκθετική αύξηση που ξεκινά πριν από κάποιο χρονικό διάστημα. Ο παρελθοντικός χρόνος στον οποίον ξεκίνησε η αύξηση του πληθυσμού για την κάθε ομάδα πληθυσμών εκτιμάται σε T=0.0337 Mya και T=0.0113 Mya για το cluster 1 και το cluster 2 αντίστοιχα.



Σχήμα 1. Σχηματική απεικόνιση του Μοντέλου αύξησης για τις δύο ομάδες πληθυσμών (cluster 1 και cluster 2) των οποίων η γεωγραφική κατανομή απεικονίζεται με κουκίδες διαφορετικού χρώματος.

Ουσιαστικά προκύπτει ότι η εκθετική αύξηση των πληθυσμών έγινε στο Μέσο Πλειστόκαινο για τους πληθυσμούς που βρίσκονται δυτικά στην Κρήτη και στα όρια Πλειστόκαινου Ολόκαινου για τους πληθυσμούς που βρίσκονται ανατολικά στην Κρήτη.

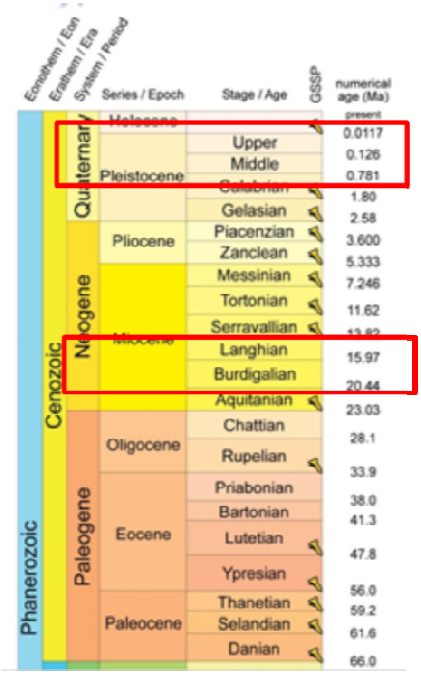


Σχήμα 2. Σχηματική απεικόνιση του Μοντέλου δευτερογενούς επαφής με συμμετρική μετανάστευση. Κάτω δεξιά απεικονίζεται το φάσμα συχνοτήτων των αλληλόμορφων (AFS) για τα δεδομένα και για το συγκλίνον μοντέλο καθώς και οι κατανομές συχνοτήτων των υπολειμμάτων (residuals).

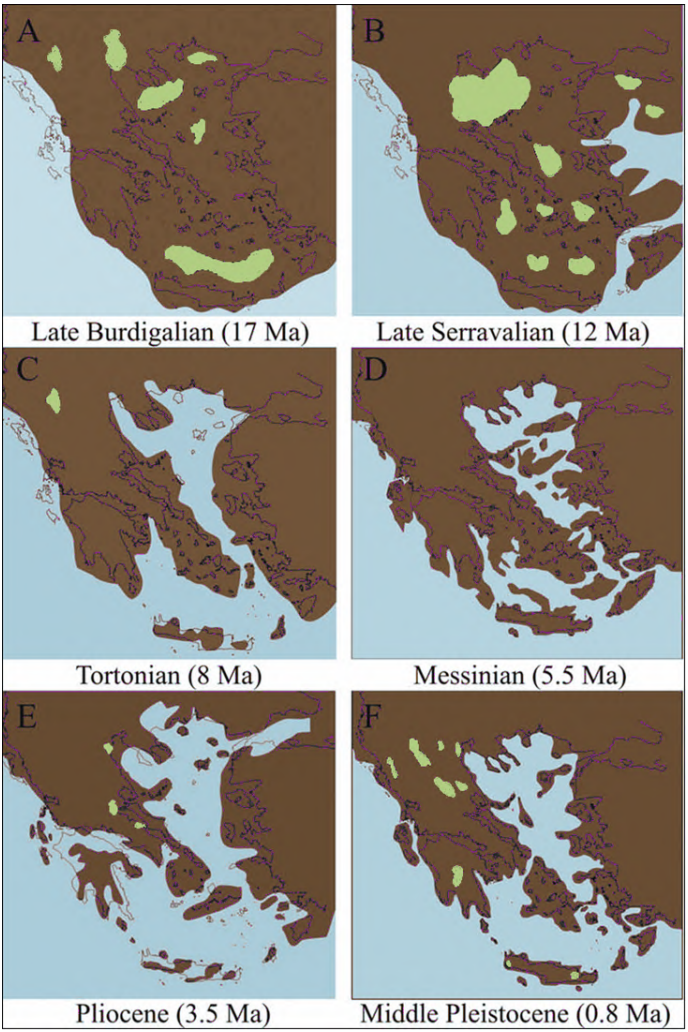
Τα αποτελέσματα από τα μοντέλα δύο διαστάσεων που ελέγχθηκαν με την Προσέγγιση Διάχυσης για Δημογραφική Συμπερασματολογία μέσω του πακέτου dadi και έπειτα από αξιολόγηση με την μέγιστη πιθανοφάνεια και το κριτήριο AIC ανέδειξαν σύγκλιση στο Μοντέλο δευτερογενούς επαφής

