

ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
Κατεύθυνση: ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

Γενετική διαφοροποίηση των ειδών *Epiractis*  
(Orchidaceae) της Ελλάδας



Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Ναταλία Πελτέκη

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

Αλέξανδρος Τριανταφυλλίδης

Συνεπιβλέπων:

Ανδρέας Δ. Δρούζας

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2014



**ARISTOTLE UNIVERSITY OF THESSALONIKI**  
**FACULTY OF SCIENCE**  
**SCHOOL OF BIOLOGY**  
**POSTGRADUATE PROGRAMME OF STUDIES**  
**Field: APPLIED GENETICS AND BIOTECHNOLOGY**

**Genetic differentiation of the *Epipactis* species  
(Orchidaceae) in Greece**

**Postgraduate Diploma Thesis**

**Natalia Pelteki**

**SUPERVISOR**

**Alexandros Triantafyllidis**

**Co-supervisor:**

**Andreas D. Drouzas**

**THESSALONIKI 2014**



# ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιολογίας ΑΠΘ, Κατεύθυνση: «Εφαρμοσμένη Γενετική & Βιοτεχνολογία». Το εργαστηριακό της κομμάτι έλαβε χώρα στο εργαστήριο Συστηματικής Βοτανικής και Φυτογεωγραφίας του Τομέα Βοτανικής του ίδιου τμήματος.

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω την επιτροπή του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών, τον Καθηγητή κύριο Μηνά Γιάγκου, την Καθηγήτρια κυρία Αντιγόνη Λάζου και την Καθηγήτρια κυρία Μαργαρίτα Χατζοπούλου-Κλαδαρά που με επέλεξαν ως φοιτήτρια αυτού του μεταπτυχιακού και μου έδωσαν την ευκαιρία να πραγματοποιήσω αυτήν την εργασία.

Ευχαριστώ κυρίως τους επιβλέποντες καθηγητές αυτής της εργασίας, τον Επίκουρο Καθηγητή του Τομέα Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας ΑΠΘ κύριο Αλέξανδρο Τριανταφυλλίδη και το Λέκτορα του Τομέα Βοτανικής του ίδιου τμήματος κύριο Ανδρέα Δ. Δρούζα, που μου εμπιστεύτηκαν αυτό το θέμα, καθώς και για την καθοδήγηση και τις συμβουλές τους στη διάρκεια διεξαγωγής αυτής της διπλωματικής εργασίας. Επίσης, την Καθηγήτρια του Τομέα Βοτανικής κυρία Στέλλα Κοκκίνη που δέχτηκε να είναι στην εξεταστική επιτροπή.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στο Δρ. Σπύρο Τσιφτσή για την παραχώρηση του φυτικού υλικού και την παροχή όλων των απαραίτητων πληροφοριών σχετικά με αυτό.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω τους συνεργάτες μου στο εργαστήριο συστηματικής βοτανικής και κυρίως τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Ελένη Μπέλλα και τον προπτυχιακό φοιτητή Γρηγόρη Γεωργολόπουλο για την ξενάγηση στο εργαστήριο και την εκμάθηση των τεχνικών, αλλά και τους προπτυχιακούς φοιτητές, Λίζα Αλεξιάδου, Χαρά Σουλτούκη, Αφροδίτη Γιαννακού και Πέτρο Δημητριάδη για την άριστη συνεργασία και το φιλικό κλίμα.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω τους φοιτητές στο εργαστήριο του κυρίου Τριανταφυλλίδη για τη βοήθειά τους γενικότερα και την επίλυση των αποριών μου σχετικά με την αλληλούχηση.

Ευχαριστώ τα μέλη του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και κυρίως τον υποψήφιο διδάκτορα Κώστα Τσιγαρίδα και τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Μαρία Μπαμπέτσα για τη βοήθεια και τις συμβουλές τους.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου, που στάθηκαν δίπλα μου και μου έδωσαν αγάπη και δύναμη σε όλη τη διάρκεια αυτού του μεταπτυχιακού.



Η ολοκλήρωση της εργασίας αυτής έγινε στο πλαίσιο της υλοποίησης του μεταπτυχιακού προγράμματος το οποίο συγχρηματοδοτήθηκε μέσω της Πράξης «Πρόγραμμα χορήγησης υποτροφιών ΙΚΥ με διαδικασία εξατομικευμένης αξιολόγησης ακαδ. έτους 2012-2013» από πόρους του Ε.Π. «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου (ΕΚΤ) και του ΕΣΠΑ (2007-2013)

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	σελ. 7
<b>ABSTRACT</b>	9
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	11
<b>Οικογένεια Orchidaceae</b>	11
<i>Συστηματική κατάταξη</i>	11
<i>Μορφολογία-Οικολογία</i>	12
<i>Ιστορία</i>	13
<b>Γένος <i>Epiractis</i></b>	14
<i>Συστηματική κατάταξη</i>	14
<i>Το γένος <i>Epiractis</i> στην Ελλάδα</i>	18
<i>Καρυολογία</i>	18
<b>DNA δείκτες στη διάκριση των φυτικών ειδών</b>	19
<i>Πλεονεκτήματα της χρήσης DNA δεικτών</i>	19
<i>Χλωροπλαστικοί δείκτες</i>	20
<i>Πυρηνικοί δείκτες</i>	21
<i>Μέθοδοι εντοπισμού πολυμορφισμών στο DNA</i>	22
<b>Σκοπός</b>	23
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	25
<b>Φυτικό υλικό</b>	25
<b>Ενίσχυση DNA</b>	27
<b>PCR-RFLP</b>	29
<b>Αλληλούχιση (sequencing)</b>	31
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	33
<b>PCR</b>	33
<b>PCR-RFLP</b>	35
<i>Περιοχή <i>trnL</i></i>	35
<i>Περιοχή <i>matK</i></i>	35

<i>Περιοχή trnH-psbA</i>	36
<i>Περιοχή ITS</i>	37
<b>Αλληλούχηση</b>	39
<b>Αντιστοίχιση αποτελεσμάτων PCR-RFLP και αλληλούχησης στο <i>trnL</i></b>	44
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	47
<b>Ικανότητα των δεικτών DNA για διάκριση στο γένος <i>Eripractis</i></b>	47
<i>Περιοχή trnL</i>	47
<i>Περιοχή matK</i>	49
<i>Περιοχή trnH-psbA</i>	50
<i>Περιοχή ITS</i>	50
<b>Διαφοροποιήσεις ανάμεσα στα είδη του γένους <i>Eripractis</i></b>	51
<i>Eripractis microphylla</i>	52
<i>E. palustris</i>	52
<i>E. subclausa</i>	53
<i>Ταξα για τα οποία δε βρέθηκε διαφοροποίηση</i>	54
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	55
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	57



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η απόδοση ενός φυσικού πληθυσμού σε ένα συγκεκριμένο taxon και ο προσδιορισμός του επιπέδου των taxa ως είδη ή υποείδη είναι απαραίτητες προϋποθέσεις για τη σωστή εφαρμογή των προγραμμάτων προστασίας και διαχείρισης. Το γένος *Epipactis* της οικογένειας Orchidaceae παρουσιάζει μεγάλες δυσκολίες στην ταξινόμηση των taxa που περιλαμβάνει, λόγω του πρόσφατου εξελικτικά διαχωρισμού μεταξύ τους και της παρουσίας αυτογονιμοποιούμενων πληθυσμών. Για τη διάκριση φυτικών ειδών, εκτός από τους μορφολογικούς χρησιμοποιούνται και δείκτες DNA, αλλά η βιβλιογραφία σχετικά με την ταυτοποίηση μελών του γένους *Epipactis* με αυτήν την τεχνολογία είναι σχετικά περιορισμένη. Για τους αυτοφυείς πληθυσμούς της Ελλάδας, έχει γίνει μόνο μια εργασία πάνω σε μικρό αριθμό ειδών.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο εντοπισμός πολυμορφισμών DNA ικανών να διακρίνουν taxa του γένους *Epipactis*, αυτοφυή της Ελλάδας. Μελετήθηκαν 25 πληθυσμοί *Epipactis* της Ελλάδας και ένας της Κύπρου που ανήκαν σε συνολικά 22 taxa. Εφαρμόστηκε η μέθοδος των PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Length Fragment Polymorphism) στις χλωροπλαστικές περιοχές *trnL*, *matK* και *trnH-psbA* και στην πυρηνική περιοχή ITS και η μέθοδος της αλληλούχισης (sequencing) στη χλωροπλαστική περιοχή *trnL*.

Γενικά, δε βρέθηκε μεγάλη ποικιλότητα εντός του γένους στους δείκτες που εξετάστηκαν. Με χρήση της περιοχής *trnL* ταυτοποιούνται τα είδη *E. microphylla*, *E. palustris* και *E. subclausa*. Το *E. palustris* διαφοροποιείται και στην περιοχή *trnH-psbA*. Δεν εντοπίστηκαν δείκτες κατάλληλοι για διάκριση taxa στις περιοχές *matK* και ITS.

Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με την άποψη ότι τα διαφορετικά taxa του γένους *Epipactis* έχουν διαχωριστεί μεταξύ τους πρόσφατα στην εξέλιξη και δεν εμφανίζουν μεγάλη διαφοροποίηση στο επίπεδο του DNA.



# ABSTRACT

Attributing natural populations in specific taxa and defining the taxonomic level of the aforementioned taxa as species or subspecies is essential for the effective function of conservation projects. The taxa of the genus *Epipactis* of the family Orchidaceae raise taxonomic challenges due to recent evolutionary divergence and the presence of autogamous populations. Apart from morphological characters, DNA markers are also used for plant species identification, but there are relatively limited literature references concerning the use of this technology on the genus *Epipactis*. Regarding the native populations in Greece, there has only been one study on a few species.

Aim of the present study is the detection of DNA polymorphisms capable of distinguishing taxa of the genus *Epipactis*, native in Greece. A total of 25 populations from Greece, plus one from Cyprus, belonging to 22 different *Epipactis* taxa were studied. The method of PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Length Fragment Polymorphism) was used on the chloroplast loci *trnL*, *matK* and *trnH-psbA* and the nuclear locus ITS and sequencing was also applied on the chloroplast locus *trnL*.

Overall, low diversity was detected within the genus in the markers studied. Using the *trnL* locus, the species *E. microphylla*, *E. palustris* and *E. subclausa* can be identified, while *E. palustris* is also identified with the *trnH-psbA* locus. No suitable markers for distinguishing taxa were detected in the *matK* and ITS loci.

The results are in agreement with the bibliography that the various *Epipactis* taxa have diverged recently and they don't exhibit high diversity on the DNA level.



# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## Οικογένεια Orchidaceae

Η οικογένεια Orchidaceae είναι η πολυπληθέστερη σε αριθμό ειδών στην υπέρταξη Liliales (μονοκότυλα) και από τις πολυπληθέστερες οικογένειες αγγειοσπέρμων. Αντιπροσωπευτικά είδη της μπορούν να βρεθούν παγκοσμίως αν και η μεγαλύτερη συγκέντρωσή τους παρατηρείται στους τροπικούς (Cribb *et al*, 2003, Chase, 2005), ενώ απουσιάζουν μόνο από τους πόλους και τις ξηρές ερήμους (Chase, 2005). Υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον διεθνώς για την προστασία των ορχεοειδών. Ολόκληρη η οικογένεια περιλαμβάνεται στη διεθνή Σύμβαση για το Διεθνές Εμπόριο Απειλούμενων Ειδών της Άγριας Πανίδας και Χλωρίδας (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, CITES, <http://www.cites.org/eng/disc/species.php>) η οποία υιοθετήθηκε από τις χώρες-μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης με τον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 338/97 (<http://www.ypeka.gr/LinkClick.aspx?fileticket=M7qlPNurgMo%3d&tabid=537&language=el-GR>), με πιο πρόσφατη τροποποίηση τον κανονισμό (ΕΕ) αριθ. 750/2013 (<http://www.ypeka.gr/LinkClick.aspx?fileticket=cxr7StCsxaM%3d&tabid=537&language=el-GR>). Στην Ελλάδα είδη της οικογένειας Orchidaceae προστατεύονται με βάση το Προεδρικό Διάταγμα 67/1981 (<http://www.ypeka.gr/LinkClick.aspx?fileticket=fLzNzvQ8LLM%3D&tabid=538&language=el-GR>).

### Συστηματική κατάταξη

Η χρήση της τεχνολογίας του DNA προκάλεσε πολλές αναθεωρήσεις στα συστήματα φυλογενετικής κατάταξης των μονοκότυλων που είχαν δημιουργηθεί με βάση μορφολογικούς χαρακτήρες. Στις μελέτες που χρησιμοποιούν νουκλεοτιδικές ακολουθίες, η οικογένεια Orchidaceae τοποθετείται στην τάξη Asparagales μαζί με τις Asparagaceae, Iridaceae κ. ά. (π.χ. Kim *et al*, 2012). Μία συστηματική κατάταξη που λαμβάνει υπόψη τα δεδομένα αυτά φαίνεται στον πίνακα 1. Οι Chase *et al*. (2003) πρότειναν ότι αποτελείται από πέντε υποοικογένειες, τις Apostasioideae, Cyrtipedioideae, Vanilloideae, Orchidoideae και Epidendroideae (από Chase, 2005). Η τελευταία είναι και η πολυπληθέστερη με μεγάλη διαφορά από τις υπόλοιπες. Στην Ελλάδα εκπροσωπούνται οι υποοικογένειες Orchidoideae και Epidendroideae (Τσιφτσής, 2009), με ένα σύνολο από 19 γένη και 101 είδη που εξαπλώνονται σε όλα

τα χλωριδικά διαμερίσματα της χώρας. Είκοσι έξι taxa, τα περισσότερα υποείδη, αναφέρονται ως ενδημικά της Ελλάδας (Dimopoulos *et al*, 2013).

Πίνακας 1: Συστηματική κατάταξη της οικογένειας Orchidaceae σύμφωνα με τη Euro+Med PlantBase (<http://ww2.bgbm.org/EuroPlusMed/>)

<b>Βασίλειο</b>	Plantae	(Φυτά)
<b>Άθροισμα</b>	Tracheophyta	(Τραχειόφυτα)
<b>Υποάθροισμα</b>	Spermatophytina	(Σπερματόφυτα)
<b>Κλάση</b>	Magnoliopsida	(Αγγειόσπερμα)
<b>Υπέρταξη</b>	Lilianaes	(Μονοκότυλα)
<b>Τάξη</b>	Asparagales	(Ασπαραγώδη)
<b>Οικογένεια</b>	Orchidaceae	(Ορχεοειδή)

### *Μορφολογία-Οικολογία*

Το πρώτο ίσως μορφολογικό χαρακτηριστικό των Orchidaceae που τραβάει την προσοχή είναι η ιδιαίτερη κατασκευή των ανθικών μερών τους. Αν και υπάρχουν είδη που απλά παράγουν νέκταρ ή προσφέρουν καταφύγιο για να προσελκύσουν επικονιαστές, ένα μεγάλο ποσοστό χρησιμοποιεί μηχανισμούς εξαπάτησης, όπως τον οπτικό και τον οσφρητικό μιμητισμό. Τα άνθη αυτών των ειδών μπορεί να μιμούνται την όψη ή την οσμή άλλων ανθέων που προσφέρουν νέκταρ, ή τοποθεσιών κατάλληλων για ωοαπόθεση (κυρίως τα τροπικά είδη). Το είδος του μιμητισμού, όμως, που απαντά μόνο στα ορχεοειδή είναι ο σεξουαλικός μιμητισμός, στον οποίο το άνθος μιμείται τη μορφή και τις φερομόνες θηλυκού εντόμου με αποτέλεσμα τα αρσενικά να επιχειρούν να ζευγαρώσουν μαζί του (Jersáková *et al*, 2006, Τσιφτσής, 2009, Vereecken *et al*, 2010).

Το πώς προέκυψαν αυτές οι ανθικές δομές εξελικτικά είναι ένα θέμα που μελετήθηκε ήδη από την εποχή της γένεσης της εξελικτικής θεωρίας. Όπως αναφέρεται στους Jersáková *et al*. (2006) και Vereecken *et al*. (2010), ο ίδιος ο Κάρολος Δαρβίνος δημοσίευσε ένα βιβλίο με τίτλο “On the various contrivances by which British and foreign orchids are fertilised by insects” (Τα διάφορα τεχνάσματα με τα οποία οι βρετανικές και ξένες ορχιδέες γονιμοποιούνται από τα έντομα) το 1862, τρία μόλις χρόνια μετά την Καταγωγή των Ειδών. Θεωρούσε μάλιστα ότι η προσαρμογή των ανθών των ορχεοειδών στους επικονιαστές τους ήταν ένα από τα καλύτερα παραδείγματα δράσης της εξέλιξης μέσω της φυσικής επιλογής (Jersáková *et al*, 2006, Vereecken *et al*, 2010).

Εκτός από τις διάφορες στρατηγικές που περιλαμβάνουν επικονιαστές, σε κάποια ορχεοειδή απαντάται και η αυτογονιμοποίηση, ανάμεσά τους και είδη του γένους *Epipactis* (βλ. παρακάτω) (Τσιφτσής, 2009, Vereecken *et al*, 2010).

Χαρακτηριστικό γνώρισμα της οικογένειας Orchidaceae αποτελεί το πρώιμο αναπτυξιακό στάδιο που ακολουθεί τη βλάστηση του σπέρματος και ονομάζεται *protocorm*. Κατά το στάδιο αυτό το φυτό συνδέεται με κάποιο μύκητα με τον οποίο δημιουργεί τη συμβιωτική δομή της μυκόρριζας (Chase, 2005, Těšitelová *et al*, 2012). Η σύνδεση αυτή είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη του σε ώριμο άτομο. Και ως ενήλικα άτομα, όμως, τα ορχεοειδή βασίζονται στο συμβιωτικό μύκητα για παροχή θρεπτικών συστατικών (Oberwinkler *et al*, 2013). Μία περίπτωση είναι τα μη-φωτοσυνθετικά είδη. Για κάποια από αυτά, έχει αποδειχτεί ότι «μοιράζονται» τη μυκόρριζα άλλων, φωτοσυνθετικών φυτών και μέσω αυτής τα χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα (Taylor and Bruns, 1997, Roy *et al*, 2009). Ο δεσμός μεταξύ ορχεοειδών και άλλων ειδών (π.χ. δασικών δέντρων) μέσω κοινής μυκόρριζας και η ροή άνθρακα μεταξύ τους παρατηρείται και σε είδη που φωτοσυνθέτουν μόνα τους, όπως στη φυλή Neottieae (Roy *et al*, 2009, Oberwinkler *et al*, 2013). Ενώ κάποια είδη ορχεοειδών εμφανίζουν ισχυρή προτίμηση για συγκεκριμένα *taxa* μυκήτων, κάποια άλλα είναι λιγότερο εξειδικευμένα (Otero *et al*, 2007, Martos *et al*, 2012). Η εξειδίκευση στην επιλογή μυκόρριζας συγκεκριμένων φυτών μπορεί να παίζει ρόλο στον αποικισμό ή μη νέων περιοχών (Tranchida-Lombardo *et al*, 2011).

Η εξάρτηση των ορχεοειδών από άλλους οργανισμούς (έντομα-επικονιαστές, συμβιωτικοί μύκητες της μυκόρριζας) τα καθιστά ευαίσθητα σε οποιαδήποτε διαταραχή του περιβάλλοντος επηρεάζει αυτούς τους οργανισμούς. Έτσι, οποιαδήποτε προσπάθεια διαχείρισης και προστασίας ορχεοειδών πρέπει να λαμβάνει υπόψη και αυτές τις σχέσεις για να είναι αποτελεσματική (Vereecken *et al*, 2010).

