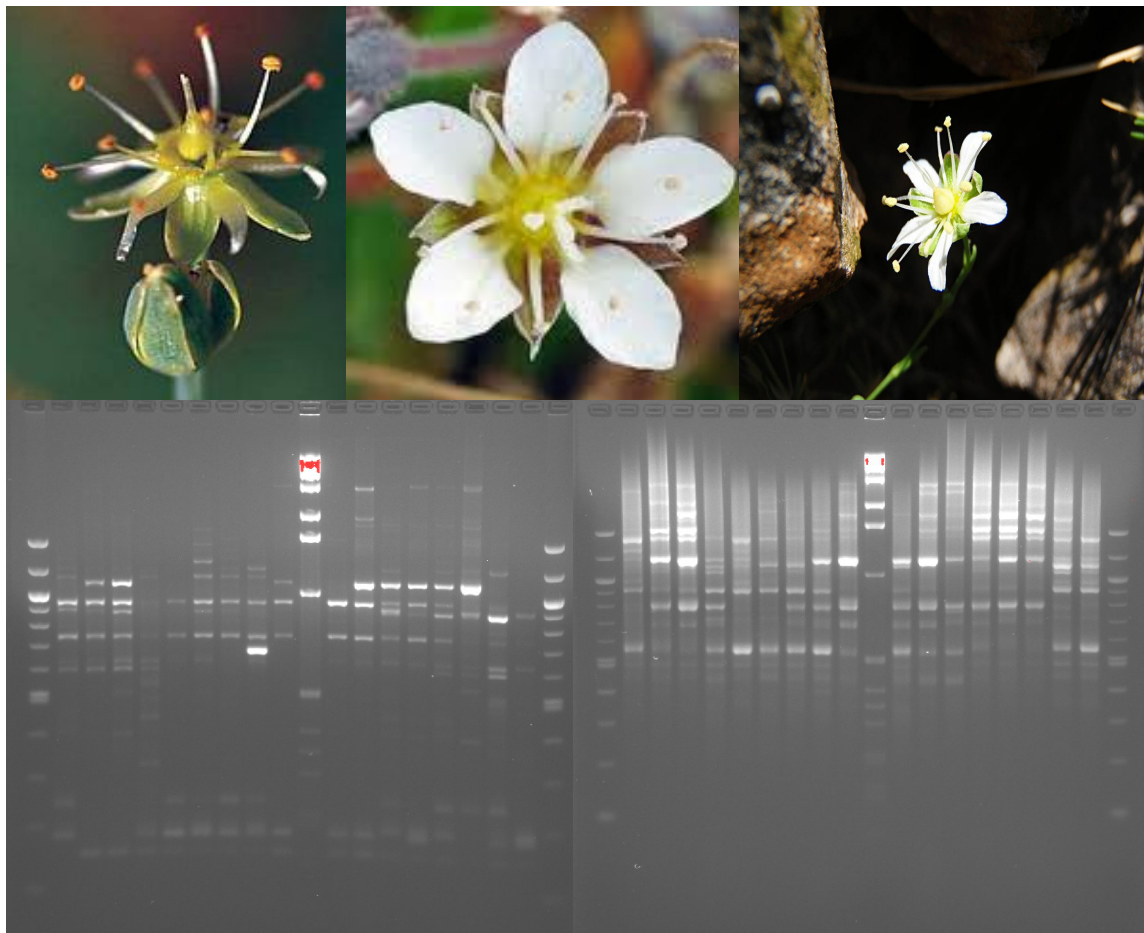


**Τ.Ε.Ι. ΔΥΤΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΩΝ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

**ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΝΔΗΜΙΚΩΝ ΕΙΔΩΝ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ**  
***MINUARTIA* ΜΕ ΣΚΟΠΟ ΤΗΝ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΚΑΙ**  
**ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΟΥΣ**



**ΣΩΤΗΡΑΚΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**  
**ΠΑΠΑΣΩΤΗΡΟΠΟΥΛΟΣ Β. ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b> .....	- 03 -
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	- 04 -
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	- 05 -
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	- 9-
• ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ.....	- 9 -
• ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA.....	- 10 -
• ΤΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ STAB (Doyle and Doyle 1990).....	- 11 -
• ΕΛΕΓΧΟΣ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	- 11 -
• ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΠΗΚΤΗΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	- 12 -
• ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	- 12 -
• ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΠΗΚΤΗΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	- 13 -
• ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR) ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ.....	- 14 -
• ΤΑ ΒΑΣΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ PCR.....	- 16 -
• ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΤΗΣ PCR.....	- 18 -
• ΧΛΩΡΟΠΛΑΣΤΙΚΟΙ ΜΙΚΡΟΔΟΥΦΟΡΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ.....	- 19 -
• ΔΕΙΚΤΕΣ REMAP.....	- 19 -
• ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ.....	- 21 -
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	- 24 -
• ΧΛΩΡΟΠΛΑΣΤΙΚΟΙ ΜΙΚΡΟΔΟΥΦΟΡΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ.....	- 24 -
• ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ ΕΚΤΙΜΩΜΕΝΗ ΜΕ ΔΕΙΚΤΕΣ REMAP:.....	- 25 -
• ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΤΟΣ ΤΗΣ <i>M. parnonia</i> .....	- 29 -
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	- 32 -
• ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΕΙΔΩΝ <i>Minuartia</i> .....	- 32 -
• ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗΣ ΤΩΝ ΕΙΔΩΝ.....	- 35 -
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ</b> .....	- 38 -
<b>ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ</b> .....	-43-

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Ευχαριστώ θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή, του Τμήματος Θερμοκηπιακών Καλλιεργειών και Ανθοκομίας του Τ.Ε.Ι. Μεσολογγίου κ. Βασίλη Παπασωτηρόπουλο επιβλέποντα της πτυχιακής μου εργασίας για τη διδασκαλία της επιστήμης της γενετικής των φυτών, για την ανάθεση αυτού του θέματος, για την εμπιστοσύνη που έδειξε προς το πρόσωπο μου, και για τις χρήσιμες υποδείξεις του καθ' όλη τη διάρκεια της πτυχιακής μελέτης.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γένος *Minuartia* εμφανίζει μεγάλη ποικιλότητα στην περιοχή της Μεσογείου, καθώς περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό ενδημικών και γεωγραφικά περιορισμένων ειδών. Η γενετική ποικιλότητα τριών ειδών *Minuartia* (*M. dirphya*, *M. parnonia*, *M. wettsteinii*) τα οποία είναι ενδημικά στη χώρα μας διερευνήθηκε, έχοντας ως στόχο την ανάπτυξη αποτελεσματικών σχεδίων διατήρησης για την προστασία τους. Τα είδη *M. dirphya* και *M. wettsteinii* εμφανίζονται σε μία μόνο περιοχή το καθένα σχηματίζοντας από ένα μικρό πληθυσμό. Αντίθετα, η *M. parnonia* αποτελεί πιο διαδεδομένο είδος σχηματίζοντας εφτά ξεχωριστούς πληθυσμούς στην περιοχή της νοτιοανατολικής Πελοποννήσου. Η γενετική ποικιλότητα των ειδών αυτών μελετήθηκε χρησιμοποιώντας δέκα μικροδορυφορικούς χλωροπλαστικούς δείκτες (cp DNA) καθώς και πέντε δείκτες REMAP. Οι χλωροπλαστικοί μικροδορυφορικοί δείκτες αποκάλυψαν περιορισμένο πολυμορφισμό, μόνο μεταξύ των ειδών, ενώ οι δείκτες REMAP αποκάλυψαν υψηλό βαθμό τόσο διαειδικού όσο και ενδό/διαπληθυσμιακού πολυμορφισμού. Όλες οι αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν (φυλογενετικά δένδρα, PCoA, STRUCTURE) έδειξαν μια σαφή διαφοροποίηση των τριών ειδών, με το είδος *M. wettsteinii* να είναι το πλέον γενετικά απομακρυσμένο. Εντός του είδους *M. parnonia* όπως προέκυψε από την ανάλυση AMOVA το 41% της συνολικής ποικιλότητας κατανεμήθηκε μεταξύ των πληθυσμών, ενώ το 59% στα άτομα των πληθυσμών. Μεταξύ των ειδών ο μεγαλύτερος βαθμός γενετικής ποικιλότητας (PPB = 75.86%,  $H_j = 0.2728$ ,  $I = 0.3509$ ) παρατηρήθηκε στο είδος *M. parnonia* αμέσως μετά στο *M. dirphya* (PPB = 55.17%,  $H_j = 0.2350$ ,  $I = 0.2767$ ), ενώ η μικρότερη παρατηρήθηκε στο είδος *M. wettsteinii* (PPB = 28.74%,  $H_j = 0.1449$ ,  $I = 0.1498$ ). Μικρή γονιδιακή ροή ( $N_m = 0.5451$ ) παρατηρήθηκε μεταξύ των πληθυσμών της *M. parnonia*. Η παρούσα μελέτη είναι σημαντική για την ανάπτυξη στρατηγικών διαχείρισης και προστασίας για τα τρία απειλούμενα είδη του γένους *Minuartia*.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η γενετική ποικιλότητα αποτελεί σημαντικό συστατικό της βιοποικιλότητας και επομένως μελέτες σχετικά με τη γενετική δομή ενός πληθυσμού διευκολύνουν σημαντικά στην κατανόηση των βιολογικών του χαρακτηριστικών, της εξελικτικής του ιστορίας και του προσαρμοστικού δυναμικού του (Yang et al. 2012). Συγκεκριμένα, γενετικές μελέτες σπάνιων και στενά ενδημικών ειδών είναι συχνά αναγκαίες για την ανάπτυξη αποτελεσματικών στρατηγικών για τη προστασία και διαχείριση τους, καθώς ο αριθμός των απειλούμενων υπό εξαφάνιση ειδών σταδιακά αυξάνεται (Holsinger and Gottlieb 1991; Gitzendanner and Soltis 2000).

Αν και η εξαφάνιση ενός είδους οφείλεται στην συνδυασμένη επίδραση πολλών ντετερμινιστικών και στοχαστικών παραγόντων, θα πρέπει να ληφθούν επίσης υπ' όψη και οι γενετικοί παράγοντες καθώς τα περισσότερα από τα απειλούμενα είδη σχηματίζουν μικρούς πληθυσμούς όπου η ομομειξία και τελικά η απώλεια της γενετικής ποικιλότητας είναι αναπόφευκτες (Frankham 2005). Οι πληθυσμοί αυτοί συχνά εμφανίζουν μικρή ικανότητα επιβίωσης και αναπαραγωγής έχοντας μειωμένο προσαρμοστικό δυναμικό (Paschke et al. 2002; Frankham et al. 2010).

Οι γενετικές μελέτες μπορούν να συμβάλλουν αποφασιστικά και να βελτιώσουν τις στρατηγικές διατήρησης που ακολουθούνται αποκαλύπτοντας πληθυσμούς με πολύ χαμηλά επίπεδα γενετικής ποικιλότητας και παρέχοντας πληροφορίες που αφορούν στην έκταση της γονιδιακής ροής μεταξύ κατακερματισμένων πληθυσμών (Nicoletti et al. 2012).

Η Ελλάδα αποτελεί σημαντικό κέντρο βιοποικιλότητας για όλη την οικογένεια Caryophyllaceae, φιλοξενώντας 436 είδη και υποείδη. Σε παγκόσμιο επίπεδο, σχεδόν το 5% του συνόλου των ειδών της οικογένειας αυτής είναι ενδημικά στην Ελλάδα (Trigas et al. 2007). Το γένος *Minuartia* L. (Caryophyllaceae, *Alsinoideae*) απαρτίζεται από περίπου 120 ετήσια και πολυετή είδη που κατανέμονται σε ολόκληρο το βόρειο ημισφαίριο (Bittrich 1993). Η Ελλάδα, με 33 είδη τα οποία κατατάσσονται σε 6 sections, είναι επίσης ένα από τα κέντρα βιοποικιλότητας του γένους. Τα περισσότερα από τα είδη αυτά, ιδίως τα πολυετή συνήθως μεγαλώνουν σε αφιλόξενες συνθήκες όπως πετρώδη εδάφη, βραχώδεις σχισμές και αλπικά περιβάλλοντα. Τα είδη *M. dirphyra*, *M. parnonia* και *M. wettsteinii* είναι ενδημικά στην Ελλάδα και όλα συμπεριλαμβάνονται στο Red Data Book of Rare and Threatened Plants of Greece (Phitos et al. 2009). Το είδος *M. dirphyra* επίσης

συμπεριλαμβάνεται στην έκδοση του Top 50 Mediterranean Island Plants (De Montmollin and Strahm 2005).

Τα είδη *M. dirphya*, *M. parnonia* και *M. wettsteinii* έχουν πολλά κοινά μορφολογικά και φαινολογικά χαρακτηριστικά, π.χ. φύλλα, άνθηση κλπ. Παρόλα αυτά, τα τρία είδη είναι ξεκάθαρα διακριτά λόγω συγκεκριμένων μορφολογικών διαφορών που παρατηρούνται κυρίως στην βάση του άνθους (μέγεθος και σχήμα των πετάλων), ταξιανθία (αριθμός ανθέων και μήκος του μίσχου) και στην μορφολογία του σπόρου (μέγεθος, σχήμα και επιφάνεια) (Trigas and Iatrou 2005).



Εικόνα 1. *Minuartia dirphya*



Εικόνα 2. *Minuartia parnonia*



Εικόνα 3. *Minuartia wettsteinii*

Μαζί με επτά άλλα είδη που υπάρχουν στην κεντρική και νοτιοδυτική Ευρώπη αποτελούν μια καλά καθορισμένη ομάδα εντός της *Minuartia* sect. *Spectabiles* subsect. *Laricifoliae* ser. *Laricifoliae* (McNeill 1962; Trigas and Iatrou 2005; Moore and Kadereit 2013).

Σύμφωνα με την μελέτη των Moore and Kadereit (2013), οι οποίοι μελέτησαν πυρηνικές αλληλουχίες μεταγραφόμενων ριβοσωμικών περιοχών το section *Spectabiles* είναι μία καλά υποστηριζόμενη μονοφυλετική ομάδα μέσα στο γένος *Minuartia*. Επιπλέον τα μέλη του ser. *Laricifoliae* σχηματίζουν έναν μεγάλο κλάδο μέσα στην ομάδα ειδών του *Spectabiles* ενώ και τα τρία είδη που μελετούνται εδώ ομαδοποιούνται δημιουργώντας μια ξεχωριστή εξελικτική γραμμή εντός του ser. *Laricifoliae*. Έτσι, τόσο οι παραδοσιακές ταξινομήσεις όσο και οι φυλογενετικές μελέτες υποστηρίζουν την στενή σχέση των τριών ειδών και την δημιουργία μιας ξεχωριστής εξελικτικής γραμμής.

Τα τρία είδη *Minuartia* που μελετούνται εδώ έχουν μικρούς σπόρους (1.5-3.0 mm), που ζυγίζουν 0.9-1.5 mg οι οποίοι διασκορπίζονται απ' την βαρύτητα σε μικρή απόσταση από το γονικό φυτό ή από δυνατό άνεμο σε σχετικά μεγαλύτερη απόσταση. Τα είδη *M.*

*dirphya* και *M. parnonia* επίσης παρουσιάζουν κλωνική αναπαραγωγή η οποία δεν παρατηρείται στο *M. wettsteinii*. Αυτό πιθανότατα συμβαίνει εξαιτίας του βραχόδου περιβάλλοντος στο οποίο μεγαλώνει, το οποίο δεν ευνοεί την ανάπτυξη των υπόγειων βλαστών.

Το είδος *M. dirphya* είναι γνωστό μόνο από τον πληθυσμό που βρίσκεται στο Όρος Δίρφη στην Εύβοια. Μεγαλώνει σε βραχώδες έδαφος σε μια μικρή σερπεντινική περιοχή (εδαφική νησίδα), απομονωμένο από άλλες τέτοιες περιοχές λόγω εκτεταμένων ασβεστολιθικών σχηματισμών που υπάρχουν στην Κεντρικής Εύβοια, σε ύψος 900-920 μέτρα πάνω από το επίπεδο της θάλασσας. Αυτή την στιγμή καταλαμβάνει μια περιοχή περίπου 0.3 εκταρίων και ο πληθυσμός του υπολογίζεται περίπου στα 500 ώριμα άτομα. Έχει βιώσει σοβαρή απώλεια ενδιαιτημάτων (και στην συνέχεια μια μείωση του πληθυσμού) τις τελευταίες δυο δεκαετίες, εξαιτίας των ανθρώπινων δραστηριοτήτων και σύμφωνα με κατηγορίες του IUCN το είδος πρόσφατα έχει εκτιμηθεί ως “Κρισίμως Κινδυνεύων” (Trigas and Smyrni 2009).

Το είδος *M. parnonia* εμφανίζεται στο Όρος Πάρνων και στις νοτιοανατολικές απολήξεις του στην νοτιοανατολική Πελοπόννησο. Μεγαλώνει σε βραχώδες ασβεστολιθικό έδαφος σε υψόμετρο από 550-1200 μέτρα. Εφτά πληθυσμοί της *M. parnonia* είναι γνωστοί στην νοτιοανατολική Πελοπόννησο έχοντας καταμετρηθεί σχεδόν 20,000 ώριμα άτομα. Το είδος αυτό έχει εκτιμηθεί ως “Σχεδόν Απειλούμενο” (Kalroutzakis and Constantinidis 2009).

Το είδος *M. wettsteinii* είναι επίσης γνωστό μόνο από τον τοποθεσία του στο Όρος Τρίπτης στην ανατολική Κρήτη. Μεγαλώνει σε βραχώδεις ρωγμές και σάρες, σε ασβεστόλιθο, σε υψόμετρο από 1100-1400 μέτρα. Καταλαμβάνει μια περιοχή περίπου 3 km<sup>2</sup> και ο μόνος γνωστός πληθυσμός υπολογίζεται σε λιγότερο από 1000 άτομα. Έχει χαρακτηριστεί ως “Κινδυνεύων” βασισμένο στα κριτήρια του IUCN (Turland and Kamari 2009). Σύμφωνα με τους υπολογισμούς των Trigas and Smyrni (2009) ο πληθυσμός του *M. wettsteinii* είναι μικρότερος από 200 άτομα και το είδος είναι εξαιρετικά σπάνιο στον *locus classicus* του. Επομένως, το είδος θα πρέπει να εκτιμηθεί ως “Κρισίμως Κινδυνεύων” σύμφωνα με το κριτήριο C2a (ii) (IUCN 2001).

Τα τρία είδη είναι τοποθετημένα γεωγραφικά μακριά το ένα από το άλλο. Επιπλέον η παρουσία θαλάσσιων ορίων ενδυναμώνει την απομόνωσή τους, η οποία, στην περίπτωση του *M. wettsteinii* διαρκεί τουλάχιστον 5.3 Myr (όσο δηλαδή ο χρόνος απομόνωσης της Κρήτης από την Πελοπόννησο) (Meulenkaamp 1985). Με δεδομένη την στενή φυλογενετική σχέση των τριών ειδών *Minuartia*, την τωρινή τους διαφοροποίηση και



την στενά περιορισμένη τους εξάπλωση θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως ‘‘υπολειμματικά’’ είδη (relictual).

Στα ενδημικά είδη που περιορίζονται σε μικρούς εγκαταλελειμμένους πληθυσμούς εμφανίζονται διάφορα επίπεδα γενετικής ποικιλότητας, αλλά γενικά, τα στενά περιορισμένα είδη τείνουν να εμφανίζουν μικρότερη γενετική ποικιλότητα ότι τα εξαπλωμένα είδη (Godt et al. 1997; Setoguchi et al. 2011). Αναμφίβολα, η αποκάλυψη της γενετικής ποικιλότητας των ειδών του γένους *Minuartia* που συμπεριλαμβάνονται σε αυτήν την μελέτη, ιδίως αυτών που χαρακτηρίζονται ως ‘‘Κρίσιμως Κινδυνεύοντα’’ είναι επειγόντως αναγκαία για τον σχεδιασμό πρακτικών και στρατηγικών διατήρησης και προστασίας τους. Επιπροσθέτως, ο υπολογισμός του βαθμού της γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ αυτών των ειδών θα ρίξει περισσότερο φως στις εξελικτικές και ταξινομικές τους σχέσεις και επίσης θα βοηθήσει στον προσδιορισμό κρίσιμων παραγόντων που διαμόρφωσαν την εξελικτική τους ιστορία.

Με στόχο τη μελέτη της γενετικής διαφοροποίησης των ειδών του γένους *Minuartia* χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι μοριακοί δείκτες: i) Μικροδορυφορικές αλληλουχίες του χλωροπλαστικού (cp) DNA και ii) ένα σχετικά νέο είδος μοριακών δεικτών που ονομάζεται Retrotransposon Microsatellite Amplified Polymorphism (REMAP) (Kalendar et al. 1999). Το χλωροπλαστικό DNA είναι μητρικά κληρονομούμενο στα περισσότερα φυτά και παρόλο που χρησιμοποιείται συνήθως για φυλογενετικές μελέτες, πρόσφατα παραδείγματα δείχνουν ότι υπάρχει δυνατότητα για χρήση του και σε πληθυσμιακές έρευνες σε ενδοειδικό επίπεδο (Doulaty Baneh et al. 2007; Mondini et al. 2009).

Οι δείκτες REMAP από την άλλη, έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στον προσδιορισμό των φυλογενετικών σχέσεων, την ταυτοποίηση γενετικού υλικού και την εκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας διαφόρων φυτικών ειδών (Biswas et al. 2010; Boronnikova and Kalendar 2010; D’ Onofrio et al. 2010; Mandoulakani et al. 2012).

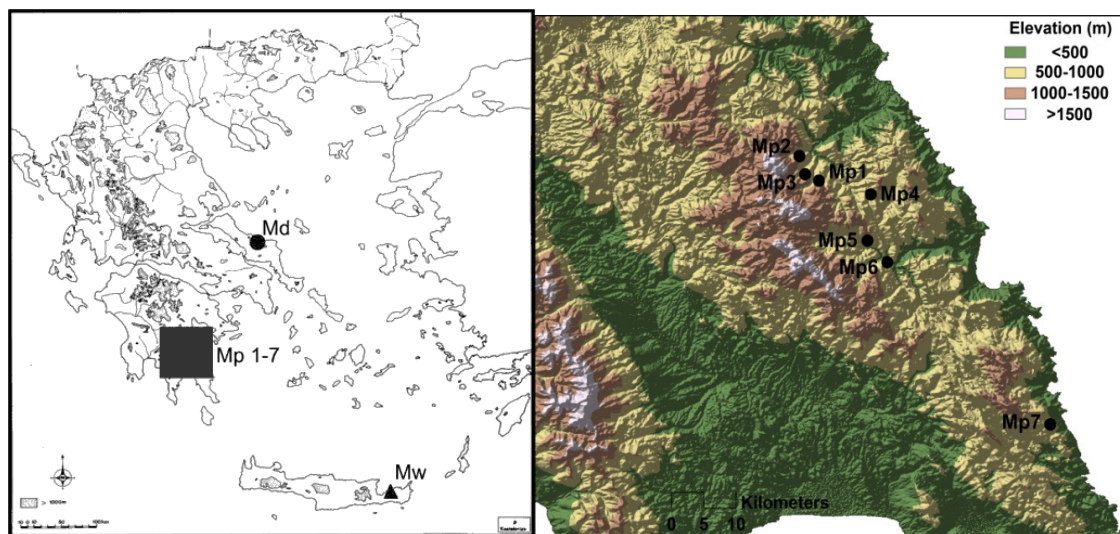
Οι στόχοι αυτής της μελέτης είναι: 1) να υπολογίσουμε την γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των ειδών *M. dirphya*, *M. parnonia* και *M. wettsteinii*, 2) να αναλύσουμε την κατανομή της γενετικής ποικιλότητας στους πληθυσμούς της *M. parnonia* και 3) να προσδιορίσουμε την γενετική δομή και να αξιολογήσουμε τα επίπεδα της γενετικής ποικιλότητας των πληθυσμών των τριών ειδών με σκοπό την απόκτηση βασικών πληροφοριών για την ανάπτυξη πρακτικών και στρατηγικών για τη διαχείριση και προστασία τους.



## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### Δειγματοληψία

Η δειγματοληψία μας, κάλυψε όλους τους γνωστούς πληθυσμούς και των τριών ειδών που μελετήθηκαν δηλαδή επτά πληθυσμών του είδους *M. parnonia* και ενός πληθυσμού από κάθε ένα από τα είδη *M. wettsteinii* και *M. dirrhya*. Φυτά συλλέχτηκαν με τουλάχιστον 5 μέτρα απόσταση μεταξύ τους προς αποφυγή συλλογής ατομικών κλώνων. Η κατανομή των ειδών του γένους *Minuartia* που μελετήθηκαν, τα σημεία συλλογής, καθώς επίσης και μία εκτίμηση του μεγέθους κάθε πληθυσμού βασισμένο σε επιτόπια παρατήρηση παρουσιάζονται στην Εικόνα 1. και τον Πίνακα 1. Από κάθε φυτό δείγματα φρέσκων και υγιών φύλλων συλλέχτηκαν, αποξηράνθηκαν σε γέλη πυριτίου (silica gel) και αποθηκεύτηκαν στους 4 °C για περαιτέρω επεξεργασία.



**Εικόνα 4.** a): Χάρτης κατανομής του είδους *Minuartia wettsteinii* (Mw, τρίγωνο), *M. dirrhya* (Md, κύκλος) και *M. parnonia* (Mp, τετράγωνο); b): Πληθυσμοί του είδους *M. parnonia*: Mp1 (Πραστός), Mp2 (Ζιπουγγιάς), Mp3 (Καστάνιτσα), Mp4 (Ηγούμενος), Mp5 (Παλαιοχώρι), Mp6 (Μονή Ελώνας), Mp7 (Χιονοβούνι).

**Πίνακας 1.** Σύμβολα που χρησιμοποιήθηκαν για τους πληθυσμούς που μελετήθηκαν, περιοχές συλλογής των *M. wettsteinii*, *M. parnonia* και οι πληθυσμοί του *M. dirphya* και εκτιμώμενος αριθμός ατόμων ανά πληθυσμό.

Πληθ.	Είδος	Εκτιμ. Αριθμ. Φυτών/πληθ.	Συντεταγμένες	Τοποθεσία
Mw	<i>M. wettsteinii</i>	200	35°04'55''N 25°52'10''E	Κρήτη, Όρος Τρίπτης
Md	<i>M. dirphya</i>	500	38°38'15''N 23°48'53''E	Εύβοια, Όρος Δίρφυς
Mp1	<i>M. parnonia</i>	14,000	37°15'36''N 22°41'08''E	Όρος Πάρνων, Πραστός
Mp2	<i>M. parnonia</i>	3,000	37°17'17''N 22°38'98''E	Όρος Πάρνων, Ζιπουγγιάς
Mp3	<i>M. parnonia</i>	50	37°15'84''N 22°39'45''E	Όρος Πάρνων, Καστάνιτσα
Mp4	<i>M. parnonia</i>	1,000	37°13'81''N 22°45'34''E	Όρος Πάρνων, Ηγούμενος
Mp5	<i>M. parnonia</i>	500	37°10'20''N 22°43'08''E	Όρος Πάρνων, Παλαιοχώρι
Mp6	<i>M. parnonia</i>	1,000	37°08'61''N 22°45'77''E	Όρος Πάρνων, Μονή Ελώνας
Mp7	<i>M. parnonia</i>	500	36°54'68''N 22°58'54''E	Όρος Πάρνων, Χιονοβούνι

## Γενετική Ανάλυση

### Απομόνωση DNA

Το DNA εκχυλίστηκε από το κάθε άτομο με ομογενοποίηση χρησιμοποιώντας 20 mg ξηρού βάρους ιστού φύλλου και ακολουθώντας το πρωτόκολλο CTAB (Doyle and Doyle 1990) με ήσσονος σημασίας τροποποιήσεις. Η ποσοτικοποίηση και η αξιολόγηση της ποιότητας του απομονωμένου DNA έγιναν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης καθώς και φασματοφωτομετρικά. Τα δείγματα DNA αποθηκεύτηκαν στους -20 °C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

### **Τα στάδια του πρωτοκόλλου CTAB (Doyle and Doyle 1990):**

1. Οι σπόροι επωάζονται από το προηγούμενο βράδυ στους 50°C μέσα σε σωληνάκι τύπου erpendorf σε 200ul διαλύματος CTAB.
2. Ακολουθεί ομογενοποίηση με έμβολο και προσθήκη 1ul proteinase k από στοκ 20mg/ml
3. Το μίγμα επωάζεται στους 60°C για 30 min .
4. Νέα ομογενοποίηση και προσθήκη 300ul προθερμασμένου CTAB.
5. Επάση στους 60°C για 30 min.
6. Προσθήκη ίσου όγκου (500ul) διαλύματος χλωροφόρμιο-ισοαμυλική αλκοόλη (24:1).
7. Αναδευση και φυγοκέντρηση για 10 min στις 10.000 rpm .
8. Μεταφορά της υδάτινης φάσης σε νέο σωληνάκι τύπου erpendorf και προσθήκη ίσου όγκου (450ul) διαλύματος χλωροφόρμιο-ισοαμυλική αλκοόλη (24:1).
9. Ανάδευση για 5min.
10. Φυγοκέντρηση για 10 min στις 10.000 rpm.
11. Μεταφορά της υδάτινης φάσης σε νέο σωληνάκι τύπου erpendorf και προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης.
12. Ανάδευση 1 min σε vortex .
13. Τοποθέτηση στους -20°C για τουλάχιστον 30 min.
14. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20 min στους 4°C.
15. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και προστίθεται 1 ml αιθανόλης 70%.
16. Φυγοκέντρηση για 20 min στους 4°C.
17. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και κρατάμε το ίζημα.
18. Το ίζημα ξηραίνεται τοποθετώντας τα σωληνάκια σε θερμοκρασία 37°C (τα καπάκια ανοικτά) .
19. Επαναδιάλυση σε 50 ul ddH<sub>2</sub>O και αποθήκευση στους -20 °C.

### **Έλεγχος DNA σε πήκτωμα αγαρόζης**

Η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός του απομονωθέντος DNA γίνεται με τη μέθοδο ηλεκτροφόρησης. Η ηλεκτροφόρηση είναι μια μέθοδος που στηρίζεται στο γεγονός ότι τα περισσότερα μακρομόρια όπως το DNA, RNA και πρωτεΐνες, διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους καθώς είναι ηλεκτρικά φορτισμένα. Άρα όταν βρεθούν σε

ηλεκτρικό πεδίο, κινούνται με ταχύτητα που εξαρτάται από τον λόγο του ηλεκτρικού φορτίου προς την μάζα τους.

Τα νουκλεϊκά οξέα είναι συνήθως αρνητικά φορτισμένα, λόγω των φωσφορικών τους ομάδων, με αποτέλεσμα να κινούνται προς τον θετικό πόλο κατά την διάρκεια της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή.

### **Παρασκευή της πηκτής αγαρόζης**

Για την παρασκευή της πηκτής αγαρόζης, αρχικά αναμιγνύουμε σε ειδική κωνική φιάλη 1,5 gr αγαρόζης με 100 ml διαλύματος TAE 1X. Στη συνέχεια, το μείγμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι το σημείο βρασμού. Έπειτα για να κρυώσει το διάλυμα, τοποθετείται κάτω από συνεχή ροή νερού βρύσης και αναδεύεται κυκλικά. Αμέσως μετά προσθέτουμε 5 ul διαλύματος 1% βρωμιούχου αιθιδίου και αναδεύουμε. Ακολουθεί η έκχυση του διαλύματος σε ειδικό πλαίσιο, και απομακρύνονται οι φυσαλίδες που πιθανόν έχουν δημιουργηθεί. Σε ειδικές εγκοπές του πλαισίου τοποθετούμε μια "χτένα" η οποία δημιουργεί "πηγαδάκια". Αφού πήξει η αγαρόζη, αφαιρείται η χτένα προσεκτικά από τη πηκτή. Με αυτόν τον τρόπο έχουν σχηματιστεί τα πηγαδάκια μέσα στην πηκτή στα οποία τοποθετείται η ποσότητα του DNA που επιθυμούμε να ηλεκτροφορηθεί.

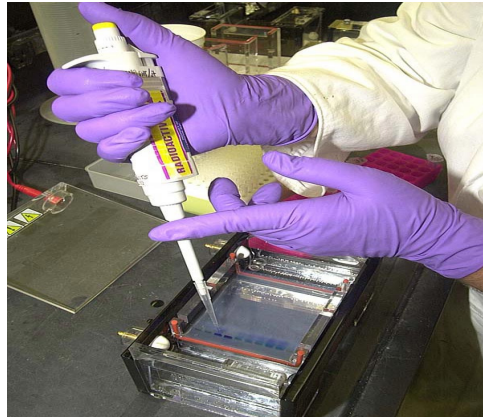


**Εικόνα 5.** Δημιουργία πηκτώματος αγαρόζης

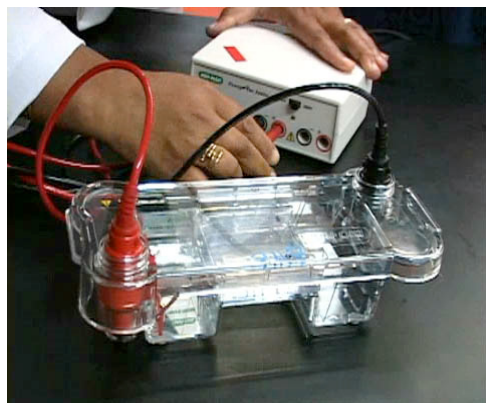
### **Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων**

Τοποθετούμε την πηκτή αγαρόζης μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία περιέχει 700 ml διαλύματος TAE 1X. Για κάθε δείγμα, αναμιγνύουμε πάνω σε ειδική

επιφάνεια parafilm 5 ul διαλύματος DNA με 1 ul διαλύματος φόρτωσης (Loading Buffer). Κάθε δείγμα τοποθετείται σε ξεχωριστό πηγαδάκι της πηκτής, με τη βοήθεια μιας μικροπιπέτας. Μετά το τέλος της διαδικασίας, συνδέουμε τη συσκευή ηλεκτροφόρησης με τροφοδοτικό μηχανήμα και εφαρμόζουμε ηλεκτρικό πεδίο (120 Volts, 90 mAmps). Η διάρκεια της ηλεκτροφόρησης είναι περίπου 1 ώρα.



**Εικόνα 6.** Φόρτωση δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης



**Εικόνα 7.** Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων

### Έλεγχος της πηκτής αγαρόζης

Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης γίνεται ορατό με τη βοήθεια συσκευής που εκπέμπει υπεριώδη ακτινοβολία (UV), ώστε να μπορούμε να δούμε με ευκρίνεια τις ζώνες

που έχουν δημιουργηθεί εκμεταλλεόμενοι τη δέσμευση του βρωμιούχου αιθιδίου στις φωσφοδιεστερικές ομάδες του DNA. Εάν η απομόνωση είναι επιτυχής, το DNA θα εμφανίζεται σαν μία φωτεινή ζώνη επάνω στην πηκτική αγαρόζη. Το μηχάνημα συνδέεται με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή και με ηλεκτρονικό υπολογιστή. Μέσω ενός ειδικού λογισμικού προγράμματος, γίνεται η επεξεργασία και η αποθήκευση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης.



**Εικόνα 8.** Ειδικό μηχάνημα απεικόνισης DNA

## **Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού (PCR)**

### **Αρχή της μεθόδου**

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης επινοήθηκε στα μέσα της δεκαετίας του '80 από τον Kary Mullis. Χάρης στη δυνατότητα απομόνωσης καθαρής DNA πολυμεράσης, καθώς και στη χημική σύνθεση ολιγονουκλεοτιδίων, σε μεγάλες ποσότητες, πραγματοποιήθηκε ο πολλαπλασιασμός συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA χωρίς τη χρήση της τεχνικής της κλωνοποίησης και της μεταφοράς σε βακτηριακούς δείκτες.

Η PCR είναι μια πολύ γρήγορη τεχνική που χρησιμοποιείται για να πολλαπλασιάσει με ακρίβεια μικρά τμήματα του DNA. Κάτι τέτοιο είναι απαραίτητο γιατί για να γίνει ανάλυση του DNA σε μοριακό επίπεδο, είναι απαραίτητες αρκετά μεγάλες ποσότητες του DNA. Απομονωμένα τμήματα DNA θα ήταν αδύνατο να μελετηθούν επαρκώς χωρίς την μέθοδο της PCR, λόγω του πολύ μικρού τους μεγέθους. Έτσι λοιπόν με τον όρο «αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης» (Polymerase Chain Reaction - PCR) αναφερόμαστε

στην τεχνική που χρησιμοποιείται για την *in vitro* παραγωγή μεγάλου αριθμού αντιγράφων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA.

Στα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της μεθόδου συγκαταλέγονται η ελάχιστη ποσότητα αρχικού DNA, από την οποία είναι εφικτό να παραχθεί σε σύντομο χρονικό διάστημα και με μικρό κόστος ανιχνεύσιμη ποσότητα συγκεκριμένης αλληλουχίας, όπως επίσης και η μη χρήση ραδιενεργών ισotόπων για τη σήμανση και την ανίχνευση του DNA (Arnheim και Erlich 1992). Αντίθετα περιορισμό της μεθόδου αποτελεί η ανάγκη για αυστηρή τήρηση συνθηκών αποστείρωσης προς αποφυγή πιθανής μόλυνσης.

Η εφαρμογή της τεχνικής της PCR απαιτεί τα ακόλουθα:

### **Πρότυπο DNA (DNA template)**

Ποσότητα δίκλωνου DNA που περιέχει την αλληλουχία που επιθυμούμε να πολλαπλασιάσουμε και παίζει το ρόλο μήτρας (template DNA). Δεν είναι απαραίτητο η αλληλουχία αυτή να είναι απομονωμένη, εφόσον το κομμάτι που θα πολλαπλασιαστεί θα καθοριστεί από τα ολιγονουκλεοτίδια έναρξης (primers) που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση.

### **Ταq πολυμεράση**

Ειδική θερμοσταθερή DNA πολυμεράση (Taq), που έχει απομονωθεί από το θερμοφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* από τα αρχικά του οποίου προέρχεται η ονομασία Taq και παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε θερμοκρασίες έως 95°C

### **Ολιγονουκλεοτίδια έναρξης (primers)**

Ένα ζεύγος συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων έναρξης (primers), που καθορίζουν το σημείο έναρξης της σύνθεσης DNA και των οποίων το μήκος κυμαίνεται μεταξύ 20-30 ζεύγων βάσεων. Επειδή η δράση της Taq πολυμεράσης ξεκινά από το 3' άκρο του ολιγονουκλεοτιδίου έναρξης, είναι απαραίτητο να υπάρχει απόλυτη ομολογία του συγκεκριμένου σημείου με το DNA στόχο.

Επίσης είναι σημαντικό τα ολιγονουκλεοτίδια έναρξης να έχουν παρεμφερή σημεία τήξης ( $T_m$ ), ομοιόμορφη σύσταση (περίπου 50% GC), να μην εμφανίζουν συμπληρωματικότητα ώστε να αποτρέπεται ο σχηματισμός ετεροδιμερών μεταξύ τους και σε κανένα από τα δύο να μην υπάρχει η πιθανότητα σχηματισμού δευτεροταγούς δομής.



### **dNTP's**

Διάλυμα ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTP's) σε ίση συγκέντρωση από το κάθε ένα από τα dATP, dCTP, dGTP, dTTP, τα οποία θα αποτελέσουν δομικά συστατικά των νέων αλυσίδων DNA.

### **MgCl<sub>2</sub>**

Διάλυμα ιόντων Mg<sup>2+</sup> που παρέχονται με τη μορφή διαλύματος MgCl<sub>2</sub> και τα οποία δρουν ως προσθετική ομάδα, καθώς είναι απαραίτητα για τη δράση της πολυμεράσης. Η τελική συγκέντρωση των ιόντων αυτών εξαρτάται από την παρουσία EDTA και την αντίστοιχη των dNTPs.

### **Ρυθμιστικό διάλυμα της πολυμεράσης (Reaction Buffer)**

Για να δράσει το ένζυμο απαιτείται η ύπαρξη του κατάλληλου διαλύματος αντίδρασης (reaction buffer). Τα συστατικά που περιέχονται συνήθως στο διάλυμα αντίδρασης είναι : Tris-HCl για τη ρύθμιση του pH, KCl το οποίο διευκολύνει τον υβριδισμό των ολιγονουκλεοτιδίων έναρξης και αυξάνει τον ρυθμό σύνθεσης της συμπληρωματικής αλληλουχίας από την πολυμεράση, BSA ή ζελατίνη που βοηθούν στη σταθεροποίηση της Taq, καθώς και ένα μη ιονικό απορρυπαντικό όπως TritonX-100 ή NP-40 τα οποία βοηθούν στη σταθεροποίηση της δράσης της Taq.

Ο πολλαπλασιασμός της επιθυμητής αλληλουχίας λαμβάνει χώρα σε ειδική συσκευή (θερμοκυκλοποιητή) που ακολουθεί ένα καθορισμένο από το χρήστη πρόγραμμα αυξομειώσεων της θερμοκρασίας με κυκλικές επαναλήψεις

### **Βασικά στάδια μεθόδου PCR**

#### **1° Στάδιο: Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA (denaturation)**

Στο στάδιο αυτό η θερμοκρασία κυμαίνεται μεταξύ 93-95 °C. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου DNA, δημιουργώντας μονόκλωνες αλυσίδες πάνω στις οποίες θα υβριδιστούν τα ολιγονουκλεοτίδια έναρξης.

#### **2° Στάδιο: Υβριδοποίηση εκκινητών (primer annealing) στις αλληλουχίες του DNA-στόχου**

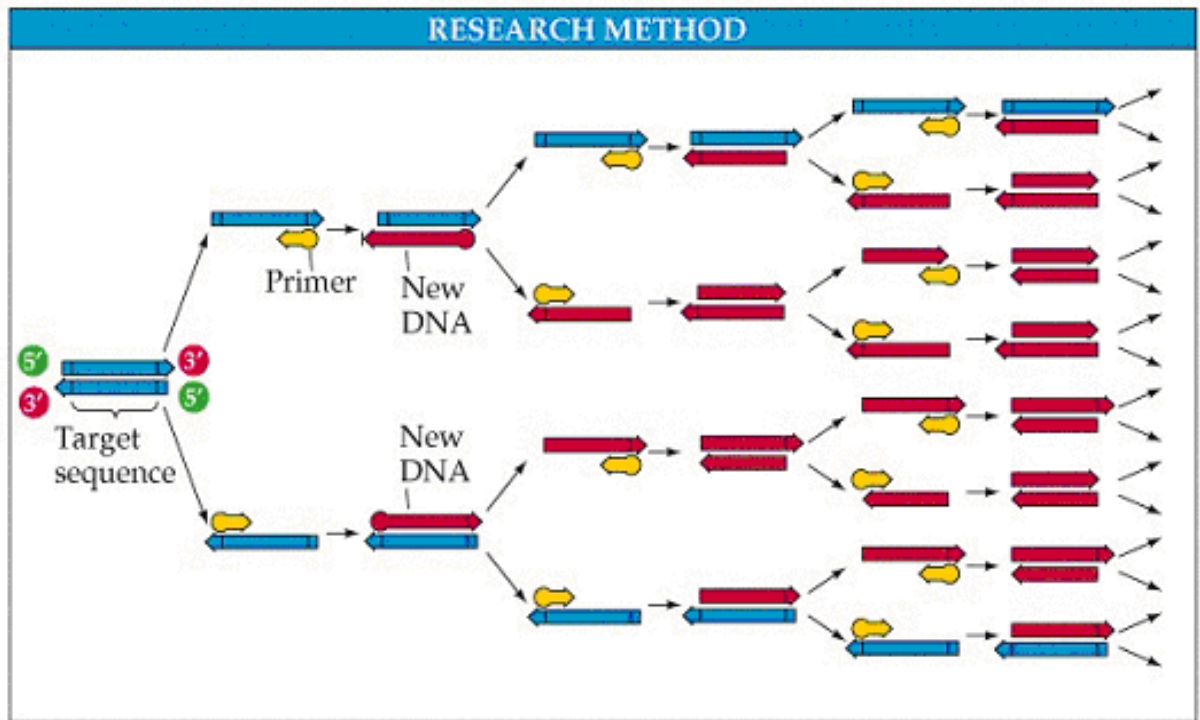
Πραγματοποιείται ο υβριδισμός του αποδιατεταγμένου πλέον DNA με τα ολιγονουκλεοτίδια έναρξης, σε θερμοκρασία που κυμαίνεται μεταξύ 37°C και 60°C. Η επιλογή της καταλληλότερης θερμοκρασίας εξαρτάται από το σημείο τήξης ( $T_m$ ) των ολιγονουκλεοτιδίων έναρξης και από την εξειδίκευση που εμφανίζουν αυτά ως προς την αλληλουχία-στόχο. Στο στάδιο αυτό ελέγχονται διάφορες θερμοκρασίες αντίδρασης και χρόνοι ώστε να προσδιοριστούν οι καταλληλότερες συνθήκες για τη δεδομένη αλληλουχία-στόχο.

### **3° Στάδιο: Επιμήκυνση εκκινητών (extension)**

Πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 72 °C . Εδώ επιμηκύνεται η αλληλουχία των ολιγονουκλεοτιδίων έναρξης, προσθέτοντας τα κατάλληλα 5' τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια, σύμφωνα με την αλληλουχία της αλυσίδας-μήτρας.

Το τέλος του τρίτου σταδίου σηματοδοτεί και την ολοκλήρωση του πρώτου σταδίου της PCR, με αποτέλεσμα από την αρχική δίκλωνη αλυσίδα να δημιουργούνται de novo νέες θυγατρικές δίκλωνες αλυσίδες.

Αυτή η διαδικασία συνεχίζεται για  $n$  κύκλους, που συνήθως κυμαίνονται μεταξύ 30 και 40 κύκλων. Στο τέλος  $n$  τέτοιων κύκλων, η αντίδραση περιέχει θεωρητικά  $2n$  δίκλιωνα DNA μόρια που είναι αντίγραφα της αλληλουχίας του DNA που υπάρχει ανάμεσα στους primers. Πιο συγκεκριμένα περιέχονται:  $(2n-2n) \times$  μόρια όπου:  $n$ =αριθμός κύκλων,  $2n$ =δίκλιωνα μόρια με ακαθόριστο μήκος και  $x$ =αριθμός αντιγράφων από την αρχική μήτρα. Τέλος για να καλυφθούν τυχόν εναπομείναντες μονόκλωνες περιοχές, το μίγμα αντίδρασης αφήνεται στους 72 °C για 5-10 min, για να προσθέσει νουκλεοτίδια η Taq πολυμεράση.