με συμμετρική μετανάστευση (Secondary contact with symmetric migration model). Το συγκεκριμένο μοντέλο (Σχήμα 2) προβλέπει διαχωρισμό χωρίς ροή γονιδίων, ακολουθούμενο από δευτερογενή επικοινωνία με συμμετρική μετανάστευση.

Ο παρελθοντικός χρόνος από το διαχωρισμό έως τη δευτερογενή επαφή εκτιμάται σε T=19849 Mya, ενώ ο περελθοντικός χρόνος από τη δευτερογενή σύνδεση έως τον παρόντα χρόνο εκτιμάται σε T=0.4054 Mya. Με βάση τη Διεθνή Επιτροπή Στρωματογραφίας (Σχήμα 3), ο διαχωρισμός γίνεται στη Βουρδιγάλιο βαθμίδα της Μειόκαινου Εποχής στην Νεογενή Περίοδο, δηλαδή περίπου 20.2 Mya, ενώ η δευτερογενής επαφή γίνεται στη Μέση βαθμίδα της Πλειστόκαινου Εποχής στην Τεταρτογενή Περίοδο, δηλαδή περίπου 0.4 Mya.



Σχήμα 3. Λεπτομέρεια από το Διεθνή Χρονοστρωματογραφικό Χάρτη του 2014 που συντάχθηκε από τη Διεθνή Επιτροπή Στρωματογραφίας.

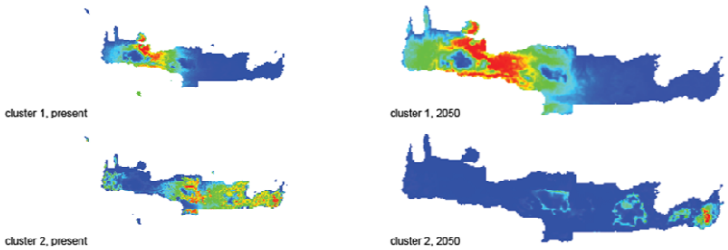


Σχήμα 4. Η διαμόρφωση του Ελληνικού χώρου τα τελευταία 17 Mya. Τα σχήματα επανασχεδιάστηκαν από την ΟΓΖ με βάση τους Creutzburg (1963), Dermitzakis and Papanikolaou (1981) και Dermitzakis (1990).

Ο Ελληνικός χώρος τις περιόδους που προαναφέρθηκαν απεικονίζεται σε σκαρίφημα στο Σχήμα 4. Φαίνεται χαρακτηριστικά ότι στη βαθμίδα που έγινε ο διαχωρισμός είχαμε μία ενιαία στεριά στον Αιγειακό χώρο, ενώ η δευτερογενής επαφή φαίνεται ότι έγινε στη βαθμίδα του Πλειστόκαινου που είχε σχηματιστεί μεγάλο μέρος της νήσου Κρήτης.