### *Ιστορία*

Η ηλικία της οικογένειας Orchidaceae μέχρι πρόσφατα δεν ήταν αποσαφηνισμένη λόγω της απουσίας επαρκούς αρχείου απολιθωμάτων. Η μελέτη των σύγχρονων ειδών δε δίνει ξεκάθαρη εικόνα καθώς διαθέτουν τόσο χαρακτηριστικά που υποδεικνύουν πρόσφατη εμφάνιση της οικογένειας (π.χ. εξειδικευμένοι μηχανισμοί επικονίασης, επιφυτισμός), όσο και χαρακτηριστικά που θα ταίριαζαν σε παλαιότερη εμφάνιση (π.χ. παγκόσμια εξάπλωση, βασική θέση στην τάξη Asparagales). Η προσέγγιση του μοριακού ρολογιού επίσης έδωσε αντικρουόμενα αποτελέσματα, με διαφορετικές εργασίες να υπολογίζουν ηλικίες από 26 εκατομμύρια χρόνια πριν (26

Myr πριν) μέχρι και 110 Myr πριν (Chase, 2005, Ramírez *et al*, 2007). Η κατάσταση αυτή άλλαξε με την εύρεση, το 2000, ενός απολιθώματος ορχεοειδούς από το Μειόκαινο, διατηρημένου μαζί με τον επικονιαστή του, ένα είδος μέλισσας. Η σύγκριση του απολιθώματος αυτού με σημερινά είδη βοήθησε στην κατασκευή ενός φυλογενετικού δέντρου που έδειχνε τον πιο πρόσφατο πρόγονο των σημερινών ορχεοειδών να έχει ζήσει στο ύστερο Κρητιδικό περίπου 76 με 84 Myr πριν τουλάχιστον, με πιθανότητα να είναι ακόμα αρχαιότερος (Ramírez *et al*, 2007). Η μεγάλη ηλικία των ορχεοειδών εξηγεί και την παγκόσμια εξάπλωσή τους, ενώ έχει προταθεί ότι η διασπορά τους επηρεάστηκε από τη μετακίνηση των ηπείρων (Chase, 2005).

### **Γένος *Eripactis***

Το γένος *Eripactis* απαντάται κυρίως στην περιοχή της Ευρασιατικής ηπείρου αν και κάποια είδη του έχουν αποικίσει τη Βόρεια Αφρική και τη Βόρεια Αμερική, στη δεύτερη περίπτωση πιθανότατα μέσω ανθρωπογενούς επίδρασης (Squirrell *et al*, 2001, Hollingsworth *et al*, 2006). Ανήκει στα taxa που συνδέονται με την εκτομυκόρριζα δασικών δέντρων και πιθανώς αυτό να επηρεάζει τον αποικισμό διαφορετικών ενδιαιτημάτων και την εξάπλωσή του γένους (Ogura-Tsujita and Yukawa, 2008, Těšitelová *et al*, 2012)

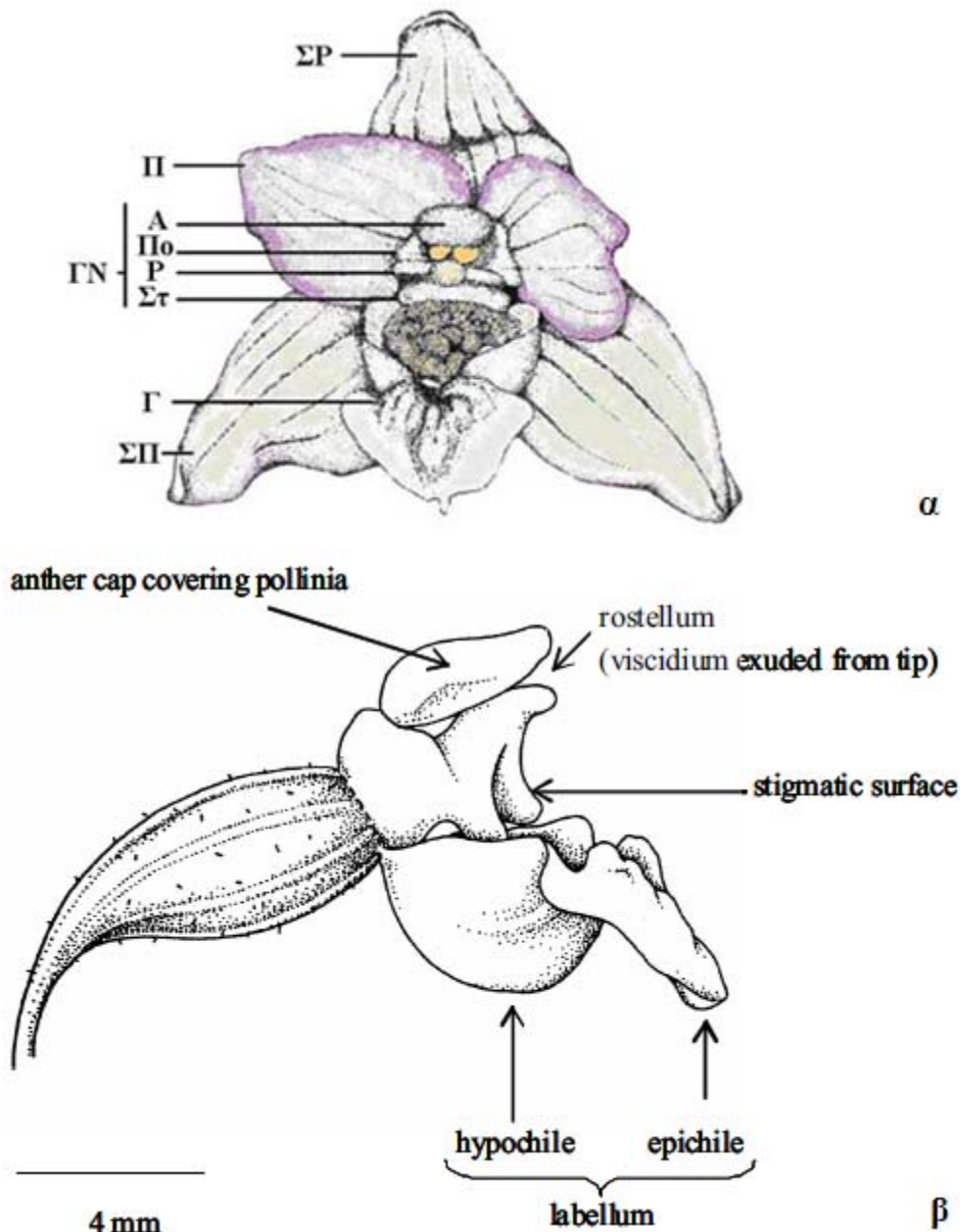
#### *Συστηματική κατάταξη*

Το γένος *Eripactis* τοποθετείται στη φυλή Neottieae της υποοικογένειας Epidendroideae. Η Neottieae, συνιστά έναν κλάδο που αποχωρίστηκε νωρίς στην εξέλιξη της υποοικογένειας (Cameron *et al*, 1999, Cameron 2004, Neubig *et al*, 2009, Gómiak *et al*, 2010). Οι ταξινομικές σχέσεις ανάμεσα στα μέλη του γένους *Eripactis* δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένες. Χαρακτηριστική είναι η εικόνα που δίνουν οι ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων της ευρωπαϊκής χλωρίδας Flora Europaea (<http://rbg-web2.rbge.org.uk/FE/fe.html>) και Euro+Med PlantBase (<http://ww2.bgbm.org/EuroPlusMed/>). Σε αυτές φαίνεται ότι πολλά taxa έχουν αλλάξει πολλές φορές όνομα ή και ταξινομικό επίπεδο ανάμεσα σε είδος, υποείδος και ποικιλία π.χ. το είδος *E. leptochila* (τρέχουσα ονομασία) έχει αναφερθεί και ως υποείδος του *E. helleborine*, ποικιλία του *E. muelleri* και ποικιλία του *E. viridiflora*. Κάποια από τα είδη έχουν μεγάλο αριθμό υποειδών και ποικιλιών τα οποία επίσης μπορεί να αντιμετωπίζονται ως ξεχωριστά είδη. Στο προηγούμενο παράδειγμα, το *E. leptochila* έχει 7 καταγεγραμμένα υποείδη και όλα έχουν χαρακτηριστεί κάποια



στιγμή ως ανεξάρτητα είδη. Επίσης, για κάποια είδη υπάρχουν πολλαπλές ονομασίες για τις οποίες δεν υπάρχει ενιαία αντιμετώπιση π.χ. το είδος *E. persica* (αποδεκτή ονομασία σύμφωνα με την Euro+Med PlantBase) ονομάζεται *E. confusa* στη Flora Europaea . Όπως αναφέρουν οι Squirrell *et al.* (2002), ο ίδιος ερευνητής (Delforge) σε δύο διαφορετικές απόπειρες καταγραφής των ειδών του γένους ανέφερε πολύ διαφορετικούς αριθμούς, με 35 είδη στην καταγραφή του 1995, και 56 στην καταγραφή του 2001, έξι μόλις χρόνια αργότερα. Γενικά, ο διαχωρισμός ανάμεσα στις μορφολογικές διαφορές που αποτελούν ενδοειδική ποικιλότητα και σε αυτές που διακρίνουν είδη στα ορχεοειδή είναι ένα ανοιχτό θέμα μεταξύ των επιστημόνων και η κατάσταση δυσκολεύει σε περίπλοκα γένη σαν το *Epipactis* (Vereecken *et al.*, 2010).

Σύμφωνα με τους Hollingsworth *et al.* (2006) τα taxa του γένους μπορούν να διακριθούν μορφολογικά σε δύο ανεπίσημες ομάδες: την ομάδα «*palustris*» και την ομάδα «*helleborine*». Η ομάδα «*helleborine*» περιλαμβάνει δύο τύπους: έναν με καλά ανεπτυγμένο ρυγχίο (δομή που διαχωρίζει τα ανδρικά από τα γυναικεία μέρη του άνθους αποτρέποντας την αυτογονιμοποίηση και εκκρίνει ιξώδη ουσία που κολλάει τη γύρη στους επικονιαστές), στον οποίο ανήκει και το επώνυμο είδος *E. helleborine*, και έναν τύπο με πιο περιορισμένο ρυγχίο, όπου προάγεται η αυτογονιμοποίηση (Εικ. 1). Σε αυτόν τον τύπο ανήκουν κυρίως οι πληθυσμοί με ασαφή ταξινομική θέση. Ακόμα, έχουν περιγραφεί πληθυσμοί με χαρακτηριστικά ανάμεσα στην ετερογονιμοποιούμενη και την αυτογονιμοποιούμενη μορφολογία, όπως το *E. youngiana* στη Βρετανία (Hollingsworth *et al.*, 2006). Πολλές από αυτές τις περιπτώσεις έχουν περιορισμένη γεωγραφική εξάπλωση και συνήθως χαρακτηρίζονται ως ενδημικά είδη (Squirrell *et al.*, 2002, Tranchida-Lombardo *et al.*, 2011).



Εικόνα 1: Μορφολογία ετερογονιμοποιούμενου άνθους *Eripractis*. α. Μπροστινή όψη *E. helleborine*. Α: ανθήρας, Γ: γλωσσάριο (επιχείλιο), ΓΝ: γυνοστήμιο, Π: πέταλα, Πo: πολλίνια, Ρ: ρυγχίο, ΣΠ: πλευρικά σέπαλα, ΣΡ: ραχιαίο σέπαλο, Στ: στίγμα (Πηγή: Cozzolino and Widmer, 2005, τροποποιημένο από Τσιφτσής, 2009). β. Πλευρική όψη ετερογονιμοποιούμενου *Eripractis*. labelium: γλωσσάριο. rostellum: ρυγχίο (Πηγή: Hollingsworth *et al*, 2006).

Οι αυτογονιμοποιούμενοι πληθυσμοί *Eripractis* πιστεύεται ότι προήλθαν από εντομόφιλους προγόνους μέσω νεοταινίας. Η αλλαγή αυτή μπορεί να αποτελεί προσαρμογή σε δυσμενείς συνθήκες οι οποίες εμποδίζουν την επικονίαση, π.χ. καθυστερώντας την ανάπτυξη των φυτών και μετατοπίζοντας την ανθοφορία τους σε

μια περίοδο όπου δεν υπάρχουν πια οι κατάλληλοι επικονιαστές. Ένα περιβάλλον στο οποίο συναντώνται πιο εύκολα αυτογονιμοποιούμενα είδη είναι οι περιοχές με μεγάλο υψόμετρο (Ehlers and Pedersen, 2000, Hollingsworth *et al*, 2006, Τσιφτσής 2009). Ακόμα και τα είδη με ετερογονιμοποιούμενη μορφολογία μπορούν να καταφύγουν σε προαιρετική αυτογονιμοποίηση αν δεν επικονιαστούν, ή όταν ιδρυτικοί πληθυσμοί αποικίζουν μία καινούρια περιοχή (Squirrell *et al*, 2001, Tałajaj and Brzosko, 2008). Μάλιστα, είναι εξαιρετικά δύσκολο να αποδοθεί σε ένα είδος *Epipactis* αποκλειστικά μία αναπαραγωγική στρατηγική, λόγω αυτής της ευελιξίας (Tałajaj and Brzosko, 2008 και βιβλιογραφία τους). Επίσης, η επιλογή της αυτογονιμοποίησης μπορεί να σχετίζεται και με την προτίμηση κάποιων ειδών για σύνδεση με τη μυκόρριζα συγκεκριμένων φυτών τα οποία όμως φύονται σε περιβάλλοντα που δεν ευνοούν την ύπαρξη επικονιαστών, όπως πυκνά δάση (Tranchida-Lombardo *et al*, 2011). Έχει προταθεί, τέλος, ένα εναλλακτικό σενάριο σύμφωνα με το οποίο ετερογονιμοποιούμενα και αυτογονιμοποιούμενα είδη που φύονται σε κοντινή απόσταση μπορούν να υβριδίσουν και να οδηγήσουν στη δημιουργία νέων αυτογονιμοποιούμενων ειδών (Hollingsworth *et al*, 2006). Δεν είναι γνωστό πόσες φορές μπορεί να έγινε η μετάβαση από την ετερογονιμοποίηση στην αυτογονιμοποίηση στο *Epipactis*, ούτε ποια από τα αυτογονιμοποιούμενα taxa προέρχονται από τον ίδιο ή διαφορετικούς κλάδους και κατά συνέπεια πόσο διακριτά είναι τελικά μεταξύ τους (Squirrell *et al*, 2002, Hollingsworth *et al*, 2006).

Από όλα τα παραπάνω φαίνεται ότι ο διαχωρισμός ανάμεσα στα μέλη του γένους *Epipactis* αποτελεί πρόσφατο εξελικτικά γεγονός (Tranchida-Lombardo *et al*, 2011) και υπάρχουν πληθυσμοί του που βρίσκονται σε κατάσταση ειδογένεσης χωρίς να έχουν φτάσει ακόμα σε γενετική σταθερότητα. Πρακτικά, αυτό σημαίνει ότι έχουν διαφοροποιηθεί αρκετά από το προγονικό είδος ώστε να αναγνωρίζονται μορφολογικά ως πιθανά διακριτά taxon, αλλά όχι αρκετά ώστε αυτό το taxon να μπορεί με ασφάλεια να χαρακτηριστεί ως ανεξάρτητο είδος ή ακόμα και υποείδος. Σε κάποιες τέτοιες περιπτώσεις όπως το υποψήφιο είδος *E. youngiana* έχει προταθεί ο χαρακτηρισμός τους ως ποικιλίες του προγονικού είδους (Hollingsworth *et al*, 2006). Συνεπώς, δεδομένου ότι η διαφοροποίηση των ειδών *Epipactis* είναι σε εξέλιξη, υπάρχουν δυσκολίες στον προσδιορισμό των ειδών του γένους που με τη σειρά του προκαλεί προβλήματα στα προγράμματα προστασίας και διαχείρισης απειλούμενων ειδών. Όταν πληθυσμοί χαρακτηρίζονται ως ξεχωριστά «είδη» χωρίς στην πραγματικότητα να διαφοροποιούνται γενετικά, δαπανώνται άδικα χρήματα και

χρόνος για την προστασία τους. Αντιθέτως, όταν γενετικά διαφοροποιημένοι πληθυσμοί κατατάσσονται στο ίδιο «είδος» δεν υφίστανται ξεχωριστή διαχείριση με αποτέλεσμα τον πιθανό αφανισμό γενετικής ποικιλότητας (Squirrell *et al*, 2002). Για το λόγο αυτό γίνεται προσπάθεια με τη χρήση των εργαλείων της μοριακής βιολογίας, ώστε να μπορέσουν να προσδιοριστούν τα γενετικά διακριτά ή μη διακριτά taxa και να καθοριστούν τα κατά το δυνατόν καταλληλότερα ταξινομικά επίπεδα για όλες τις περιπτώσεις (π.χ. Squirrell *et al*, 2002, Hollingsworth *et al*, 2006).

#### *Το γένος Epiractis στην Ελλάδα*

Λόγω της γεωγραφικής της θέσης, στην Ελλάδα απαντώνται τόσο είδη με ευρωπαϊκή εξάπλωση, όπως το *E. palustris*, όσο και με ασιατική όπως τα *E. pontica* και *E. turcica* (Από Tsiftsis, 2010). Η έρευνα πάνω στην εκπροσώπηση του γένους στην Ελλάδα είναι συνεχής: μέχρι και τα τελευταία χρόνια δημοσιεύονται αναφορές σε καινούρια taxa που δεν είχαν ξαναπεριγραφεί στον Ελλαδικό χώρο (π.χ. Tsiftsis, 2010, Antonopoulos and Tsiftsis, 2012). Η πιο πρόσφατη καταγραφή των μελών του γένους που είναι αυτοφυή στην Ελλάδα συμπεριλαμβάνεται στο έργο *Vascular plants of Greece: An annotated checklist* (Dimopoulos *et al*, 2013). Σε αυτήν περιλαμβάνονται 15 είδη και συνολικά 20 taxa (είδη και υποείδη) εκ των οποίων 5 ενδημικά, ενώ παραθέτονται και όλες οι ονομασίες που έχουν χρησιμοποιηθεί στη βιβλιογραφία και σε ποια taxa του βιβλίου αντιστοιχούν, είτε πρόκειται για συνώνυμα είδη, είτε για αλλαγή ταξινομικού επιπέδου (από είδος σε υποείδος και αντίστροφα). Αν και το γένος *Epiractis* εξαπλώνεται σε όλα τα χλωριδικά διαμερίσματα της χώρας (Dimopoulos *et al*, 2013), πολύ πλούσιες σε αριθμό taxa φαίνεται να είναι οι περιοχές της Πίνδου και της Ανατολικής Μακεδονίας (Από Antonopoulos and Tsiftsis, 2012). Στην Ελλάδα, εκτός από τα ενδημικά taxa, ιδιαίτερη προστασία χρειάζονται και όσα φύονται σε σπάνια και απειλούμενα οικοσυστήματα (π.χ. το *E. palustris* σε υγρά λιβάδια) καθώς και αυτά για τα οποία η Ελλάδα αποτελεί το όριο της γεωγραφικής τους εξάπλωσης (π.χ. *E. pontica*) (Tsiftsis *et al*, 2008).

#### *Καρυολογία*

Γενικά τα γένη της υποοικογένειας Epidendroideae δεν έχουν σταθερό αριθμό χρωμοσωμάτων. Ο πιο συχνός αριθμός ανάμεσα στα είδη του γένους *Epiractis* είναι n=20 αλλά έχουν αναφερθεί και n=18 ή 19 (D'Emérico *et al*, 1999, Bartolo *et al*, 2003, Bernardos *et al*, 2003, 2004, Felix and Guerra, 2010, Giuseppina *et al*, 2010). Οι Amich *et al*. (2007) αναφέρουν για το γένος *Epiractis* την ύπαρξη πολυπλοειδίας (τριπλοειδών, τετραπλοειδών και εξαπλοειδών πληθυσμών), ανευπλοειδίας και

γενικά χρωμοσωμικής αστάθειας. Μάλιστα, υπάρχει μεγάλη ποικιλία στο χρωμοσωμικό αριθμό και μέσα στο ίδιο είδος (π.χ εννιά διαφορετικοί αριθμοί στο είδος *E. tremolsii*:  $2n=16, 24, 32, 34, 36, 38 + 1B, 40 + 1B, 52, 60$ , Bernardos *et al*, 2003). Τα άτομα που φέρουν διαφορετικούς χρωμοσωμικούς αριθμούς, όμως, δεν εμφανίζουν διαφορές στη μορφολογία ή οικολογία τους (Bernardos *et al*, 2004). Υπάρχουν ενδείξεις ότι ο καρυότυπος του γένους προέκυψε από αρχαίους πολυπλοειδείς προγόνους με αρχικό  $n=10$  (D'Emérico *et al*, 1999).