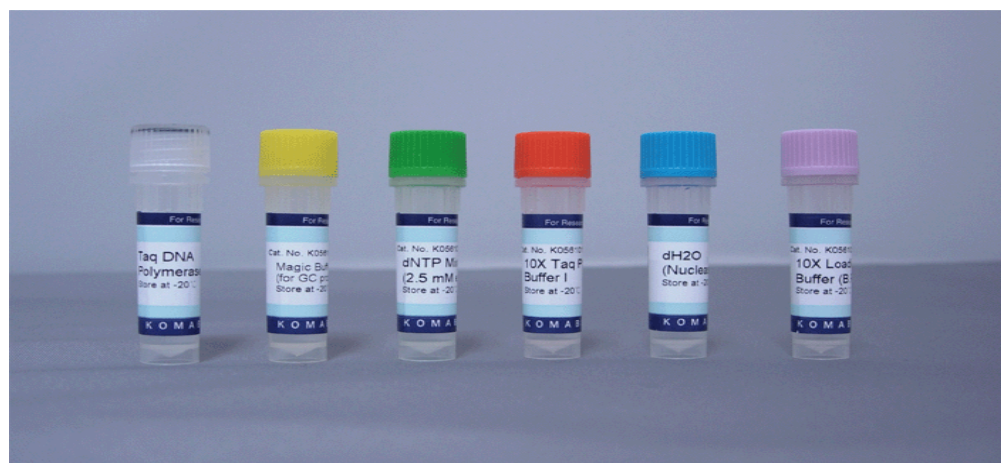
© 2001 Sinauer Associates, Inc.

Εικόνα 9. Βασικά στάδια μεθόδου PCR

## ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΤΗΣ PCR

Τα υλικά που χρησιμοποιήσαμε ήταν τα εξής:

- 1) PCR Buffer 10x
- 2) dNTP's mix
- 3)  $MgCl_2$
- 4) ssDNA
- 5) primers
- 6)  $H_2O$
- 7) Taq



Εικόνα 10. Αντιδραστήρια της PCR

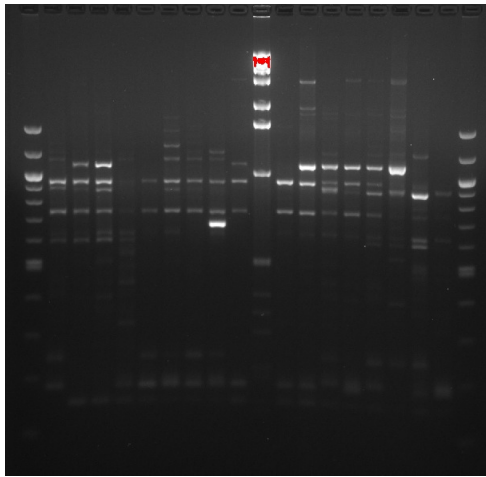
## **Χλωροπλαστικοί Μικροδορυφορικοί δείκτες**

Τα ακόλουθα δέκα ζεύγη “παγκόσμιων” (universal) εκκινητών: *ccmp1*, *ccmp5*, *ccmp6*, *ccmp7*, *ccmp8*, *ccmp9*, *ccmp10* (Weising και Gardner (1999), NTCP12 (Bryan et al. 1999), *provan1* και *provan2* (Provan et al. 2004), χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των μικροδορυφορικών περιοχών του χλωροπλαστικού DNA. Οι αντιδράσεις PCR διεξήχθησαν με βάση την εργασία των Weising και Gardner (1999), Bryan et al. (1999) και Provan et al. (2004), χρησιμοποιώντας *KapaTaq* DNA πολυμεράση (Kapa Biosystems) και DNA από τα τρία είδη *Minuartia*. Οι αλληλουχίες που προέκυψαν μετά την ενίσχυση με PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5% (Sigma) και οι εκκινητές που παρήγαγαν σαφή πρότυπα και επαναλήψιμες ζώνες χρησιμοποιήθηκαν περαιτέρω για γενοτυπική ανάλυση.

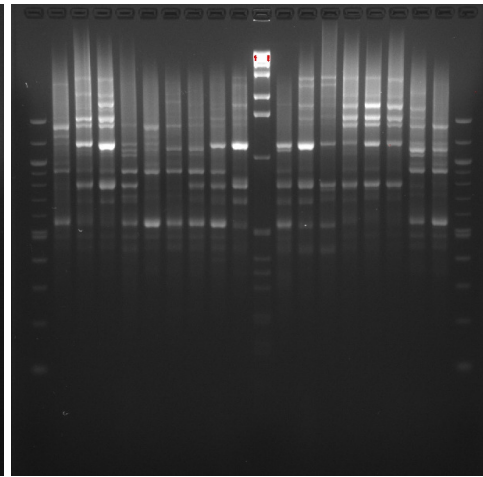
Η γενοτυπική ανάλυση εφαρμόστηκε χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο που περιγράφηκε από τον Zheng (1997), με ραδιοσήμανση του ενός πέμπτου του πρόσθιου εκκινητή με  $^{32}\text{P}$  ATP, χρησιμοποιώντας την  $T_4$  πολυνουκλεοτιδική κινάση (MBI, Fermentas) και ενσωματώνοντας τον στην αντίδραση PCR. Τα προϊόντα PCR ηλεκτροφόρηθηκαν σε πήκτωμα μετουσιωμένου πολυακρυλαμιδίου 5% και οπτικοποιήθηκαν μέσω αυτοραδιογραφίας. Το σκοράρισμα πραγματοποιήθηκε με το χέρι.

## **Δείκτες REMAP**

Οι δείκτες REMAP αποκαλύπτουν πολυμορφισμούς που υπάρχουν μεταξύ μικροδορυφορικών αλληλουχιών (SSRs) και της LTR αλληλουχίας ενός μεταθέσιμου γενετικού στοιχείου.



**Εικόνα 4.** 807/99001R



**Εικόνα 12.** 820/99001R

Με σκοπό να αποκαλυφθούν οι δείκτες με το μεγαλύτερο βαθμό πολυμορφισμού και επαναληψιμότητας, εξετάσαμε διάφορους συνδυασμούς εκκινητών LTR από διάφορα μεταθέσιμα γενετικά στοιχεία όπως περιγράφονται στους Baumel et al. (2002) μαζί με εκκινητές ISSR που προέρχονται από το σετ εκκινητών του University of British Columbia (Vancouver, Canada) και τους Baumel et al. (2002). Τελικά επιλέχθηκαν πέντε συνδυασμοί εκκινητών οι οποίοι απέδωσαν τον μέγιστο αριθμό αξιόπιστων και επαναλήψιμων πολυμορφικών δεικτών REMAP για την ανάλυση των πληθυσμών μας (Πίνακας 2).

**Πίνακας 2.** Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση REMAP. Θερμοκρασίες υβριδοποίησης. Αριθμός και εύρος μεγέθους ζωνών που προέκυψαν για κάθε εκκινητή που χρησιμοποιήθηκε.

Εκκινητής	Αλληλουχία (5'-3')	T υβριδοπ. (°C)	Αρ. Ζωνών	Εύρος (bp)
<b>ISSR</b>				
UBC-807	(AG) <sub>8</sub> T	51	21	180-1250
UBC-808	(AG) <sub>8</sub> C	53	20	230-1750
UBC-811	(GA) <sub>8</sub> C	50	18	370-1530
UBC-820	(GT) <sub>8</sub> C	55	13	480-1620
B9900*	(GTG) <sub>7</sub> A	58	15	310-1280
<b>LTR</b>				
Sukkula*: GATAGGGTTCGCATCTTGGGCGTGAC				
*Από τους Baumel et al. (2002)				

Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν σε ένα μείγμα αντίδρασης 20  $\mu$ l που περιείχε: 20 ng γονιδιωματικό DNA, 1x ρυθμιστικό διάλυμα PCR (80 mM Tris-HCl, 20 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.02% w/v Tween-20), 10 pmol από κάθε εκκινητή, 300  $\mu$ M από κάθε dNTP και 1U θερμοσταθερή DNA πολυμέραση (Promega). Οι αντιδράσεις εκτελέστηκαν σε έναν θερμικό κυκλοποιητή MJ Research PTC-100 υπό τις ακόλουθες συνθήκες: ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης στους 95°C για 4 λεπτά ακολουθούμενο από 35 κύκλους: i) αποδιάταξης του DNA στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα, ii) υβριδισμού των εκκινητών στη μήτρα DNA στους 50-58°C (εξαρτάται από το σετ εκκινητών) για 45 δευτερόλεπτα και iii) επέκτασης των νουκλεοτιδικών αλυσίδων στους 72°C για 60 δευτερόλεπτα. Το πρόγραμμα τελείωσε με ένα τελευταίο βήμα επέκτασης των αλυσίδων DNA στους 72°C για 5 λεπτά. Τα προϊόντα PCR διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση στα 110V για 4 ώρες σε πήκτωμα αγαρόζης 2% (Sigma). Οι ζώνες που προέκυψαν απεικονίστηκαν με το σύστημα απεικόνισης GelDocEZ (BioRad). Τα μοριακά βάρη των ζωνών υπολογίστηκαν συγκρίνοντας μάρτυρες DNA γνωστού μήκους 100-bp και 1-kb (New England Biolabs).

Τα ενισχυμένα θραύσματα (ζώνες) REMAP που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση κυμαίνονταν σε μέγεθος μεταξύ 180 και 1750 bp. Το σκοράρισμα έγινε με το χέρι. Σε κάθε δείγμα οι ζώνες χαρακτηρίστηκαν με 1 (παρούσα) ή 0 (απούσα) υποθέτοντας πως κάθε ζώνη αντιστοιχεί σε έναν γενετικό τόπο με δυο αλληλόμορφα (Kalendar and Schulman 2006) ώστε τελικά να σχηματιστεί μια δυαδική μήτρα (0,1).

### **Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων**

Η ανάλυση της γενετικής ποικιλότητας που αποκαλύφθηκε χρησιμοποιώντας τους δείκτες REMAP πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους Boronnikova και Kalendar (2010). Με σκοπό την εκτίμηση του βαθμού επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων που πήραμε, τρία τυχαία διαλεγμένα άτομα από κάθε πληθυσμό και είδος χρησιμοποιήθηκαν για έναν δεύτερο γύρο ενίσχυσης με PCR και γενοτύπησης REMAP.

Για τον υπολογισμό των παραμέτρων (δεικτών) γενετικής ποικιλότητας χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα POPGENE 1.31 (Yeh et al. 1997) και AFLPsurv 1.0 (Vekemans et al. 2002). Οι δείκτες ποικιλότητας που υπολογίστηκαν περιλάμβαναν το ποσοστό των πολυμορφικών ζωνών (PPB, δείκτης που αντιστοιχεί σε ποσοστό πολυμορφικών γενετικών τόπων) που υπολογίστηκε διαιρώντας τον αριθμό των πολυμορφικών ζωνών ανά πληθυσμό και είδος δια του αριθμού των ζωνών που

αποκαλύφθηκαν συνολικά. Επίσης υπολογίστηκαν σε επίπεδο πληθυσμού και είδους, ο συντελεστής γονιδιακής ποικιλότητας κατά Nei ( $H_j$ ) όπως τροποποιήθηκε από τους Lynch και Milligan (1994) και ο δείκτης ποικιλότητας του Shannon ( $I$ ), ο οποίος μάλιστα δεν προϋποθέτει ισορροπία του πληθυσμού κατά Hardy-Weinberg (Lewontin 1972). Επειδή δεν υπήρχαν εκ των προτέρων πληροφορίες σχετικά με το επίπεδο ομομιξίας εντός των πληθυσμών, εφαρμόσαμε το πρόγραμμα AFLPsurv1.0 με διαφορετικές τιμές  $F_{is}$  (0 υποθέτοντας ισορροπία κατά Hardy-Weinberg μέχρι 1 δηλαδή πλήρη έλλειψη ετεροζυγωτών).

Με σκοπό την εξάλειψη της επίδρασης των διαφορών στον αριθμό των δειγμάτων που συλλέχθηκαν για κάθε πληθυσμό υπολογίσαμε τους δείκτες Band richness ( $Br$ ) και  $PLP$  (το ποσοστό των πολυμορφικών τόπων) αναχθέντες στον πληθυσμό με το μικρότερο μέγεθος δείγματος (Mr3-Kastanitsa) με την βοήθεια μιας μεθόδου αραιώσης (rarefaction) με το λογισμικό AFLPDIV 1.0 (Coart et al. 2005).

Η εκτίμηση της γονιδιακής ροής ( $Nm$ ), υπολογισμένη ως το νούμερο των μεταναστών που εισέρχονται στον πληθυσμό σε κάθε γενιά, έγινε σύμφωνα με τον Wright (1931), όπου ο δείκτης  $G_{ST}$  χρησιμοποιείται ως προσέγγιση για το δείκτη  $F_{ST}$  (Yeh et al. 1997).

Οι τιμές των συντελεστών γενετικής απόστασης κατά Nei όπως τροποποιήθηκε από τους Lynch και Milligan (1994) υπολογίστηκαν με τη βοήθεια του AFLPsurv 1.0 με 1000 bootstrap επαναλήψεις σε κάθε γενετικό τόπο REMAP και χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή δενδρογραμμάτων UPGMA με το πρόγραμμα Neighbor στο υπολογιστικό πακέτο PHYLIP (Felsenstein 2005). Το πρόγραμμα Treeview (Page 1996), χρησιμοποιήθηκε για την απεικόνιση των δενδρογραμμάτων. Η ανάλυση μοριακής ποικιλότητας (AMOVA) καθώς και η ανάλυση κύριων συντεταγμένων (PCoA) πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα Genalex 6.5. (Peakall and Smouse 2006). Για την PCoA, ακολουθήθηκε η μέθοδος που αφορά στους υπερέχοντες χαρακτήρες, σύμφωνα με τους Huff et al. (1993). Η ανάλυση PCoA αρχικά εκτελέστηκε σε ολόκληρο το σετ δεδομένων συμπεριλαμβανομένων και των τριών ειδών *Minuartia*. Όμως, επειδή το είδος *M. parnonia* είναι το μόνο που εκπροσωπείται με πολλούς πληθυσμούς, η PCoA πραγματοποιήθηκε επιπλέον μόνο σε αυτό το είδος, στοχεύοντας στην καλύτερη ανάλυση της δομής των πληθυσμών του είδους αυτού. Η δοκιμή σημαντικότητας για την ανάλυση AMOVA διεξήχθη με 9999 παραλλαγές των δεδομένων.

Η δοκιμή κατά MANTEL προκειμένου να εκτιμηθεί η συσχέτιση μεταξύ της γεωγραφικής και της γενετικής απόστασης μεταξύ των τριών ειδών πραγματοποιήθηκε



χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα TFPGA 1.3 (Miller 1997) με 9999 παραλλαγές. Μια ξεχωριστή δοκιμή επίσης εκτελέστηκε επίσης μόνο για τους πληθυσμούς της *M. parnonia*.

Για να εξάγουμε συμπεράσματα για τη δομή των πληθυσμών και να διατάξουμε τα άτομα σε κάθε πληθυσμό χρησιμοποιήσαμε το πρόγραμμα STRUCTURE έκδοση 2.3.1 (Pritchard et al. 2000). Υιοθετήσαμε το χωρίς πρόσμιξη μοντέλο με ασυσχέτιστες συχνότητες αλληλομόρφων όπως προτάθηκε από τους Pritchard et al. (2000) για υπερέχοντες χαρακτήρες. Κανείς εκ των προτέρων χαρακτηρισμός των ατόμων του είδους δεν συμπεριλήφθηκε στο σετ δεδομένων που αναλύθηκαν. Για να προσδιορίσουμε τον βέλτιστο αριθμό των ομάδων (K) δηλαδή των πληθυσμών που αντιστοιχούν στα δεδομένα μας, εκτελέστηκε το πρόγραμμα STRUCTURE με το K να διαφοροποιείται από το 1 μέχρι το 9 (ίσο με τον συνολικό αριθμό των πληθυσμών), με πέντε επαναλήψεις για κάθε τιμή K, χρησιμοποιώντας μια περίοδο burn-in  $10^5$  αλληλεπιδράσεων ακολουθούμενο από  $10^6$  επιπλέον αλληλεπιδράσεις Markov Chain Monte Carlo (MCMC).

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι σε πολλές περιπτώσεις, η εκ των υστέρων (posterior) πιθανότητα για ένα δεδομένο αριθμό K αυξάνεται ελαφρώς, ακόμη και αφού επιτευχθεί η αληθινή τιμή του K (Dan et al. 2009). Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε μια *ad-hoc* ανάλυση, το  $\Delta K$ , προκειμένου να εκτιμηθεί η πραγματική τιμή του K (Evanno et al. 2005). Μια ξεχωριστή ανάλυση επίσης πραγματοποιήθηκε εξαιρώντας τα δύο διακριτά είδη και χρησιμοποιώντας μόνο τα δείγματα της *M. parnonia*. Γι' αυτήν την ανάλυση, οι τιμές του K διαφοροποιήθηκαν από το 1 μέχρι το 7.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Χλωροπλαστικοί Μικροδορυφορικοί Δείκτες

Δέκα ζεύγη “παγκόσμιων” εκκινητών χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση διαφορετικών μικροδορυφορικών περιοχών του χλωροπλαστικού DNA. Τέσσερις από αυτούς (ccmp8, NTCP12, provan1, provan2) απέτυχαν να δώσουν ικανοποιητικά αποτελέσματα στην PCR και εξαιρέθηκαν από περαιτέρω ανάλυση. Τα προβλήματα στις ενισχύσεις PCR περιλάμβαναν χαμηλή ή καθόλου ενίσχυση, παρουσία πολλαπλών θραυσμάτων αντί για τα αναμενόμενα και αδυναμία στο να δώσουν συνεχή και επαναλαμβανόμενα αποτελέσματα. Οι εναπομείναντες 6 αξιοποιήθηκαν για το γενεοτυπικό έλεγχο 10 ατόμων από τα είδη *M. wettsteinii* και *M. dirphya* και 10 από κάθε πληθυσμό *M. parnonia*. Από αυτούς τους δείκτες, τέσσερις (ccmp1, ccmp6, ccmp9 και ccmp10) ήταν μονομορφικοί τόσο εντός όσο και μεταξύ των ειδών και επομένως δεν μπορούσαν να παρέχουν καμία πληροφορία στα είδη που αναλύθηκαν. Οι δύο που απέμειναν (ccmp5 και ccmp7) αποκάλυψαν πολύ χαμηλό βαθμό πολυμορφισμού, με την εμφάνιση δύο αλληλομόρφων ο καθένας. Και οι δύο ήταν πολυμορφικοί μόνο σε διαειδικό επίπεδο, αποκαλύπτοντας μηδενική ενδοειδική ποικιλότητα στα υπόλοιπα δύο είδη, αλλά και δια/ενδο-πληθυσμιακό πολυμορφισμό στη *M. parnonia*.

Είναι ενδιαφέρον ότι η συνδυασμένη χρήση των δύο αυτών δεικτών μπορεί να διακρίνει τα τρία είδη μεταξύ τους και επομένως μπορούν να αξιοποιηθούν ως διαγνωστικά εργαλεία στο επίπεδο των ειδών. Πιο συγκεκριμένα, τα άτομα που ανήκουν στα είδη *M. parnonia* και *M. wettsteinii* εμφάνισαν το ίδιο αλληλόμορφο του γενετικού τόπου *ccmp5* (*ccmp5A*), ενώ αυτά που ανήκουν στο είδος *M. dirphya* αποκάλυψαν ένα διαφορετικό (*ccmp5B*). Παρομοίως όλα τα άτομα των ειδών *M. parnonia* και *M. dirphya* μοιράστηκαν το ίδιο αλληλόμορφο του γενετικού τόπου *ccmp7*, το οποίο ήταν διαφορετικό από αυτό που παρουσιάστηκε στα άτομα του είδους *M. wettsteinii*. Λόγω του χαμηλού ποσοστού του πολυμορφισμού και της πλήρους εδραίωσης (100% fixation) των δυο αλληλομόρφων η στατιστική ανάλυση δεν μπορούσε να πραγματοποιηθεί αποτελεσματικά.

## Γενετική ποικιλότητα εκτιμώμενη με δείκτες REMAP

Μετά από προκαταρκτικές δοκιμές, πέντε δείκτες REMAP τελικά επιλέχθηκαν για την γενοτυπική ανάλυση 76 ατόμων που ανήκουν στους 9 πληθυσμούς των τριών ειδών που μελετήθηκαν. Αποκαλύφθηκαν συνολικά 87 ζώνες (που αντιστοιχούν σε ανάλογο αριθμό γενετικών τόπων) μεγέθους 180-1750 bp σε όλα τα άτομα που μελετήθηκαν. Η επαναληψιμότητα εμφάνισης των ζωνών στα άτομα που ο γενοτυπικός έλεγχος επαναλήφθηκε κυμαίνονταν από 90.9% έως 100%, ωστόσο μόνο οι ζώνες που εμφανίζονταν συνεχώς χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω ανάλυση. Ο μεγαλύτερος αριθμός ζωνών παρατηρήθηκε για τον εκκινητή UBC-807, ενώ οι λιγότερες ζώνες εμφανίστηκαν στον εκκινητή UBC-20 (Πίνακας 2).

**Πίνακας 2.** Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση REMAP. Θερμοκρασίες υβριδοποίησης. Αριθμός και εύρος μεγέθους ζωνών που προέκυψαν για κάθε εκκινητή που χρησιμοποιήθηκε.

Εκκινητής	Αλληλουχία (5'-3')	Τ υβριδοπ. (°C)	Αρ. Ζωνών	Εύρος (bp)
<b>ISSR</b>				
UBC-807	(AG) <sub>8</sub> T	51	21	180-1250
UBC-808	(AG) <sub>8</sub> C	53	20	230-1750
UBC-811	(GA) <sub>8</sub> C	50	18	370-1530
UBC-820	(GT) <sub>8</sub> C	55	13	480-1620
B9900*	(GTG) <sub>7</sub> A	58	15	310-1280
<b>LTR</b>				
Sukkula*: GATAGGGTTCGCATCTTGGGCGTGA C				
*Από τους Baumel et al. (2002)				

Σε επίπεδο είδους, 45 ζώνες εμφανίστηκαν στα άτομα του *M. wettsteinii* και 57 σε αυτά του *M. dirphya*. Εντός της *M. parnonia* οι περισσότερες ζώνες (55) παρατηρήθηκαν στον πληθυσμό Mr1, ενώ οι λιγότερες (46) στο Mr4. Έξι μοναδικές ζώνες καταγράφηκαν στη *M. dirphya*, τέσσερις στη *M. wettsteinii* και δεκαπέντε στη *M. parnonia*. Δύο από αυτές εμφανίστηκαν μόνο σε ορισμένα άτομα του πληθυσμού Mr7 της *M. parnonia*. Το ποσοστό των πολυμορφικών ζωνών (PPB) ανά είδος κυμαίνεται από 28.74% - 74.75%, ενώ σε πληθυσμιακό επίπεδο κυμαίνεται από 21.84% - 47.13% (Πίνακας 3).