Προκύπτει λοιπόν ότι οι δύο ομάδες πληθυσμών του είδους *S.fruticosa*στην Κρήτη, που εμφανίζουν γεωγραφική διαφοροποίηση, εμφανίζουν διαφορετική δημογραφική ιστορία η οποία περιλαμβάνει διαχωρισμό ενός ενιαίου γενωμικά πληθυσμού σε δύο κλάδους οι οποίοι για μεγάλο χρονικό διάστημα δεν έχουν ούτε αμφίδρομη ούτε μονόδρομη μετανάστευση και μετά τη δευτερογενή επαφή που γίνεται περίπου 19 εκ. χρόνια μετά εμφανίζουν αμφίδρομη μετανάστευση έως και σήμερα.

Αυτές οι δύο ομάδες πληθυσμών, που όπως φαίνεται από τη δημογραφική τους ιστορία έχουν διανύσει ως κλάδοι χρονικά τις μεγάλες κλιματικές αλλαγές που έλαβαν χώρα στην Ευρώπη,εμφανίζουν διαφοροποίηση ως προς την προβλεπόμενη μελλοντική τους κατανομή με βάση τα σενάρια κλιματικής αλλαγής που προβλέπονται από τη Διακυβερνητική Επιτροπή για την Αλλαγή του Κλίματος (Intergovernmental Panel on Climate Change -IPCC). Στο Σχήμα 5 παρουσιάζεται η προβλεπόμενη κατανομή της κάθε ομάδας πληθυσμών με βάση τα βιοκλιματικά δεδομένα και τις κλιματικές προβολές που χρησιμοποιήθηκαν για το έτος 2050 σύμφωνα με το κλιματικό σενάριο RCP6.0 (Representative Concentration Pathway 6.0).



Σχήμα 5. Προβλεπόμενη μελλοντική κατανομή των δύο ομάδων πληθυσμών του είδους *Salvia fruticosa*στην Κρήτη με βάση κλιματικές προβολές για το έτος 2050 σύμφωνα με το κλιματικό σενάριο RCP6.0. Τα θερμά χρώματα υποδηλώνουν αυξημένη πιθανότητα παρουσίας.

Όπως προκύπτει από την μελλοντική προβολή, η δυτική ομάδα πληθυσμών (cluster 1) σε γενικές γραμμές διατηρεί και σε κάποιες περιπτώσεις αυξάνει τις εν δυνάμει περιοχές παρουσίας της, ενώ η ανατολική ομάδα πληθυσμών, που θα μπορούσε ίσως με ακρίβεια να αποδοθεί ως κεντρο ανατολική ομάδα (cluster 2),συρρικνώνεται.

Αυτό που μπορεί να υποτεθεί με βάση αυτά τα αποτελέσματα είναι το ότι, δεν αποκλείεται η δημογραφική ιστορία των δύο κλάδων να σχετίζεται και με τη διαφοροποίηση που παρουσιάζουν οι δύο κλάδοι ως προς την μελλοντική προβολή με βάση συγκεκριμένο σενάριο αλλαγής του κλίματος. Δεν πρέπει να διαφύγει της προσοχής ότι η μελλοντική προβολή δεν προέκυψε με βάση τα γενωμικά δεδομένα, αλλά μόνο με την αξιοποίηση των βιοκλιματικών παραμέτρων που σχετίζονται σε πρώτη φάση με την υπάροχυσα διανομή των πληθυσμών. Η αντιστοίχιση αυτή γεννά προσδοκίες για την μελλοντική διερεύνηση της σχέσης μεταξύ της δημογραφικής ιστορίας ενός είδους που βασίζεται σε γενωμικά δεδομένα με τις αποκρίσεις του είδους σε πιθανές μελλοντικές αλλαγές του κλίματος, καθώς και στην εξεύρεση πολυμορφισμών που πιθανότατα σχετίζονται με αυτές τις αποκρίσεις.