### **DNA δείκτες στη διάκριση των φυτικών ειδών**

#### *Πλεονεκτήματα της χρήσης DNA δεικτών*

Σύμφωνα με τους Semagn *et al.* (2006) οι διάφοροι δείκτες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για διάκριση στα φυτά ανήκουν σε τρεις κατηγορίες: αυτοί που βασίζονται στην παρατήρηση (μορφολογικοί, οικολογικοί χαρακτήρες), αυτοί που βασίζονται σε προϊόντα γονιδίων (βιοχημικοί δείκτες) και αυτοί που βασίζονται σε αναλύσεις DNA (DNA δείκτες). Οι δύο πρώτες κατηγορίες αφορούν το φαινότυπο των φυτικών οργανισμών και κατά συνέπεια επηρεάζονται από περιβαλλοντικούς και αναπτυξιακούς παράγοντες. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, ανάλογα με τις συνθήκες, ο ίδιος γενότυπος να μπορεί να δώσει διαφορετικά μορφολογικά και βιοχημικά πρότυπα, ή αντίστροφα διαφορετικοί γενότυποι να μπορούν να δώσουν το ίδιο πρότυπο (Bachmann, 1994, Gnavi *et al*, 2010). Αντιθέτως, οι DNA δείκτες δεν επηρεάζονται από το περιβάλλον (Bachmann, 1994). Επίσης, η μελέτη DNA δεικτών έχει το πλεονέκτημα να απαιτεί πολύ μικρές ποσότητες φυτικού ιστού (Από Gnavi *et al*, 2010). Ένα ακόμη χαρακτηριστικό της τεχνολογίας των DNA δεικτών είναι ότι μπορεί να ανιχνεύσει το σύνολο της γενετικής διαφοροποίησης. Ενώ οι άλλες κατηγορίες αφορούν μόνο όσους πολυμορφισμούς μεταφράζονται σε λειτουργική πρωτεΐνη, ποικιλομορφία συναντάται σε ολόκληρο το γονιδίωμα, περιλαμβάνοντας κωδικοποιούσες, μη-κωδικοποιούσες και περιοχές επαναλήψεων. Όλη αυτή η πληροφορία είναι διαθέσιμη με χρήση DNA δεικτών ενώ με οποιαδήποτε άλλη μεθοδολογία παραμένει ανεκμετάλλευτη (Bachmann, 1994).

Παρόλο που οποιαδήποτε περιοχή του DNA μπορεί να δώσει μια κάποια πληροφορία για την ταξινόμική θέση του οργανισμού από τον οποίο προήλθε, εξαρτάται από τον εξελικτικό της ρυθμό το αν θα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διάκριση σε επίπεδο είδους, γένους ή υψηλότερο (Tautz *et al*, 2003).

### *Χλωροπλαστικοί δείκτες*

Η επιλογή συγκεκριμένων περιοχών DNA για τη διάκριση και ταυτοποίηση των φυτικών ειδών με τη μέθοδο του barcoding αποτελεί αντικείμενο πολλών μελετών την τελευταία δεκαετία (Hollingsworth *et al*, 2011). Το μιτοχondριακό γονίδιο *COI* που χρησιμοποιείται για τους ζωικούς οργανισμούς δεν μπορεί να δώσει ανάλογα αποτελέσματα και στα φυτά. Για το σκοπό αυτό, έχουν προταθεί πολλές περιοχές, κυρίως του χλωροπλαστικού γονιδιώματος (CBOL Plant Working Group, 2009). Η χρήση του χλωροπλαστικού DNA παρουσιάζει πλεονεκτήματα όπως τη μονογονεϊκή κληρονομηση, την παρουσία πολλών αντιγράφων στο κύτταρο, την ευκολία ενίσχυσης και αλληλούχισης και την απουσία του στα ζώα και τους μύκητες (από Cameron, 2004). Το τελευταίο χαρακτηριστικό είναι πολύ χρήσιμο στην περίπτωση των ορχεοειδών τα οποία συμβιώνουν με μύκητες και είναι πολύ εύκολο να υπάρξει επιμόλυνση των δειγμάτων με μυκητιακό DNA (από Cameron, 2004). Το Consortium for the Barcode of Life (CBOL) κατέληξε σε τρεις περιοχές του χλωροπλαστικού DNA ως τις πιο ενδεδειγμένες για barcoding στα φυτά, τις *rbcL*, *matK* και *trnH-psbA*. Καμία από αυτές όμως, δεν ανταποκρινόταν πλήρως σε όλες τις απαραίτητες προϋποθέσεις, δηλαδή την ύπαρξη παγκοσμίως εκκινητών, την καλή ποιότητα των προϊόντων αλληλούχισης και την αποτελεσματική διάκριση σε επίπεδο είδους. Έτσι, προτάθηκε η χρήση δύο περιοχών σε συνδυασμό, των *rbcL* και *matK* (CBOL Plant Working Group, 2009). Η περιοχή *matK* έχει τη μέγιστη διακριτική ικανότητα ανάμεσα στους συνήθεις δείκτες που χρησιμοποιούνται και είναι το ανάλογο του *COI* για τα φυτά, αλλά παρουσιάζει δυσκολία στην ενίσχυση με PCR. Αντίθετα, η περιοχή *rbcL* έχει αρκετά μικρότερη διαφοροποίηση μεταξύ των ειδών αλλά δίνει άριστα αποτελέσματα ενίσχυσης και αλληλούχισης για την πλειοψηφία των φυτικών οργανισμών (Hollingsworth *et al*, 2011).

Ειδικά για τα ορχεοειδή, οι Lahaye *et al*. (2008) μετά από εκτεταμένη έρευνα (>1000 διαφορετικά taxa) κατέληξαν ότι η ιδανική περιοχή για barcoding είναι η *matK*, ακολουθούμενη από την *trnH-psbA*. Βρήκαν μάλιστα, ότι για τα ορχεοειδή της Κεντρικής Αμερικής η περιοχή *matK* παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αναλογικά ποικιλότητα μεταξύ διαφορετικών ειδών σε σχέση με την αντίστοιχη μέσα στο ίδιο είδος, ένα απαραίτητο στοιχείο για barcoding. Αντίθετα, η περιοχή *rbcL* δεν έχει αρκετή ποικιλότητα στα ορχεοειδή και είναι πιο αποτελεσματική για διάκριση σε επίπεδο γένους και υψηλότερο, αν και σε αυτή την περίπτωση είναι καλό να χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με κάποιον άλλο δείκτη (Cameron *et al*, 1999).

Η περιοχή *trnL* του χλωροπλαστικού DNA χρησιμοποιείται ευρέως στη συστηματική των φυτών και τη φυλογεωγραφία. Το πλεονέκτημά της είναι η παρουσία μέσα στο γονίδιο του tRNA ενός πολυμορφικού ιντρονίου με μεγάλη διακριτική ικανότητα μεταξύ των διαφόρων ειδών, η οποία εντοπίζεται κυρίως σε μια συγκεκριμένη δομή του ιντρονίου, το βρόχο P6. Η μικρή αυτή περιοχή μπορεί να ενισχυθεί επιτυχώς ακόμα και από δείγματα με κατακερματισμένο γενετικό υλικό (Hollingsworth *et al*, 2011). Για την περιοχή αυτή έχουν σχεδιαστεί παγκόσμιοι εκκινητές, οι οποίοι λειτουργούν σε μια ευρεία ποικιλία ειδών, όχι μόνο στα σπερματόφυτα, αλλά και σε φύκη, βρύα και πτέριδες (Taberlet *et al*, 1991) και δίνουν καλή ποιότητα προϊόντων. Αυτό καθιστά το ιντρόνιο του *trnL* ένα εύχρηστο εργαλείο μελέτης ταξινομικών και εξελικτικών σχέσεων, ενώ ο βρόχος P6 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ταυτοποίηση φυτικών taxa από υποβαθμισμένο γενετικό υλικό, όπως μεταποιημένα τρόφιμα, κόπρανα ή απολιθώματα (Taberlet *et al*, 2007).

#### *Πυρηνικοί δείκτες*

Γενικά, οι φυλογενετικές έρευνες στα φυτά με τη χρήση DNA στηρίζονται κυρίως σε δείκτες που προέρχονται από το χλωροπλάστη. Δυστυχώς, όμως, η μονογονεϊκή κληρονόμηση του χλωροπλαστικού DNA σημαίνει ότι χάνονται τα δεδομένα της μιας προγονικής γραμμής. Γίνεται έτσι φανερό ότι θα πρέπει, σε αυτό το ερευνητικό πεδίο, να περιλαμβάνονται και κατάλληλοι πυρηνικοί δείκτες οι οποίοι, αν και στερούνται τα πλεονεκτήματα των χλωροπλαστικών, μπορούν να δώσουν πληροφορία και για τους δύο γονείς. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο η περιοχή ITS (Internal Transcribed Spacer) του ριβοσωμικού DNA (Álvarez and Wendel, 2003).

Η περιοχή ITS βρίσκεται ανάμεσα στα γονίδια του 18S rRNA και του 26S rRNA. Περιλαμβάνει τρία μέρη: το ITS1, το γονίδιο του 5,8S rRNA και το ITS2 (Baldwin *et al*, 1995). Ανάμεσα στα πλεονεκτήματα της συγκεκριμένης περιοχής για φυλογενετική χρήση, είναι η παρουσία πολλών αντιγράφων της στο ίδιο ή και σε άλλα χρωμοσώματα (εκατοντάδες έως και χιλιάδες στο γονιδίωμα των φυτών) και το μικρό μέγεθος στα αγγειόσπερμα που κυμαίνεται μεταξύ 500 και 700 βάσεων. Τα χαρακτηριστικά αυτά διευκολύνουν τον πολλαπλασιασμό της με τη χρήση της PCR. Επίσης, υπάρχουν ζεύγη παγκόσμιων εκκινητών, σχεδιασμένα από τους White *et al*. (1990), που μπορούν να ενισχύσουν είτε όλη την περιοχή είτε επιλεκτικά το ITS1 ή το ITS2 στην πλειοψηφία των σπερματοφύτων και μυκήτων. Η πολυμορφικότητα του ITS μπορεί να χρησιμοποιηθεί κυρίως για το διαχωρισμό μεταξύ γενών και ειδών. Είναι ενδεικτικό, το ότι μέχρι το 2003 η πλειοψηφία των δημοσιευμένων μελετών στο

επίπεδο του γένους και πιο κάτω περιελάμβαναν δεδομένα από την περιοχή ITS (Baldwin *et al*, 1995, Álvarez and Wendel, 2003).

Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της περιοχής κρύβουν όμως και μειονεκτήματα. Τα πολλαπλά αντίγραφα μπορούν να συσσωρευτούν διαφορετικές μεταλλάξεις και να διαφοροποιηθούν μεταξύ τους, δημιουργώντας παράλογα γονίδια ή ακόμα και ψευδογονίδια (Baldwin *et al*, 1995, Álvarez and Wendel, 2003). Παρά την ύπαρξη μηχανισμών ομογενοποίησής τους, έχουν αναφερθεί τέτοιες περιπτώσεις που δίνουν προβληματικά αποτελέσματα σε φυλογενετικές αναλύσεις (Baldwin *et al*, 1995, Álvarez and Wendel, 2003). Μία λύση σε αυτό είναι να γίνεται κλωνοποίηση και εντοπισμός του ορθόλογου κλώνου, η οποία όμως είναι δαπανηρή ιδίως σε μεγάλους αριθμούς δειγμάτων. Ένα άλλο πρόβλημα του ριβοσωμικού DNA είναι ότι μπορεί να δημιουργούνται δευτεροταγείς δομές που παρεμποδίζουν την ενίσχυση με PCR (Baldwin *et al*, 1995, Álvarez and Wendel, 2003). Τέλος, σε περιπτώσεις υβριδίων, μπορούν λόγω ανασυνδυασμού ανάμεσα στο πατρικό και το μητρικό DNA να προκύψουν χμιαϊκές ακολουθίες ITS που επίσης περιπλέκουν τη φυλογενετική ανάλυση (Baldwin *et al*, 1995, Álvarez and Wendel, 2003).

#### *Μέθοδοι εντοπισμού πολυμορφισμών στο DNA*

Έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι εντοπισμού των διαφορών σε περιοχές DNA όπως οι RAPD, AFLP κ.ά. (Arif *et al*, 2010). Εδώ θα αναφερθούν δύο: η PCR-RFLP και η αλληλούχιση (sequencing).

Η μέθοδος του πολυμορφισμού μήκους περιοριστικών τμημάτων (Restriction Length Fragment Polymorphism, RFLP) βασίζεται στην ιδιότητα των ενζύμων (ενδονουκλεασών) περιορισμού να αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες μέσα στο DNA και να τις κόβουν. Έτσι ένα τμήμα DNA που περιέχει έναν αριθμό θέσεων αναγνώρισης και κοπής από κάποιο ένζυμο θα κοπεί από αυτό το ένζυμο σε κομμάτια συγκεκριμένου μήκους που αποτελούν το πρότυπο πέψης αυτού του τμήματος από το συγκεκριμένο ένζυμο. Με τη μέθοδο αυτή εντοπίζονται δύο ειδών πολυμορφισμοί. Αρχικά, πολυμορφισμοί που προκαλούν αύξηση ή μείωση του αριθμού των βάσεων (π.χ. διπλασιασμοί, ελλείμματα) ανάμεσα στις θέσεις κοπής θα δώσουν τμήματα διαφορετικού μήκους από ότι στο πρότυπο. Επιπλέον, μεταλλάξεις στις θέσεις αναγνώρισης του ενζύμου οδηγούν σε απώλεια θέσεων κοπής και κατά συνέπεια αλλαγή στο πρότυπο πέψης. Επίσης, είναι δυνατή η δημιουργία μιας καινούριας θέσης από μετάλλαξη σε σημείο που δεν υπήρχε, κάτι που αλλάζει επίσης το πρότυπο πέψης. Η μέθοδος αυτή μπορεί να εφαρμοστεί σε ολόκληρο γονιδίωμα ή σε



συγκεκριμένες περιοχές που έχουν ενισχυθεί με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR), και στη δεύτερη περίπτωση ονομάζεται PCR-RFLP (Τριανταφυλλίδης, 2006).

Με την αλληλούχιση (sequencing) γίνεται εύρεση της πρωτοταγούς δομής ενός τμήματος DNA. Χρησιμοποιείται η μέθοδος κατά Sanger σύμφωνα με την οποία η ακολουθία-αντικείμενο μελέτης πολλαπλασιάζεται με τη χρήση ενός μίγματος νουκλεοτιδίων στο οποίο περιλαμβάνονται διδεοξυ-νουκλεοτίδια επισημασμένα με φθορίζουσα χρωστική διαφορετικού χρώματος για κάθε βάση. Η προσθήκη διδεοξυ-νουκλεοτιδίου αντί για κανονικό μπορεί να γίνει σε οποιοδήποτε σημείο του νεοσχηματιζόμενου κλώνου και τερματίζει την επιμήκυνσή του. Έτσι, παράγονται κλώνοι σε όλα τα πιθανά μεγέθη με σημασμένη την τελευταία τους βάση. Οι κλώνοι αυτοί ηλεκτροφορούνται σε πηκτή που διαχωρίζει τμήματα με διαφορά ενός νουκλεοτιδίου και αφού διαχωριστούν σαρώνονται με λέιζερ και αναγνωρίζεται το χρώμα της χρωστικής τους και άρα η αντίστοιχη βάση. Η διαδικασία πραγματοποιείται σε σύγχρονα μηχανήματα, τους αυτόματους αναλυτές αλληλουχιών που μπορούν να αναλύσουν ταυτόχρονα 96 δείγματα. Είναι φανερό ότι με αυτή τη μέθοδο, εφόσον προσδιορίζεται ολόκληρη η ακολουθία, εντοπίζονται όλοι οι πολυμορφισμοί τους οποίους περιλαμβάνει (Τριανταφυλλίδης, 2006, Arif *et al*, 2010).

### **Σκοπός**

Η μελέτη του γένους *Epipactis* με DNA δείκτες στη βιβλιογραφία είναι σχετικά μικρή. Ειδικά για τους πληθυσμούς της Ελλάδας υπάρχει μόνο μία αναφορά, η οποία αφορούσε αποκλειστικά δύο είδη (Δρούζας και Τσιφτσής, 2011). Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο εντοπισμός πολυμορφισμών DNA, με χρήση δεικτών PCR-RFLP και αλληλούχισης, ικανών να διακρίνουν taxa του γένους *Epipactis*, αυτοφυή της Ελλάδας.



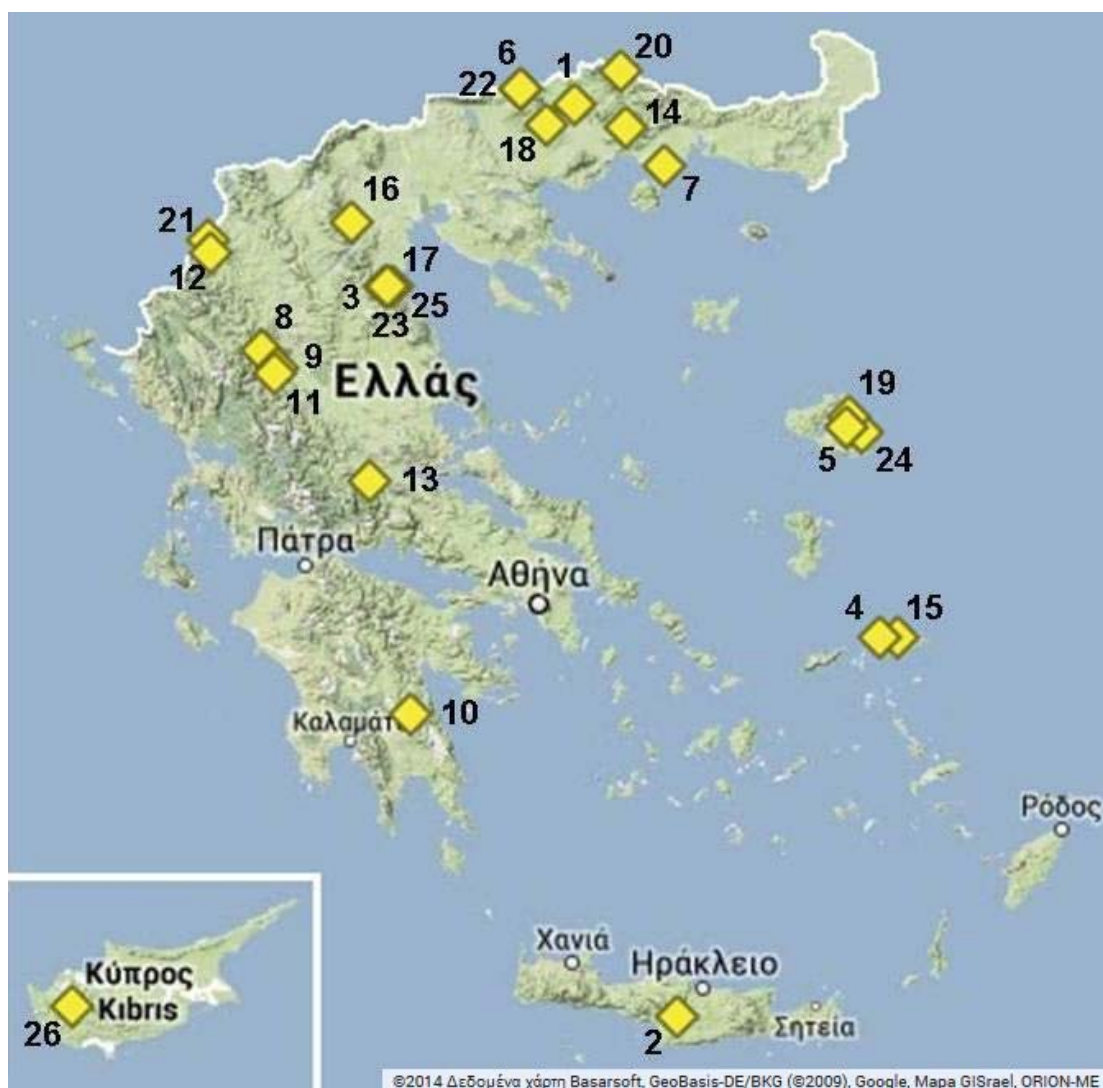
# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## Φυτικό υλικό

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν κατεψυγμένα φύλλα από άτομα αντιπροσωπευτικά διαφόρων taxa του γένους *Epipactis* που συλλέχθηκαν από το Δρ. Σπύρο Τσιφτσή. Η αναγνώριση των taxa έγινε από το Δρ. Σπύρο Τσιφτσή με βάση μορφολογικούς δείκτες και σύμφωνα με τα συγγράμματα των Kreutz (2004), Baumann *et al.* (2006) και Delforge (2006). Τα δείγματα προέρχονταν από συνολικά 26 διαφορετικούς πληθυσμούς, οι 24 εκ των οποίων ήταν αντιπροσωπευτικοί 21 taxa του γένους, αυτοφυών της Ελλάδος. Για τον 25<sup>ο</sup> πληθυσμό δεν ήταν δυνατή η συστηματική του κατάταξη με βάση μορφολογικούς χαρακτήρες και ερευνήθηκε η πιθανότητα ταυτοποίησής του με τη χρήση των DNA δεικτών. Επιπλέον των ελληνικών πληθυσμών, αναλύθηκε και ένας πληθυσμός του ενδημικού είδους της Κύπρου *Epipactis troodi* (Πίν. 2 και Εικ. 2).