**Πίνακας 3.** Γενετική ποικιλότητα στους πληθυσμούς των ειδών *Minuartia* όπως υπολογίστηκαν από τους δείκτες REMAP.

N = αριθμός ατόμων που μελετήθηκαν από κάθε πληθυσμό

No.B = αριθμός ζωνών που σημειώθηκαν

PPB = Ποσοστό των πολυμορφικών ζωνών

PrB = μοναδικές ζώνες

H<sub>j</sub> = γονιδιακή ποικιλότητα κατά Nei μετά την τροποποίηση από τους Lynch και Milligan (1994), πληθυσμοί σε ισορροπία HW (H<sub>j-HW</sub>) ή μη (H<sub>j-non HW</sub>)

I = Δείκτης ποικιλότητας του Shannon; Br = συντελεστής προσαρμογής στο ελάχιστο μέγεθος δείγματος (n=6)

PLP = ποσοστό πολυμορφικών γενετικών τόπων στο 1% μετά την προσαρμογή στο ελάχιστο μέγεθος δείγματος(6)

Nm= γονιδιακή ροή με βάση την τιμή G<sub>ST</sub>; \* επίπεδο είδους

Pop/Id	N	No. B	PPB	PrB	H <sub>j-HW</sub>	H <sub>j-non HW</sub>	I	Br	PLP (1%)	Nm
Mw	11	45	28.74	4	0.1449±0.0187	0.1179±0.0189	0.1498±0.0272	1.228	0.287	
Md	10	57	55.17	6	0.2350±0.0201	0.2225±0.0005	0.2704±0.0297	1.468	0.552	
Mp*	55		75.86	15	0.2728	0.2665	0.3509±0.0283			0.5451
Mp1	11	55	48.28	-	0.2189±0.0200	0.2095±0.0224	0.2400±0.0299	1.417	0.483	
Mp2	7	51	33.48	-	0.1955±0.0195	0.1701±0.0215	0.1762±0.0284	1.325	0.345	
Mp3	6	47	21.84	-	0.1384±0.0170	0.1187±0.0177	0.1122±0.0243	1.218	0.218	
Mp4	7	46	26.44	-	0.1764±0.1925	0.1527±0.0223	0.1496±0.0278	1.259	0.264	
Mp5	8	54	37.93	-	0.2093±0.0193	0.1845±0.0221	0.1969±0.0292	1.349	0.379	
Mp6	7	49	33.33	-	0.1991±0.0204	0.1633±0.0212	0.1857±0.0298	1.315	0.333	
Mp7	8	47	39.08	2	0.1860±0.0201	0.1667±0.0211	0.1910±0.0285	1.342	0.391	

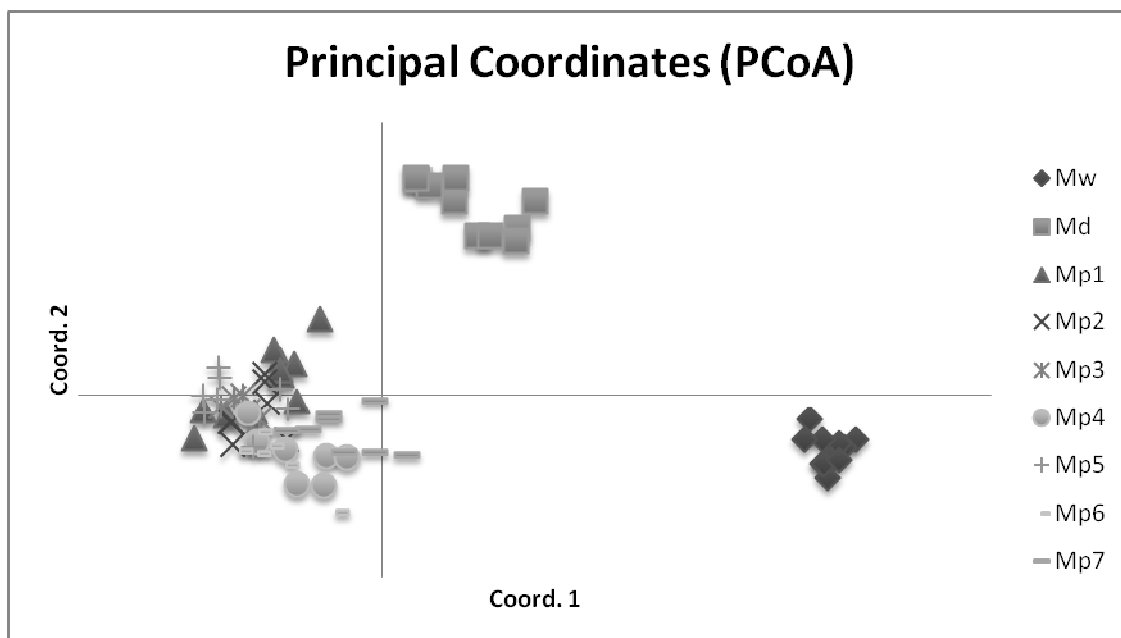
Οι τιμές των συντελεστών γονιδιακής ποικιλότητας διέφεραν όταν υπολογίστηκαν σε συνθήκες ισορροπίας κατά Hardy-Weinberg (HW) ή μη. Ωστόσο, το μοτίβο ποικιλότητας που παρατηρήθηκε σε όλους τους πληθυσμούς που μελετήθηκαν ήταν σχεδόν ίδιο με αυτό που βρέθηκε κάτω από το μοντέλο ισορροπίας HW. Έτσι λοιπόν υποθέτοντας ότι οι πληθυσμοί βρίσκονται σε ισορροπία HW, ο συντελεστής γονιδιακής ποικιλότητας κατά Nei (H<sub>j</sub>) και για τους 87 γενετικούς τόπους ήταν 0.2350 ± 0.0201 για το είδος *M. dirphya* και 0.1449 ± 0.0187 για το είδος *M. wettsteinii*. Η μέση γονιδιακή ποικιλότητα (H<sub>s</sub>) εντός της *M. parnonia* ήταν 0.1891, ενώ η γονιδιακή ποικιλότητα σε όλο τον πληθυσμό (H<sub>T</sub>) ήταν 0.2728. Ο δείκτης ποικιλότητας του Shannon (I) κυμάνθηκε από 0.1498 ± 0.0272 έως

0.3509±0.0283 στο επίπεδο των ειδών, ενώ εντός της *M. parnonia* κυμαίνονταν από 0.1122 ± 0.0243 έως 0.2400 ± 0.0299.

Συγκρίνοντας τους συντελεστές *Br* και *PLP* με τους άλλους δείκτες ποικιλότητας φαίνεται ότι τα επίπεδα ποικιλότητας δεν συνδέονται με τον αριθμό των ατόμων που μελετήθηκαν σε κάθε πληθυσμό. Τέλος, η γονιδιακή ροή μέσα στους πληθυσμούς της *M. parnonia* ήταν 0.523 (Πίνακας 3).

Η δοκιμή MANTEL για τα τρία είδη που μελετήθηκαν αποκάλυψε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της γεωγραφικής και της γενετικής απόστασης ( $r = 0.9436$ ,  $p = 0.001$ ), ωστόσο αν και θετική αυτή η συσχέτιση δεν ήταν τόσο ισχυρή όταν εξετάστηκαν μόνο οι πληθυσμοί του *M. parnonia* ( $r = 0.3985$ ,  $p=0.088$ ).

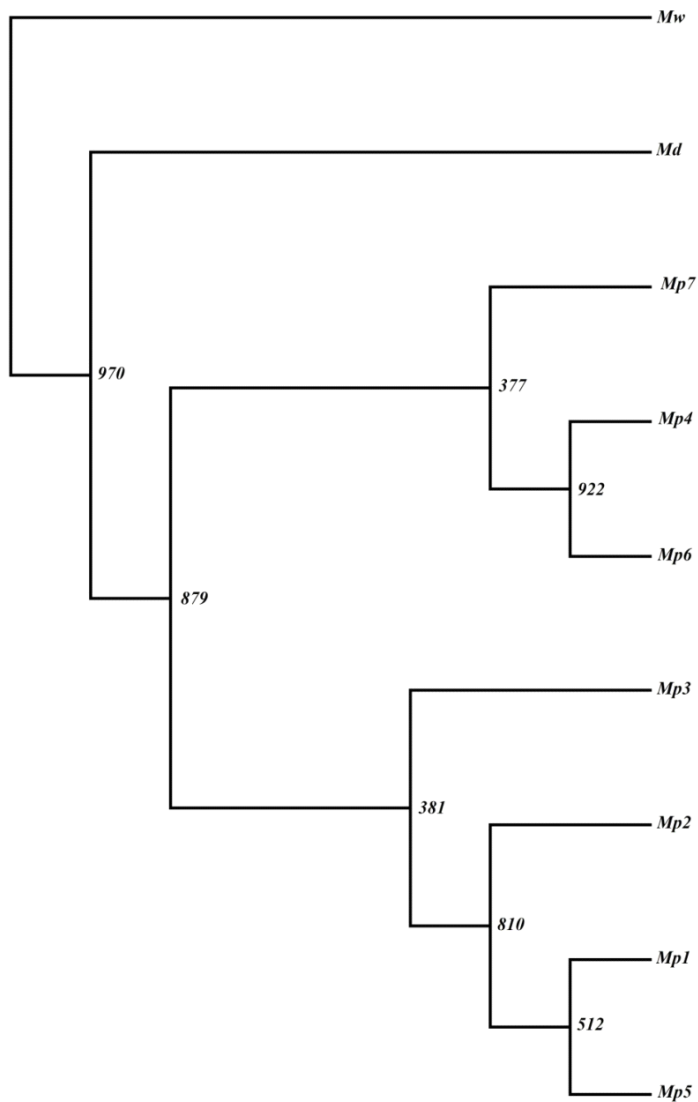
Η ανάλυση PCoA για όλα τα άτομα και των τριών ειδών έδειξε ότι το 75.43% της συνολικής ποικιλότητας εξηγείται στους τρεις πρώτους άξονες (43.03%, 19.85% και 12.55% αντίστοιχα). Όπως φαίνεται όλα τα άτομα ομαδοποιούνται στα αντίστοιχα είδη τους, ενώ τα τρία είδη είναι διακριτά το ένα από το άλλο. Η πρώτη κύρια συντεταγμένη διαχωρίζει τους πληθυσμούς της *M. parnonia* από τα άλλα είδη *Minuartia*, ενώ η δεύτερη χωρίζει το είδος *M. wetsteinii* από τη *M. dirphya* (Εικόνα 13).



**Εικόνα 13.** Δισδιάστατο διάγραμμα της ανάλυσης των κυρίων συντεταγμένων (PCoA) των δεδομένων REMAP που απεικονίζει την κατανομή των ειδών *Minuartia*

Στην ανάλυση STRUCTURE, η τιμή του  $\Delta K$  ήταν 7402.36 για  $K = 3$ , 53.71 για  $K = 4$ , 26.88 για  $K=5$  και  $<5.58$  για όλες τις τιμές του  $K$  μεγαλύτερες από 5. Επομένως, η υπόθεση ότι το  $K=3$  ταιριάζει καλύτερα με τα δεδομένα που παρουσιάζονται εδώ είναι σωστή. Η ανάλυση με το πρόγραμμα STRUCTURE για  $K=3$  έδειξε έναν ξεκάθαρο διαχωρισμό ανάμεσα στα τρία είδη *Minuartia*, ενώ δεν υπήρχε εμφανής διαχωρισμός μεταξύ των πληθυσμών της *M. parnonia* (η σχετική εικόνα δεν παρουσιάζεται).

Τέλος, σύμφωνα με την τοπολογία που παρουσιάζεται στο δενδρόγραμμα UPGMA το είδος *M. wettsteinii* είναι τοποθετημένο εκτός των υπολοίπων ειδών ως το πλέον γενετικά απομακρυσμένο. Το είδος *M. dirphya* είναι επίσης τοποθετημένο σε έναν διακριτό κλάδο, ενώ οι πληθυσμοί της *M. parnonia* ομαδοποιούνται. Μέσα σε αυτήν την ομάδα δημιουργούνται δύο διακριτές υποομάδες. Η πρώτη περιλαμβάνει τους πληθυσμούς Mr1, Mr2, Mr3 και Mr5, ενώ η δεύτερη τους πληθυσμούς Mr4, Mr6 και Mr7 (Εικόνα 14). Μια μικρή απόκλιση από αυτήν την τοπολογία εμφανίστηκε όταν για την κατασκευή του δενδρογράμματος χρησιμοποιήσαμε τις γενετικές αποστάσεις κατά Nei οι οποίες υπολογίστηκαν υποθέτοντας ότι οι πληθυσμοί δεν βρίσκονται σε ισορροπία HW. Σε αυτήν την περίπτωση, όπως επίσης και στο δενδρόγραμμα που προέκυψε χρησιμοποιώντας μόνο τους πληθυσμούς της *M. parnonia* ο πληθυσμός του Mr7 είναι τοποθετημένος σε έναν διαφορετικό κλάδο, ενώ οι άλλοι είναι συγκεντρωμένοι σε δύο διαφορετικές ομάδες, στην πρώτη ομάδα οι πληθυσμοί Mr1, Mr2, Mr3 και Mr5, ενώ στην δεύτερη οι πληθυσμοί Mr4 και Mr6.



**Εικόνα 14.** Δενδρόγραμμα UPGMA βασισμένο στην γενετική απόσταση του Nei's μετά την τροποποίηση των Lynch and Milligan (1994)

#### **Γενετική διαφοροποίηση εντός του είδους *M. parnonia***

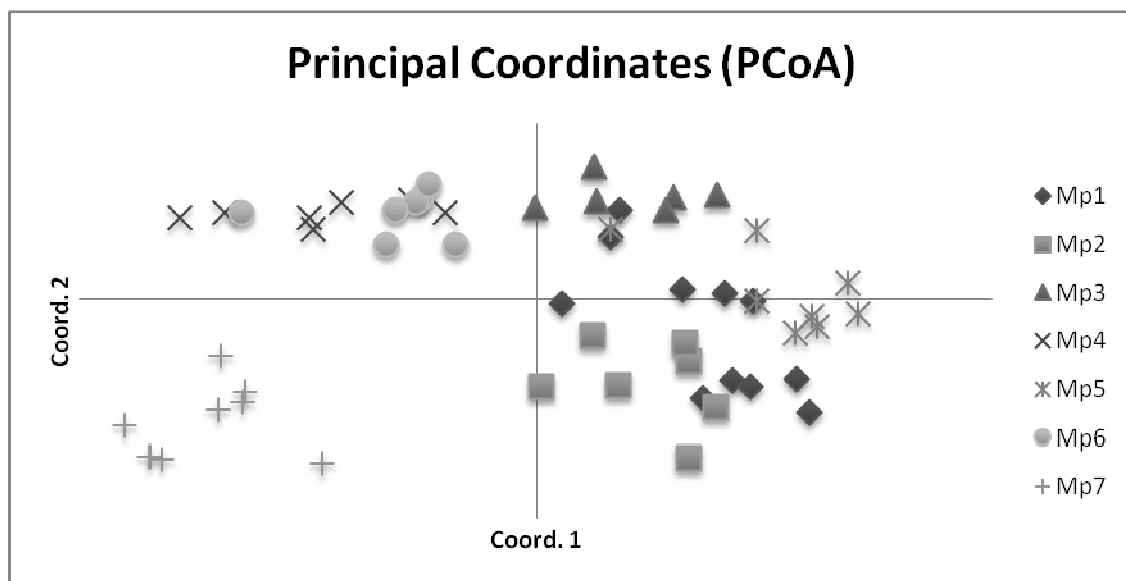
Η ανάλυση της μοριακής ποικιλότητας (AMOVA) ανάμεσα στους πληθυσμούς της *M. parnonia* έδειξε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό της ποικιλότητας (59%) κατανέμεται στα άτομα εντός πληθυσμών ενώ το υπόλοιπο ποσοστό (41%) αποδίδεται σε διαπληθυσμιακή διαφοροποίηση (Πίνακας 4).



**Πίνακας 4.** Ανάλυση μοριακής ποικιλότητας (AMOVA) για τα άτομα που ανήκουν στους πληθυσμούς του *M. parnonia* Βαθμοί ελευθερίας (d.f.), άθροισμα τετραγώνων (SS), μέσα τετράγωνα (MS), Τα συστατικά διακύμανσης και η ολική ποικιλότητα κατανεμημένη στα συστατικά της (%).

AMOVA					
Πηγή ποικιλότητας	df	SS	MS	Est. Var.	%
Μεταξύ πληθυσμών	6	249.697	41.588	4.565	41%
Εντός Πληθυσμών	47	309.665	6.589	6.589	59%
Σύνολο	53	559.222		11.154	100%

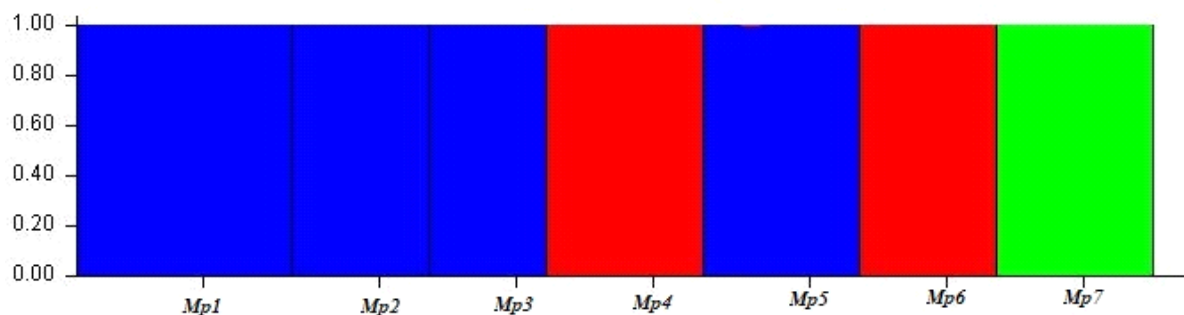
Επιπροσθέτως όπως έδειξε το δενδρόγραμμα UPGMA, φαίνεται να υπάρχει μια διαφοροποίηση των πληθυσμών της *M. parnonia*. Για να εξεταστεί περαιτέρω αυτή η υπόθεση, οι αναλύσεις PCoA και STRUCTURE πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας μόνο τα δεδομένα των πληθυσμών της *M. parnonia*. Η PCoA που έγινε στα άτομα δείχνει μια πιθανή διαφοροποίηση του Mp7, δεδομένου ότι κανένα από τα άτομα του πληθυσμού αυτού δεν ταυτίζεται με άτομα που ανήκουν σε κάποιον άλλο πληθυσμό του είδους (Εικόνα 15).



**Εικόνα 15.** Δισδιάστατο διάγραμμα της ανάλυσης των κυρίων συντεταγμένων (PCoA) των δεδομένων REMAP που απεικονίζει την συγκέντρωση των ατόμων *M. parnonia*

Επίσης, τα άτομα που ανήκουν στους πληθυσμούς Mp4 και Mp6, αν και μοιάζουν μεταξύ τους, φαίνεται να έχουν διαφοροποιηθεί από αυτά που ανήκουν στους υπόλοιπους πληθυσμούς της *M. parnonia*.

Στην ανάλυση STRUCTURE οι πληθυσμοί αναλύθηκαν υπό την υπόθεση ότι οι τιμές του κυμαίνονται από 1-7 (K=1-7), υπάρχουν δηλαδή 1-7 διακριτοί πληθυσμοί. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης φαίνεται ότι ευνοούν την παρουσία δύο ή τριών πληθυσμών εντός της *M. parnonia* (K=2 ή K=3). Για K=2, οι πληθυσμοί Mp4, Mp6 και Mp7 φαίνεται να διαφοροποιούνται από τους υπόλοιπους, ενώ για K=3 ο πληθυσμός Mp7 φαίνεται να είναι διακριτός (Εικόνα 15). Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία τόσο με την ανάλυση κυρίων συντεταγμένων PCoA όσο και με το δενδρόγραμμα UPGMA που παρουσιάστηκαν παραπάνω.



**Εικόνα 5.** Ανάλυση των πληθυσμών της *M. parnonia* χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα STRUCTURE, υπό την προϋπόθεση ύπαρξης τριών γενετικών συστάδων (K=3)

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σε αυτήν την μελέτη, χλωροπλαστικοί μικροδορυφορικοί δείκτες καθώς και δείκτες REMAP χρησιμοποιήθηκαν για να αποκαλύψουν τον βαθμό γενετικής διαφοροποίησης και να ερμηνεύσουν το πρότυπο της γενετικής ποικιλότητας σε εννέα πληθυσμούς που ανήκουν σε τρία στενά συνδεδεμένα είδη *Minuartia* ενδημικά στην Ελλάδα. Τα αποτελέσματα μας βασιζόμενα σε δύο γενετικά συστήματα, αποκάλυψαν την υπάρχουσα γενετική διαφοροποίηση ανάμεσα στα τρία είδη αναδεικνύοντας τα επίπεδα της σημαντικής απόκλισης που υφίσταται μεταξύ τους. Όμως, μόνο οι δείκτες REMAP αποκάλυψαν σημαντικό ποσοστό γενετικής ποικιλότητας τόσο ενδο- όσο και διαπληθυσμιακά.

Δείκτες βασισμένοι σε μεταθέσιμα γενετικά στοιχεία συμπεριλαμβανομένων των δεικτών REMAP έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε αναλύσεις γενετικής ποικιλότητας καθώς και φυλογενετικές μελέτες σε πολλά είδη φυτών σε επίπεδα πληθυσμού, είδους ή γένους: π.χ. τζίντζερ (Pandotra et al. 2013), αλφάλφα (Mandoulakani et al. 2012), σιτάρι (Carvalho et al. 2010), εσπεριδοειδή (Biswas et al. 2010), αμπέλι (D' Onofrio et al. 2010) λωτό (Guo et al. 2006), ρύζι (Branco et al. 2007), σπάρτινα (Baumel et al. 2002) καθώς επίσης και σε σπάνια διακοσμητικά και φαρμακευτικά φυτά (Boronnikova and Kalendar 2010). Οι δείκτες REMAP έχουν αποδειχτεί ότι είναι αξιόπιστοι, δείχνοντας έτσι ότι διαθέτουν μεγάλο δυναμικό αξιοποίησης (Branco et al. 2007; Biswas et al. 2010; D' Onofrio et al. 2010; Mandoulakani et al. 2012).

Από την άλλη περιορισμένη ήταν η γενετική πληροφορία που αποκαλύφθηκε από τη χρήση των χλωροπλαστικών μικροδορυφορικών δεικτών, καθώς η πλειοψηφία αυτών (τέσσερις από τους έξι που τελικά αναλύθηκαν) ήταν μονομορφικοί σε όλους τους πληθυσμούς. Παρ όλα αυτά, οι δύο δείκτες οι οποίοι ήταν πολυμορφικοί μπορούν να παρέχουν ένα σταθερό διαγνωστικό εργαλείο για την διάκριση ανάμεσα στα τρία είδη *Minuartia*, αφού η συνδυασμένη τους χρήση κατάφερε να διακρίνει τα τρία είδη μεταξύ τους.

### **Γενετική ποικιλότητα και διαφοροποίηση των ειδών του γένους *Minuartia***

Η γενετική ποικιλότητα ενός είδους ή πληθυσμού καθορίζεται από τις συνδυασμένες επιδράσεις της γενεαλογίας και των διαφόρων εξελικτικών διαδικασιών

(Comes and Kadereit 1998; Ge et al. 2005). Εξαιτίας της περιορισμένης εξάπλωσης, τα ενδημικά είδη χαρακτηρίζονται συνήθως από χαμηλό επίπεδο γενετικής ποικιλότητας (Ellstrand and Elam 1993; Gitzendanner and Soltis 2000; Segarra-Moragues et al. 2005). Ωστόσο, αρκετές εξαιρέσεις έχουν αναφερθεί (Batista et al. 2001; Hoebee and Young 2001) επιβεβαιώνοντας την ανάγκη για μελέτη κάθε περίπτωσης ξεχωριστά.