Αν υποτεθεί ότι στην περίπτωση του *S.fruticosa*η διαφορετική απόκριση στην μελλοντική κλιματική αλλαγή σχετίζεται με συγκεκριμένους πολυμορφισμούς, προκύπτει ότι παρά τη δευτερογενή επαφή των δύο κλάδων που ανέδειξε η δημογραφική ιστορία και τη συμμετρική μετανάστευση που ξεκίνησε στο Πλειστόκαινο,σε γενωμικό επίπεδο δεν έχουν αρθεί οι διαφοροποιήσεις στους συγκεκριμένους πολυμορφισμούς που πιθανότατα συσσωρεύτηκαν την μακρά περίοδο του διαχωρισμού. Αυτό ενισχύει τις προαναφερθείσες προσδοκίες για την εξεύρεση πολυμορφισμών που πιθανότατα σχετίζονται με την αλλαγή του κλίματος.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης όσον αφορά τους χρόνους διαχωρισμού και δευτερογενούς επαφής φαίνεται να είναι συμβατά με το γενικό σχήμα που περιγράφει τη διαφοροποίηση του γένους Salvias.l., παρ' όλο που στην ανάδειξη του εν λόγω σχήματος οαριθμός των ειδών του γένους που εξετάστηκαν ήταν περιορισμένος και δεν συμπεριελαμβανόταν το είδος *S.fruticosa.* Συγκεκριμένα σύμφωνα με τους Drew & Sytsma (2012) η υπο-οικογένεια Napetoideae διαχωρίστηκε στα 57 Mya στα όρια Παλαιόκαινου-Ηώκαινου ενώ όλες οι υπο-φυλές των Nepetoideae

εμφανίζεται ότι προέκυψαν 34 Mya,κάτι που είναι συμβατό με το χρόνο διαχωριμού των δύο κλάδων της παρούσας μελέτης. Νεώτερη εκτίμηση προσδιορίζει το χρόνο διαχωρισμού της υπο-οικογένειας Napetoideae ακόμη παλαιότερα και συγκεκριμένα στα 63.4 Mya (Likai συν. 2017). Επίσης, ο πιο πρόσφατος κοινός πρόγονος (most recent common ancestor-MRCA) του γένους Salvias.l. εκτιμάται ότι υπήρξε στο Ύστερο Ηώκαινο (34 Mya) έως το Μέσο Ολιγόκαινο (26 Mya) και εμφανίζεται παλαιότερος του πιο πρόσφατου κοινού πρόγονου του γένους Salvias.s. (CladeI) στο οποίο ανήκει και το *Salvia fruticosa* ο οποίος διαφοροποιήθηκε μεταξύ του Μέσου και Ύστερου Μειόκαινου (15-6 Mya). Εδώ εμφανίζεται μια μικρή ασυμφωνία/απόκλιση η οποία όπως χρηζει παραπέρα διερεύνησης σε μελλοντικές μελέτες, δεδομένου ότι τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης εμφανίζουν διαχωρισμό των δύο κλάδων στα 19 Mya και το είδος *S.fruticosa* όπως αναφέρθηκε παραπάνω δεν συμπεριλαμβανόταν στην εργασία των Drew & Sytsma (2012).

Μία σχετικά πρόσφατη μελέτη σχολιάζει τη δημογραφική ιστορία του είδους *Salvia officinalis* (Rešetnik και συν. 2016) αλλά δεν μας δίνει συγκρίσιμα αποτελέσματα δεδομένου ότι χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά δεδομένα. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκαν μικροδορυφορικοί τόποι, ενώ στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ως γενωμικά δεδομένα οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί που αναδείχθηκαν από DArT μικροσυστοιχίες και επιπλέον έχει χρησιμοποιηθεί διαφορετική μεθοδολογία δημογραφικής ανάλυσης. Αξίζει όμως να σχολιαστεί ότι και στο είδος *Salvia officinalis* η απομόνωση λόγω απόστασης αναδείχθηκε το κυρίαρχο μοντέλο γενετικής διαφοροποίησης στον χώρο καθώς και το ότι το είδος Salvia officinalis επιβίωσε σε καταφύγια που παρουσιάζουν ταυτόχρονο διαχωρισμό σε τρείς γενετικές ομάδες. Αναγνωρίζοντας όμως το γεγονός ότι τα δεδομένα μικροδορυφορικών δεν είναι κατάλληλα για την εκτίμηση των χρόνων απόκλισης και της απόλυτης χρονολόγησης, ήταν δύσκολο να εκτιμηθεί χρονικά η χωρική απόκλιση του *S. officinalis* στην συγκεκριμένη εργασία. Σε λίγο προγενέστερη όμως εργασία που δημοσιεύθηκε (Stojanović και συν. 2015) προτάθηκε ότι η διαφοροποίηση της γενετικής δεξαμενής του είδους *Salvia officinalis* εκτιμάται κάπου στο Πλειόκαινο.