Πίνακας 2: Οι 26 πληθυσμοί που εξετάστηκαν ανά taxon και αριθμός ατόμων ανά πληθυσμό. Με \* τα taxa που αναφέρονται ως ενδημικά της Ελλάδας στους Dimopoulos *et al.* (2013)

Πληθυσμός	Taxon	Αριθμός ατόμων
1	<i>Epipactis atrorubens</i>	10
2	<i>E. cretica*</i>	10
3	<i>E. degenii*</i>	10
4	<i>E. densifolia</i> (πληθ. α')	10
5	<i>E. densifolia</i> (πληθ. β')	11
6	<i>E. distans</i>	10
7	<i>E. gracilis</i> (πληθ. α')	10
8	<i>E. gracilis</i> (πληθ. β')	10
9	<i>E. greuteri</i>	10
10	<i>E. halacsyi*</i>	12
11	<i>E. helleborine</i> (πληθ. α')	10
12	<i>E. helleborine</i> (πληθ. β')	10
13	<i>E. heraclea</i>	9
14	<i>E. leptochila ssp. neglecta</i>	10
15	<i>E. microphylla</i>	10
16	<i>E. nauosaensis</i>	10
17	<i>E. olympica*</i>	10
18	<i>E. palustris</i>	10
19	<i>E. persica</i>	10
20	<i>E. pontica</i>	10
21	<i>E. purpurata</i>	11
22	<i>E. spiridonovii</i>	10
23	<i>E. subclausa</i>	10
24	<i>E. turcica</i>	4
25	<i>Epipactis</i> sp.	10
26	<i>E. troodi</i>	12
<b>Σύνολο ατόμων</b>		<b>259</b>



Εικόνα 2: Χάρτης με τις τοποθεσίες συλλογής του υλικού που χρησιμοποιήθηκε. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στους πληθυσμούς του πίνακα 2 (Δημιουργήθηκε με χρήση του εργαλείου Χάρτες Google, <https://maps.google.com/>).

Τμήμα του φύλλου από κάθε άτομο (περίπου 100 mg) λειοτριβήθηκε με υγρό άζωτο από το οποίο στη συνέχεια απομονώθηκε ολικό γονιδιωματικό DNA με το πρωτόκολλο των Doyle και Doyle (1987), με μικρές τροποποιήσεις. Το προϊόν της απομόνωσης ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αραρόζης 0,8 % και η συγκέντρωση του γενετικού υλικού υπολογίστηκε με φασματοφωτομέτρηση σε συσκευή NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific Inc.).

## Ενίσχυση DNA

Μελετήθηκαν οι χλωροπλαστικές περιοχές *trnL*, *matK* και *trnH-psbA* και η πυρηνική περιοχή του ριβοσωμικού DNA ITS. Οι εκκινητές ήταν σύμφωνα με τους Taberlet *et al.* (1991), Cuénot *et al.* (2002), Karaka *et al.* (2008) και White *et al.* (1990) αντίστοιχα. Η αντίδραση της PCR και για τις τέσσερις περιοχές έγινε σε τελικό όγκο 25 µl που περιελάμβαναν:

- ❖ για το *trnL*: 10 ng γονιδιωµατικού DNA, 1X ρυθµιστικό διάλυµα (PCR Buffer), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 0,4 µM από κάθε εκκινητή και 0,5 U Taq πολυµεράση·
- ❖ για τους άλλους δύο χλωροπλαστικούς τόπους: 25 ng γονιδιωµατικού DNA, 1X PCR Buffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 0,2 µM από κάθε εκκινητή και 1 U Taq πολυµεράση·
- ❖ για το ITS: 25 ng γονιδιωµατικού DNA, 1X PCR Buffer, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,15 mM dNTPs, 0,2 µM από κάθε εκκινητή και 1 U Taq πολυµεράση (Πίν. 3).

Οι συνθήκες ενίσχυσης όλων των PCR φαίνονται στον πίνακα 4.

Πίνακας 3: Σύσταση του διαλύµατος ενίσχυσης για τις τέσσερις περιοχές που µελετήθηκαν

Γενετικός τύπος	<i>trnL</i>	<i>matK</i>	<i>trnH-psbA</i>	ITS
Γονιδιωµατικό DNA	10 ng	25 ng	25 ng	25 ng
PCR Buffer	1X	1X	1X	1X
MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM	2 mM	2 mM	1,5 mM
dNTPs	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM	0,15 mM
Forward εκκινητής	0,4 µM	0,2 µM	0,2 µM	0,2 µM
Reverse εκκινητής	0,4 µM	0,2 µM	0,2 µM	0,2 µM
Taq πολυµεράση	0,5 U	1 U	1 U	1 U
ddH <sub>2</sub> O	Μέχρι τα 25 µl	Μέχρι τα 25 µl	Μέχρι τα 25 µl	Μέχρι τα 25 µl

Πίνακας 4: Εκκινητές και συνθήκες ενίσχυσης που χρησιμοποιήθηκαν για τις τέσσερις περιοχές που μελετήθηκαν

Τύπος	Εκκινητές	Αρχική αποδιάταξη	Φάση κύκλων			Αριθμός κύκλων	Τελική επιμήκυνση
			Αποδιάταξη	Σύνδεση εκκινητών	Επιμήκυνση		
<i>trnL</i>	trnL c: 5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3'	94° C	92° C	55° C	72° C	30	72° C
	trnL d: 5'-GGGGATAGAGGGACTTGAAC-3' (Taberlet <i>et al</i> , 1991)	4 min	30 sec	30 sec	2 min		10 min
<i>matK</i>	matK 390F: 5'-CGATCTATTCAATTCAATATTTTC-3'	94° C	94° C	53° C	72° C	35	72° C
	matK 1326R: 5'-TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT-3' (Cuénoud <i>et al</i> , 2002)	7 min	45 sec	30 sec	1 min		7 min
<i>trnH-psbA</i>	trnH Salvia: 5'-TGATCCCACTTGGCTACATCCGCC-3'	94° C	94° C	55° C	72° C	35	72° C
	psbA Salvia: 5'-GCTAACCTTGGTATGGAAGT-3' (Karaka <i>et al</i> , 2008)	3 min	45 sec	45 sec	2 min		3 min
ITS	ITS 4p: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	94° C	94° C	52,5° C	72° C	30	72° C
	ITS 5p: 5'-GGAAGGAGAAGTCGTAACAAG-3' (White <i>et al</i> , 1990)	4 min	1 min	1 min	1,5 min		5 min

## PCR-RFLP

Η μέθοδος PCR-RFLP εφαρμόστηκε σε όλους τους τόπους που μελετήθηκαν. Χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα περιορισμού *MboI* (TaKaRa), *HinfI* (Fermentas), *BccI* (NEB) και *HaeIII* (TaKaRa) όπως φαίνεται στον πίνακα 5. Με εξαίρεση το *MboI*, η επιλογή των ενζύμων έγινε με βάση τις κατατεθειμένες αλληλουχίες στη βάση δεδομένων GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) των συγκεκριμένων περιοχών σε taxa του γένους *Eripactis*. Δημιουργήθηκαν χάρτες περιορισμού αυτών των αλληλουχιών με το λογισμικό BioEdit version 7.2.0 (Hall, 1999) και επιλέχθηκαν ένζυμα που να δίνουν ζώνες που μπορούν να διαχωριστούν σε ηλεκτροφόρηση αгарόζης. Αντίθετα, η επιλογή της πέψης *trnL-MboI* έγινε επειδή είχε ήδη χρησιμοποιηθεί σε taxa του γένους *Eripactis* στη βιβλιογραφία (Squirrell *et al*, 2001, 2002, Hollingsworth *et al*, 2006, Δρούζας και Τσιφτσής, 2011). Κάποια από τα δείγματα δεν χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη πέψη, αλλά υποβλήθηκαν σε αλληλούχιση της ίδιας περιοχής (βλ. παρακάτω). Επίσης, ενώ με τις πέψεις των περιοχών *matK* και ITS εξετάστηκαν όλα τα δείγματα που είχαν ενισχυθεί επιτυχώς στην PCR, για την πέψη του *trnH-psbA* έγινε επιλογή 3-4 δειγμάτων ανά taxon. Επιλέχθηκαν τα δείγματα που προέρχονταν από τα ίδια άτομα που αλληλουχήθηκαν για το *trnL* με ελάχιστες αντικαταστάσεις όπου δεν υπήρχε ενισχυμένο προϊόν από την PCR (Πίν. 5).

Πίνακας 5: Πέψεις περιορισμού και αριθμός ατόμων ανά taxon στα οποία πραγματοποιήθηκαν

Taxon	<i>trnL-MboI</i>	<i>matK-HinfI</i>	<i>matK-BccI</i>	<i>trnH-psbA-HinfI</i>	ITS- <i>HinfI</i>	ITS- <i>HaeIII</i>
<i>Epipactis atrorubens</i>	9	8	8	4	10	10
<i>E. cretica</i>	8	10	10	5	10	10
<i>E. degenii</i>	10	10	10	2	9	9
<i>E. densifolia</i>	21	20	20	7	20	20
πληθ. α'	10	9	9	2	9	9
πληθ. β'	11	11	11	5	11	11
<i>E. distans</i>	2	2	2	4	3	3
<i>E. gracilis</i>	19	20	18	5	19	19
πληθ. α'	9	10	9	3	9	9
πληθ. β'	10	10	9	2	10	10
<i>E. greuteri</i>	8	10	10	4	8	8
<i>E. halacsyi</i>	1	3	3	3	4	4
<i>E. helleborine</i>	16	17	15	5	16	16
πληθ. α'	10	10	10	5	10	10
πληθ. β'	6	7	5	-	6	6
<i>E. heraclea</i>	7	8	8	4	9	9
<i>E. leptochila ssp. neglecta</i>	9	9	9	4	10	10
<i>E. microphylla</i>	8	10	10	5	10	10
<i>E. nauosaensis</i>	10	10	10	4	10	10
<i>E. olympica</i>	8	9	9	2	9	9
<i>E. palustris</i>	8	10	9	4	10	10
<i>E. persica</i>	8	10	10	3	10	10
<i>E. pontica</i>	10	10	10	4	10	10
<i>E. purpurata</i>	5	3	3	2	11	11
<i>E. spiridonovii</i>	10	9	9	4	3	3
<i>E. subclausa</i>	10	10	10	2	8	8
<i>E. turcica</i>	2	4	4	4	4	4
<i>Epipactis sp.</i>	8	10	10	4	10	10
<i>E. troodi</i>	-	-	-	-	5	7

Το διάλυμα περιορισμού περιελάμβανε >500 ng PCR product, 1X Buffer και 1 U του ενζύμου για τις πέψεις των *trnL*, *matK* και ITS και 0,75 U του ενζύμου για την πέψη του *trnH-psbA*. Η επώαση έγινε στους 37° C για 3 h στην πέψη *trnL-MboI* και 3,5 h για όλες τις υπόλοιπες. Τα αποτελέσματα των πέψεων ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 3 % για την πέψη *trnL-MboI*, 3,5 % για την πέψη *matK-HinfI*, 2,5 % για την πέψη *matK-BccI* και 4 % για τις πέψεις *trnH-psbA-HinfI*,



ITS-*Hinf*I και ITS-*Hae*III. Σε όλες χρησιμοποιήθηκε σκάλα DNA (ladder) 100 bp. Η κινητικότητα των ζωνών τόσο των πέψεων όσο και του ladder στις φωτογραφίες μετρήθηκε με το λογισμικό ImageJ version 1.47 (διαθέσιμο από <http://imagej.nih.gov/ij/>) και στη συνέχεια, με βάση αυτήν, υπολογίστηκαν κατά προσέγγιση τα μήκη των ζωνών των πέψεων με τη βοήθεια του λογισμικού DNAFRAG version 3.03 (Schaffer and Sederoff, 1981).

### Αλληλούχιση (sequencing)

Σε 88 από τα δείγματα (4-5 από κάθε taxon), για την περιοχή *trnL*, πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση (Πίν. 6), από την εταιρία Beckman Coulter Genomics. Από αυτά, 1-2 από κάθε πληθυσμό είχαν εξεταστεί και με τη μέθοδο PCR-RFLP για λόγους σύγκρισης. Ο έλεγχος των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης και η επεξεργασία τους έγιναν με τη βοήθεια των λογισμικών BioEdit και Geneious version 5.0.3 (created by Biomatters. Available from <http://www.geneious.com/>). Με το πρώτο λογισμικό έγινε και η ευθυγράμμιση των ακολουθιών που προέκυψαν με τη χρήση του αλγόριθμου ClustalW (Larkin *et al*, 2007).

Πίνακας 6: Αριθμός ατόμων ανά taxon στα οποία πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση

Taxon	Αριθμός ατόμων	Πληθυσμός	Αριθμός ατόμων
<i>Epipactis atrorubens</i>	4	<i>E. heraclea</i>	4
<i>E. cretica</i>	4	<i>E. leptochila ssp. neglecta</i>	4
<i>E. degenii</i>	3	<i>E. microphylla</i>	4
<i>E. densifolia</i>	4	<i>E. nauosaensis</i>	4
πληθ. α'	2	<i>E. olympica</i>	4
πληθ. β'	2	<i>E. palustris</i>	4
<i>E. distans</i>	5	<i>E. persica</i>	4
<i>E. gracilis</i>	5	<i>E. pontica</i>	4
πληθ. α'	3	<i>E. purpurata</i>	5
πληθ. β'	2	<i>E. spiridonovii</i>	4
<i>E. greuteri</i>	4	<i>E. subclausa</i>	4
<i>E. halacsyi</i>	1	<i>E. turcica</i>	4
<i>E. helleborine</i>	5	<i>Epipactis</i> sp.	4
πληθ. α'	3	<i>E. troodi</i>	-
πληθ. β'	2	<b>Σύνολο</b>	<b>88</b>

Στη συνέχεια, κατασκευάστηκε φυλογενετικό δέντρο με τη μέθοδο Neighbor-Joining (Saitou and Nei, 1987) χρησιμοποιώντας το λογισμικό MEGA version 6.06 (Tamura *et al*, 2013).

Τέλος, έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων της παρούσας αλληλούχισης με τη βιβλιογραφία. Δύο εργασίες έχουν πραγματοποιήσει αλληλούχιση της περιοχής *trnL* σε taxa του γένους *Epiractis*, αυτές των Squirrell *et al.* (2002) και Jakubska-Busse *et al.* (2012). Οι ακολουθίες που προέκυψαν από εκείνες τις μελέτες εντοπίστηκαν στη βάση δεδομένων GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>) και ευθυγραμμίστηκαν με αυτές τις παρούσας εργασίας με χρήση του λογισμικού BioEdit.

# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

## PCR

Τα ποσοστά επιτυχίας της PCR ήταν σε γενικές γραμμές υψηλά, για όλους τους τόπους (Πίν. 7). Χαμηλά ποσοστά ενίσχυσης παρατηρήθηκαν κυρίως σε συγκεκριμένους πληθυσμούς. Το μεγαλύτερο πρόβλημα παρουσίασε το κυπριακό είδος *Epiractis troodi*, για το οποίο η ενίσχυση με τρία από τα τέσσερα ζεύγη των εκκινητών δεν ήταν δυνατή, παρ' όλες τις προσπάθειες σε διάφορες συνθήκες αντίδρασης.

Πίνακας 7: Ποσοστά επιτυχίας ενίσχυσης ανά taxon και γενετικό τόπο

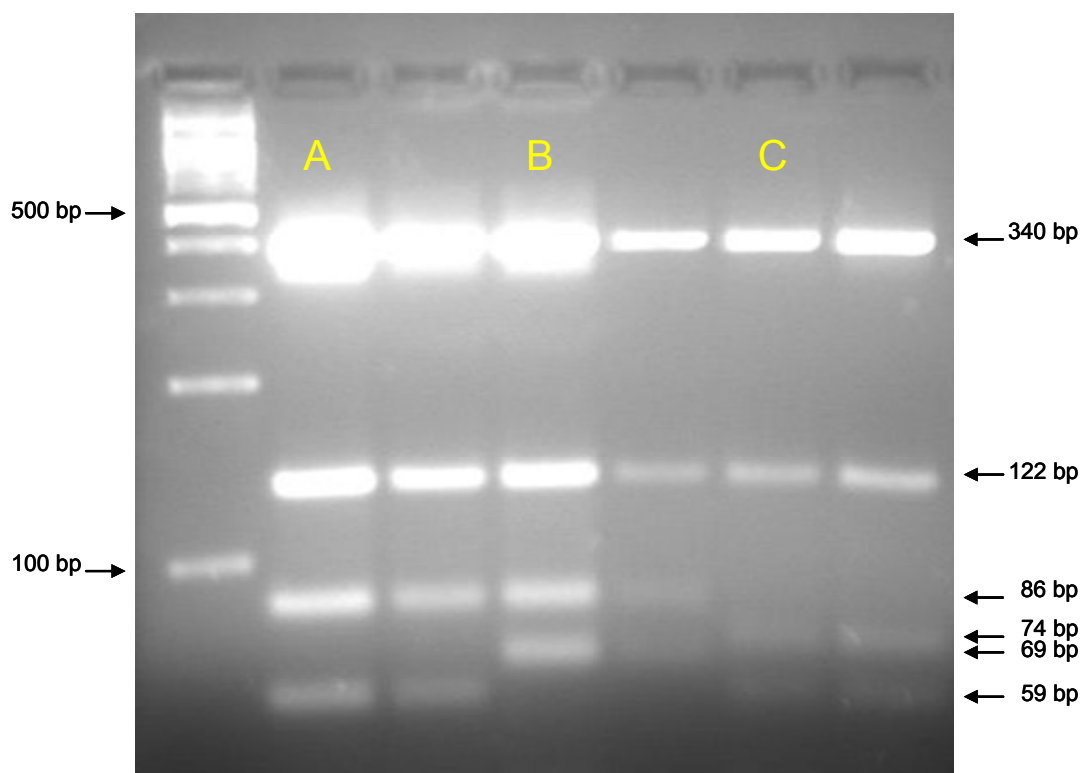
Taxon	<i>trnL</i>	<i>matK</i>	<i>trnH-psbA</i>	ITS	Σύνολο
<i>Epipactis atrorubens</i>	100 %	80 %	70 %	100 %	87,5 %
<i>E. cretica</i>	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
<i>E. degenii</i>	100 %	100 %	20 %	90 %	77,5 %
<i>E. densifolia</i>	100 %	95,24 %	95,24 %	95,24 %	96,43 %
πληθ. α'	100 %	90 %	90 %	90 %	92,5 %
πληθ. β'	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
<i>E. distans</i>	50 %	20 %	20 %	30 %	30 %
<i>E. gracilis</i>	100 %	100 %	75 %	95 %	92,5 %
πληθ. α'	100 %	100 %	70 %	90 %	90 %
πληθ. β'	100 %	100 %	80 %	100 %	95 %
<i>E. greuteri</i>	100 %	100 %	90 %	80 %	92,5 %
<i>E. halacsyi</i>	8,33 %	25 %	25 %	33,33 %	22,92 %
<i>E. helleborine</i>	85 %	85 %	50 %	50 %	67,5 %
πληθ. α'	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
πληθ. β'	70 %	70 %	0 %	0 %	35 %
<i>E. heraclea</i>	100 %	88,89 %	100 %	100 %	97,22 %
<i>E. leptochila ssp. neglecta</i>	100 %	90 %	90 %	100 %	95 %
<i>E. microphylla</i>	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
<i>E. nauosaensis</i>	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
<i>E. olympica</i>	100 %	90 %	80 %	90 %	90 %
<i>E. palustris</i>	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
<i>E. persica</i>	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
<i>E. pontica</i>	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
<i>E. purpurata</i>	63,64 %	27,27 %	18,18 %	90,91 %	50 %
<i>E. spiridonovii</i>	100 %	90 %	90 %	30 %	77,5 %
<i>E. subclausa</i>	100 %	100 %	80 %	80 %	90 %
<i>E. turcica</i>	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
<i>Epipactis</i> sp.	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
<i>E. troodi</i>	0 %	0 %	0 %	58,33 %	14,58 %
<b>Σύνολο</b>	<b>86,49 %</b>	<b>81,85 %</b>	<b>72,2 %</b>	<b>82,24 %</b>	<b>78,96 %</b>

Η ενίσχυση της περιοχής ITS έδωσε σε πολλά δείγματα πολλαπλές ζώνες, οι οποίες δε στάθηκε δυνατόν να απαλειφθούν με αλλαγή των συνθηκών της PCR, αλλά η ύπαρξή τους δεν επηρέασε τα αποτελέσματα.