Υψηλά επίπεδα γενετικής ποικιλότητας εμφανίστηκαν στη *M. parnonia* (PPB=74.15%,  $I=0.3509$ ,  $H=0.2728$ ), ενδιάμεσα για τη *M. dirphya* (PPB=55.17%,  $I=0.2767$ ,  $H=0.2350$ ), ενώ ήταν σημαντικά μειωμένη στη *M. wettsteinii* (PPB=28.74%,  $I=0.1498$ ,  $H=0.1449$ ). Αν και η πιο κοινή άποψη είναι ότι γενικά οι σερπεντινικοί πληθυσμοί εμφανίζουν χαμηλότερα επίπεδα γενετικής ποικιλότητας σε σύγκριση με τους συγγενείς τους που διαβιούν σε κανονικά εδάφη (Kruckeberg 1986; Macnair and Gardner 1998), υπάρχουν αρκετές περιπτώσεις όπου η αναμενόμενη μείωση της γενετικής ποικιλότητας στους σερπεντινικούς πληθυσμούς δεν είναι εμφανής (Mengoni et al. 2001; Quintela-Sabaris et al. 2010). Διάφορες υποθέσεις έχουν προταθεί προκειμένου να εξηγηθεί το φαινόμενο αυτό, όπως για παράδειγμα η πιθανότητα ύπαρξης γονιδιακής ροής από γειτονικούς πληθυσμούς (Mengoni et al. 2001), ή ότι οι περιοχές αυτές μπορεί να χρησιμοποιούνται ως καταφύγια για ανταγωνιστικά κατώτερους γενοτύπους που δεν θα ήταν σε θέση να επιβιώσουν σε κανονικά εδάφη (Ducouso et al. 1990). Επομένως, είναι πιο πιθανό ότι ατομικοί, ιστορικοί και βιολογικοί παράγοντες (π.χ. η ηλικία του κάθε taxon, οι διαδικασίες αποικισμού κλπ) θα μπορούσαν να έχουν συγκεκριμένο ρόλο στον καθορισμό των επιπέδων γενετικής ποικιλότητας των σερπεντινικών πληθυσμών (Moore and Kadereit 2013).

Το είδος *M. parnonia* αναπτύσσεται μόνο σε ασβεστολιθικές βραχώδεις θέσεις. Σχετικά υψηλός βαθμός γενετικής ποικιλότητας αποκαλύφθηκε σε επίπεδο είδους, ενώ εντός πληθυσμών το επίπεδο της γενετικής ποικιλότητας διέφερε. Το μεγαλύτερο επίπεδο γενετικής ποικιλότητας παρατηρήθηκε στον πληθυσμό Mr1 (PPB=48.28%,  $I=0.2400$ ,  $H=0.2189$ ), ενώ το χαμηλότερο στον Mr3 (PPB=21.84%,  $I=0.1122$ ,  $H=0.1384$ ). Αν και στην μελέτη μας το μέγεθος του πληθυσμού δεν συσχετίζεται με τα επίπεδα γενετικής ποικιλότητας, οι υψηλότερες τιμές της παρατηρήθηκαν στον πληθυσμό με το μεγαλύτερο αριθμό ατόμων ενώ οι χαμηλότερες σε αυτόν με το μικρότερο αριθμό ατόμων. Αυτή είναι μια ένδειξη ότι η περιοχή του Πραστού στο Όρος Πάρνων θα μπορούσε να δράσει ως κέντρο ποικιλότητας ή καταφύγιο για το είδος της *M. parnonia*, λειτουργώντας ως μια δεξαμενή γενετικής ποικιλότητας. Αυτό σημαίνει ότι ο πληθυσμός Mr1 πιθανότατα

διατηρεί το μεγαλύτερο δυναμικό για να προσαρμοστεί και να εξελιχθεί σε σύγκριση με όλους τους άλλους πληθυσμούς που μελετήθηκαν.

Τα χαμηλά επίπεδα γενετικής ποικιλότητας που αποκαλύφθηκαν στη *M. wettsteinii* θα μπορούσαν να αποδοθούν σε διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων της επίδρασης της τυχαίας γενετικής εκτροπής και το μειωμένο μέγεθος του πληθυσμού το οποίο προάγει την ομομιξία. Η μειωμένη ανταγωνιστική ικανότητα των φυτών του είδους καθώς και η μακροχρόνια συστηματική υπερβόσκηση, έχουν πιθανότατα επηρεάσει τα επίπεδα γενετικής ποικιλότητας που παρατηρούνται σήμερα στη *M. wettsteinii*.

Όπως έδειξε η ανάλυση AMOVA η γενετική διαφοροποίηση ανάμεσα στους πληθυσμούς της *M. parnonia* είναι σημαντική αντιπροσωπεύοντας το 41% της συνολικής γενετικής ποικιλότητας. Το γεγονός ότι τα επίπεδα της γονιδιακής ροής ήταν αρκετά χαμηλά ( $Nm < 1$ ), δηλώνει γενετική απομόνωση μεταξύ των εξεταζόμενων πληθυσμών, δείχνοντας ταυτόχρονα ότι η τυχαία γενετική εκτροπή θα μπορούσε ενδεχομένως να επηρεάσει την δομή του πληθυσμού (Slatkin 1987). Επομένως, δεν μπορούμε να αγνοήσουμε την πιθανότητα ότι κάποια διαφοροποίηση ανάμεσα στους πληθυσμούς της *M. parnonia* θα μπορούσαν να συμβαίνει λόγω απομόνωσης, καθώς η γεωγραφική θέση των ίδιων των πληθυσμών και ιδιαίτερα του Mr7 συνηγορεί σε κάτι τέτοιο. Η υπάρχουσα διαφοροποίηση ανάμεσα στους πληθυσμούς της *M. parnonia* τονίζεται περαιτέρω από το δενδρόγραμμα και τις αναλύσεις PCoA και STRUCTURE που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τους πληθυσμούς αυτούς μόνο. Οι αναλύσεις αυτές δείχνουν επίσης μια πιθανή διαφοροποίηση του πληθυσμού Mr7 η οποία υπογραμμίστηκε επίσης από μοναδικές ζώνες που αποκαλύφθηκαν σε ορισμένα άτομα του συγκεκριμένου πληθυσμού.

Σύμφωνα με τους Moore και Kadereit (2013), τα είδη *M. wettsteinii*, *M. parnonia* και *M. dirphyia* ομαδοποιούνται μαζί δημιουργώντας μια ξεχωριστή εξελικτική γραμμή μέσα στο *ser. Laricifoliae*. Όμως ανεξαρτήτως των στενών φυλογενετικών τους σχέσεων, τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι τα τρία είδη είναι επαρκώς διαχωρισμένα μεταξύ τους αποκαλύπτοντας υψηλά επίπεδα γενετικής διαφοροποίησης. Σε όλες τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν τα είδη *M. wettsteinii* και *M. dirphyia* διαχωρίζονται απόλυτα από τους πληθυσμούς της *M. parnonia*, μια παρατήρηση σύμφωνη με τα παλαιογεωγραφικά στοιχεία για την εξέλιξη της περιοχής του Αιγαίου.

Η εμφάνιση της *M. wettsteinii* σε ξεχωριστό κλάδο ως το πιο γενετικά απόμακρο είδος ήταν αναμενόμενη, καθώς η γεωγραφική του θέση στην ανατολική Κρήτη υποστηρίζει τη μακράς διαρκείας απομόνωση του είδους αυτού από τα συγγενικά του (Meulenkaamp 1985). Παρόμοια, η διακριτή θέση της *M. dirphyia* είναι επίσης σύμφωνη με

την γεωγραφική απομόνωση του είδους αυτού από τα υπόλοιπα είδη. Οι απομακρυσμένες τοποθεσίες που βρίσκονται τα τρία είδη καθώς και η έλλειψη εμφανών προσαρμογών για την προώθηση της αποτελεσματικής διασποράς των σπόρων τους σε μεγάλες αποστάσεις υποστηρίζει επίσης την από καιρό απομόνωση τους.

Η υπάρχουσα γενετική διαφοροποίηση ανάμεσα στα τρία είδη μπορεί να οφείλεται σε πιθανή αποκλίνουσα (vicariance) εξελικτική διαδικασία από έναν κοινό πρόγονο μέσω του κατακερματισμού του φάσματος της φυσικού του ενδιαίτηματος. Είναι επομένως λογικό να θεωρήσουμε τα τρία είδη *Minuartia* ως αποκλίνοντα, προερχόμενα από έναν κοινό πρόγονο που διαβιούσε στο Αιγαίο πριν τον διαχωρισμό της ξηράς. Η διαφοροποίηση τους λοιπόν έχει πιθανότατα προέλθει εξαιτίας της γεωγραφική τους απομόνωσης ενισχυόμενη περαιτέρω από την προσαρμογή τους σε διαφορετικές οικολογικές συνθήκες (τουλάχιστον αυτό για τη *M. dirphya*).

Υψηλή γενετική διαφοροποίηση μεταξύ χωρικά απομονωμένων πληθυσμών μπορεί να αναμένεται επίσης ως αποτέλεσμα της δράσης της τυχαίας γενετικής εκτροπής, περιορισμένης γονιδιακής ροής ή επιλογής σε ένα ετερογενές τοπίο (Till-Bottraud and Gaudeul 2002; Shimono et al. 2009). Επιπλέον οι μοναδικές ζώνες, που παρατηρήθηκαν και στα τρία είδη, επίσης δείχνουν το επίπεδο γενετικής διαφοροποίησης ανάμεσα σε αυτά. Απομονωμένοι για πολύ καιρό πληθυσμοί θα μπορούσαν να συσσωρεύσουν μοναδικά αλληλόμορφα αντανακλώντας έτσι τις γενετικές διαφορές τους λόγω της απομόνωσης εξαιτίας της γεωγραφικής απόστασης (Prentice et al. 2003).

### **Προοπτικές προστασίας και διατήρησης των ειδών**

Αυτή η μελέτη προσφέρει γενετικές πληροφορίες για τρία σπάνια και τοπικά περιορισμένα είδη *Minuartia* στην Ελλάδα. Οι γνώση αυτή είναι πολύτιμη προκειμένου να καταρτισθούν σχέδια διαχείρισης για την διατήρηση και προστασία αυτών των ειδών. Οι παρατηρήσεις πεδίου αλλά και οι γενετικές αναλύσεις δείχνουν ότι το είδος *M. wettsteinii* αντιμετωπίζει υψηλό κίνδυνο εξαφάνισης και θα πρέπει πλέον να θεωρείται ως “Κρισίμως Απειλούμενο”. Είναι δύσκολο να εκτιμηθεί ωστόσο, σε ποιο βαθμό η γενετική υποβάθμιση της *M. wettsteinii* μπορεί να θέσει σε κίνδυνο την επιβίωση του είδους βραχυπρόθεσμα, καθώς οι μελέτες δυναμικής του πληθυσμού για αυτό το είδος είναι ελλιπείς.

Αναζήτηση αυτού του είδους στον τόπο που διαβιεί κατά την διάρκεια των τελευταίων δύο δεκαετιών δείχνει μια αυξημένη δυσκολία στην ανεύρεση ατόμων. Έτσι, μια πρόσφατη μείωση του πληθυσμού δεν μπορεί να αποκλειστεί, ενισχύοντας τον κίνδυνο

εξαφάνισης ως αποτέλεσμα του μειωμένου μεγέθους του πληθυσμού. Η γενετική υποβάθμιση, χαρακτηριστικό των ειδών με μικρό μέγεθος πληθυσμών και με ιστορία κατακερματισμού των πληθυσμών τους, πιστεύεται ότι έχει δραματικές συνέπειες για την ικανότητά τους να επιβιώσουν σε περιβαλλοντικές αλλαγές (Ellstrand and Elam 1993; Wise et al. 2002), καθώς θα μπορούσε να συνδέεται με ορισμένα χαρακτηριστικά προσαρμοστικότητας (Gautschi et al. 2002; Paschke et al. 2002; Frankham et al. 2010).

Τα χαμηλά επίπεδα της γενετικής ποικιλότητας που αποκαλύφθηκαν στο είδος *M. wettsteinii* δείχνουν έναν βαθμό γενετικού κινδύνου που μπορεί να καταλήξει σε ανικανότητα να αντιπαρέλθει στη μείωση του πληθυσμού λόγω της απώλειας γονιδίων, της τυχαίας γενετικής εκτροπής και της ομομεικτικής κατάπτωσης μειώνοντας έτσι την ικανότητα του να αποικίσει νέους οικοτόπους. Τα χαμηλά επίπεδα ποικιλότητας θεωρούνται αποδεικτικό στοιχείο ότι οι πληθυσμοί έχουν περάσει από φαινόμενα στενωπού (bottleneck effects) σε περιπτώσεις μείωσης του δημογραφικού τους μεγέθους (Houlden et al. 1996).

Το μέγεθος του πληθυσμού της *M. wettsteinii* έχει πιθανότατα μειωθεί σημαντικά στο πρόσφατο παρελθόν, γεγονός που δηλώνει ότι το υπόλοιπο του πληθυσμού που διεσώθη μπορεί να έχει διατηρήσει ένα μικρό μόνο μέρος του δραστικού μεγέθους του πληθυσμού και μπορεί να έχει βιώσει μια σοβαρή απώλεια γενετικής ποικιλότητας. Τα αποτελέσματά μας έχουν άμεσες επιπτώσεις για την προστασία και διατήρηση της *M. wettsteinii* εφόσον η ανίχνευση της χαμηλής ποικιλότητας πιθανότατα σημαίνει ότι η ολική γενετική ποικιλότητα του πληθυσμού μπορεί να αποτυπωθεί επαρκώς μόνο σε λίγα μόνο άτομα. Μια συλλογή σπόρων και φυτών της *M. wettsteinii* ήδη διατηρείται στο Μεσογειακό Αγρονομικό Ινστιτούτο Χανίων (MAICh). Είναι αβέβαιο, ωστόσο, αν η γενετική ποικιλότητα σε αυτήν την συλλογή είναι αντιπροσωπευτική της γενετικής ποικιλότητας που υπάρχει σε όλον τον πληθυσμό. Προτείνουμε την εξερεύνηση της γενετικής ποικιλότητας που περιέχεται στην συλλογή του MAICh, ιδίως αν αυτό το υλικό χρησιμοποιηθεί σε μελλοντικά προγράμματα αποκατάστασης και διατήρησης του είδους.

Σύμφωνα με τους Godt et al. (1996), γενετικά μοναδικοί πληθυσμοί μπορεί να πρέπει να τυγχάνουν μεγαλύτερης προτεραιότητας για *in-situ* (επιτόπια) διαχείριση και προστασία. Το είδος *M. wettsteinii* κατανέμεται σε έναν εξαιρετικά περιορισμένο γεωγραφικό χώρο και γι αυτό η εγκατάσταση ενός μικροαποθέματος (Laguna 2001) φαίνεται ως κατάλληλο μέτρο για την προστασία του. Ένα πιλοτικό δίκτυο μικροαποθεμάτων έχει ήδη εγκατασταθεί στην Δυτική Κρήτη, με σκοπό την προστασία συγκεκριμένων απειλούμενων κρητικών φυτών (Kargiolaki et al. 2007) και η επέκτασή του



σε άλλες περιοχές της Κρήτης καθώς και του Αιγαίου θα συνεισέφερε στην αποτελεσματική προστασία πολλών τοπικά περιορισμένων και απειλούμενων ειδών φυτών.

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι το επίπεδο της γενετικής ποικιλότητας στο μοναδικό πληθυσμό της *M. dirphya* δεν αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για την διατήρηση του είδους. Η σημερινή κατάσταση της *M. dirphya* και ο χαρακτηρισμός του είδους ως ‘Κρισίμως Κινδυνεύων’ είναι περισσότερο το αποτέλεσμα της καταστροφής περιοχών του βιοτόπου του από ανθρώπινες δραστηριότητες μαζί με δυσκολίες στον αποικισμό νέων περιοχών οι οποίες προκαλούνται από τις ειδικές απαιτήσεις που έχει σε εδαφικό υπόστρωμα ή/και την μείωση στην γενετικής του ποικιλότητας. Έτσι, δράσεις επιτόπιας διαχείρισης, όπως η προστασία του συνόλου του περιβάλλοντος του καθώς επίσης και η εγκατάσταση ενός μικροαποθέματος φαίνεται να είναι τα κατάλληλα μέτρα προστασίας για το είδος αυτό. Επιπροσθέτως, το μέγεθος του πληθυσμού θα πρέπει να αυξηθεί μέσω τεχνητής αναπαραγωγής και συλλογής γενετικού υλικού από τον μόνο γνωστό πληθυσμό της *M. dirphya* προκειμένου να επιτευχθεί αποτελεσματική *ex-situ* (εκτός βιοτόπου) διαχείριση και προστασία του.

Η σχετικά υψηλή γενετική διαφοροποίηση που εμφανίζεται μεταξύ των πληθυσμών της *M. parnonia*, καθώς επίσης και τα χαμηλά επίπεδα γονιδιακής ροής που υπολογίστηκαν, δείχνουν ότι τουλάχιστον κάποιοι από τους πληθυσμούς που εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα γενετικής ποικιλότητας (Mr1, Mr6 and Mr7) θα πρέπει να θεωρηθούν ως ξεχωριστές μονάδες διαχείρισης και θα πρέπει να έχουν προτεραιότητα στις δράσεις επιτόπιας διατήρησης. Επιπροσθέτως, γενετικά παρόμοια άτομα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ενίσχυση άλλων πληθυσμών με σκοπό την αύξηση των τωρινών επιπέδων της γενετικής ποικιλότητας σε πληθυσμούς με χαμηλό ποσοστό ποικιλότητας (π.χ. Mr3, Mr4).

Επειδή οι μέχρι τώρα οικολογικές μελέτες καθώς και οι μελέτες δημογραφικής δυναμικής για τους πληθυσμούς των τριών ειδών *Minuartia* που περιλήφθησαν σε αυτήν την έρευνα είτε γενικά απουσιάζουν ή διαθέτουν ελλιπή δεδομένα θα πρέπει άμεσα να ξεκινήσουν και να εμπλουτιστούν με νέα στοιχεία προκειμένου να σχεδιαστούν και να εφαρμοστούν αποτελεσματικές στρατηγικές και πρακτικές διαχείρισης και προστασίας αυτών των ειδών.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- Baumel A, Ainouche ML, Kalendar R, Schulman AH (2002) Retrotransposons and genomic stability in populations of the young allopolyploid species *Spartina anglica* C.E. Hubbard (Poaceae). *Mol Biol Evol* 19: 1218–1227
- Biswas MK, Xu Q, Deng XX (2010) Utility of RAPD, ISSR, IRAP and REMAP markers for the genetic analysis of *Citrus* spp. *Sci Hort* 124: 254–261
- Bittrich V (1993) Caryophyllaceae. In: Kubitzki K, Rohwer JG, Bittrich V (eds) *The Families and Genera of Vascular Plants*, vol. 2, Flowering Plants Dicotyledons: Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid Families. Springer, Germany, pp 206-236
- Boronnikova SV, Kalendar RN (2010) Using IRAP markers for analysis of genetic variability in populations of resource and rare species of plants. *Russ J Genet* 46(1): 36-42
- Branco JSC, Vieira EA, Malone G, Kopp MM, Malone E, Bernardes A, Mistura CC, Carvalho FIF, Oliveira CA (2007) IRAP and REMAP assessments of genetic similarity in rice. *J Appl Genet* 48:107–113
- Bryan GJ, McNicoll J, Ramsay G, Meyer RC (1999) Polymorphic simple sequence repeat markers in chloroplast genomes of Solanceous plants. *Theor Appl Genet* 99: 859-867
- Carvalho A, Guedes-Pinto H, Martins-Lopes P, Lima-Brito J (2010) Genetic variability of Old Portuguese bread wheat cultivars assayed by IRAP and REMAP markers. *Ann Appl Biol* 156: 337–345
- Coart E, Van Glabeke S, Petit RJ, Van Bockstaele E, Rolda'n-Ruiz I (2005) Range wide versus local patterns of genetic diversity in hornbeam (*Carpinus betulus* L.). *Conserv Genet* 6:259–273
- Comes HP, Kadereit JW (1998) The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends Plant Sci* 3: 432-438
- Dan T, Ikeda H, Mitsui Y, Isagi Y, Setoguchi H (2009) Genetic structure of refugial populations of the temperate plant *Shortia rotundifolia* (Diapensiaceae) on a subtropical island. *Conserv Genet* 10: 859–867
- De Montmollin B, Strahm W (eds) (2005) *The Top 50 Mediterranean Island Plants: Wild plants at the brink of extinction, and what is needed to save them*. IUCN/SSC Mediterranean Islands Plant Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. x + 110 pp.
- D' Onofrio C, De Lorenzis G, Giordani T, Natali L, Cavallini A, Scalabrelli G. (2010) Retrotransposon-based molecular markers for grapevine species and cultivars identification. *Tree Genet Genomes* 6:451–466
- Doulaty Baneh H, Mohammadi SA, Labra M, Nazemieh A, De Mattia F, Mardi (2007) Chloroplast Microsatellites Markers to Assess Genetic Diversity in Wild and Cultivated Grapevines of Iran. *Pak J Biol Sci* 10: 1855-1859

- Doyle JJ, Doyle JL (1990) A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* 12:13-15
- Ducousso A, Petit D, Valero M, Vernet P (1990) Genetic variation between and within populations of a perennial grass: *Arrhenatherum elatius*. *Heredity* 65: 179-188
- Ellstrand NC, Elam DR (1993) Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annu Rev Ecol Syst* 24: 217–242
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Mol. Ecol* 14: 2611–262
- Felsenstein J (2005) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle
- Frankham R (2005) Genetics and extinction. *Biol Conserv* 126: 131-140
- Frankham R, Ballou, JD, Briscoe DA (2010) Introduction to conservation genetics. 2<sup>nd</sup> Ed, Cambridge University Press, Cambridge
- Gautschi B, Widmer A, Joshi J, Koella JC (2002) Increased frequency of scale anomalies and loss of genetic variation in serially bottlenecked populations of the dice snake, *Natrix tesellata*. *Conserv Genet* 3: 235–245.
- Ge XJ, Yu Y, Yuan YM, Huang HW, Yan C (2005) Genetic diversity and geographic differentiation in endangered *Ammopiptanthus* (Leguminosae) populations in desert regions of Northwest china as revealed by ISSR analysis. *Ann Bot-London* 95: 843-851
- Gitzendanner MA, Soltis PS (2000) Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *Am J Bot* 87: 783-792
- Godt MJW, Johnson BR, Hamrick JL (1996) Genetic diversity and population size in four rare southern Appalachian plant species. *Conserv Biol* 10: 796-805
- Godt MJW, Walker J, Hamrick JL (1997) Genetic diversity in the endangered lily *Harperocalis flava* and a close relative, *Tofieldia racemosa*. *Conserv Biol* 11: 361-366
- Holsinger KE, Gottlieb LD (1991) Conservation of rare and endangered plants: principles and prospects. In: Falk DA, Holsinger KE (eds) *Genetics and Conservation of Rare Plants*. Oxford University Press, Oxford, pp 195-223
- Houlden BA, Costello BH, Sharkey D, Fowler EV, Melzer A, Ellis W, Carrick F, Baverstock PR, Elphinstone MS (1996) Phylogeographic differentiation in the mitochondrial control region in the koala *Phascolarctos cinereus* (Goldfuss, 1817). *Mol Ecol* 8: 999-1011
- Huff DR, Peakall R, Smouse PE (1993) RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss [*Buchoë dactyloides* (Nutt.) Engelm]. *Theor Appl Genet* 86: 927–934
- IUCN (2001) IUCN Red List Categories and Criteria: Version 3.1. IUCN Species Survival Commission. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. Iiii+30pp.
- Kalendar R, Grob T, Regina M, Suoniemi A, Schulman A (1999) IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based fingerprinting techniques. *Theor Appl Genet* 98:704–711