Τα παραπάνω δεδομένα για το είδος *Salviao fficinalis* έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον συγκριτικά με το είδος *S.fruticosa* διότι μεταξύ τους τα δύο είδη

υβριδίζουν (Radosavljević και συν. 2015) και τίθενται νέα ερωτήματα κυρίως ως προς το κατά πόσο η δημογραφική ιστορία των δύο ειδών βασισμένη σε γενωμικά δεδομένα μπορεί να ερμηνεύσει διεργασίες που σχετίζονται με τον υβριδισμό των δύο ειδών.

4. Συμπεράσματα

Η γενωμική διαφοροποίηση των πληθυσμών του είδους *Salvia fruticosa* στην Κρήτη που δεν έχει προσαρμοστικό χαρακτήρα φαίνεται να σχετίζεται με τη δημογραφική ιστορία των πληθυσμών. Επίσης, αυτή η διαφοροποίηση, παρά τον μη προσαρμοστικό χαρακτήρα, σχετίζεται με τις προβλεπόμενες αποκρίσεις των πληθυσμών σε σενάρια αλλαγής κλίματος κάτι που δημιουργεί προσδοκίες α) για την μελλοντική διερεύνηση του ρόλου που μπορεί να έχουν οι δημογραφικές ιστορίες των πληθυσμών στην απόκριση στην κλιματική αλλάγη και β) για την εξεύρεση συγκεκριμένων πολυμορφισμών που πιθανότατα εμπλέκονται στις αποκρίσεις των ειδών στην κλιματική αλλαγή.

Σημείωση: *Τα παραπάνω συμπεράσματα προτείνεται να χρησιμοποιηθούν με επιφύλαξη διότι ενδέχεται να τροποποιηθούν ριζικά σε μεταγενέστερη δημοσίευση. Δεν αποτελούν τελικά συμπεράσματα δεδομένου του ότι δεν έγινε έλεγχος ορθότητας, λόγω χρονικού περιορισμού που υπήρχε στην υλοποίηση της παρούσας διατριβής. Η διαθέσιμη υπολογιστική δύναμη του εργαστηρίου σε συνδυασμό με το χρόνο που απαιτεί το τρέξιμο των παραπάνω μοντέλων δεν καθιστούσε κάτι τέτοιο εφικτό στα διαθέσιμα χρονικά όρια.*

5. Βιβλιογραφία

Abdelhalim, A., Chebib, M., Aburjai, T., Johnston, G. A., Hanrahan, J. R. (2014). GABAA Receptor Modulation by Compounds Isolated from *Salvia triloba* L. *Advances in Biological Chemistry*, 4(02), 148.

Adams, A.M., Hudson, R.R. (2004). Maximum-likelihood estimation of demographic parameters using the frequency spectrum of unlinked single-nucleotide polymorphisms. *Genetics* 168, 1699-712.

Akbari, M., Wenzl, P., Caig, V., Carling, J., Xia, L., Yang, S., … Kilian, A. (2006). Diversity arrays technology (DArT) for high-throughput profiling of the hexaploid wheat genome. *Theoretical and Applied Genetics* 113(8), 1409–1420.

Chapman, M.A., Hiscock, S.J., Filatov, D.A. (2013). Genomic divergence during speciation driven by adaptation to altitude. *Molecular Biology and Evolution* 30, 2553-67.

Bariotakis, M. (2015). Niche Issues in ExploringHybridization Patterns. PhD Thesis, University of Crete

Dimopoulos, P., Bergmeier, E., Kokkini, S. (2013). Vascular plants of Greece: an annotated checklist. Botanic Garden and Botanical Museum Berlin-Dahlem, Berlin & Hellenic Botanical Society, Athens.

Drew, B.T., Sytsma, K.J.(2012). Phylogenetics, biogeography, and staminal evolutionin the tribe Mentheae (Lamiaceae). *Am. J. Bot.* 99, 933–953.