## PCR-RFLP

### Περιοχή *trnL*

Η πέψη με το ένζυμο *MboI* έδωσε τρία διαφορετικά πρότυπα ζωνών, τα A, B και C (Εικ. 3). Και τα τρία περιλαμβάνουν τρεις κοινές ζώνες στις 340-342, 122 και 29 (δε φαίνεται στην εικόνα) βάσεις και δύο επιπλέον στις οποίες διαφοροποιούνται. Οι ζώνες αυτές, στο πρότυπο A έχουν μήκος 86 και 59 βάσεων, στο πρότυπο B, 86 και 69 βάσεων και στο πρότυπο C, 74 και 59 βάσεων. Συμπερασματικά (βλ. και σελ. 44), στα δείγματα που παρουσιάζουν το πρότυπο B υπάρχει ένας διπλασιασμός 10 βάσεων που απουσιάζει από τα άλλα δύο πρότυπα, ενώ σε αυτά που εμφανίζουν το πρότυπο C παρουσιάζεται ένα έλλειμμα 12 βάσεων σε σχέση με τα άλλα δύο πρότυπα (αναλυτικά τα ποσοστά εμφάνισης του κάθε προτύπου ανά taxon στη σελ. 45)

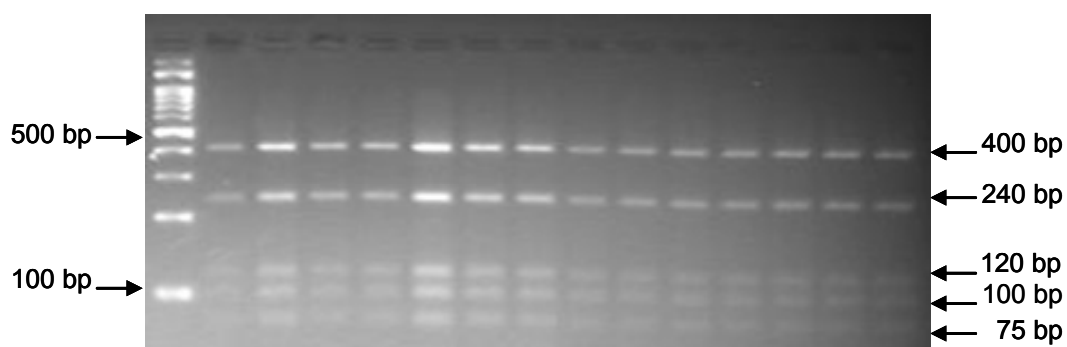


Εικόνα 3: Τα τρία πρότυπα πέψης *trnL-MboI*, A, B και C. Από αριστερά: Ladder 100 bp, *E. microphylla*, *E. densifolia* (δύο δείγματα), *E. greuteri* και *E. palustris* (δύο δείγματα).

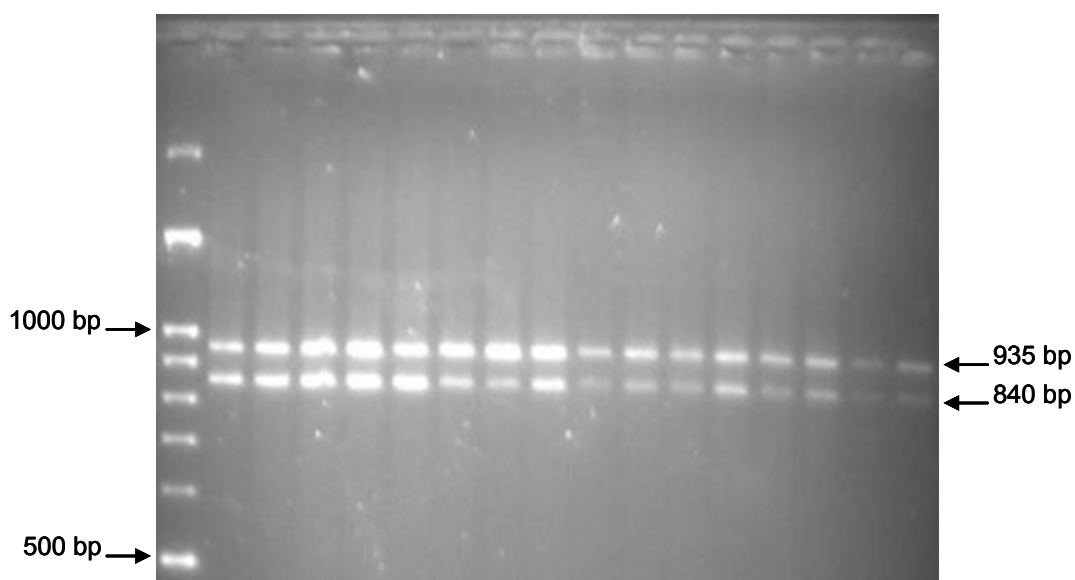
### Περιοχή *matK*

Η περιοχή *matK* δεν έδειξε πολυμορφισμό σε κανέναν από τους δύο PCR-RFLP δείκτες που μελετήθηκαν. Το ένζυμο *HinfI* έδωσε ένα πρότυπο πέντε ζωνών 400, 240, 120, 100 και 75 βάσεων περίπου (Εικ. 4). Το ένζυμο *BccI* έδωσε δύο ζώνες 840 και 95 (δε φαίνεται στη φωτογραφία) βάσεων περίπου, ενώ σε όλα τα δείγματα η πέψη

ήταν μερική (Εικ. 5). Το άπεπτο προϊόν της PCR δεν ήταν δυνατόν να απομακρυνθεί ακόμα και με αύξηση στη συγκέντρωση του ενζύμου.



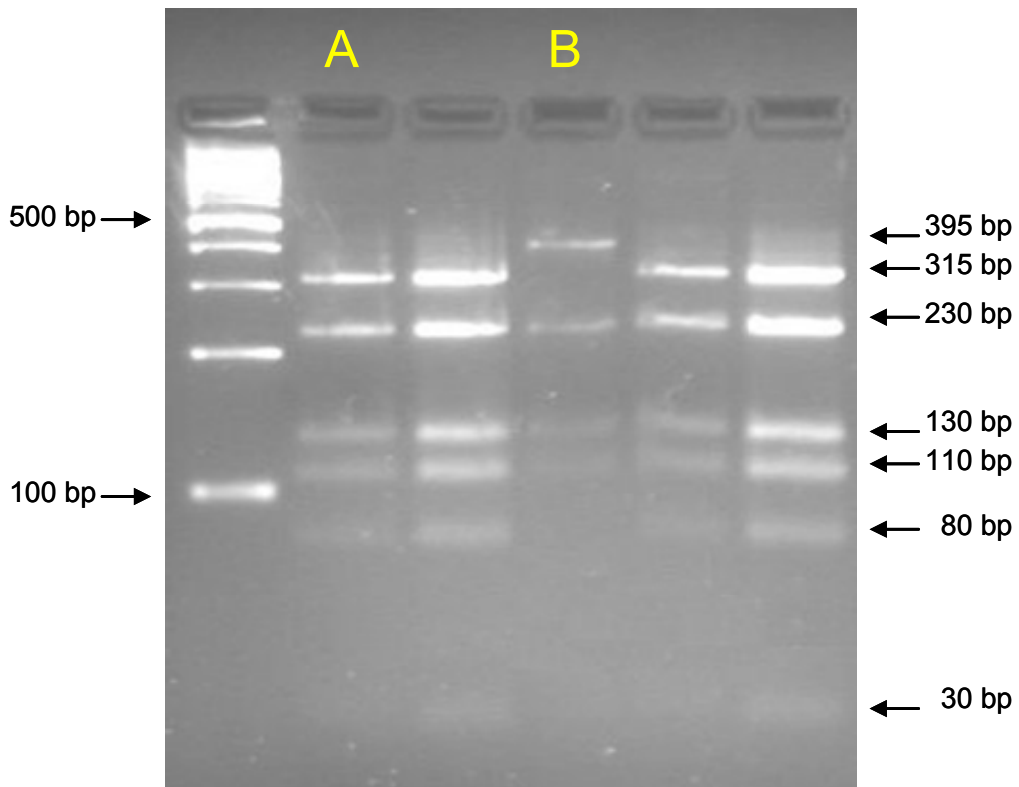
Εικόνα 4: Πρότυπο πέψης *matK-HinfI*.



Εικόνα 5: Πρότυπο πέψης *matK-BclI*. Προκύπτουν δύο ζώνες 840 και 95 (δε φαίνεται στην εικόνα) βάσεων. Στις 935 βάσεις το άπεπτο προϊόν της PCR.

#### Περιοχή *trnH-psbA*

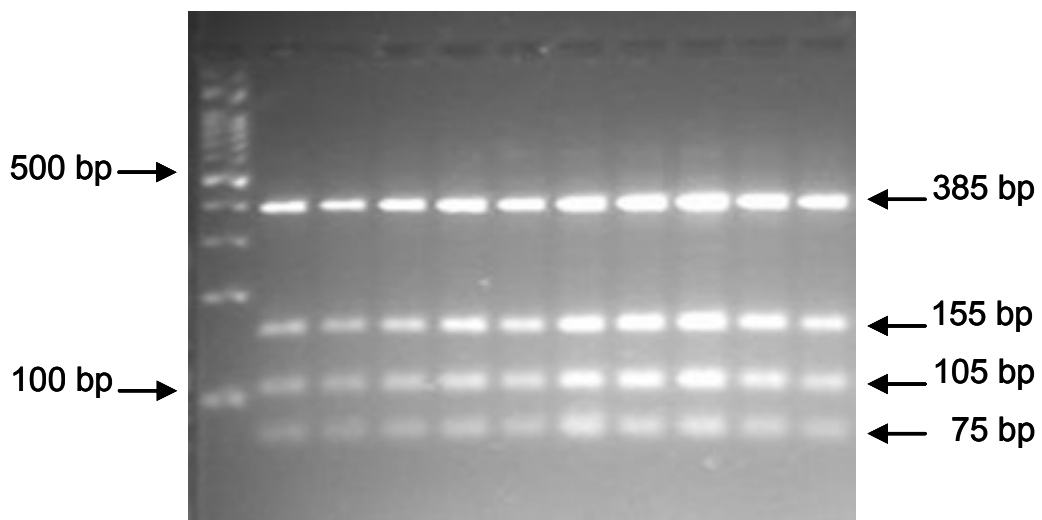
Η πέψη *trnH-psbA-HinfI* έδωσε δύο αλληλόμορφα, τα A και B (Εικ. 6), εκ των οποίων το δεύτερο απαντώνταν αποκλειστικά στα άτομα *E. palustris* και τα χαρακτήριζε όλα. Μετά τον υπολογισμό του μήκους των ζωνών φάνηκε ότι το αλληλόμορφο αυτό προκύπτει από την απώλεια μιας θέσης κοπής ανάμεσα σε δύο ζώνες 315 και 80 βάσεων περίπου με αποτέλεσμα την εμφάνιση μιας ζώνης των 395 βάσεων. Οι υπόλοιπες ζώνες, κοινές και στα δύο πρότυπα ήταν στις 230, 130, 110 και 30 βάσεις περίπου. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, το πρότυπο B διαχωρίζει το είδος *E. palustris* από τα υπόλοιπα που εξετάστηκαν.



Εικόνα 6: Πρότυπα πέψης *trnH-psbA-HinI*. Από αριστερά: Ladder 100 bp, *Eripactis atrorubens*, *E. helleborine*, *E. palustris*, *E. leptochila ssp. neglecta* και *E. heraclea*.

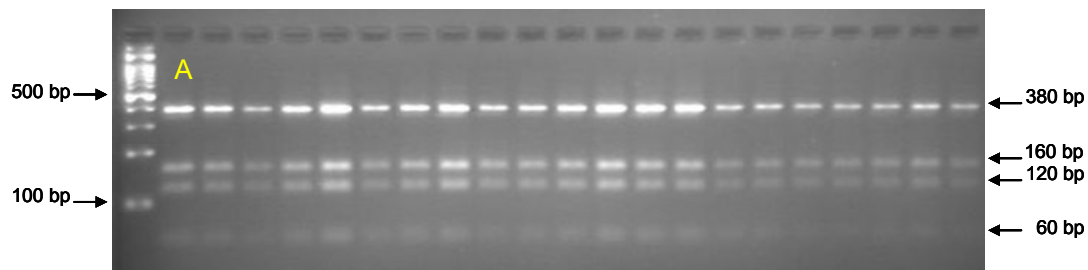
### Περιοχή ITS

Η πέψη της περιοχής ITS με το ένζυμο περιορισμού *HinI* δεν έδωσε καθόλου πολυμορφισμό, καθώς όλα τα δείγματα εμφάνισαν τις ίδιες ζώνες στις 385, 155, 105 και 75 βάσεις περίπου (Εικ. 7).



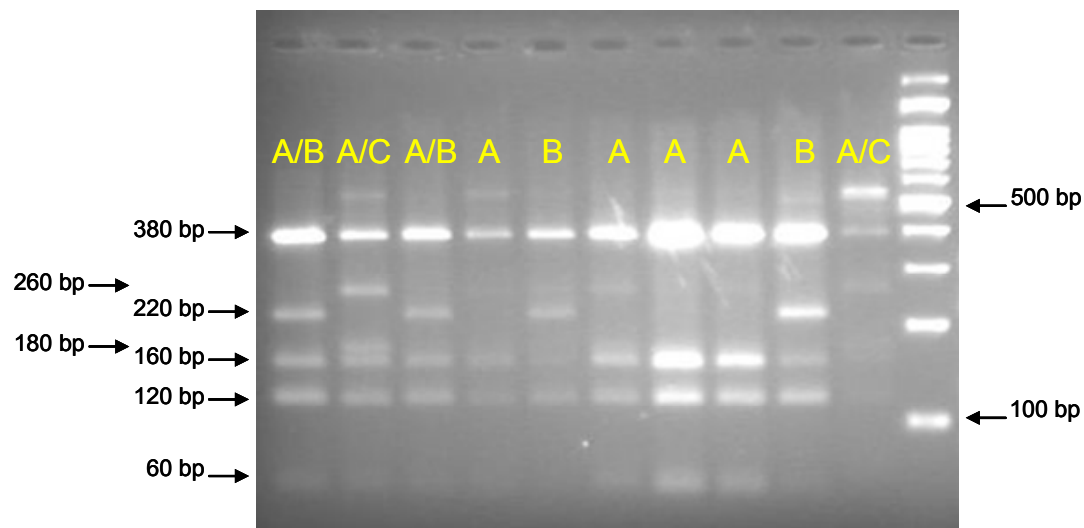
Εικόνα 7: Πρότυπο πέψης ITS-*HinI*.

Μετά την πέψη με το ένζυμο *Hae*III, τα περισσότερα taxa έδωσαν το ίδιο πρότυπο με τέσσερις ζώνες στις 380, 160, 120 και 60 βάσεις περίπου (Εικ. 8).



Εικόνα 8: Πρότυπο A της πέψης ITS-*Hae*III στα περισσότερα taxa του γένους *Epiractis*.

Ωστόσο στο είδος *E. nauosaensis* παρουσιάστηκαν και κάποια πρότυπα επιπλέον του A, μερικά από τα οποία προέρχονταν από την ύπαρξη ετεροζυγωτίας (Εικ. 9). Αναγνωρίστηκαν τρία αλληλόμορφα, τα A, B και C, από τα οποία μπορούν θεωρητικά να προκύψουν τα ετερόζυγα πρότυπα A/B, A/C και B/C (Πίν. 8). Δε βρέθηκαν άτομα ομόζυγα για το αλληλόμορφο C ούτε ετερόζυγα B/C.



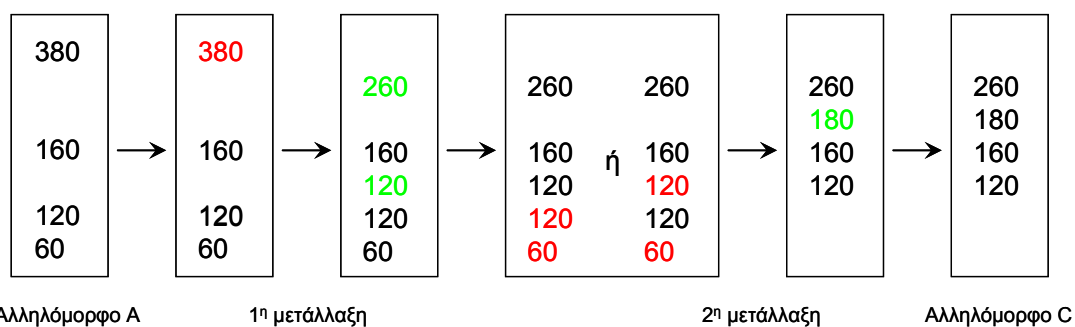
Εικόνα 9: Τα διαφορετικά πρότυπα που εμφανίζει η πέψη ITS-*Hae*III στα 10 δείγματα του είδους *E. nauosaensis*.



Πίνακας 8: Πρότυπα ομόζυγα και ετερόζυγα (που παρατηρήθηκαν και θεωρητικά) στο είδος *E. nauosaensis* μετά από πέψη ITS-*Hae*III. N: αριθμός ατόμων που εμφανίζουν το συγκεκριμένο πρότυπο στο παρόν πείραμα, √: παρουσία μιας ζώνης, √√: παρουσία διπλής ζώνης σε ετερόζυγα άτομα

Πρότυπο	380 bp	260 bp	220 bp	180 bp	160 bp	120 bp	60 bp	N
A	√				√	√	√	4
B	√		√			√		2
C		√		√	√	√		-
A/B	√√		√		√	√√	√	2
A/C	√	√		√	√√	√√	√	2
B/C	√	√	√	√	√	√√		-

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι το αλληλόμορφο B προκύπτει από την απώλεια μιας θέσης κοπής ανάμεσα στις ζώνες των 160 και των 60 βάσεων. Το αλληλόμορφο C, αντίθετα, προέρχεται από δύο μεταλλάξεις: μία νέα θέση κοπής μέσα στη ζώνη των 380 βάσεων που δίνει τη ζώνη των 260 και μια επιπλέον των 120 βάσεων και στη συνέχεια, την απώλεια μιας θέσης κοπής ανάμεσα στη ζώνη των 60 και μία από αυτές των 120 βάσεων (Εικ. 10).



Εικόνα 10: Μεταλλάξεις μέσα από τις οποίες το αλληλόμορφο A μετατρέπεται σε αλληλόμορφο C. Σε κάθε μετάλλαξη με κόκκινο οι ζώνες που χάνονται και με πράσινο αυτές που προκύπτουν.