- Kalendar R, Schulman AH (2006) IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. *Nat Protoc* 1(5): 2478-2484
- Kalpoutzakis, E, Constantinidis TH (2009) *Minuartia parnonia*. In: Phitos D, Constantinidis TH, Kamari G. (eds) *The Red Data Book of Rare and Threatened Plants of Greece*. Hellenic Botanical Society, Patras, pp 189-191 (in Greek)
- Kargiolaki H, Thanos CA, Fournaraki C, Maria EA, Karpathaki H (2007) Plant Micro-Reserves (A Pilot Project Implemented In Western Crete & Samaria Biosphere Reserve) In: 'Priorities for Conservation of Biodiversity in Biosphere Reserves in Changing Conditions', pp 17-23, Proceedings from the International Conference, MAB UNESCO, 2-6 June 2007, Stará Lesná, Slovakia.
- Kruckeberg AR (1986) An essay: the stimulus of unusual geologies for plant speciation. *Syst Bot* 11: 455-463
- Laguna E (2001) The micro-reserves as a tool for conservation of threatened plants in Europe. *Nature and Environment*, No 121, Council of Europe Publishing.
- Lewontin RC (1972) The apportionment of human diversity. *Evol Biol* 6:381-398
- Lynch M, Milligan BG (1994) Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol Ecol* 3: 91-99
- Macnair MR, Gardner M (1998) The evolution of edaphic endemics. In: Howard DJ, Berlocher SH (eds) *Endless Forms: Species and Speciation*. Oxford University Press, New York, pp. 157-171
- Mandoulakani BA, Piri Y, Darvishzadeh R, Bernoosi I, Jafari M (2012) Retroelement Insertional Polymorphism and Genetic Diversity in *Medicago sativa* Populations Revealed by IRAP and REMAP Markers. *Plant Mol Biol Rep* 30: 286-296
- McNeill J (1962) Taxonomic studies in the Alsinoideae II. A revision of the species in the Orient. *Notes Roy Bot Gard Edinburgh* 24:241-426
- Mengoni A, Barabesi C, Gonnelli C, Galardi F, Gabbrielli R, Bazzicalupo M (2001) Genetic diversity of heavy metal-tolerant populations in *Silene paradoxa* L. (Caryophyllaceae): a chloroplast microsatellite analysis. *Mol Ecol* 10: 1909-1916
- Meulenkaamp JE (1985) Aspects of the Late Cenozoic evolution of the Aegean region. In: Stanley DJ, Wezel FC (eds) *Geological evolution of the Mediterranean basin*. Springer-Verlag, New York, pp 307-321
- Miller MP (1997) Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA), 1.3: A Windows Program for the Analysis of Allozyme and Molecular Population Genetic Data. Distributed by the author.
- Mondini L, Noorani A, Pagnotta MA (2009) Assessing Plant Genetic Diversity using Molecular Tools. *Diversity* 1(1): 19-35.
- Moore AJ, Merges D, Kadereit JW (2013) The origin of the serpentine endemic *Minuartia laricifolia* subsp. *ophiolitica* by vicariance and competitive exclusion. *Mol Ecol* 22: 2218-2231

- Moore AJ, Kadereit JW (2013) The evolution of substrate differentiation in *Minuartia* series *Laricifoliae* (Caryophyllaceae) in the European Alps: in situ origin or repeated colonization? *Am J Bot* 100: 2412-24
- Nicoletti F, De Benedetti L, Airò M, Ruffoni B, Mercuri A, Minuto L, Casazza G (2012) Spatial genetic structure of *Campanula sabatia*, a threatened narrow endemic species of the Mediterranean Basin. *Folia Geobot* 47:249-262
- Page RDM (1996) TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comp Appl Biosci* 12:357
- Pandotra P, Husain MK, Ram R, Gupta S, Gupta AP (2013) Retrotransposon based genetic status of North-West Himalayan *Zingiber officinale* revealed high heterogeneity. *J Plant Biochem Biot* DOI 10.1007/s13562-013—0196-8
- Paschke M, Abstract C, Schmid B (2002) Relationship between population size, allozyme variation, and plant performance in the narrow endemic *Cochlearia bavarica*. *Conserv Genet* 3: 131–144.
- Peakall R and Smouse PE (2006) GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetics software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6: 288-295
- Phitos D, Constantinidis TH, Kamari G (eds) 2009. The Red Data Book of Rare and Threatened Plants of Greece, Vol. 2 (E-Z). Patras
- Prentice HC, Malm JU, Mateu-Andrés I, Segarra-Moragues JG (2003) Allozyme and chloroplast DNA variation in island and mainland populations of the rare Spanish endemic, *Silene hifacensis* (Caryophyllaceae). *Conserv Genet* 4: 543–555
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure from multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959
- Provan J, Biss MA, McMeel D, Mathews SH (2004) Universal primers for the amplification of chloroplast microsatellites in grasses (Poaceae). *Mol Ecol Notes* 4: 262-264
- Quintela-Sabaris C, Vendramin GG, Castro-Fernández D, Fraga MI (2010) Chloroplast microsatellites reveal that metallicolous populations of the Mediterranean shrub *Cistus ladanifer* L. have multiple origins. *Plant Soil* 334: 161–174
- Segarra-Moragues JG, Palop-Esteban A, Gonzales-Candelas F, Catalan P (2005) On the verge of extinction: genetics of the critically endangered Iberian plant species, *Borderea chouardii* (Dioscoreaceae) and implications for conservation management. *Mol Ecol* 14: 969–982
- Setoguchi H, Mitsui Y, Ikeda H, Nomura N, Tamura A (2011) Genetic structure of the critically endangered plant *Tricyrtis ishiana* (Convallariaceae) in relict populations of Japan. *Conserv Genet* 12: 491-501
- Shimono Y, Watanabe M, Hirao AS, Wada N, Kudo G (2009) Morphological and genetic variations of *Potentilla matsumurae* (Rosaceae) between fellfield and snowbed populations. *Am J Bot* 96:728-737

- Slatkin M (1987) Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236: 787-792
- Till-Bottraund I, Gaudeul M (2002) Intraspecific genetic diversity in alpine plants. In: Körner C, Spehn EM (eds), *Mountain Biodiversity: A Global Assessment*. Parthenon Publishing, New York, pp 23–34
- Trigas P, Iatrou G (2005) A new species of *Minuartia* (Caryophyllaceae) from the island of Evvia (Greece). *Nordic J Bot* 23: 415-425
- Trigas P, Iatrou G, Karetos G (2007) Species diversity, endemism and conservation of the family Caryophyllaceae in Greece. *Biodivers Conserv* 16: 357-376
- Trigas P, Smyrni V (2009) *Minuartia dirphyia*. In: Phitos D, Constantinidis TH, Kamari G (eds) *The Red Data Book of Rare and Threatened Plants of Greece*. Hellenic Botanical Society, Patras, pp. 186-188 (in Greek)
- Turland N, Kamari G (2009) *Minuartia wettsteinii*. In: Phitos D, Constantinidis TH, Kamari G (eds) *The Red Data Book of Rare and Threatened Plants of Greece*. Hellenic Botanical Society, Patras, pp. 186-188 (in Greek)
- Vekemans X, Beauwens T, Lemaire M, Roldan-Ruiz I (2002) Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Mol Ecol* 11: 139-151
- Weising K, Gardner R (1999) A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphism in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome* 42: 9-19
- Wise CA, Ranker TA, Linhart YB (2002) Modeling problems in conservation genetics with *Brassica rapa*. I. Genetic variation and fitness in plants under mild, stable conditions. *Conserv Biol* 16: 1542–1554
- Wright S (1931) Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16: 97–159
- Yang J, Yang J, Yang M, Qing H (2012) Genetic diversity of *Caragana* species of the Ordos Plateau in China. *Plant Syst Evol* 298: 801–809
- Yeh FC, Yang RC, Boyle TBJ, Ye ZH, Mao JX. 1997. POPGENE, the User-Friendly Shareware for Population Genetic Analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada
- Zheng L (1997) Microsatellite mapping of insect genomes. In: Crampton JM, Beard CB, Louis C (eds) *Molecular Biology of Insect Disease Vectors: A methods manual*. Chapman & Hall, London, pp 309-320

# ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ

(accepted for publication in *Folia Geobotanica IF* 2013 1,612)

## Genetic variation in three closely related *Minuartia* (Caryophyllaceae) species endemic to Greece: implications for conservation management

Antonios Augustinos<sup>1,2‡</sup> Kostas Sotirakis<sup>1‡</sup> Panayiotis Trigas<sup>3§</sup> Eleftherios Kalpoutzakis<sup>4</sup> Vassilis Papatziropoulos<sup>1§</sup>

1: Department of Agricultural Technology, Technological Educational Institute of Western Greece, Theodoropoulou Str., 27200, Amaliada, Greece.

2: Insect Pest Control Laboratory, Joint FAO/IAEA Programme of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Seibersdorf, Vienna, Austria.

3: Laboratory of Systematic Botany, Department of Crop Science, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, 118 55 Athens, Greece

4: Div. of Pharmacognosy - Chemistry of Natural Products, School of Pharmacy, National & Kapodistrian Univ. of Athens, Panepistimiopolis, GR-157 71 Athens, Greece.

‡: These authors contributed equally to this work

§: Corresponding authors VP: Tel. & Fax: 00302622039008; e-mail: vpapasot@teimes.gr, vpapasot@gmail.com; PT: Tel. & Fax: 002105294302; e-mail: trigas@aua.gr

### Abstract

The genus *Minuartia* is highly diverse in the Mediterranean region including several endemic and locally restricted species. The genetic variation of three *Minuartia* species (*M. dirphya*, *M. parnonia*, *M. wettsteinii*) endemic to Greece was investigated, aiming also to develop effective conservation plans for their protection. *M. dirphya* and *M. wettsteinii* are known to occur only at their type localities forming a small population each, while *M. parnonia* is more widespread with seven populations located in South East Peloponnese. Genetic diversity was estimated using ten chloroplast microsatellite and five REMAP markers. The chloroplast microsatellite markers exhibited limited polymorphism, only among species, while REMAP revealed a significant amount of genetic variation at population and species level. All the analyses performed (dendrograms, PCoA, STRUCTURE) showed a clear differentiation among species, highlighting *M. wettsteinii* as the most genetically distant. A degree of differentiation within *M. parnonia* was also observed as shown by AMOVA where 41% of the total variation was partitioned among populations and 59% to the individuals within populations. At species level the highest genetic diversity (PPB = 75.86%,  $H_j = 0.2728$ ,  $I = 0.3509$ ) was observed in *M. parnonia*, followed by *M. dirphya* (PPB = 55.17%,  $H_j = 0.2350$ ,  $I = 0.2767$ ), while the lowest was observed in *M. wettsteinii* (PPB = 28.74%,  $H_j = 0.1449$ ,  $I = 0.1498$ ). A scarce gene flow ( $N_m = 0.5451$ ) was observed among *M. parnonia* populations. The current study is important for developing conservation management plans for the three threatened *Minuartia* species.

**Key words:** *Minuartia*; genetic diversity; REMAP; chloroplast microsatellite markers; conservation; endangered species

## Introduction

Genetic diversity is an important component of biological diversity and therefore studies on the genetic structure of a particular population facilitate the understanding of its biological characteristics, evolutionary history and adaptive potential (Yang et al. 2012). In particular, genetic studies of rare and narrow endemic species are often necessary for efficient conservation management, as the number of species threatened by extinction steadily increases (Holsinger and Gottlieb 1991; Gitzendanner and Soltis 2000). Although biological extinctions are due to the combined effects of several deterministic and stochastic factors, the genetic factors should also be taken into account because threatened species have small and/or declining populations and in such populations inbreeding and loss of genetic diversity are unavoidable (Frankham 2005). These populations often show reduced survival and reproductive ability having a depleted adaptive potential (Paschke et al. 2002; Frankham et al. 2010). Genetic studies can improve conservation activities by identifying populations with very low genetic diversity and by providing information regarding the extent of gene flow among fragmented populations (Nicoletti et al. 2012).

Greece is an important biodiversity center for the whole Caryophyllaceae family, hosting 436 species and subspecies. At the species level, almost 5% of the global family diversity is endemic to the country (Trigas et al. 2007). The genus *Minuartia* L. (Caryophyllaceae, *Alsinoideae*) comprises approximately 120 annual and perennial species distributed throughout the northern hemisphere (Bittrich 1993). Greece, with 33 species belonging to six sections, is also one of the biodiversity centers of the genus. Most of these species, especially the perennial ones usually grow in inhospitable conditions such as stony soils, rock crevices and alpine environments. *M. dirphya*, *M. parnonia* and *M. wettsteinii* are endemic to Greece and all of them are included in the Red Data Book of Rare and Threatened Plants of Greece (Phitos et al. 2009). *M. dirphya* is also included in the Top 50 Mediterranean Island Plants (De Montmollin and Strahm 2005).

*M. dirphya*, *M. parnonia* and *M. wettsteinii* have the same habit sharing several morphological characters, i.e. leaf, inflorescence, capsule and indumentums. Nevertheless, the three species are clearly distinguishable because of certain morphological differences observed mainly on the base of flower (size and shape of petals), inflorescence (number of flowers and length of pedicels) and seed (size, shape and surface) morphology (Trigas and Iatrou 2005). Together with seven other species distributed in C & SE Europe they form a well-defined group classified to *Minuartia* sect. *Spectabiles* subsect. *Laricifoliae* ser. *Laricifoliae* (McNeill 1962; Trigas and Iatrou 2005; Moore and Kadereit 2013). According to the study of Moore and Kadereit (2013), based on nuclear ribosomal internal and external transcribed spacer regions, *Minuartia* sect. *Spectabiles* is a well-supported monophyletic group within Caryophyllaceae. In addition the members of ser. *Laricifoliae* are forming a major clade within sect. *Spectabiles* while, the three species studied here are clustered together forming a separate lineage within ser. *Laricifoliae*. Thus, both traditional classification and phylogenetic evidence support the close relation of the three species, and the formation of a distinct evolutionary unit.

The three *Minuartia* species studied have small seeds (1.5-3.0 mm), weighting 0.9-1.5 mg that are dispersed by gravity within a short distance from the parent plant or by strong wind to a relatively larger distance. *M. dirphya* and *M. parnonia* also show clonal reproduction which is not observed in *M. wettsteinii*. This is probably because of the rocky habitats it grows, which does not favor the development of underground runners. *M. dirphya* is known only from the type locality on Mt Dirphys in Evvia Island. It grows on rocky ground in a small serpentine outcrop (edaphic island), isolated from other serpentine areas by the extensive limestone



formations of Central Evvia, at an altitude of 900-920 m above sea level (a.s.l). It currently occupies an area of nearly 0.3 ha and its population counts approximately 500 mature individuals. It has been experienced a severe habitat loss (and subsequently a population decline) the last two decades, because of human activities and, according to IUCN categories the species has been recently evaluated as “Critically Endangered” (Trigas and Smyrni 2009).

*M. parnonia* is distributed on Mt Parnon and its South East branches in SE Peloponnese. It grows on limestone rocky ground at an altitude of 550-1200 m a.s.l. Seven *M. parnonia* populations are known in SE Peloponnese counting almost 20,000 mature individuals. The species has been evaluated as “Near Threatened” (Kalpoutzakis and Constantinidis 2009).

*M. wettsteinii* is also known only from the type locality on Mt Thriptis in East Crete. It grows in rock crevices and screes, on limestone, at an altitude of 1100-1400 m a.s.l. It occupies an area of approximately 3 km<sup>2</sup>, and the only known population is estimated to count less than 1000 individuals. It has been designated as “Endangered” species based on IUCN criteria (Turland and Kamari 2009). According to our own estimation the population of *M. wettsteinii* counts less than 200 individuals and the species is extremely rare in its *locus classicus*. Thus, the species should be evaluated as “Critically Endangered” according to criterion C2a(ii) (IUCN 2001).

The three species are located far from each other (Fig. 1a). In addition the presence of sea barriers for a long period of time - i.e. the isolation time of Crete from the Peloponnese is at least 5.3 Myr (Meulenkaamp 1985) - strengthens their isolation. Given the close phylogenetic relationship of the three *Minuartia* species, their present, disjunct and narrowly restricted distribution ranges they could be characterized as relictual. Endemic species confined to small relictual populations harbor varying levels of genetic variability, but in general, narrowly restricted species tend to have lower levels than widespread species (Godt et al. 1997; Setoguchi et al. 2011). Undoubtedly, an understanding of the genetic diversity of the *Minuartia* species included in this study, especially those which have been designated as Critically Endangered is urgently needed for planning their conservation action. Moreover an estimation of the degree of the genetic differentiation among those species will shed more light on their evolutionary and taxonomic relationships and will also help to identify critical factors that shaped their evolutionary history.

In order to study the genetic variation of the *Minuartia* species the following molecular markers were used: i) chloroplast (cp) microsatellite markers, and ii) a relatively novel kind of markers called Retrotransposon Microsatellite Amplified Polymorphism (REMAP) (Kalendar et al. 1999). The cpDNA is maternally inherited in most plants and although it is normally used for phylogenetic studies, recent examples of observed intraspecific variation show that there is additional potential for within-species genetic analysis (Doulaty Baneh et al. 2007; Mondini et al. 2009). REMAP on the other hand, has been successfully applied for the determination of genetic relationships, germplasm identification and assessment of genetic variation of several plant species (Biswas et al. 2010; Boronnikova and Kalendar 2010; D’ Onofrio et al. 2010; Mandoulakani et al. 2012).

The objectives of this study are: 1) to estimate the genetic differentiation among *M. dirphyia*, *M. parnonia* and *M. wettsteinii*, 2) to analyze the distribution of genetic diversity within *M. parnonia* and 3) to determine the genetic structure and to assess the levels of population genetic diversity of the three species in order to obtain basic information for the development of conservation strategies.

## Materials and Methods

### Sampling

Our sampling scheme covered all known populations of the three species studied; seven populations of *M. parnonia* and a single population from each of one of the *M. wettsteinii* and *M. dirphya* species. Individuals were collected at least 5 m apart, to avoid sampling clonal ramets. A distribution map of the *Minuartia* species studied, as well as the collection sites and an estimate of the size of each population based on *in situ* observation are shown in Figs. 1a, 1b and Table 1. Samples of fresh and healthy leaves were collected in the field, dried immediately in silica gel and stored at 4 °C until further processing.

### Genetic analysis

#### DNA extraction

DNA was extracted from each individual using 20 mg dry weight of leaf tissue and following the *CTAB* (hexadecyltrimethylammonium bromide) protocol (Doyle and Doyle 1990) with minor modifications. Quantification and quality assessment of the purified DNA were performed by gel electrophoresis and spectrophotometrically as well. DNA samples were stored at -20 °C until used.

#### Chloroplast microsatellite markers

Ten universal primer pairs namely: *ccmp1*, *ccmp5*, *ccmp6*, *ccmp7*, *ccmp8*, *ccmp9*, *ccmp10* (Weising and Gardner (1999), *NTCP12* (Bryan et al. 1999), *provan1* and *provan2* (Provan et al. 2004), were used for the amplification of chloroplastic microsatellite regions. PCRs were performed as described in Weising and Gardner (1999), Bryan et al. (1999) and Provan et al. (2004), using KapaTaq (Kapa Biosystems) DNA polymerase and *Minuartia* sp. DNA as template. PCR-amplicons were electrophoresed in 1.5% agarose gels (Sigma) and those primers producing clear and reproducible bands were used further for genotyping. Genotyping was carried out using the protocol described by Zheng (1997), by radio-labelling one fifth of the forward primer with  $\gamma$ -<sup>32</sup>P ATP, using T4 polynucleotide kinase (MBI, Fermentas) and incorporating it in the PCR reaction. PCR products were electrophoresed on 5% denaturing polyacrylamide gels and visualized by autoradiography. Scoring was performed manually.

#### REMAP markers

REMAP exploits polymorphisms among regions amplified between an anchored simple sequence repeat (SSR) and a LTR retrotransposon. In order to obtain highly reproducible and polymorphic bands, we performed a preliminary screening testing several LTR primers described in Baumel et al. (2002) together with ISSR primers derived from the University of British Columbia (Vancouver, Canada) primer set and Baumel et al. (2002). Based on the amplification quality and the reproducibility of bands, we chose five REMAP markers that yielded the maximum numbers of reliable and reproducible polymorphisms to screen the populations (Table 2).

PCR amplification was carried out in a 20 µl reaction mixture containing: 20 ng genomic DNA, 1× PCR buffer (80 mM Tris-HCl, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.02% w/v Tween-20), 10 pmol from each primer, 300 µM each dNTP, 1U thermostable DNA polymerase (Promega). Reactions were carried out in a MJ Research PTC-100 thermal cycler under the following conditions: an initial denaturation step at 95°C for 4 min

followed by 35 cycles of denaturation at 95°C for 30s, annealing at 50-58 °C (depending on the primer set) for 45s, extension at 72°C for 60s. The program was ended with a final extension step at 72°C for 5 min. The PCR products were separated by electrophoresis at 110 V for 4 h in a 2% agarose gel (Sigma) and visualized using a GelDocEZ imaging system (BioRad). Molecular weights were estimated by comparison with a 100-bp and a 1-kb DNA ladder (New England Biolabs)

Amplified REMAP fragments ranging between 180 and 1750 base pairs and showing consistent amplification patterns were scored manually to form a binary matrix. For each sample, bands were scored as present (1) or absent (0) assuming that each band position corresponded to one locus with two alleles (Kalendar and Schulman 2006).

#### *Data analysis*

Analysis of molecular variation using REMAP markers was made according to Boronnikova and Kalendar (2010). In order to evaluate the reproducibility of our data three randomly chosen individuals from each population and species were used for a second round of PCR amplification and REMAP genotyping.

For the estimation of the genetic diversity parameters the POPGENE version 1.31 (Yeh et al. 1997) and AFLPsurv 1.0 (Vekemans et al. 2002) programs were employed. These parameters included the percentage of polymorphic bands (PPB, an index equivalent to polymorphic loci), calculated by dividing the number of polymorphic bands at population and species levels by the total number of bands scored, Nei's gene diversity ( $H_j$ ) after the modification by Lynch and Milligan (1994) and Shannon's index of diversity ( $I$ ) that does not assume the Hardy-Weinberg equilibrium (Lewontin 1972), at population and species levels. Because there was no prior information regarding the population level of inbreeding, we ran AFLPsurv 1.0 with different  $F_{IS}$  values (0 assuming Hardy-Weinberg equilibrium to 1 complete lack of heterozygotes).

In order to eliminate the effect of differences in sampling intensity between populations we computed the band richness ( $B_r$ ) and the proportion of polymorphic loci ( $PLP$ ) standardized to the smallest sample size (Mp3-Kastanitsa) by means of a rarefaction method with the AFLPDIV 1.0 software (Coart et al. 2005).

The estimation of gene flow ( $Nm$ ), calculated as the number of migrants entering a population in each generation, was made according to Wright (1931), where  $G_{ST}$  is used as an approximation for  $F_{ST}$  (Yeh et al. 1997).

Nei's genetic distance after Lynch and Milligan (1994) with 1000 bootstrap replications over the REMAP loci was calculated using AFLPsurv 1.0. The estimated values were then employed to construct UPGMA dendrograms with the program Neighbor in the PHYLIP package (Felsenstein 2005). Treeview (Page 1996), was used to visualize the dendrograms.

Analysis of Molecular Variance (AMOVA) and Principal Coordinates Analysis (PCoA) were performed with Genalex 6.5. (Peakall and Smouse 2006). For PCoA, the method for dominant data by Huff et al. (1993) was followed. PCoA was initially performed to the whole data set including the three different species, both among samples and among individuals. However, since *M. parnonia* is the only species represented by multiple populations, PCoA was also performed on *M. parnonia* alone, aiming at a better insight at the population structuring of this species. The test of significance for the AMOVA was carried out on 9999 permutations of the data.

A Mantel test to estimate the correlation between the geographic and the genetic distance of the three species studied was employed using TFPGA 1.3 (Miller 1997) with 9999 permutations. A separate test was also performed within *M. parnonia* populations only.