Duijker, G., Bertsias, A., Symvoulakis, E.K., Moschandreas, J., Malliaraki, N., Derdas, S.P., Tsikalas, G.K., Katerinopoulos, H.E., Pirintsos, S.A., Sourvinos, G., Castanas, E., Lionis, C. (2015). Reporting effectiveness of an extract of three traditional Cretan herbs on upper respiratory tract infection: Results from a double-blind randomized controlled trial. *Journal of Ethnopharmacology* 163, 157-166.

Excoffier, L., Dupanloup, I., Huerta-Sánchez, E., Sousa, V.C., Foll, M. (2013). Robust Demographic Inference from Genomic and SNP Data. *PLOS Genetics* 9, e1003905.

Fielding, J., Turland, N.J., Turland, N. (2005). Flowers of Crete. Royal Botanic Gardens, Kew.

Fulgione, A., Koornneef, M., Roux, F., Hermisson, J., Hancock, A.M. (2017). Madeiran *Arabidopsis thaliana* reveals ancient long-range colonization and clarifies demography in Eurasia. *Molecular Biology and Evolution* 35(3), 564-574.

Gravel, S., Henn, B.M., Gutenkunst, R.N., Indap, A.R., Marth, G.T., Clark, A.G., Yu, F., Gibbs, R.A., Bustamante, C.D. (2011). Demographic history and rare allele sharing among human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 11983.

Greuter, W., Burdet, H.M., Long, G. (eds.) (1986). Med-Checklist, Vol. 3. Conservatoire etJardin botaniques, Genève.

Gutenkunst, R.N., Hernandez, R.D., Williamson, S.H., Bustamante, C.D. (2009). Inferring the Joint Demographic History of Multiple Populations from Multidimensional SNP Frequency Data. *PLOS Genetics* 5, e1000695.

Harley RM, Atkins S, Budantsey AL, Cantino PD, Conn BJ, Grayer R, et al. (2004). Labiatae. In: Kadereit JW, editor. The families and genera of vascular plants 7, Lamiales. Berlin: Springer, pp. 167–282.

Hedge, I.C. (1972). Salvia L. In T.G.Tutin, V.H.Heywood, N.A.Burges, D.M.Moore,D.H.Valentine, S.M.Walters, and D.A.Webb (eds.), Flora Europaea, Vol. 3, University Press.Cambridge, pp. 188–192.

Hedge, I.C. (1982). Salvia L. In P.H. Davis (ed.) Flora of Turkey and the East Aegean Islands,Vol. 7, University Press, Edinburgh, pp. 400–461.

Higgins, M.D., Higgins, R. (1996). A geological companion to Greece and the Aegean. Cornell University Press, Great Britain.

Hu G-X, et al. (2018).Phylogeny and staminal evolution of Salvia (Lamiaceae, Nepetoideae) in East Asia. *Annals of botany*, 122.4, 649-668.

Jaccoud, D., Peng, K., Feinstein, D., Kilian, A. (2001). Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic acids research* 29(4), e25-e25.

Jahn, R., Schönfelder, P. (1995). Exkursionflora für Kreta. – Stuttgart.

Jombart, T., Collins, C. (2015). A tutorial for Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC) using adegenet 2.0.0.

Karki, R., Pandya, D., Elston, R.C., Ferlini, C. (2015). Defining "mutation" and "polymorphism" in the era of personal genomics. *BMC Medical Genomics* 8, 37-37.

Karousou, R., Hanlidou, E., Kokkini, S. (2000). II. Botany 2. The Sage Plants of Greece: Distribution and infraspecific variation. The Genus Salvia, 27.

Karousou, R., Kokkini, S. (1997). Distribution and clinal variation of *Salvia fruticosa*Mill. (Labiatae) on the island of Crete (Greece). *Willdenowia* 27, 113–120.

Katsadoura, A. (2018). Spatial differentiation in essential oil production from plants of high ethnopharmacological interest of the family Lamiaceae in relation to environmental factors of the island of Crete. Master Thesis, University of Crete.

Keinan, A., Mullikin, J.C., Patterson, N., Reich, D. (2007). Measurement of the human allele frequency spectrum demonstrates greater genetic drift in East Asians than in Europeans. *Nat Genet* 39, 1251-5.