### Αλληλούχιση

Η αλληλούχιση ήταν επιτυχής για τα 80 από τα 88 συνολικά δείγματα που αναλύθηκαν (ποσοστό επιτυχίας 90,9 %). Ανάμεσα σε αυτά που δεν έδωσαν προϊόν αλληλούχισης ήταν τα πέντε δείγματα *Eripactis distans* (ποσοστό επιτυχίας 0 %), δύο από τα πέντε δείγματα *E. purpurata* (ποσοστό επιτυχίας 60 %) και ένα από τα τέσσερα δείγματα *E. atrorubens* (ποσοστό επιτυχίας 75 %). Τα προϊόντα της αλληλούχισης ήταν μεταξύ 630 και 650 βάσεων ενώ το συνολικό μήκος της ευθυγράμμισης ήταν 653 βάσεις.

Εντοπίστηκαν οι παρακάτω πολυμορφισμοί (Πίν. 9):

- μία περιοχή SSR 9-13 επαναλήψεων αδενίνης στη θέση 82,
- ένας διπλασιασμός 2 βάσεων στη θέση 247,
- μία απαλοιφή 1 βάσης στη θέση 249,
- ένας διπλασιασμός 10 βάσεων στη θέση 386,
- ένα έλλειμμα 12 βάσεων στη θέση 420 και
- 9 πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου (SNPs) στις θέσεις 9, 209, 221, 238, 280 (2 SNPs), 332, 354 και 549.

Πίνακας 9: Πολυμορφισμοί μεταξύ των προϊόντων αλληλούχισης ανά taxon. Επισημαίνονται οι πολυμορφισμοί που ταυτοποιούν συγκεκριμένα είδη (βλ. πίν. 10)

Θέση στην ευθυγράμμιση	9	82	209	221	238	247	280	332	354
<i>E. atrorubens</i>	A . . . .	10A . . . . .	T . . . .	A . . . .	C . . . .	--CG . . . . .	T . . . . .	A . . . .	G . . . .
<i>E. cretica</i>	A . . . .	9A . . . . .	T . . . .	A . . . .	C . . . .	--CG . . . . .	T . . . . .	A . . . .	G . . . .
<i>E. degenii</i>	A . . . .	10A . . . . .	T . . . .	A . . . .	C . . . .	--CG . . . . .	T . . . . .	A . . . .	G . . . .
<i>E. densifolia</i>	A . . . .	10A/11A . . . . .	T . . . .	A . . . .	C . . . .	--CG . . . . .	T . . . . .	A . . . .	G . . . .
<i>E. gracilis</i>	A . . . .	10A . . . . .	T . . . .	A . . . .	C . . . .	--CG . . . . .	T . . . . .	A . . . .	G . . . .
<i>E. greuteri</i>	A . . . .	10A . . . . .	T . . . .	A . . . .	C . . . .	--CG . . . . .	T . . . . .	A . . . .	G . . . .
<i>E. halacsyi*</i>	A . . . .	10A . . . . .	T . . . .	A . . . .	C . . . .	--CG . . . . .	T . . . . .	A . . . .	G . . . .
<i>E. helleborine</i>	A . . . .	9A/10A/11A . . . . .	T . . . .	A . . . .	C . . . .	--CG . . . . .	G/T . . . . .	A . . . .	G . . . .
<i>E. heraclea</i>	A . . . .	9A . . . . .	T . . . .	A . . . .	C . . . .	--CG . . . . .	T . . . . .	A . . . .	G . . . .
<i>E. leptochila ssp. neglecta</i>	A . . . .	11A . . . . .	T . . . .	A . . . .	C . . . .	--CG . . . . .	T . . . . .	A . . . .	G . . . .
<i>E. microphylla</i>	A . . . .	13A . . . . .	A . . . .	A . . . .	C . . . .	--G . . . . .	T . . . . .	A . . . .	G . . . .
<i>E. nauosaensis</i>	A . . . .	9A/10A . . . . .	T . . . .	A . . . .	C . . . .	--CG . . . . .	T . . . . .	A . . . .	G . . . .
<i>E. olympica</i>	A . . . .	10A . . . . .	T . . . .	A . . . .	C . . . .	--CG . . . . .	T . . . . .	A . . . .	G . . . .
<i>E. palustris</i>	A . . . .	9A . . . . .	T . . . .	G . . . .	A . . . .	--CG . . . . .	G . . . . .	G . . . .	A . . . .
<i>E. persica</i>	A . . . .	10A . . . . .	T . . . .	A . . . .	C . . . .	--CG . . . . .	T . . . . .	A . . . .	G . . . .
<i>E. pontica</i>	A . . . .	11A . . . . .	T . . . .	A . . . .	C . . . .	--CG . . . . .	T . . . . .	A . . . .	G . . . .
<i>E. purpurata</i>	A . . . .	9A . . . . .	T . . . .	A . . . .	C . . . .	--CG . . . . .	T . . . . .	A . . . .	G . . . .
<i>E. spiridonovii</i>	A . . . .	10A . . . . .	T . . . .	A . . . .	C . . . .	CGCG/--CG . . . . .	T . . . . .	A . . . .	G . . . .
<i>E. subclausa</i>	G . . . .	9A/11A . . . . .	T . . . .	A . . . .	C . . . .	--CG . . . . .	A/T . . . . .	A . . . .	G . . . .
<i>E. turcica</i>	A . . . .	10A/11A . . . . .	T . . . .	A . . . .	C . . . .	--CG . . . . .	T . . . . .	A . . . .	G . . . .
<i>Epipactis sp.</i>	A . . . .	10A . . . . .	T . . . .	A . . . .	C . . . .	--CG . . . . .	T . . . . .	A . . . .	G . . . .

Πίνακας 9: Συνέχεια

Θέση στην ευθυγράμμιση	386	420	549
<i>E. atrorubens</i>	CTATTAATTA-----	.AAAAAATCTATC . . . . T	
<i>E. cretica</i>	CTATTAATTA-----	.AAAAAATCTATC . . . . T	
<i>E. degenii</i>	CTATTAATTACTATTAATTA . . . . .	.AAAAAATCTATC . . . . T	
<i>E. densifolia</i>	CTATTAATTA-----	.AAAAAATCTATC . . . . T	
<i>E. gracilis</i>	CTATTAATTA-----	.AAAAAATCTATC . . . . T	
<i>E. greuteri</i>	CTATTAATTACTATTAATTA . . . . .	.AAAAAATCTATC . . . . T	
<i>E. halacsyi*</i>	CTATTAATTA-----	.AAAAAATCTATC . . . . T	
<i>E. helleborine</i>	CTATTAATTACTATTAATTA/CTATTAATTA-----	. . . .AAAAAATCTATC . . . . T	
<i>E. heraclea</i>	CTATTAATTA-----	.AAAAAATCTATC . . . . T	
<i>E. leptochila ssp. neglecta</i>	CTATTAATTA-----	.AAAAAATCTATC . . . . T	
<i>E. microphylla</i>	CTATTAATTA-----	.AAAAAATCTATC . . . . T	
<i>E. nauosaensis</i>	CTATTAATTACTATTAATTA/CTATTAATTA-----	. . . .AAAAAATCTATC . . . . T	
<i>E. olympica</i>	CTATTAATTACTATTAATTA . . . . .	.AAAAAATCTATC . . . . T	
<i>E. palustris</i>	CTATTAATTA-----	.----- . . . . C	
<i>E. persica</i>	CTATTAATTACTATTAATTA . . . . .	.AAAAAATCTATC . . . . T	
<i>E. pontica</i>	CTATTAATTACTATTAATTA . . . . .	.AAAAAATCTATC . . . . T	
<i>E. purpurata</i>	CTATTAATTA-----	.AAAAAATCTATC . . . . T	
<i>E. spiridonovii</i>	CTATTAATTA-----	.AAAAAATCTATC . . . . T	
<i>E. subclausa</i>	CTATTAATTA-----	.AAAAAATCTATC . . . . T	
<i>E. turcica</i>	CTATTAATTACTATTAATTA/CTATTAATTA-----	. . . .AAAAAATCTATC . . . . T	
<i>Epipactis</i> sp.	CTATTAATTACTATTAATTA/CTATTAATTA-----	. . . .AAAAAATCTATC . . . . T	

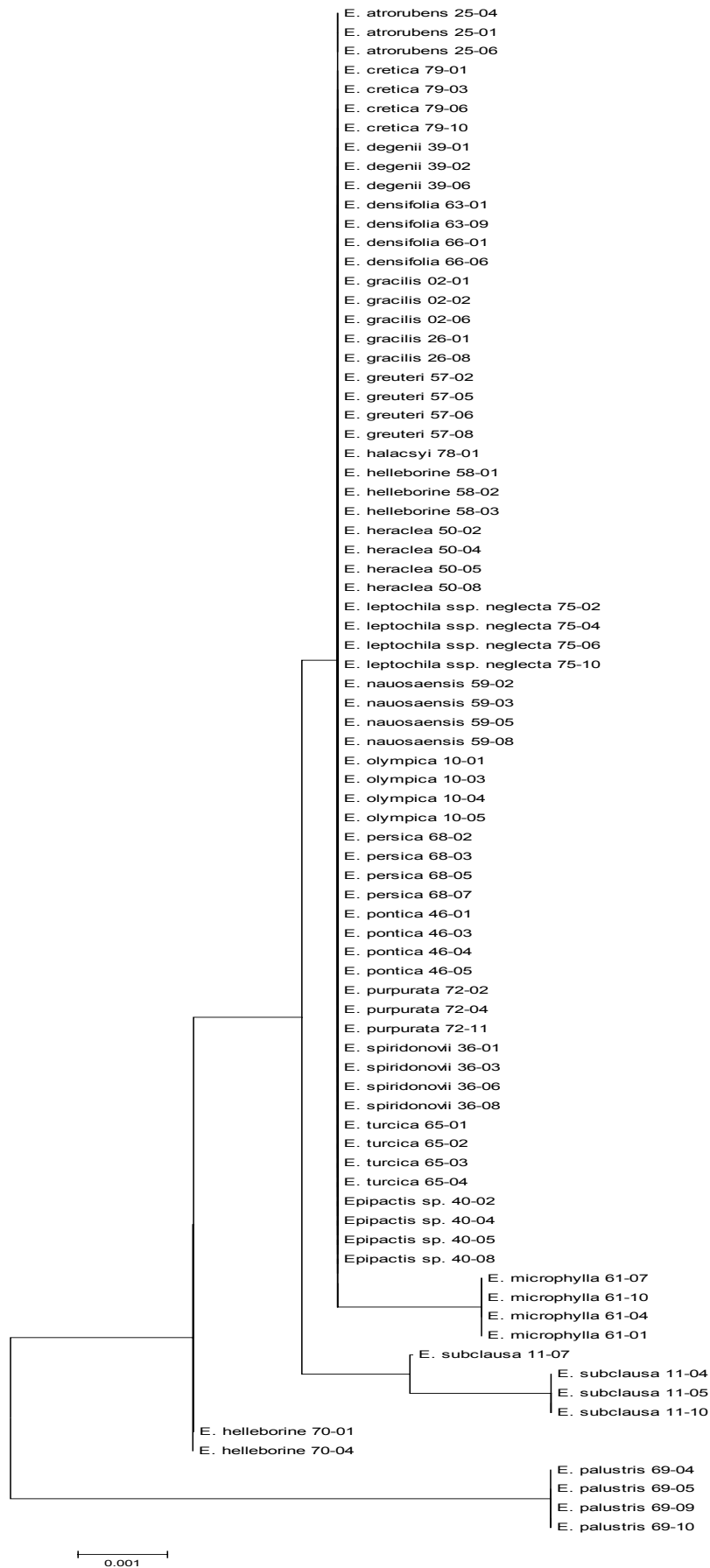
\*Το είδος *E. halacsyi* εκπροσωπείται από ένα άτομο

Από αυτούς μόνο δέκα πολυμορφισμοί χαρακτηρίζαν συγκεκριμένα είδη: ένα από τα αλληλόμορφα του SSR, η απαλοιφή και ένας SNP το είδος *E. microphylla*, το έλλειμμα και 5 SNPs το είδος *E. palustris* και τέλος, ένας SNP το *E. subclausa* (Πίν. 10). Οι υπόλοιποι είτε ήταν κοινί σε περισσότερα του ενός taxa είτε παρουσίαζαν ενδοειδική ποικιλότητα και επομένως δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση ειδών.

Πίνακας 10: Πολυμορφισμοί μοναδικοί για συγκεκριμένα είδη

Θέση στην ευθυγράμμιση	9	82	209	221	238	249	332	354	420	549
Υπόλοιπα είδη	A...	9A/10A/11A...	T...	A...	C...	C...	A...	G...	AAAAAATCTATC...	T
<i>E. microphylla</i>	A...	13A.....	A...	A...	C...	-....	A...	G...	AAAAAATCTATC...	T
<i>E. palustris</i>	A...	9A.....	T...	G...	A...	C...	G...	A...	-----	C
<i>E. subclausa</i>	G...	9A/11A.....	T...	A...	C...	C...	A...	G...	AAAAAATCTATC...	T

Το κάθε ένα από τα τρία αυτά είδη καταλαμβάνει δικό του κλάδο στο φυλογενετικό δέντρο Neighbor-Joining (Εικ. 11), με το *E. palustris* να είναι το πιο απομακρυσμένο φυλογενετικά από όλα τα υπόλοιπα taxa. Ο κλάδος του *E. subclausa* χωρίζεται σε δύο υποκλάδους που προκύπτουν από την παρουσία ενός SNP (πολυμορφισμός 280 στον πίν. 9) και διαφορετικού αλληλομόρφου της περιοχής SSR σε τρία από τα τέσσερα άτομα που εξετάστηκαν. Τα υπόλοιπα taxa ομαδοποιούνται σε έναν κλάδο, με μόνη εξαίρεση τους εκπροσώπους του πληθυσμού β' του *E. helleborine*, που διαφέρουν από αυτούς του πληθυσμού α' και τα υπόλοιπα taxa σε έναν SNP (πολυμορφισμός 280 στον πίν. 9).



Εικόνα 11: Φυλογενετικό δέντρο Neighbor-Joining για τις ακολουθίες της περιοχής *trnL*.

### **Αντιστοίχιση αποτελεσμάτων PCR-RFLP και αλληλούχισης στο *trnL***

Συγκρίνοντας τις ακολουθίες με τα μήκη των ζωνών της πέψης με *MboI* (Εικ. 3), έγινε αντιστοίχιση των προτύπων πέψης με τους πολυμορφισμούς που αποκάλυψε η αλληλούχιση. Το πρότυπο Β αντιστοιχεί στην παρουσία του διπλασιασμού 10 βάσεων στη θέση 386 της αλληλούχισης, ενώ το C στην παρουσία του ελλείμματος 12 βάσεων στη θέση 420. Το πρότυπο Α υποδηλώνει την απουσία και των δύο πολυμορφισμών, ενώ δεν εντοπίστηκε περίπτωση που να υπάρχει ταυτόχρονη παρουσία τους. Σε όλα τα δείγματα που υπήρξε αλληλούχιση και πέψη με το ένζυμο *MboI*, τα αποτελέσματα συμφωνούσαν μεταξύ τους. Τα δείγματα στα οποία πραγματοποιήθηκε μόνο αλληλούχιση αντιστοιχίστηκαν με το πρότυπο που θα έδιναν σε πέψη με το *MboI* με βάση τα παραπάνω. Έτσι, μπόρεσε να υπολογιστεί το ποσοστό εμφάνισης που θα παρουσίαζε κάθε πρότυπο ανά ταχον αν όλα τα δείγματα είχαν υποβληθεί σε πέψη. Βρέθηκε ότι 9 ταχα εμφανίζουν μόνο το πρότυπο Α, 5 μόνο το πρότυπο Β, 7 εμφανίζουν και τα δύο, ενώ ένα, το είδος *E. palustris*, εμφανίζει αποκλειστικά το πρότυπο C (Πίν. 11).

Πίνακας 11: Ποσοστά εμφάνισης του κάθε προτύπου της πέψης *trnL-MboI* ανά taxon

Taxon	Πρότυπο Α	Πρότυπο Β	Πρότυπο C
<i>Epipactis atrorubens</i>	100 %	-	-
<i>E. cretica</i>	100 %	-	-
<i>E. degenii</i>	-	100 %	-
<i>E. densifolia</i>	95,24 %	4,76 %	-
πληθ. α'	100 %	-	-
πληθ. β'	90,91 %	9,09 %	-
<i>E. distans*</i>	-	100 %	-
<i>E. gracilis</i>	100 %	-	-
πληθ. α'	100 %	-	-
πληθ. β'	100 %	-	-
<i>E. greuteri</i>	-	100 %	-
<i>E. halacsyi*</i>	100 %	-	-
<i>E. helleborine</i>	6,67 %	93,33 %	-
πληθ. α'	10 %	90 %	-
πληθ. β'	-	100 %	-
<i>E. heraclea</i>	77,78 %	22,22 %	-
<i>E. leptochila ssp. neglecta</i>	100 %	-	-
<i>E. microphylla</i>	100 %	-	-
<i>E. nauosaensis</i>	70 %	30 %	-
<i>E. olympica</i>	50 %	50 %	-
<i>E. palustris</i>	-	-	100 %
<i>E. persica</i>	-	100 %	-
<i>E. pontica</i>	-	100 %	-
<i>E. purpurata</i>	100 %	-	-
<i>E. spiridonovii</i>	100 %	-	-
<i>E. subclausa</i>	100 %	-	-
<i>E. turcica</i>	75 %	25 %	-
<i>Epipactis</i> sp.	20 %	80 %	-

\*Τα είδη *E. distans* και *E. halacsyi* εκπροσωπούνται από ένα άτομο το καθένα.





# ΣΥΖΗΤΗΣΗ

## Ικανότητα των δεικτών DNA για διάκριση στο γένος *Eripactis*

Έχει αναφερθεί ότι η ταυτοποίηση ειδών στα ορχεοειδή είναι δύσκολη και για αυτό το λόγο θεωρούνται καλό πειραματικό υλικό για τον έλεγχο υποψηφίων δεικτών για barcoding (Lahaye *et al*, 2008). Οι διάφοροι δείκτες που προτείνονται και χρησιμοποιούνται στη βιβλιογραφία δεν έχουν καλά ποσοστά διάκρισης σε στενά συγγενικά είδη, π.χ. αυτά που ανήκουν στο γένος *Dendrobium* (Singh *et al*, 2012). Και για το γένος *Eripactis*, έχει αναφερθεί η δυσκολία εύρεσης DNA δεικτών που να παρουσιάζουν επαρκή ποικιλότητα ώστε να διακρίνουν κοντινά φυλογενετικά είδη και αυτό αποδίδεται στην πρόσφατή του εξέλιξη (βλ. Εισαγωγή) (Hollingsworth *et al*, 2006, Tranchida-Lombardo *et al*, 2011, Jakubska-Busse *et al*, 2012).

### Περιοχή *trnL*

Η περιοχή *trnL* έχει μελετηθεί συνολικά σε ένα μεγάλο αριθμό taxa του γένους *Eripactis* (Squirrell *et al*, 2001, 2002, Hollingsworth *et al*, 2006, Δρούζας και Τσιφτσής, 2011, Jakubska-Busse *et al*, 2012), αλλά δεν έχει δείξει μεγάλη ποικιλότητα, σε συμφωνία με τα παρόντα αποτελέσματα, ενώ και κάποιοι από τους πολυμορφισμούς που εντοπίστηκαν, δε διακρίνουν είδη. Στην παρούσα εργασία, διακρίθηκαν με χρήση αυτής της περιοχής τρία είδη, τα *E. microphylla*, *E. palustris* και *E. subclausa*, με μόνο το δεύτερο να διακρίνεται με τη μέθοδο των PCR-RFLPs.