A Mantel test to estimate the correlation between the matrix of direct line geographic distance with the genetic distance and also the  $\Phi_{pt}$  was employed using TFPGA 1.3 (Miller 1997) with 9999 permutations.

To infer population structure and assign individuals to populations we used the program STRUCTURE version 2.3.1 (Pritchard et al. 2000). We adopted the no admixture model with uncorrelated allele frequencies as proposed by Pritchard et al. (2000) for dominant genetic data. No prior knowledge of the species was included in the analyzed data set. To determine the optimal number of groups ( $K$ ), we ran STRUCTURE with  $K$  varying from 1 to 9 (equal to the number of populations), with five runs for each  $K$  value using a burn-in period of  $10^5$  interactions followed by  $10^6$  additional Markov Chain Monte Carlo (MCMC) interactions. Previous studies have shown that, in many cases, the posterior probability for a given  $K$  increases slightly, even after the real  $K$  is reached (Dan et al. 2009). Therefore, we used an *ad hoc* statistic,  $\Delta K$ , to determine the true value of  $K$  (Evanno et al. 2005). A separate analysis was also performed excluding the two discrete species, focusing on the *M. parnonia* samples. For this analysis,  $K$  varied from 1 to 7.

## Results

### *Chloroplast microsatellite markers:*

Ten universal primer pairs designed for the amplification of different chloroplast microsatellite regions were initially screened. Four of them (*ccmp8*, *NTCP12*, *provan1*, *provan2*) did not amplify well and were excluded from further analysis. Problems in the amplification included low or no amplification at all, presence of multiple amplicons instead of the expected one and inability to have consistent and reproducible results. The remaining 6 markers were used for the genotyping of 10 individuals from *M. wettsteinii* and *M. dirphya* species and 10 from each *M. parnonia* population. Among those markers four (*ccmp1*, *ccmp6*, *ccmp9* and *ccmp10*) were monomorphic both within and among species and hence could not provide any information for the samples analyzed. The remaining two (*ccmp5* and *ccmp7*) presented a low degree of polymorphism, each one revealing two alleles. Both were polymorphic only at species level, showing zero inter/intra-population (for *M. parnonia*) and intra-specific (for the other two species) variation. Interestingly, the combined analysis of these two markers discriminates among the three species and therefore they can be used as diagnostic tools at species level. More specifically the individuals belonging to *M. parnonia* and *M. wettsteinii* exhibited the same *ccmp5* allele (*ccmp5A*), while those belonging to *M. dirphya* revealed a different one (*ccmp5B*). Similarly all individuals from *M. parnonia* and *M. dirphya* shared the same *ccmp7* allele, which was different from that exhibited by *M. wettsteinii* individuals. Due to the low amount of polymorphism and the 100% fixation of the different alleles, no statistical analysis could be performed.

### *Genetic variability assessed with REMAP markers:*

After preliminary testing, five REMAP markers were eventually chosen for the genotyping of 76 individuals, from 9 populations belonging to the three species studied. A total of 87 bands ranging in size from 180 to 1750 bp were scored for all the markers used. Band reproducibility ranged from 90.9% to identical for the samples

that were PCR amplified and genotyped twice, however only identical bands appeared in both genotyping rounds were used for further analysis. The highest number of bands was scored for UBC-807, while the lowest was recorded for UBC-20 (Table 2).

At species level 45 bands were scored for *M. wettsteinii* and 57 for *M. dirphya*. Within *M. parnonia* the highest number of bands (55) was observed in population Mp1, while the lowest (46) in Mp4. Six private bands were scored for *M. dirphya*, four for *M. wettsteinii* and fifteen for *M. parnonia*. Two of the *M. parnonia* private bands appeared only in some individuals of the Mp7 population. The percentage of polymorphic bands (PPB) per species ranged from 28.74% to 75.86%, while at population level PPB varied from 21.84% to 48.28% (Table 3).

Assuming Hardy-Weinberg (HW) equilibrium Nei's gene diversity ( $H_j$ ) for the 87 loci was  $0.2350 \pm 0.0201$  for *M. dirphya*, and  $0.1449 \pm 0.0187$  for *M. wettsteinii*. The average gene diversity within *M. parnonia* ( $H_s$ ) was 0.1891, while the gene diversity in the total population ( $H_T$ ) was 0.2728. Gene diversity values were different when estimated under the non HW assumption ( $F_{is} = 1$ ); however the diversity pattern in all the populations studied was almost similar to that obtained under the HW equilibrium model. The Shannon's information index ( $I$ ) varied from  $0.1498 \pm 0.0272$  and  $0.3509 \pm 0.0283$  at species level, while within *M. parnonia* ranged from  $0.1122 \pm 0.0243$  to  $0.2400 \pm 0.0299$ . When comparing the rarefied measures ( $Br$  and  $PLP$ ) to the other diversity indices it seems that the levels of diversity are not associated with the number of individuals surveyed from each population. Finally gene flow among *M. parnonia* populations was 0.5451 (Table 3).

The Mantel test for the three species studied revealed a significant correlation between the geographic and the genetic distance ( $r = 0.9436$ ,  $p = 0.001$ ), however this correlation was not as strong when only the *M. parnonia* populations were examined ( $r = 0.3985$ ,  $p = 0.088$ ).

Moreover we found a strong positive correlation to exist between population size and genetic diversity levels in *M. parnonia* under the assumption of H-W equilibrium ( $r=0.8219$   $p=0.0233$ ) or not ( $r=0.8542$   $p=0.0144$ ).

The PCoA analysis for the whole data set among individuals showed that 75.43% of total variation is explained by the first three axes (43.03%, 19.85% and 12.55% respectively). As it is shown all individuals cluster to their respective species, while species are discrete from each other. The first principal coordinate separates *M. parnonia* populations from the rest of the *Minuartia* species, while the second separates *M. wettsteinii* from *M. dirphya* (Fig. 2).

In the STRUCTURE analysis, the value of  $\Delta K$  was 7402.36 for  $K = 3$ , 53.71 for  $K = 4$ , 26.88 for  $K=5$  and  $<5.58$  for all values of  $K$  higher than 5. Therefore the assumption of  $K=3$  best fits to the data presented here. Structure analysis run with  $K=3$  showed a clear separation among the three *Minuartia* species, while there was no discrimination among *M. parnonia* populations since all the populations were clustered together (graph not shown).

Finally according to the topology obtained by the UPGMA dendrogram *M. wettsteinii* is positioned outside the rest of the species studied being the most genetically distant. *M. dirphya* is positioned in a distinct clade too, while *M. parnonia* populations are clustered together. Within this cluster two groups are forming. The first one comprises the populations Mp1, Mp2, Mp3 and Mp5, while the second the populations Mp4, Mp6 and Mp7 (Fig. 3). A slight departure from this topology was obtained when for the construction of the dendrogram we used the Nei distances calculated assuming non HW equilibrium. In this case as well as in the dendrogram obtained using only the *M. parnonia* populations (graphs not shown), the population Mp7 is positioned in a

different clade within *M. parnonia*, while the others are clustered in two different groups; in the first one the populations Mp1, Mp2, Mp3 and Mp5, while in the second the populations Mp4 and Mp6.

#### *Within M. parnonia differentiation:*

The analysis of molecular variance (AMOVA) among *M. parnonia* populations indicated that the greatest amount of variation (59%) was due to variability within individuals in a population, whereas the remaining (41%) is attributed to population differences as inter-population diversity (Table 4).

Moreover as shown by the UPGMA dendrogram, there seems to be some differentiation within *M. parnonia*. To further unravel this, the PCoA and the STRUCTURE analyses were performed using only the *M. parnonia* samples. The PCoA analysis among individuals shows a possible differentiation of Mp7, since none of the individuals assigned to this population overlaps with individuals belonging to any other population (Fig. 4). Also, individuals belonging to Mp4 and Mp6 populations, although overlap with each other, they seem to be differentiated from the individuals belonging to the rest of the *M. parnonia* populations.

In the Bayesian structure analysis, populations were analyzed under the assumptions of K=1-7 discrete populations. Analysis of the curves produced from the ln probability of data, incorporating standard deviations of multiple runs seem to be in favor of the presence of two or three groups of populations within Parnonia (K=2 or K=3) (data not shown). For K=2, populations Mp4, Mp6 and Mp7 seem to differentiate from the remaining populations, while under the assumption of three discrete populations (K=3), Mp7 also seems to be discrete (Fig. 5). These results are well in accordance with both PCoA and the UPGMA dendrogram discussed earlier.

## **Discussion**

In this study, chloroplast microsatellite and REMAP markers were used to assess the degree of genetic variation and the pattern of genetic diversity in nine populations belonging to three closely related *Minuartia* species that are endemic to Greece. Our results based on both genetic systems, indicated the sufficient discrimination of the three species highlighting also the levels of genetic differentiation existing among them. However only the REMAP markers revealed a significant amount of intra and inter population diversity.

Retrotransposon based marker systems including REMAP have been successfully utilized in genetic diversity and phylogeny studies in several plants at population, species and genus level: e.g. ginger (Pandotra et al. 2013), alfalfa (Mandoulakani et al. 2012), wheat (Carvalho et al. 2010), *Citrus* (Biswas et al. 2010), grapevine (D' Onofrio et al. 2010) persimmon (Guo et al. 2006), rice (Branco et al. 2007), *Spartina* (Baumel et al. 2002) and also in rare decorative and medicinal plants (Boronnikova and Kalendar 2010). REMAP markers have proved to be as reliable as other molecular markers when tested, showing thus a great potential (Branco et al. 2007; Biswas et al. 2010; D' Onofrio et al. 2010; Mandoulakani et al. 2012).

On the other hand limited information was added by the cp microsatellite markers since the majority of them (four out of six analyzed) were monomorphic in all populations studied. However, the two markers that were polymorphic can provide a solid diagnostic tool for the discrimination among the three *Minuartia* species, since their combined use managed to cluster all individuals at their respective species



### *Genetic diversity and differentiation*

The genetic diversity of a species or a population is greatly affected by the combined effects of genealogical history and evolutionary processes (Comes and Kadereit 1998; Ge et al. 2005). Because of their narrow ranges, endemics are commonly characterized by low levels of genetic diversity (Ellstrand and Elam 1993; Gitzendanner and Soltis 2000; Segarra-Moragues et al. 2005). However, several exceptions have been reported (Batista et al. 2001; Hoebee and Young 2001) indicating the need to study each particular case separately.

High levels of genetic diversity were found for *M. parnonia* (PPB=75.86%,  $I=0.3509$ ,  $H=0.2728$ ), intermediate in *M. dirphya* (PPB=55.17%,  $I=0.2704$ ,  $H=0.2350$ ), while it was significantly reduced in *M. wettsteinii* (PPB=28.74%,  $I=0.1498$ ,  $H=0.1449$ ). At the population level though, the highest genetic diversity among all populations was detected in the single population of *M. dirphya*. Although the most common view is that, in general, serpentine populations exhibit lower levels of genetic diversity compared to their relatives on normal soils (Kruckeberg 1986; Macnair and Gardner 1998), there are several cases that the expected reduction in the genetic diversity in the serpentine populations is not evident (Mengoni et al. 2001; Quintela-Sabarís et al. 2010). Various hypotheses have been proposed to explain the higher levels of genetic diversity observed in serpentine populations including the possibility of some level of continuing gene flow from neighboring populations (Mengoni et al. 2001) and also that the serpentine areas might act as refugia for several competitively inferior genotypes that would not be able to survive on normal soils (Ducousso et al. 1990). Therefore it is more likely that individual historical and biological factors (e.g. taxon age, colonization processes) might have a specific impact determining the genetic diversity levels of serpentine populations (Moore and Kadereit 2013).

*M. parnonia* grows only in calcareous open rocky places, and relatively high genetic diversity was detected at species level, while within its seven populations the diversity levels varied. The highest genetic diversity was observed in population Mp1 (PPB=48.28%,  $I=0.2400$ ,  $H=0.2189$ ) and the lowest in Mp3 (PPB=21.84%,  $I=0.1122$ ,  $H=0.1384$ ). In addition a positive correlation between the population size and the genetic diversity was also detected when we compared the  $H_j$  values (both H-W and non H-W) with the logarithm of the estimated number of individuals per population. The highest genetic diversity values have been observed in the largest population of *M. parnonia*, while the lowest in the smallest. This is an indication that the Prastos area of Mt Parnon could have acted as a diversification center or refuge for *M. parnonia*, functioning as a reservoir of genetic diversity. This means that Mp1 possibly retains the greatest potential to adapt and evolve compared to the other populations studied.

The low levels of genetic diversity revealed in *M. wettsteinii* (as expressed by the several diversity parameters estimated) could be attributed to diverse factors, including the effect of genetic drift and the reduced population size, which likely enhance inbreeding. Reduced competitive ability and/or long-term overgrazing, as they are indicated by the habitat occupied by *M. wettsteinii*, have probably influenced the levels of genetic diversity observed today.

As indicated by AMOVA the genetic differentiation among *M. parnonia* populations was found to be significant accounting for the 41% of the total variation. The fact that the levels of gene flow were low enough ( $N_m < 1$ ), denoting genetic isolation among the considered populations, indicates that genetic drift could have possibly influenced the population structure (Slatkin 1987). Therefore, we cannot rule out the possibility that

some differentiation among the *M. parnonia* populations could be due to isolation, as is also suggested by the geographical position of the populations themselves and more specifically for the Mp7. The differentiation among *M. parnonia* populations is further supported by the dendrogram and the PCoA and STRUCTURE analyses performed using those populations only. These analyses indicate a possible differentiation of Mp7 population which is also underlined by the private bands revealed by some individuals of Mp7, since no such bands were detected in the other populations.

According to Moore and Kadereit (2013), *M. wettsteinii*, *M. parnonia* and *M. dirphya* are clustered together forming a separate lineage within ser. *Laricifoliae*. Regardless their close relationship, our results show that the three *Minuartia* species are sufficiently differentiated from each other revealing high levels of genetic variation among them. In all the analyses performed *M. wettsteinii* and *M. dirphya* are clearly separated from the populations of *M. parnonia*, an observation congruent with the palaeogeographic evidence on the evolution of the Aegean area. The appearance of *M. wettsteinii* as the most genetically distant species in a distinct clade was expected, since its geographical distribution in eastern Crete suggests an effective long-lasting isolation from its congeners (Meulenkaamp 1985). Similarly, the distinct position of *M. dirphya* is also in agreement with its geographic isolation from the other species. The differentiation observed among the species under study has probably been derived from their geographic isolation, further enhanced by adaptation to different ecological conditions, at least for *M. dirphya*. High genetic differentiation among spatially isolated populations might be expected as a result of random genetic drift, restricted gene flow or selection in a heterogeneous landscape (Till-Bottraud and Gaudeul 2002; Shimono et al. 2009). Moreover the private bands, observed, also indicate the level of genetic differentiation among those species. Long-time isolated populations could accumulate private alleles reflecting their genetic differences because of isolation by distance (Prentice et al. 2003).

### *Conservation perspectives*

This study provides genetic information on three rare and locally restricted *Minuartia* species in Greece, which is valuable in order to draw up conservation management plans. Field observations and genetic analyses indicate that *M. wettsteinii* faces high extinction risk and it should be considered as Critically Endangered. It is difficult to assess, however, to what extent the genetic impoverishment detected in *M. wettsteinii* may compromise the survival of the species at the short term, as population dynamics studies for this species are lacking. Intense searching of this species at its *locus classicus* during the last two decades indicates an increasing difficulty in locating individuals. Thus, a recent population decline cannot be excluded, highlighting the risk of extinction as a result of reduced population size. Genetic depletion, characteristic of species with a history of fragmented populations and small population sizes, is believed to have dramatic consequences for their ability to survive environmental changes (Ellstrand and Elam 1993; Wise et al. 2002), as could be associated with certain fitness traits (Gautschi et al. 2002; Paschke et al. 2002; Frankham et al. 2010).

The low levels of genetic diversity found in *M. wettsteinii* indicate a degree of genetic peril that may result in an inability to adapt to population declines because of gene loss, genetic drift, and inbreeding depression or may reduce its ability to colonize new habitats. Low levels of diversity have been considered to be evidence for bottlenecks in populations known to have undergone severe demographic decline (Houlden et al. 1996). The size of the single *M. wettsteinii* population has probably significantly decreased in the recent past, suggesting



that the remaining population of this species may have maintained only a small effective population size and may have experienced a severe loss of genetic variability.

Our results have direct implications for the conservation of *M. wettsteinii* since the low genetic diversity detected probably means that the total genetic diversity of the population may be adequately captured in only few individuals. A collection of seeds and living plants of *M. wettsteinii* is already maintained at the Mediterranean Agronomic Institute of Chania (MAICH). It is uncertain, however, if the genetic diversity sampled in this collection is representative of the genetic diversity present in the whole population. We recommend the exploration of the genetic diversity contained in the MAICH collection, especially if this material is to be used in future restoration programs. According to Godt et al. (1996), genetically unique populations may deserve highest priority for *in situ* protection. *M. wettsteinii* has an extremely restricted distribution area and the establishment of a micro-reserve (Laguna 2001) seems an appropriate measure for its protection. A pilot network of plant micro-reserves has already been established in western Crete in order to protect certain threatened Cretan plants (Kargiolaki et al. 2007) and its expansion in other areas of Crete and the Aegean would contribute to the effective protection of several locally restricted threatened plant species.

Our results indicate that the level of genetic diversity within *M. dirphya* is not a crucial factor for its conservation. The critically endangered status of *M. dirphya* is most likely due to habitat damage from human activities and the difficulties in colonizing new areas caused by its specific substrate requirements. Thus, *in situ* conservation actions, such as the protection of its entire habitat preventing illegal removal and also the establishment of a micro-reserve seem to be the appropriate protection measures for this species. Furthermore, the size of the only known population should be increased by artificial breeding and germplasm collection from the single known population of *M. dirphya* should be carried out for its effective *ex-situ* conservation.

The relatively high genetic differentiation among *M. parmonia* populations, as well as the low levels of gene flow, indicate that at least some of them exhibiting higher levels of genetic diversity (Mp1, Mp6 and Mp7) should be considered as separate management units and should have priority for *in situ* conservation actions. Moreover, genetically similar individuals can be used as population reinforcements in order to increase the current levels of genetic diversity in populations with low amount of variation (e.g. Mp3, Mp4). In-depth ecological studies for the three *Minuartia* species included in this study are currently lacking and data on their population ecology and demographic dynamics should be immediately initiated in order to reach their comprehensive conservation.

### **Acknowledgments**

The authors would like to thank Dr E. Dionyssopoulou for technical assistance, Professors A. Zacharopoulou and G. Kiliyas at the Department of Biology, University of Patras, Greece, for their generous support throughout this study and the two anonymous reviewers for their valuable comments. Moreover the authors would like to declare that the experiments performed in this study comply with the current laws of Greece.

## References

- Baumel A, Ainouche ML, Kalendar R, Schulman AH (2002) Retrotransposons and genomic stability in populations of the young allopolyploid species *Spartina anglica* C.E. Hubbard (Poaceae). *Mol Biol Evol* 19: 1218–1227
- Biswas MK, Xu Q, Deng XX (2010) Utility of RAPD, ISSR, IRAP and REMAP markers for the genetic analysis of *Citrus* spp. *Sci Hort* 124: 254–261
- Bittrich V (1993) Caryophyllaceae. In: Kubitzki K, Rohwer JG, Bittrich V (eds) *The Families and Genera of Vascular Plants, vol. 2, Flowering Plants Dicotyledons: Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid Families*. Springer, Germany, pp 206-236
- Boronnikova SV, Kalendar RN (2010) Using IRAP markers for analysis of genetic variability in populations of resource and rare species of plants. *Russ J Genet* 46(1): 36-42
- Branco JSC, Vieira EA, Malone G, Kopp MM, Malone E, Bernardes A, Mistura CC, Carvalho FIF, Oliveira CA (2007) IRAP and REMAP assessments of genetic similarity in rice. *J Appl Genet* 48:107–113
- Bryan GJ, McNicoll J, Ramsay G, Meyer RC (1999) Polymorphic simple sequence repeat markers in chloroplast genomes of Solanaceous plants. *Theor Appl Genet* 99: 859-867
- Carvalho A, Guedes-Pinto H, Martins-Lopes P, Lima-Brito J (2010) Genetic variability of Old Portuguese bread wheat cultivars assayed by IRAP and REMAP markers. *Ann Appl Biol* 156: 337–345
- Coart E, Van Glabeke S, Petit RJ, Van Bockstaele E, Rolda'n-Ruiz I (2005) Range wide versus local patterns of genetic diversity in hornbeam (*Carpinus betulus* L.). *Conserv Genet* 6:259–273
- Comes HP, Kadereit JW (1998) The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends Plant Sci* 3: 432-438
- Dan T, Ikeda H, Mitsui Y, Isagi Y, Setoguchi H (2009) Genetic structure of refugial populations of the temperate plant *Shortia rotundifolia* (Diapensiaceae) on a subtropical island. *Conserv Genet* 10: 859–867
- De Montmollin B, Strahm W (eds) (2005) *The Top 50 Mediterranean Island Plants: Wild plants at the brink of extinction, and what is needed to save them*. IUCN/SSC Mediterranean Islands Plant Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. x + 110 pp.
- D' Onofrio C, De Lorenzis G, Giordani T, Natali L, Cavallini A, Scalabrelli G. (2010) Retrotransposon-based molecular markers for grapevine species and cultivars identification. *Tree Genet Genomes* 6:451–466
- Doulaty Baneh H, Mohammadi SA, Labra M, Nazemieh A, De Mattia F, Mardi (2007) Chloroplast Microsatellites Markers to Assess Genetic Diversity in Wild and Cultivated Grapevines of Iran. *Pak J Biol Sci* 10: 1855-1859
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* 12:13-15
- Ducousso A, Petit D, Valero M, Vernet P (1990) Genetic variation between and within populations of a perennial grass: *Arrhenatherum elatius*. *Heredity* 65: 179-188
- Ellstrand NC, Elam DR (1993) Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annu Rev Ecol Syst* 24: 217–242
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Mol. Ecol* 14: 2611–2620
- Felsenstein J (2005) *PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6*. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle
- Frankham R (2005) Genetics and extinction. *Biol Conserv* 126: 131-140
- Frankham R, Ballou, JD, Briscoe DA (2010) *Introduction to conservation genetics*. 2<sup>nd</sup> Ed, Cambridge University Press, Cambridge
- Gautschi B, Widmer A, Joshi J, Koella JC (2002) Increased frequency of scale anomalies and loss of genetic variation in serially bottlenecked populations of the dice snake, *Natrix tesellata*. *Conserv Genet* 3: 235–245.
- Ge XJ, Yu Y, Yuan YM, Huang HW, Yan C (2005) Genetic diversity and geographic differentiation in endangered *Ammopiptanthus* (Leguminosae) populations in desert regions of Northwest China as revealed by ISSR analysis. *Ann Bot-London* 95: 843-851
- Gitzendanner MA, Soltis PS (2000) Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *Am J Bot* 87: 783-792
- Godt MJW, Johnson BR, Hamrick JL (1996) Genetic diversity and population size in four rare southern Appalachian plant species. *Conserv Biol* 10: 796-805
- Godt MJW, Walker J, Hamrick JL (1997) Genetic diversity in the endangered lily *Harperocallis flava* and a close relative, *Tofieldia racemosa*. *Conserv Biol* 11: 361-366
- Holsinger KE, Gottlieb LD (1991) Conservation of rare and endangered plants: principles and prospects. In: Falk DA, Holsinger KE (eds) *Genetics and Conservation of Rare Plants*. Oxford University Press, Oxford, pp 195-223