Kim, S., Plagnol, V., Hu, T.T., Toomajian, C., Clark, R.M., Ossowski, S., Ecker, J.R., Weigel, D., Nordborg, M. (2007). Recombination and linkage disequilibrium in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics* 39, 1151.

Koufaki, M. (2018). Spatial patterns of genetic diversity of the species Salvia fruticosa Mill. on Crete based on DArT sequencing data. Undergraduate Thesis, University of Crete.

Li, P., Qi, Z.C., Liu, L.X., Ohi-Toma, T., Lee, J., Hsieh, T.H., ... Qiu, Y.X. (2017). Molecular phylogenetics and biogeography of the mint tribe Elsholtzieae (Nepetoideae, Lamiaceae), with an emphasis on its diversification in East Asia. *Scientific reports* 7(1), 2057.

Malinsky, M., Trucchi, E., Lawson, D.J., Falush, D. (2018). RADpainter and fineRADstructure: Population Inference from RADseq Data. *Molecular Biology and Evolution* 35(5), 1284–1290.

Marth, G.T., Czabarka, E., Murvai, J., Sherry, S.T. (2004). The Allele Frequency Spectrum in Genome-Wide Human Variation Data Reveals Signals of Differential Demographic History in Three Large World Populations. *Genetics* 166, 351.

McCoy, R.C., Garud, N.R., Kelley, J.L., Boggs, C.L., Petrov, D.A. (2014). Genomic inference accurately predicts the timing and severity of a recent bottleneck in a nonmodel insect population. *Molecular Ecology* 23, 136-50.

Miller, T.W. (2014). Modeling techniques in predictive analytics with Python and R: a guide to data science. FT Press.

Mousavi-Derazmahalleh, M., Bayer, P.E., Nevado, B., Hurgobin, B., Filatov, D., Kilian, A., Kamphuis, L.G., Singh, K.B., Berger, J.D., Hane, J.K., Edwards, D., Erskine, W., Nelson, M.N. (2018). Exploring the genetic and adaptive diversity of a pan-Mediterranean crop wild relative: narrow-leafed lupin. T*heoretical and Applied Genetics* 131, 887-901.

Nielsen, R. (2000). Estimation of population parameters and recombination rates from single nucleotide polymorphisms. *Genetics* 154, 931-942.

Petroli, C.D., Sansaloni, C.P., Carling, J., Steane, D.A., Vaillancourt, R.E., Myburg, A.A., ...Grattapaglia, D. (2012). Genomic characterization of DArT markers based on high-density linkage analysis and physical mapping to the Eucalyptus genome. *PLoS One*, 7(9), e44684.

Philips, S.J., Anderson, R.P., Schapire, R.E. (2006). Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling* 190, 231-259.

Polanski, A., Kimmel, M. (2003). New explicit expressions for relative frequencies of single-nucleotide polymorphisms with application to statistical inference on population growth. *Genetics* 165, 427-436.

Portik, D.M., Leache, A.D. (2017). Evaluating mechanisms of diversification in a Guineo-Congolian tropical forest frog using demographic model selection. *Molecular ecology* 26(19), 5245-5263.

R Development Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. http://www.R-project.org/.

Radosavljević, I., Bogdanović, S., Celep, F., Filipović, M., Satovic, Z., Surina, B., Liber, Z. (2019). Morphological, genetic and epigenetic aspects of homoploid hybridization between *Salvia officinalis* L. and *Salvia fruticosa* Mill. *Scientific reports* 9(1), 3276.

Rešetnik, I., Baričevič, D., Rusu, D.B., Carović-Stanko, K., Chatzopoulou, P., Dajić-Stevanović, Z., ... Jug-Dujaković, M. (2016). Genetic diversity and demographic history of wild and cultivated/naturalised plant populations: evidence from Dalmatian Sage (*Salvia officinalis* L., Lamiaceae). *PloS one* 11(7), e0159545.

Şenol, F. S., Orhan, I., Celep, F., Kahraman, A., Doğan, M., Yilmaz, G., Şener, B. (2010). Survey of 55 Turkish Salvia taxa for their acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant activities. *Food Chemistry* 120(1), 34-43.