Ο PCR-RFLP δείκτης *trnL-MboI* επιλέχθηκε να μελετηθεί σε αυτήν την εργασία διότι είναι ο μοναδικός PCR-RFLP δείκτης που έχει χρησιμοποιηθεί σε taxa του γένους *Eripactis* στη βιβλιογραφία (Squirrell *et al*, 2001, 2002, Hollingsworth *et al*, 2006, Δρούζας και Τσιφτσής, 2011). Αναφέρθηκε αρχικά από τους Squirrell *et al*. (2001) για πληθυσμούς του *E. helleborine* στο οποίο εντόπισαν δύο πρότυπα που προκύπτουν από την απουσία ή παρουσία ενός διπλασιασμού 10 βάσεων, και τα οποία αντιστοιχούν στα πρότυπα A και B (Εικ. 3) στην παρούσα εργασία. Στη συνέχεια μελετήθηκε και σε επιπλέον taxa του γένους (Squirrell *et al*, 2002, Hollingsworth *et al*, 2006, Jakubska-Busse *et al*, 2012), χωρίς να δίνει κάποια άλλη πληροφορία πέρα από την παρουσία ή απουσία του διπλασιασμού αυτού. Μόνο μία περίπτωση διαφορετικού προτύπου αυτής της πέψης έχει εντοπιστεί και προήλθε από πληθυσμούς *E. helleborine* της βορειοανατολικής Ελλάδας. Σε αυτό, η ζώνη στην οποία εντοπίζεται ο διπλασιασμός είναι μεγαλύτερη κατά 10 ακόμα βάσεις και

προέρχεται από τριπλασιασμό αντί για διπλασιασμό του ίδιου σημείου (Δρούζας ΑΔ, Τσιφτσής Σ, προσωπική επικοινωνία). Αυτό το πρότυπο όμως δεν ανιχνεύτηκε στα δείγματα που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία. Αντιθέτως, το πρότυπο C που προκύπτει από την παρουσία του ελλείμματος των 12 βάσεων και διαχωρίζει το είδος *E. palustris* από όλα τα υπόλοιπα (Εικ. 3 και Πίν. 10 και 11) αναφέρεται για πρώτη φορά στην παρούσα εργασία.

Κυρίως στη βιβλιογραφία αναφέρονται δύο πολυμορφισμοί της περιοχής *trnL*: ο διπλασιασμός των 10 βάσεων και η μικροδορυφορική περιοχή των επαναλήψεων αδενίνης. Και οι δύο στην παρούσα εργασία παρουσιάζαν σε μεγάλο ποσοστό ενδοειδική ποικιλότητα που δεν επέτρεπε τη χρήση τους για διάκριση ειδών, με εξαίρεση το αλληλόμορφο της μικροδορυφορικής περιοχής των 13 επαναλήψεων αδενίνης που χαρακτηρίζει το *E. microphylla*. Αν και η βιβλιογραφία είναι σε συμφωνία με αυτά τα αποτελέσματα για τη μικροδορυφορική περιοχή (Hollingsworth *et al*, 2006, Jakubská-Busse *et al*, 2012), αυτό δεν ισχύει για το διπλασιασμό, ο οποίος ήταν μονομορφικός σε όλα τα είδη που εξετάστηκαν, εκτός από το *E. helleborine* και το στενά συγγενικό του *E. youngiana* (Squirrell *et al*, 2001, 2002, Hollingsworth *et al*, 2006, Δρούζας και Τσιφτσής, 2011). Οι μελέτες αυτές ήταν μία ένδειξη ότι ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός θα μπορούσε πιθανώς να χρησιμοποιείται για διαχωρισμό taxa εκτός του *E. helleborine* σε συνδυασμό με άλλους πολυμορφισμούς. Στην παρούσα εργασία, όμως, περίπου το ένα τρίτο των taxa ήταν πολυμορφικά (Πίν. 11) κάτι που περιορίζει μια τέτοια δυνατότητα. Σε αυτά πρέπει να προστεθούν και τα taxa που στη βιβλιογραφία χαρακτηρίζονται από διαφορετικό αλληλόμορφο από αυτό που βρέθηκε σε αυτήν την εργασία. Η ενδοειδική ποικιλότητα σε πολλά taxa μειώνει τη ικανότητα του διπλασιασμού των 10 βάσεων για διάκριση ειδών, αλλά παρόλα αυτά μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μερικές περιπτώσεις (βλ. παρακάτω).

Αντίθετα, η ικανότητα της μικροδορυφορικής περιοχής να διακρίνει το είδος *E. microphylla* επιβεβαιώνεται τόσο από την παρούσα εργασία, όσο και από τη βιβλιογραφία, παρόλο που και αυτό φαίνεται να παρουσιάζει ενδοειδική ποικιλότητα (Hollingsworth *et al*, 2006). Πιο συγκεκριμένα, εκτός από το αλληλόμορφο των 13 επαναλήψεων που εντοπίστηκε εδώ, έχουν αναφερθεί πληθυσμοί που χαρακτηρίζονται από 12 επαναλήψεις. Το πρώτο αλληλόμορφο εμφανίζεται μόνο στο συγκεκριμένο είδος ενώ το δεύτερο εμφανίζεται επίσης στο τοπικό ενδημικό της Γερμανίας *E. peitzii*. Τα δύο είδη, όμως, μπορούν να διακριθούν λόγω της παρουσίας

του διπλασιασμού των 10 βάσεων στο *E. peitzii*, και της απουσίας του από το *E. microphylla* (Hollingsworth *et al*, 2006). Επομένως, το αλληλόμορφο των 13 επαναλήψεων χαρακτηρίζει μόνο το *E. microphylla*, ενώ το αλληλόμορφο των 12 επαναλήψεων πρέπει να συνδυάζεται με την απουσία του διπλασιασμού των 10 βάσεων για να το χαρακτηρίζει μία περίπτωση όπου ο διπλασιασμός αυτός βοηθάει σε διάκριση ειδών *Eripactis*.

Εκτός από τα αλληλόμορφα της μικροδορυφορικής περιοχής που χαρακτηρίζουν το *E. microphylla* υπάρχουν ελάχιστοι πολυμορφισμοί ικανοί για διάκριση ειδών στη βιβλιογραφία. Αναφέρονται μόνο τρεις SNPs, δύο από τους Squirrell *et al.* (2002) και ένας από τους Jakubská-Busse *et al.* (2012). Οι δύο πρώτοι διαχωρίζουν τα είδη *E. muelleri* και *E. dunensis* αντίστοιχα, ενώ ο τρίτος το *E. helleborine*. Από αυτούς μόνο ο δεύτερος υπήρχε και σε δείγματα της παρούσας εργασίας (πολυμορφισμός 280 στον πίνακα 9), και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διάκριση ειδών λόγω ενδοειδικής ποικιλότητας. Οι υπόλοιποι πολυμορφισμοί που εντοπίστηκαν σε αυτήν την εργασία δεν έχουν ξαναπεριγραφεί. Είναι, συνεπώς, η πρώτη φορά που αναφέρεται διάκριση των ειδών *E. palustris* και *E. subclausa* με χρήση της περιοχής *trnL*, καθώς και διάκριση του *E. microphylla* με πολυμορφισμούς επιπλέον της μικροδορυφορικής περιοχής.

Συνοπτικά, η περιοχή *trnL* διαθέτει πολυμορφισμούς (το έλλειμμα, την απαλοιφή και κάποιους SNPs) ικανούς να ταυτοποιήσουν ένα μικρό αριθμό taxa του γένους, τα *E. microphylla*, *E. palustris* και *E. subclausa*, αλλά ο διπλασιασμός και η μικροδορυφορική περιοχή δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε αυτήν την κατεύθυνση λόγω της μεγάλης ενδοειδικής ποικιλομορφίας, με εξαίρεση τα αλληλόμορφα που χαρακτηρίζουν το *E. microphylla*.

#### Περιοχή *matK*

Η περιοχή *matK* δεν έχει ξαναχρησιμοποιηθεί στο γένος *Eripactis* στη βιβλιογραφία. Στην παρούσα εργασία δεν έδειξε καμία απολύτως ποικιλότητα στα δείγματα που εξετάστηκαν, παρόλο που είναι ένας από τους προτεινόμενους δείκτες για barcoding (CBOL Plant Working Group, 2009) και θεωρείται ότι παρουσιάζει τη μέγιστη διακριτική ικανότητα ανάμεσα στους συνήθεις δείκτες που χρησιμοποιούνται (Hollingsworth *et al*, 2011). Το μεγαλύτερο πρόβλημα με τη χρήση της περιοχής *matK* για barcoding είναι η απουσία παγκόσμιων εκκινητών. Η επιλογή του ζεύγους 390F-1326R (Πίν. 4) των Cuénoud *et al.* (2002), που χρησιμοποιήθηκε και εδώ, έχει αναφερθεί ότι μπορεί να δώσει στα αγγειόσπερμα επιτυχή ενίσχυση με προϊόντα

καλής ποιότητας σε ένα ποσοστό 80 % των δειγμάτων περίπου (Hollingsworth *et al*, 2011), σε αντιστοιχία με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας. Το συγκεκριμένο τμήμα DNA που ενισχύεται από αυτούς τους εκκινητές έχει προταθεί ως ο πιο αποτελεσματικός γενετικός δείκτης για barcoding στα ορχεοειδή με >90 % επιτυχία σε ένα σύνολο >1000 taxa, που δεν περιλάμβαναν, όμως μέλη του γένους *Epipactis* (Lahaye *et al*, 2008). Επίσης, η περιοχή *matK* διαχωρίζει μεταξύ τους στενά συγγενικά είδη ορχεοειδών, όπως του γένους *Dendrobium* (Asahina *et al*, 2010). Το ότι δεν έδειξε καμία απολύτως διαφοροποίηση ανάμεσα στα είδη που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη, πιθανόν να οφείλεται στις διαφορετικές μεθοδολογίες που ακολουθήθηκαν. Ενώ οι άλλες μελέτες εργάστηκαν με αλληλουχημένες ακολουθίες που αποκαλύπτουν όλη τη γενετική πληροφορία, τα PCR-RFLPs της παρούσας εργασίας εντοπίζουν μόνο διαφοροποιήσεις στο μήκος των ακολουθιών και σημειακές μεταλλάξεις στα σημεία αναγνώρισης των ενζύμων περιορισμού. Μία άλλη πιθανή εξήγηση είναι ότι τα δείγματα των Lahaye *et al*. προέρχονταν από την Κεντρική Αμερική, ενώ της παρούσας εργασίας από την Ελλάδα. Οι διαφορές στη γεωλογία, οικολογία και κατά συνέπεια εξελικτική ιστορία ανάμεσα στις δύο γεωγραφικές περιοχές μπορεί να επεκτείνονται και σε ανόμοια μοτίβα στη γενετική διαφοροποίηση των ειδών, όπως το σε ποιες περιοχές του DNA αυτή εντοπίζεται.

#### Περιοχή *trnH-psbA*

Με χρήση της περιοχής *trnH-psbA*, από τα taxa που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, διακρίθηκε μόνο το είδος *E. palustris*. Η συγκεκριμένη περιοχή έχει χρησιμοποιηθεί μόνο σε άλλη μία μελέτη (Jakubská-Busse *et al*, 2012) σε μικρό αριθμό ειδών εκ των οποίων τρία, τα *E. atrorubens*, *E. helleborine* και *E. purpurata*, περιλαμβάνονται και στην παρούσα εργασία. Οι ερευνητές δε διαπίστωσαν καμία διαφοροποίηση ανάμεσα στα τρία αυτά είδη.

#### Περιοχή ITS

Κανένα taxon δεν ήταν δυνατόν να διακριθεί με τους PCR-RFLP δείκτες της περιοχής ITS που χρησιμοποιήθηκαν. Παρόμοια αποτελέσματα έδωσε και η μελέτη μόνο του ITS1 με αλληλούχιση, σε ένα μεγάλο αριθμό taxa (Tranchida-Lombardo *et al*, 2011). Με την εξαίρεση δύο ειδών, των *E. palustris* και *E. nordeniorum*, όλα τα υπόλοιπα taxa εμφάνιζαν την ίδια αλληλουχία ενώ λίγα από αυτά διέθεταν και ένα δεύτερο αλληλόμορφο το οποίο θα διέφερε σε μία μόνο μετάλλαξη από το βασικό. Επίσης, δεν ανιχνεύτηκε ετεροζυγωτία σε κανένα taxon, αλλά το είδος που την εμφάνισε στην παρούσα εργασία, το *E. nauosaensis* δεν περιλαμβανόταν στα

δείγματα τους. Ένα ακόμα είδος που αναφέρεται ότι διακρίνεται με τη χρήση αυτής της περιοχής είναι το *E. atrorubens*, ανάμεσα σε ένα μικρό αριθμό taxa όμως (Jakubská-Busse *et al.*, 2012). Τόσο η διάκριση του *E. atrorubens* στην εργασία των Jakubská-Busse *et al.* (2012), όσο και του *E. palustris* σε αυτήν των Tranchida-Lombardo *et al.* (2011) έγιναν με χρήση αλληλούχισης, κάτι που πιθανόν εξηγεί την αδυναμία διάκρισης των ίδιων ειδών στην παρούσα εργασία όπου χρησιμοποιήθηκαν PCR-RFLPs. Γενικά, η περιοχή ITS δε δείχνει να είναι αποτελεσματικός δείκτης διάκρισης για το γένος *Eripactis*. Είναι χαρακτηριστικό, ότι οι Hollingsworth *et al.* (2006) παρατήρησαν πολύ μικρή ποικιλότητα μέσα στα μέλη της ομάδας «*helleborine*» στην περιοχή ITS με συνέπεια να μην χρησιμοποιήσουν τη συγκεκριμένη περιοχή στην εργασία τους.

Σε αρκετά δείγματα η ενίσχυση της περιοχής ITS είχε σαν αποτέλεσμα την παραγωγή πολλαπλών ζωνών. Η ύπαρξη των ζωνών αυτών θα μπορούσε να οφείλεται στην ύπαρξη πολλών ψευδογονιδίων και παράλογων γονιδίων του ριβοσωμικού DNA τα οποία ενισχύονται κατά την PCR μαζί με τους ορθόλογους κλώνους (Baldwin *et al.*, 1995, Álvarez and Wendel, 2003), ή ακόμα και από την παρουσία πολυπλοειδίας η οποία απαντάται συχνά σε μέλη των Orchidaceae (Amich *et al.*, 2007). Αν και υπάρχουν εργαστηριακές πρακτικές για τον εντοπισμό και την απομόνωση μόνο των ορθόλογων κλώνων, για τεχνικούς και οικονομικούς λόγους δεν είναι δυνατόν να ακολουθούνται πάντα (Álvarez and Wendel, 2003). Σε αυτήν την εργασία, η ύπαρξη των παραπροϊόντων δεν επηρέασε την εξαγωγή αποτελεσμάτων καθώς δεν άλλαζαν το πρότυπο ζωνώσεων, άρα πιθανότατα δεν έφεραν θέσεις κοπής για τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν.

#### **Διαφοροποιήσεις ανάμεσα στα είδη του γένους *Eripactis***

Για αρκετά από τα taxa που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία δε βρέθηκε βιβλιογραφία πάνω στη μελέτη τους με γενετικούς δείκτες. Η απουσία βιβλιογραφίας για taxa του γένους *Eripactis* έχει παρατηρηθεί και αποδοθεί στη σπανιότητα κάποιων ή/και στον ενδημισμό σε μικρές περιοχές (Jakubská-Busse *et al.*, 2012), επομένως ήταν αναμενόμενη για όσα περιορίζονται στην περιοχή της Νότιας Βαλκανικής χερσονήσου και Μικράς Ασίας, πολύ δε περισσότερο για τα αποκλειστικά ενδημικά της Ελλάδας. Μέχρι σήμερα, από τα είδη και πληθυσμούς της Ελλάδας, έχουν ερευνηθεί με DNA δείκτες μόνο κάποιοι πληθυσμοί των *E. helleborine* και *E. atrorubens* (Δρούζας και Τσιφτσής, 2011). Τα ενδημικά είδη της

Ελλάδας δεν έχουν μελετηθεί έως τώρα και η παρούσα εργασία αποτελεί την πρώτη προσπάθεια σε αυτή την κατεύθυνση.

#### *Epiractis microphylla*

Ένα από τα είδη τα οποία διακρίνονται με βάση τους δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν την εργασία, και πιο συγκεκριμένα με χρήση της περιοχής *trnL*, είναι το *E. microphylla* (Εικ. 12). Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, το αλληλόμορφο των 13 επαναλήψεων αδενίνης στη μικροδορυφορική περιοχή του *trnL* απαντάται μόνο σε αυτό το είδος ανάμεσα από έναν μεγάλο αριθμό μελετημένων taxa (Hollingsworth *et al*, 2006 και παρούσα εργασία). Επίσης, στη βιβλιογραφία αναφέρεται η ύπαρξη ενός ακόμα αλληλομόρφου, 12 επαναλήψεων αδενίνης, κοινού με το γερμανικό ενδημικό είδος *E. peitzii* (Hollingsworth *et al*, 2006). Και στην περίπτωση αυτή, όμως, το *E. microphylla* μπορεί να διακριθεί λόγω της απουσίας του διπλασιασμού των 10 βάσεων στην ίδια περιοχή DNA (το *E. peitzii* χαρακτηρίζεται από παρουσία του διπλασιασμού, πιο αναλυτικά στις σελ. 48-49). Εκτός από το *trnL*, διάκριση του *E. microphylla* μπορεί να επιτευχθεί με χρήση της χλωροπλαστικής περιοχής *rbcL-accD*, η οποία το διαχωρίζει από τα είδη *E. distans*, *E. gracilis*, *E. greuteri*, *E. helleborine*, *E. leptochila*, *E. palustris*, *E. pontica* και *E. purpurata* (Tranchida-Lombardo *et al*, 2011). Ακόμα το *E. microphylla* διαφοροποιείται από τα *E. atrorubens*, *E. distans*, *E. helleborine*, *E. leptochila*, *E. palustris* και *E. purpurata* με ισοένζυμα (Scacchi *et al*, 1987, Hollingsworth *et al*, 2006). Αντιθέτως, απουσία διάκρισης παρατηρήθηκε στην DNA περιοχή ITS1, ανάμεσα στο *E. microphylla* και τα *E. atrorubens*, *E. distans*, *E. gracilis*, *E. greuteri*, *E. helleborine*, *E. leptochila*, *E. pontica* και *E. purpurata* (Tranchida-Lombardo *et al*, 2011).

#### *E. palustris*

Το είδος *E. palustris* (Εικ. 12) έδειξε τη μεγαλύτερη γενετική διαφοροποίηση, καθώς διαχωρίζεται από τα υπόλοιπα σε δύο δείκτες PCR-RFLP, τους *trnL-MboI* και *trnH-psbA-HinfI*, και με πέντε SNPs στην περιοχή *trnL*. Ο διαχωρισμός του *E. palustris* από άλλα είδη του γένους έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες που χρησιμοποίησαν τις περιοχές ITS1 και *rbcL-accD* (διακρίνεται από τα *E. atrorubens*, *E. distans*, *E. gracilis*, *E. greuteri*, *E. helleborine*, *E. leptochila*, *E. microphylla*, *E. pontica* και *E. purpurata*, Tranchida-Lombardo *et al*, 2011), με ισοένζυμα (διακρίνεται από *E. helleborine* και *E. microphylla*, Scacchi *et al*, 1987), ενώ διαφοροποιείται και καρυολογικά (D'Emerico *et al*, 1999). Η διάκριση αυτή πιθανώς σχετίζεται με διαφορετικές οικολογικές στρατηγικές, π.χ. τη λειτουργία της

μυκόρριζας και την επιλογή ενδιαιτήματος. Το *E. palustris* είναι ένα είδος που δε χρειάζεται να συνδεθεί με άλλα φυτικά είδη μέσω κοινής μυκόρριζας (από Oberwinkler *et al*, 2013) σε αντίθεση με άλλα taxa του γένους (βλ. Εισαγωγή σελ. 13 και 14). Επίσης, ενώ τα περισσότερα είδη του γένους διαβιούν σε δάση, θαμνώνες ή διάκενα δασών, το *E. palustris* εντοπίζεται σε υγρά περιβάλλοντα, όπως υγρά λιβάδια (Scacchi *et al*, 1987, Τσιφτσής, 2009). Ο συγκεκριμένος τύπος ενδιαιτήματος είναι σπάνιος και αρκετά τρωτός, κάτι που φέρνει και το *E. palustris* σε ανάγκη προστασίας και επομένως τα εργαλεία ταυτοποίησής του μπορούν να φανούν πολύ χρήσιμα (Τσιφτσής, 2009).



Εικόνα 12: Δύο από τα είδη για τα οποία επιτεύχθηκε διάκριση στην παρούσα εργασία. Αριστερά *Epiractis microphylla*, δεξιά *E. palustris* (ΠΗΓΗ: Τσιφτσής, 2009).