- Houlden BA, Costello BH, Sharkey D, Fowler EV, Melzer A, Ellis W, Carrick F, Baverstock PR, Elphinstone MS (1996) Phylogeographic differentiation in the mitochondrial control region in the koala *Phascolarctos cinereus* (Goldfuss, 1817). *Mol Ecol* 8: 999-1011
- Huff DR, Peakall R, Smouse PE (1993) RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss [*Buchoë dactyloides* (Nutt.) Engelm]. *Theor Appl Genet* 86: 927-934
- IUCN (2001) IUCN Red List Categories and Criteria: Version 3.1. IUCN Species Survival Commission. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. Iiii+30pp. Downloadable from [http://www.iucnredlist.org/info/categories\\_criteria](http://www.iucnredlist.org/info/categories_criteria)
- Kalendar R, Grob T, Regina M, Suoniemi A, Schulman A (1999) IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based fingerprinting techniques. *Theor Appl Genet* 98:704-711
- Kalendar R, Schulman AH (2006) IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. *Nat Protoc* 1(5): 2478-2484
- Kalpoutzakis, E, Constantinidis TH (2009) *Minuartia parnonia*. In: Phitos D, Constantinidis TH, Kamari G. (eds) *The Red Data Book of Rare and Threatened Plants of Greece*. Hellenic Botanical Society, Patras, pp 189-191 (in Greek)
- Kargiolaki H, Thanos CA, Fournaraki C, Maria EA, Karpathaki H (2007) Plant Micro-Reserves (A Pilot Project Implemented In Western Crete & Samaria Biosphere Reserve) In: 'Priorities for Conservation of Biodiversity in Biosphere Reserves in Changing Conditions', pp 17-23, Proceedings from the International Conference, MAB UNESCO, 2-6 June 2007, Stará Lesná, Slovakia.
- Kruckeberg AR (1986) An essay: the stimulus of unusual geologies for plant speciation. *Syst Bot* 11: 455-463
- Laguna E (2001) The micro-reserves as a tool for conservation of threatened plants in Europe. Nature and Environment, No 121, Council of Europe Publishing.
- Lewontin RC (1972) The apportionment of human diversity. *Evol Biol* 6:381-398
- Lynch M, Milligan BG (1994) Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol Ecol* 3: 91-99
- Macnair MR, Gardner M (1998) The evolution of edaphic endemics. In: Howard DJ, Berlocher SH (eds) *Endless Forms: Species and Speciation*. Oxford University Press, New York, pp. 157-171
- Mandoulakani BA, Piri Y, Darvishzadeh R, Bernoosi I, Jafari M (2012) Retroelement Insertional Polymorphism and Genetic Diversity in *Medicago sativa* Populations Revealed by IRAP and REMAP Markers. *Plant Mol Biol Rep* 30: 286-296
- McNeill J (1962) Taxonomic studies in the *Alsinoideae* II. A revision of the species in the Orient. *Notes Roy Bot Gard Edinburgh* 24:241-426
- Mengoni A, Barabesi C, Gonnelli C, Galardi F, Gabbriellini R, Bazzicalupo M (2001) Genetic diversity of heavy metal-tolerant populations in *Silene paradoxa* L. (Caryophyllaceae): a chloroplast microsatellite analysis. *Mol Ecol* 10: 1909-1916
- Meulenkamp JE (1985) Aspects of the Late Cenozoic evolution of the Aegean region. In: Stanley DJ, Wezel FC (eds) *Geological evolution of the Mediterranean basin*. Springer-Verlag, New York, pp 307-321
- Miller MP (1997) *Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA), 1.3: A Windows Program for the Analysis of Allozyme and Molecular Population Genetic Data*. Distributed by the author.
- Mondini L, Noorani A, Pagnotta MA (2009) Assessing Plant Genetic Diversity using Molecular Tools. *Diversity* 1(1): 19-35.
- Moore AJ, Merges D, Kadereit JW (2013) The origin of the serpentine endemic *Minuartia laricifolia* subsp. *ophiolitica* by vicariance and competitive exclusion. *Mol Ecol* 22: 2218-2231
- Moore AJ, Kadereit JW (2013) The evolution of substrate differentiation in *Minuartia* series *Laricifoliae* (Caryophyllaceae) in the European Alps: in situ origin or repeated colonization? *Am J Bot* 100: 2412-2425
- Nicoletti F, De Benedetti L, Airò M, Ruffoni B, Mercuri A, Minuto L, Casazza G (2012) Spatial genetic structure of *Campanula sabatia*, a threatened narrow endemic species of the Mediterranean Basin. *Folia Geobot* 47:249-262
- Page RDM (1996) TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comp Appl Biosci* 12:357
- Pandotra P, Husain MK, Ram R, Gupta S, Gupta AP (2013) Retrotransposon based genetic status of North-West Himalayan *Zingiber officinale* revealed high heterogeneity. *J Plant Biochem Biot* DOI 10.1007/s13562-013-0196-8
- Paschke M, Abstract C, Schmid B (2002) Relationship between population size, allozyme variation, and plant performance in the narrow endemic *Cochlearia bavarica*. *Conserv Genet* 3: 131-144.
- Peakall R and Smouse PE (2006) *GenAlEx 6: genetic analysis in Excel*. Population genetics software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6: 288-295

- Phitos D, Constantinidis TH, Kamari G (eds) 2009. The Red Data Book of Rare and Threatened Plants of Greece, Vol. 2 (E-Z). Patras
- Prentice HC, Malm JU, Mateu-Andrus I, Segarra-Moragues JG (2003) Allozyme and chloroplast DNA variation in island and mainland populations of the rare Spanish endemic, *Silene hifacensis* (Caryophyllaceae). *Conserv Genet* 4: 543–555
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure from multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959
- Provan J, Biss MA, McMeel D, Mathews SH (2004) Universal primers for the amplification of chloroplast microsatellites in grasses (Poaceae). *Mol Ecol Notes* 4: 262–264
- Quintela-Sabarís C, Vendramin GG, Castro-Fernández D, Fraga MI (2010) Chloroplast microsatellites reveal that metallicolous populations of the Mediterranean shrub *Cistus ladanifer* L. have multiple origins. *Plant Soil* 334: 161–174
- Segarra-Moragues JG, Palop-Esteban A, Gonzales-Candelas F, Catalan P (2005) On the verge of extinction: genetics of the critically endangered Iberian plant species, *Borderea chouardii* (Dioscoreaceae) and implications for conservation management. *Mol Ecol* 14: 969–982
- Setoguchi H, Mitsui Y, Ikeda H, Nomura N, Tamura A (2011) Genetic structure of the critically endangered plant *Tricyrtis ishiiiana* (Convallariaceae) in relict populations of Japan. *Conserv Genet* 12: 491–501
- Shimono Y, Watanabe M, Hirao AS, Wada N, Kudo G (2009) Morphological and genetic variations of *Potentilla matsumurae* (Rosaceae) between fellfield and snowbed populations. *Am J Bot* 96:728–737
- Slatkin M (1987) Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236: 787–792
- Till-Bottraud I, Gaudeul M (2002) Intraspecific genetic diversity in alpine plants. In: Körner C, Spehn EM (eds), *Mountain Biodiversity: A Global Assessment*. Parthenon Publishing, New York, pp 23–34
- Trigas P, Iatrou G (2005) A new species of *Minuartia* (Caryophyllaceae) from the island of Evvia (Greece). *Nordic J Bot* 23: 415–425
- Trigas P, Iatrou G, Karetos G (2007) Species diversity, endemism and conservation of the family Caryophyllaceae in Greece. *Biodivers Conserv* 16: 357–376
- Trigas P, Smyrni V (2009) *Minuartia dirphyia*. In: Phitos D, Constantinidis TH, Kamari G (eds) *The Red Data Book of Rare and Threatened Plants of Greece*. Hellenic Botanical Society, Patras, pp. 186–188 (in Greek)
- Turland N, Kamari G (2009) *Minuartia wettsteinii*. In: Phitos D, Constantinidis TH, Kamari G (eds) *The Red Data Book of Rare and Threatened Plants of Greece*. Hellenic Botanical Society, Patras, pp. 186–188 (in Greek)
- Vekemans X, Beauwens T, Lemaire M, Roldan-Ruiz I (2002) Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Mol Ecol* 11: 139–151
- Weising K, Gardner R (1999) A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphism in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome* 42: 9–19
- Wise CA, Ranker TA, Linhart YB (2002) Modeling problems in conservation genetics with *Brassica rapa*. I. Genetic variation and fitness in plants under mild, stable conditions. *Conserv Biol* 16: 1542–1554
- Wright S (1931) Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16: 97–159
- Yang J, Yang J, Yang M, Qing H (2012) Genetic diversity of *Caragana* species of the Ordos Plateau in China. *Plant Syst Evol* 298: 801–809
- Yeh FC, Yang RC, Boyle TBJ, Ye ZH, Mao JX. 1997. *POPGENE, the User-Friendly Shareware for Population Genetic Analysis*. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada
- Zheng L (1997) Microsatellite mapping of insect genomes. In: Crampton JM, Beard CB, Louis C (eds) *Molecular Biology of Insect Disease Vectors: A methods manual*. Chapman & Hall, London, pp 309–320

Table 1. Symbols used for the populations studied; collection localities of *M. wettsteinii*, *M. parnonia* and *M. dirphya* populations and estimated number of individuals per population.

Pop	Species	Estimated Plants/Pop	Coordinates	Population locality
Mw	<i>M. wettsteinii</i>	200	35°04'55''N 25°52'10''E	Crete, Mt Thriptis
Md	<i>M. dirphya</i>	500	38°38'15''N 23°48'53''E	Evvia, Mt Dirphys
Mp1	<i>M. parnonia</i>	14,000	37°15'36''N 22°41'08''E	Mt Parnon, Prastos
Mp2	<i>M. parnonia</i>	3,000	37°17'17''N 22°38'98''E	Mt Parnon, Zipougias
Mp3	<i>M. parnonia</i>	50	37°15'84''N 22°39'45''E	Mt Parnon, Kastanitsa
Mp4	<i>M. parnonia</i>	1,000	37°13'81''N 22°45'34''E	Mt Parnon, Igoumenos
Mp5	<i>M. parnonia</i>	500	37°10'20''N 22°43'08''E	Mt Parnon, Paleochori
Mp6	<i>M. parnonia</i>	1,000	37°08'61''N 22°45'77''E	Mt Parnon, Moni Elonas
Mp7	<i>M. parnonia</i>	500	36°54'68''N 22°58'54''E	Mt Chionovouni

Table 2. Primers used for REMAP; Annealing temperatures; Number and range of bands scored for each primer used in the analysis

Primer Id*	Sequence (5'-3')	Ann. Temp (°C)	No of bands scored	Range (bp)
<b>ISSR</b>				
UBC-807	(AG) <sub>8</sub> T	51	21	180-1250
UBC-808	(AG) <sub>8</sub> C	53	20	230-1750
UBC-811	(GA) <sub>8</sub> C	50	18	370-1530
UBC-820	(GT) <sub>8</sub> C	55	13	480-1620
B9900*	(GTG) <sub>7</sub> A	58	15	310-1280
<b>LTR</b>				
<i>Sukkula</i> *: GATAGGGTCGCATCTTGGGCGTGAC				
*described in Baumel et al. (2002)				

Table 3. Genetic diversity in *Minuartia* populations as detected by REMAP markers; N = numbers of individuals surveyed from each population; No. B = number of bands scored; PPB= Percentage of Polymorphic Bands; PrB= private bands;  $H_j$  = Nei's gene diversity after Lynch and Milligan (1994) assuming HW equilibrium ( $H_{j-HW}$ ) or complete shortage of heterozygotes ( $H_{j-non HW}$ );  $I$  = Shannon's Information index;  $Br$  = band richness after rarefaction to the minimum sample size in the present study (n=6);  $PLP$  = percentage of polymorphic loci at 1 % after rarefaction to the minimum sample size (6);  $N_m$  = estimate of gene flow from  $G_{ST}$ ; \*species level

Pop/Id	N	No. B	PPB	PrB	$H_{j-HW}$	$H_{j-non HW}$	$I$	$Br$	$PLP$ (1%)	$N_m$
Mw	11	45	28.74	4	0.1449±0.0187	0.1179±0.0189	0.1498±0.0272	1.228	0.287	
Md	10	57	55.17	6	0.2350±0.0201	0.2225±0.0005	0.2704±0.0297	1.468	0.552	
Mp*	55		75.86	15	0.2728	0.2665	0.3509±0.0283			0.5451
Mp1	11	55	48.28	-	0.2189±0.0200	0.2095±0.0224	0.2400±0.0299	1.417	0.483	
Mp2	7	51	33.48	-	0.1955±0.0195	0.1701±0.0215	0.1762±0.0284	1.325	0.345	
Mp3	6	47	21.84	-	0.1384±0.0170	0.1187±0.0177	0.1122±0.0243	1.218	0.218	
Mp4	7	46	26.44	-	0.1764±0.1925	0.1527±0.0223	0.1496±0.0278	1.259	0.264	
Mp5	8	54	37.93	-	0.2093±0.0193	0.1845±0.0221	0.1969±0.0292	1.349	0.379	
Mp6	7	49	33.33	-	0.1991±0.0204	0.1633±0.0212	0.1857±0.0298	1.315	0.333	
Mp7	8	47	39.08	2	0.1860±0.0201	0.1667±0.0211	0.1910±0.0285	1.342	0.391	

Table 4. Analysis of molecular variance (AMOVA) for individuals belonging to *M. parnonia* populations. Degrees of freedom (d.f.), sum of squares (SS), mean squares (MS), variance components and the total variation contributed by each component (%) are presented.

Summary AMOVA Table					
Source	df	SS	MS	Est. Var.	%
Among Pops	6	249.697	41.588	4.565	41%
Within Pops	47	309.665	6.589	6.589	59%
Total	53	559.222		11.154	100%

Figure 1. a): Distribution map of *Minuartia wettsteinii* (Mw, triangle), *M. dirphyia* (Md, circle) and *M. parnonia* (Mp, square); b): *M. parnonia* populations surveyed: Mp1 (Prastos), Mp2 (Zipougias), Mp3 (Kastanitsa), Mp4 (Igoumenos), Mp5 (Paleochori), Mp6 (Moni Elonas), Mp7 (Chionovouni).

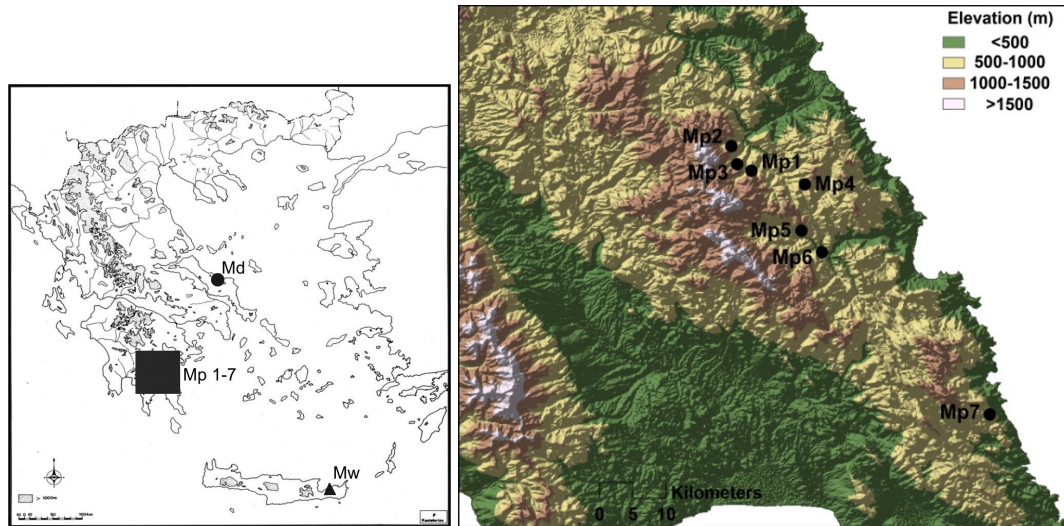


Figure 2. A two dimensional plot of the principal coordinates analysis (PCoA) of REMAP data showing the clustering of *Minuartia* species

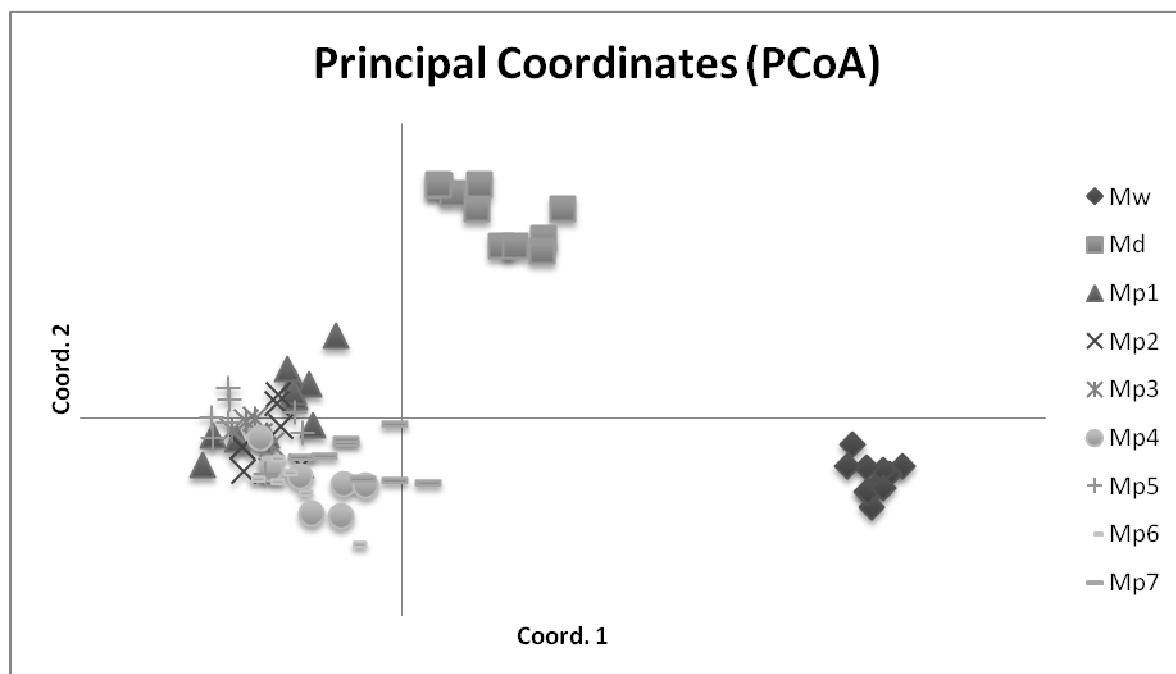


Figure 4. A two dimensional plot of the principal coordinates analysis (PCoA) of REMAP data showing the clustering of *M. parnonia* individuals

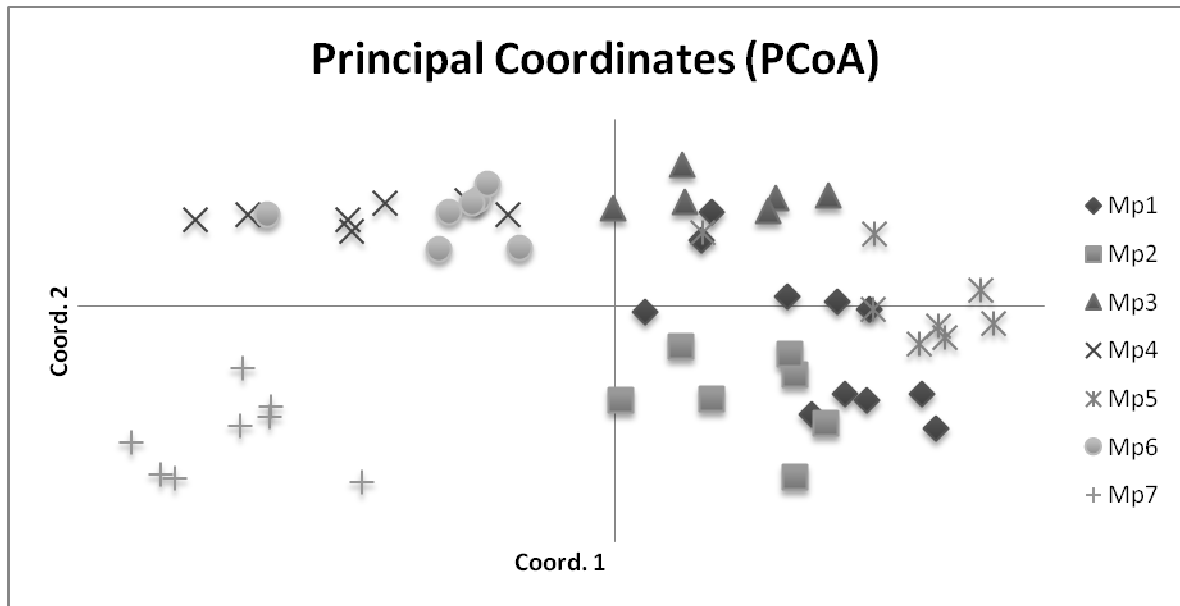




Figure 3. UPGMA dendrogram based on Nei's after Lynch and Milligan (1994) genetic distance. Numbers indicate bootstrap values (%).

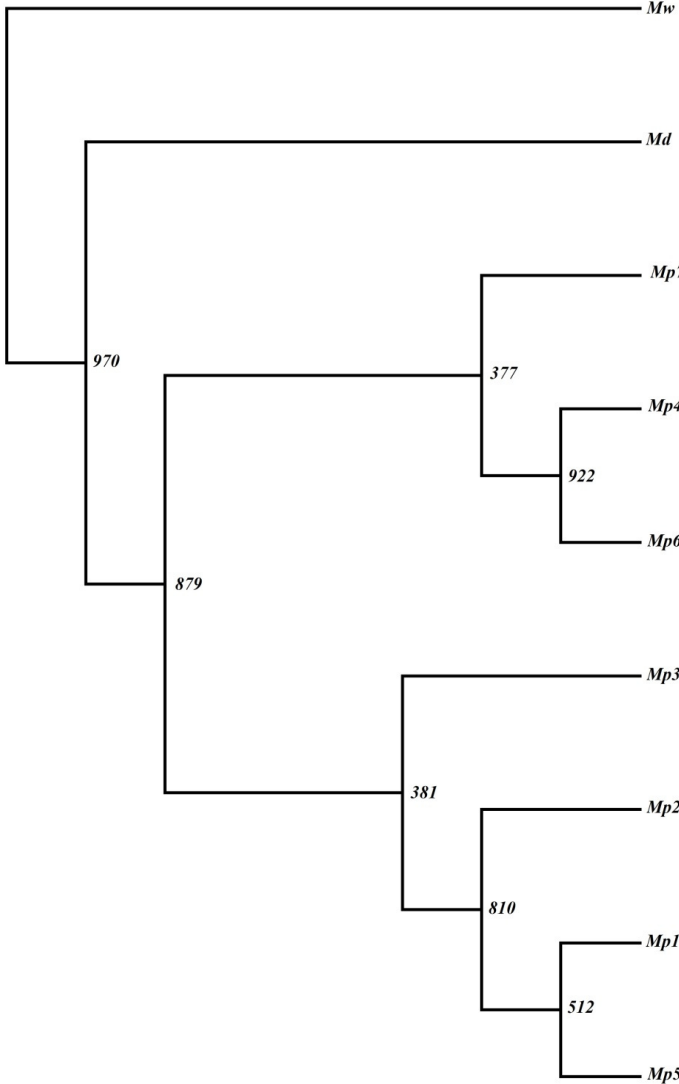


Figure 5. *M. parnonia* population analysis using the Structure software, under the assumption of the existence of three genetic clusters ( $K=3$ ).