Sigwart, J. (2009). Coalescent Theory: An Introduction. *Systematic Biology* 58, 162-165.

Sokal, R.R., Michener, C.D. (1958). A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Science Bulletin* 38, 1409–1438.

Stojanović D, Aleksić JM, Jančić I, Jančić R. (2015).A Mediterranean medicinal plant in the continental Balkans: A plastid DNA-based phylogeographic survey of *Salvia officinalis* (Lamiaceae) and its conservation implications. *Willdenowia*45, 103–118.

Strabao, W. (1966). c. A.D. 843–48, Hortulus, tr. Raef Payne. Pittsburgh, Penn.: *Hunt Botanical Library*, pp. 30–81.

Topçu, G., Öztürk, M., Kuşman, T., Demirkoz, A.A.B., Kolak, U., Ulubelen, A. (2013). Terpenoids, essential oil composition, fatty acid profile, and biological activities of Anatolian *Salvia fruticosa* Mill. *Turkish Journal of Chemistry* 37(4), 619-632.

Tseliou, M., Pirintsos, S.A., Lionis, C., Castanas, E., Sourvinos, G. (2019). Antiviral effect of an essential oil combination derived from three aromatic plants (*Coridothymus capitatus* (L.) Rchb. f., *Origanum dictamnus* L. and *Salvia fruticosa* Mill.) against viruses causing infections of the upper respiratory tract. *Journal of Herbal Medicine* 100288.

Tsykun, T., Rellstab, C., Dutech, C., Sipos, G., Prospero, S. (2017). Comparative assessment of SSR and SNP markers for inferring the population genetic structure of the common fungus Armillaria cepistipes. *Heredity* (Edinb) 119, 371-380.

Tundis, R., Iacopetta, D., Sinicropi, M.S., Bonesi, M., Leporini, M., Passalacqua, N.G., Ceramella, J., Menichini, F., Loizzo, M.R. (2017). Assessment of antioxidant, antitumor and pro-apoptotic effects of *Salvia fruticosa* Mill. subsp. *thomasii* (Lacaita) Brullo, Guglielmo, Pavone & Terrasi (Lamiaceae). *Food and Chemical Toxicology* 106, 155-164.

Tutin, T.G., et al., (1972). Flora Europaea3, Cambridge: Cambridge University Press.

Vrochidou, A., Tsanis, I.K. (2012). Assessing precipitation distribution impacts on droughts on the island of Crete. *Natural Hazards and Earth System Sciences* 12: 1159-1171.

Wagenmakers, E.J., Farrell, S. (2004). AIC model selection using Akaike weights. *Psychon Bull Rev* 11, 192-196.

Wakeley, J., Nielsen, R., Liu-Cordero, S.N., Ardlie, K. (2001). The discovery of single-nucleotide polymorphisms—and inferences about human demographic history. *The American Journal of Human Genetics* 69(6), 1332-1347.

Walker JB, Sytsma KJ, Treutlein J, Wink M. (2004).Salvia (Lamiaceae) is not monophyletic: implications for the systematics, radiation, and ecological specializations of Salvia and tribe Mentheae. *Am J Bot*91, 1115–1125

Walker JB, Sytsma KJ. (2007). Staminal evolution in the genus Salvia (Lamiaceae): molecular phylogenetic evidence for multiple origins of the staminal lever. *Ann Bot.* 100, 375–391

Watterson GA (1975). On the number of segregating sites in genetical modelswithout recombination. *Theor Popul Biol* 7, 256–276.

Will M, Claßen-Bockhoff R. (2014). Why Africa matters: evolution of Old World Salvia (Lamiaceae) in Africa.*Ann Bot* 114, 61–83.

Will M, Claßen-Bockhoff R. (2017). Time to split Salvia sl (Lamiaceae)–new insights from Old World Salvia phylogeny. *Molecular phylogenetics and evolution* 109, 33-58.

Wisz, M.S., Hijmans, R.J., Li, J., Peterson, A.T.,Graham, C.H., Guisan, A. 2008. Effects of sample size on the performance of species distribution models. *Diversity and Distributions* 14, 763-773.