### *E. subclausa*

Δε βρέθηκε στη βιβλιογραφία κάποια αναφορά για μοριακή διάκριση του *E. subclausa* από άλλα taxa του γένους. Επομένως, η ικανότητα των DNA δεικτών, και πιο συγκεκριμένα της περιοχής *trnL*, για ταυτοποίηση του συγκεκριμένου είδους εντοπίζεται για πρώτη φορά στην παρούσα εργασία.

### Taxa για τα οποία δε βρέθηκε διαφοροποίηση

Πέρα από τα τρία προαναφερθέντα είδη, τα υπόλοιπα taxa που μελετήθηκαν (βλ. πίν. 2) δε διακρίνονται με βάση τους δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν. Στη βιβλιογραφία απουσία διαφοροποίησης μεταξύ τους έχει παρατηρηθεί για τα είδη *E. distans*, *E. gracilis*, *E. greuteri*, *E. pontica* και *E. purpurata* στις περιοχές ITS1 και *rbcL-accD*, για τα παραπάνω συν τα είδη *E. atrorubens* και *E. leptochila* μόνο στην περιοχή ITS1 (Tranchida-Lombardo *et al*, 2011), για τα *E. helleborine* και *E. purpurata* σε ολόκληρο το ITS και για τα *E. atrorubens*, *E. helleborine* και *E. purpurata* στο *trnH-psbA* (Jakubska-Busse *et al*, 2012).

Διάκριση στη βιβλιογραφία, αλλά όχι σε αυτήν την εργασία, έχει επιτευχθεί μεταξύ των ειδών *E. atrorubens*, *E. helleborine* και *E. purpurata* με το συνδυασμό των χλωροπλαστικών τόπων *trnS-trnG-trnG*, *matK-5'trnK*, *rpl32-trnL*, *trnQ-5'rps19* και *rpl16*, ενώ στην περιοχή ITS διαφοροποιούνται μόνο το *E. atrorubens* και όχι τα *E. helleborine* και *E. purpurata* (Jakubska-Busse *et al*, 2012). Η διαφοροποίηση του *E. atrorubens* αφορούσε τρεις SNPs οι οποίοι δεν εντοπίστηκαν στην παρούσα εργασία πιθανότατα διότι δεν επηρεάζουν τις θέσεις κοπής των ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν. Η περιοχή *rbcL-accD* διακρίνει τα *E. atrorubens* και *E. leptochila* τόσο μεταξύ τους όσο και από τα *E. distans*, *E. gracilis*, *E. greuteri*, *E. pontica* και *E. purpurata* (Tranchida-Lombardo *et al*, 2011). Τέλος, σε επίπεδο ισοενζύμων διαφοροποιούνται μεταξύ τους τα είδη *E. helleborine* και *E. purpurata* (Ehlers and Pedersen, 2000).

Έχει προταθεί ότι η μικρή διαφοροποίηση, ειδικά στο πλαστιδιακό DNA, ανάμεσα στα μέλη του γένους οφείλεται σε πρόσφατο διαχωρισμό μεταξύ τους. Μάλιστα, υπάρχουν περιπτώσεις γεωγραφικών περιοχών (Ιταλία) όπου το *E. helleborine* παρουσιάζει μεγαλύτερη γενετική ομοιότητα με άλλα είδη της ίδιας περιοχής παρά με πληθυσμούς του ίδιου είδους από άλλα μέρη. Αυτό δεν αποκλείεται να οφείλεται σε γονιδιακή ροή μεταξύ των γειτονικών ειδών (Tranchida-Lombardo *et al*, 2011). Γενικά, το είδος *E. helleborine*, εμφανίζει τη μεγαλύτερη ενδοειδική ποικιλότητα και παρατηρείται συχνά πολλά άλλα taxa (τα οποία πιθανώς έχουν προκύψει από αυτό) να χαρακτηρίζονται από το συχνότερο αλληλόμορφο του και να μη διαφοροποιούνται μεταξύ τους (Squirrell *et al*, 2002, Hollingsworth *et al*, 2006, Tranchida-Lombardo *et al*, 2011).



## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνοψίζοντας:

- ✓ Οι PCR-RFLP δείκτες *matK-HinfI*, *matK-BccI* και *ITS-HinfI* δεν εμφανίζουν καμία ποικιλομορφία στα είδη και άτομα που εξετάστηκαν.
- ✓ Κάποιοι πολυμορφισμοί της περιοχής *trnL* και ο PCR-RFLP δείκτης *ITS-HaeIII* εμφανίζουν ποικιλομορφία η οποία όμως δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση ειδών, λόγω της ύπαρξης ενδοειδικής ποικιλότητας.
- ✓ Γενικά, εντοπίστηκε μικρή ποικιλότητα μεταξύ των taxa του γένους που συμφωνεί με την άποψη της πρόσφατης εξέλιξής τους από κοινούς κλάδους.

Ο στόχος της εργασίας, να εντοπιστούν DNA πολυμορφισμοί που να διακρίνουν taxa του γένους *Epipactis*, επετεύχθη για τρία είδη:

- 1) Το είδος *E. microphylla* διακρίνεται:
  1. με χρήση της περιοχής *trnL* (με το αλληλόμορφο των 13 επαναλήψεων αδενίνης στο SSR, την απαλοιφή της 1 βάσης και 1 SNP).
- 2) Το είδος *E. palustris* διακρίνεται:
  1. με χρήση της περιοχής *trnL* (με το έλλειμμα των 12 βάσεων – πρότυπο C της πέψης με *MboI* και 5 SNPs) και
  2. με χρήση της περιοχής *trnH-psbA* (με το πρότυπο B της πέψης με *HinfI*).
- 3) Το είδος *E. subclausa* διακρίνεται:
  1. με χρήση της περιοχής *trnL* (με 1 SNP).

Το είδος *E. palustris* παρουσιάζει τη μεγαλύτερη διαφοροποίηση σε σχέση με τα υπόλοιπα.



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Álvarez I and Wendel JF (2003) Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference *Molecular Phylogenetics and Evolution* **29**(3): 417-434
- Amich F, García-Barriuso M and Bernardos S (2007) Polyploidy and speciation in the orchid flora of the Iberian Peninsula *Botanica Helvetica* **117**(2): 143-157
- Antonopoulos Z and Tsiftsis S (2012) *Epipactis purpurata* SM. and *Epipactis leptochila* (GODF.) GODF. subsp. *neglecta* KÜMPEL (Orchidaceae), two new *Epipactis* taxa for the flora of Greece *Berichte aus den Arbeitskreisen Heimische Orchideen* **29**(1): 81-99
- Arif IA, Bakir MA, Khan HA, Al Farhan AH, Al Homaidan AA, Bahkali AH, Al Sadoon M and Shobrak M (2010) A brief review of molecular techniques to assess plant diversity *International Journal of Molecular Sciences* **11**(5): 2079-2096
- Asahina H, Shinozaki J, Masuda K, Morimitsu Y and Satake M (2010) Identification of medicinal *Dendrobium* species by phylogenetic analyses using *matK* and *rbcL* sequences *Journal of Natural Medicines* **64**(2): 133-138
- Bachmann K (1994) Molecular markers in plant ecology *New Phytologist* **126**(3): 403-418
- Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter JM, Wojciechowski MF, Campbell CS and Donoghue MJ (1995) The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on Angiosperm phylogeny *Annals of the Missouri Botanical Garden* **82**(2): 247-277
- Bartolo G, D'emerico S, Pulvirenti S, Terrasi MC and Stuto S (2003) Cytotaxonomical considerations on *Epipactis robatschiana* (Orchidaceae), new species from Calabria (S Italy) *Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics* **56**(4): 439-445
- Baumann H, Künkele S and Lorenz R (2006) *Die Orchideen Europas mit angrenzenden Gebieten* Eugen Ulmer KG, Stuttgart, Germany
- Bernardos S, Amich F and Crespi A (2003) Karyological and taxonomical notes on three species of the genus *Epipactis* (*Neottioideae*, *Orchidaceae*) in the Central-Western Iberian peninsula *Folia Geobotanica* **38**(3): 319-331

Bernardos S, Tyteca D, Revuelta JL and Amich F (2004) A new endemic species of *Epipactis* (Orchidaceae) from north-east Portugal *Botanical Journal of the Linnean Society* **145**(2): 239-249

Cameron KM, Chase MW, Whitten WM, Kores PJ, Jarrell DC, Albert VA, Yukawa T, Hills HG and Goldman DH (1999) A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: evidence from *rbcL* nucleotide sequences *American Journal of Botany* **86**(2): 208-224

Cameron KM (2004) Utility of plastid *psaB* gene sequences for investigating intrafamilial relationships within Orchidaceae *Molecular Phylogenetics and Evolution* **31**(3): 1157-1180

CBOL Plant Working Group (2009) A DNA barcode for land plants *PNAS* **106**(31): 12794-12797

Chase MW, Freudenstein JV and Cameron KM (2003) DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In: Dixon KW, Kell SP, Barrett RL and Cribb PJ (Eds.) *Orchid conservation* Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia pp. 69-89

Chase MW (2005) Classification of Orchidaceae in the age of DNA data *Curtis's Botanical Magazine* **22**(1): 2-7

Cozzolino S and Widmer A (2005) Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception? *TRENDS in Ecology and Evolution* **20**(9): 487-494

Cribb PJ, Kell SP, Dixon KW and Barrett RL (2003) Orchid conservation: a global perspective In: Dixon KW, Kell SP, Barrett RL and Cribb PJ (Eds.) *Orchid conservation* Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia pp. 1-24

Cuénoud P, Savolainen V, Chatrou LW, Powell M, Grayer RJ and Chase MW (2002) Molecular phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear 18S rDNA and plastid *rbcL*, *atpB*, and *matK* DNA sequences *American Journal of Botany* **89**(1): 132-144

Delforge P (2006) *Orchids of Europe, north Africa and the Middle East* 3rd edition. A and C Black Publishers Ltd, London, UK

D'Emerico S, Grünanger P, Scrugli A and Pignone D (1999) Karyomorphological parameters and C-band distribution suggest phyletic relationships within the subtribe *Limodorinae* (Orchidaceae) *Plant Systematics and Evolution* **217**(1-2): 147-161

Dimopoulos P, Raus Th, Bergmeier E, Constantinidis Th, Iatrou G, Kokkini S, Strid A and Tzanoudakis D (2013) *Vascular plants of Greece: An annotated checklist*

-Berlin: Botanischer Garten und Botanisches Museum Berlin-Dahlem; Athens: Hellenic Botanical Society [Englera **31**]

Doyle JJ and Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue *Phytochemical Bulletin* **19**: 11-15

Ehlers BK and Pedersen HÆ (2000) Genetic variation in three species of *Epipactis* (Orchidaceae): geographic scale and evolutionary inferences *Biological Journal of the Linnean Society* **69**(3): 411-430

Felix LP and Guerra M (2010) Variation in chromosome number and the basic number of subfamily Epidendroideae (Orchidaceae) *Botanical Journal of the Linnean Society* **163**(2): 234-278

Giuseppina B, Brullo C, Pulvirenti S, Scrugli A, Terrasi MC and D'Emérico S (2010) Advances in chromosomal studies in Neottieae (Orchidaceae): constitutive heterochromatin, chromosomal rearrangements and speciation *Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics* **63**(2): 184-191

Gnavi G, Berteà CM and Maffei ME (2010) PCR, sequencing and PCR-RFLP of the 5S-rRNA-NTS region as a tool for the DNA fingerprinting of medicinal and aromatic plants *Flavour and Fragrance Journal* **25**(3): 132-137

Górniak M, Paun O and Chase MW (2010) Phylogenetic relationships within Orchidaceae based on a low-copy nuclear coding gene, *Xdh*: Congruence with organellar and nuclear ribosomal DNA results *Molecular Phylogenetics and Evolution* **56**(2): 784-795

Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT *Nucleic Acids Symposium Series* **41**: 95-98

Hollingsworth PM, Squirrell J, Hollingsworth ML, Richards AJ and Bateman RM (2006) Taxonomic complexity, conservation and recurrent origins of self-pollination in *Epipactis* (Orchidaceae). In: Bailey J and Ellis RG (Eds) *Current taxonomic research on the British & European flora* BSBI, London, UK pp. 27-44

Hollingsworth PM, Graham SW and Little DP (2011) Choosing and using a plant DNA barcode *PLoS ONE* **6**(5): e19254

Jakubska-Busse A, Proćków J, Górniak M and Gola EM (2012) Is *Epipactis pseudopurpurata* distinct from *E. purpurata* (Orchidaceae)? Evidence from morphology, anatomy, DNA and pollination biology *Botanical Journal of the Linnean Society* **170**(2): 243-256

- Jersáková J, Johnson SD and Kindlmann P (2006) Mechanisms and evolution of deceptive pollination in orchids *Biological Reviews* **81**(2): 219-235
- Karaka M, Ince AG, Ay ST, Turgut K and Onus AN (2008) PCR-RFLP and DAMD-PCR genotyping for *Salvia* species *Journal of the Science of Food and Agriculture* **88**(14): 2508-2516
- Kim DK, Kim JS and Kim JH (2012) The phylogenetic relationships of Asparagales in Korea based on five plastid DNA regions *Journal of Plant Biology* **55**(4): 325-341
- Kreutz CAJ (2004) *Catalogue of European orchids* Kreutz Publishers, Landgraaf, Netherlands
- Lahaye R, van der Bank M, Bogarin D, Warner J, Pupulin F, Gigot G, Maurin O, Duthoit S, Barraclough TG and Savolainen V (2008) DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots *PNAS* **105**(8): 2923-2928
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ and Higgins DG (2007) ClustalW and ClustalX version 2.0 *Bioinformatics* **23**(21): 2947-2948
- Martos F, Munoz F, Pailler T, Kottke I, Gonneau C and Selosse MA (2012) The role of epiphytism in architecture and evolutionary constraint within mycorrhizal networks of tropical orchids *Molecular Ecology* **21**(20): 5098-5109
- Neubig KM, Whitten WM, Carlsward BS, Blanco MA, Endara L, Williams NH and Moore M (2009) Phylogenetic utility of *yef1* in orchids: a plastid gene more variable than *matK* *Plant Systematics and Evolution* **277**(1-2): 75-84
- Oberwinkler F, Riess K, Bauer R, Selosse MA, Weiß M, Garnica S and Zuccaro A (2013) Enigmatic Sebacinales *Mycological Progress* **12**(1):1-27
- Ogura-Tsujita Y and Yukawa T (2008) *Epipactis helleborine* shows strong mycorrhizal preference towards ectomycorrhizal fungi with contrasting geographic distributions in Japan *Mycorrhiza* **18**(6-7): 331-338
- Otero JT, Flanagan NS, Herre EA, Ackerman JD, and Bayman P (2007) Widespread mycorrhizal specificity correlates to mycorrhizal function in the neotropical, epiphytic orchid *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae) *American Journal of Botany* **94**(12): 1944-1950
- Ramírez SR, Gravendeel B, Singer RB, Marshall CR and Pierce NE (2007) Dating the origin of the Orchidaceae from a fossil orchid with its pollinator *Nature* **448**(7157): 1042-1045

Roy M, Watthana S, Stier A, Richard F, Vessabutr S and Selosse MA (2009) Two mycoheterotrophic orchids from Thailand tropical dipterocarpacean forests associate with a broad diversity of ectomycorrhizal fungi *BMC Biology* **7**: 51

Saitou N and Nei M (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees *Molecular Biology and Evolution* **4**(4): 406-425

Scacchi R, Lanzara P and De Angelis G (1987) Study of electrophoretic variability in *Epipactis helleborine* (L.) Crantz, *E. palustris* (L.) Crantz and *E. microphylla* (Ehrh.) Swartz (fam. Orchidaceae) *Genetica* **72**(3): 217-224

Schaffer HE and Sederoff RR (1981) Improved estimation of DNA fragment lengths from agarose gels *Analytical Biochemistry* **115**(1): 113-122

Semagn K, Bjørnstad Å and Ndjiondjop MN (2006) An overview of molecular marker methods for plants *African Journal of Biotechnology* **5**(25): 2540-2568

Singh HK, Parveen I, Raghuvanshi S and Babbar SB (2012) The loci recommended as universal barcodes for plants on the basis of floristic studies may not work with congeneric species as exemplified by DNA barcoding of *Dendrobium* species *BMC Research Notes* **5**: 42

Squirrell J, Hollingsworth PM, Bateman RM, Dickson JH, Light MHS, MacConaill M and Tebbitt MC (2001) Partitioning and diversity of nuclear and organelle markers in native and introduced populations of *Epipactis helleborine* (Orchidaceae) *American Journal of Botany* **88**(8): 1409-1418

Squirrell J, Hollingsworth PM, Bateman RM, Tebbitt MC and Hollingsworth ML (2002) Taxonomic complexity and breeding system transitions: conservation genetics of the *Epipactis leptochila* complex (Orchidaceae) *Molecular Ecology* **11**(10): 1957-1964

Taberlet P, Gielly L, Pautou G and Bouvet J (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA *Plant Molecular Biology* **17**(5): 1105-1109

Taberlet P, Coissac E, Pompanon F, Gielly L, Miquel C, Valentini A, Vermet T, Corthier G, Brochmann C and Willerslev E (2007) Power and limitations of the chloroplast *trnL* (UAA) intron for plant DNA barcoding *Nucleic Acids Research* **35**(3): e14

Tałałaj I and Brzosko E (2008) Selfing potential in *Epipactis palustris*, *E. helleborine* and *E. atrorubens* (Orchidaceae) *Plant Systematics and Evolution* **276**(1-2): 21-29

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A and Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**(12): 2725-2729.

Tautz D, Arctander P, Minelli A, Thomas RH and Vogler AP (2003) A plea for DNA taxonomy *TRENDS in Ecology and Evolution* **18**(2): 70-74

Taylor DL and Bruns TD (1997) Independent, specialized invasions of ectomycorrhizal mutualism by two nonphotosynthetic orchids *PNAS* **94**(9): 4510-4515

Těšitelová T, Těšitel J, Jersáková J, Říhová G and Selosse MA (2012) Symbiotic germination capability of four *Epipactis* species (Orchidaceae) is broader than expected from adult ecology *American Journal of Botany* **99**(6): 1020-1032

Tranchida-Lombardo V, Cafasso D, Cristaudo A and Cozzolino S (2011) Phylogeographic patterns, genetic affinities and morphological differentiation between *Epipactis helleborine* and related lineages in a Mediterranean glacial refugium *Annals of Botany* **107**(3): 427-436

Tsiftsis S, Tsiripidis I, Karagiannakidou V, Alifragis D (2008) Niche analysis and conservation of the orchids of east Macedonia (NE Greece) *Acta Oecologica* **33**(1): 27-35

Tsiftsis S (2010) *Epipactis persica* subsp. *persica* (Orchidaceae), a new taxon for the flora of Greece *Journal Europäischer Orchideen* **42**(3/4): 477-486

Vereecken NJ, Dafni A and Cozzolino S (2010) Pollination syndromes in Mediterranean orchids—Implications for speciation, taxonomy and conservation *The Botanical Review* **76**(2): 220-240

White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M, Gelfand D, Sninsky J and White T (Eds.) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* Academic Press, San Diego, California, USA pp. 315-322

Δρούζας ΑΔ και Τσιφτσής Σ (2011) Μοριακή ποικιλότητα του *Epipactis helleborine* (Orchidaceae) στη βορειοανατολική Ελλάδα. 12<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Βοτανικής Εταιρίας, Ρέθυμνο, Ελλάδα

Τριανταφυλλίδης Α (2006) *Ειδικά θέματα γενετικής. Ανάλυση γονιδιωμάτων, γενετική και διαχείριση πληθυσμών* Εκδόσεις Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα



Τσιφτσής ΣΕ (2009) Τα ορχεοειδή (Orchidaceae) της Α. Μακεδονίας: εξάπλωση, οικολογικές συνθήκες ανάπτυξης και καθορισμός περιοχών υψηλής αξίας διατήρησης. Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Βιολογίας ΑΠΘ

Εικόνα εξωφύλλου: *Epipactis helleborine*, *E. microphylla* και *E. palustris* (ΠΗΓΗ: Τσιφτσής, 2009)