



Πανεπιστήμιο Πατρών
Σχολή Γεωπονικών Επιστημών
Τμήμα Γεωπονίας
ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΕΙΔΩΝ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *CROCUS*



ΤΣΙΡΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ ΠΑΠΑΣΩΤΗΡΟΠΟΥΛΟΣ

ΑΜΑΛΙΑΔΑ 2021

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
Καλλιέργεια - Συλλογή Κρόκου	8
Σκοπός.....	12
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	13
Δειγματοληψία.....	13
Απομόνωση DNA	14
Τα στάδια του πρωτοκόλλου CTAB (Doyle and Doyle 1990):.....	15
Έλεγχος DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	16
Παρασκευή της πήκτης αγαρόζης.....	16
Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων	17
Έλεγχος της πήκτης αγαρόζης.....	19
Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) αρχή της μεθόδου.....	20
Αντιδραστήρια της PCR	20
Τα βασικά στάδια της μεθόδου της PCR.....	23
Δείκτες ISSR.....	24
Επεξεργασία και Ανάλυση των Δεδομένων	26
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	28
Δείκτες ISSR.....	28
Γενετική ποικιλότητα εκτιμώμενη με δείκτες ISSR	28
Συμπεράσματα	32
ΠΙΝΑΚΕΣ - ΧΑΡΤΕΣ	34
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	39

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

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

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γένος *Crocus* εμφανίζει μεγάλη παραλλακτικότητα στην περιοχή των Βαλκανίων και της Τουρκίας, καθώς περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό ενδημικών και γεωγραφικά περιορισμένων ειδών. Στοχος της εργασίας ήταν η συμβολή στον γενετικό χαρακτηρισμό ειδών του γένους *Crocus* χρησιμοποιώντας δείκτες Inter Simple Sequence Repeats (ISSR).

Γενετικό υλικό απομονώθηκε από τα είδη *C. cartwrightianus*, *C. oreoreticus* και *C. laevigatus* οι οποίοι συλλέχτηκαν στην Κρήτη καθώς και *C. sativus* που καλλιεργείται στην περιοχή της Δυτικής Μακεδονίας. Πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR με έξι εκκινητές ISSR (UBC-807, UBC-808, UBC-811, UBC-812, UBC-826, UBC-840), οι οποίοι μας έδωσαν το μέγιστο αριθμό αξιόπιστων και αναπαραγωγίμων πολυμορφισμών για την γονοτύπηση των πληθυσμών. Εκτίμηστηκαν διάφοροι παράμετροι γενετικής ποικιλότητας, ενώ κατασκευάστηκε δενδρόγραμμα UPGMA προκειμένου να απεικονισθούν οι γενετικές σχέσεις μεταξύ των ειδών. Η ανάλυση μοριακής διακύμανσης (AMOVA) έδειξε ότι το κύριο ποσό της ποικιλότητας κατανέμεται εντός των ειδών, ενώ η ανάλυση κύριων συντεταγμένων (PCoA) εμφανίζει παρόμοιο πρότυπο με αυτό του δενδρογραμματος UPGMA.

Τα αποτελέσματα, μας έδειξαν ότι οι δείκτες ISSR μπορούν να παρέχουν ένα σταθερό διαγνωστικό εργαλείο για την διάκριση ανάμεσα στα τέσσερα είδη *Crocus*, καθώς και να εκτιμήσουν τα επίπεδα γενετικής ποικιλότητας εντός αλλά και διαφοροποίησης που υπάρχουν μεταξύ τους για την ανάπτυξη αποτελεσματικών στρατηγικών προστασίας και διαχείρισης.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

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

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

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

Το γένος *Crocus* είναι γνωστό από την αρχαιότητα, αφού για αιώνες ο κρόκος ήταν ένα πολύ σημαντικό είδος πολυτελείας στην Περσία, καθώς και ένα πολύτιμο είδος συναλλαγής στις χώρες της Ασίας. Οι Φοίνικες αφιέρωναν πίτες από κρόκο στη θεά Αστάρτη, ενώ μικρά δοχεία με κρόκο βρέθηκαν σε Αιγυπτιακούς τάφους. Η Κλεοπάτρα χρησιμοποίησε τον κρόκο στα καλλυντικά και οι Ρωμαίοι σε επίσημα γεύματα, προσέφεραν κρασί αρωματισμένο με κρόκο. Έχει αναφερθεί από τον Όμηρο, τον Πλίνιο και τον Ιπποκράτη, ενώ έχει βρεθεί τοιχογραφία στο βορειοδυτικό τμήμα του ανακτόρου της Κνωσού (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. «Ο Κροκοσυλλέκτης» στα Ανάκτορα της Κνωσού (πηγή: <http://www.gcex.gr/wp-content/uploads/2012/09/Krokow-Kozanis.pdf>)

Το γένος *Crocus* ανήκει στην οικογένεια Iridaceae και στη τάξη των μονοκοτυλήδων και αποτελείται από περίπου 160 αναγνωρισμένα είδη (Mathew 1982, Petersen et al. 2008, Kerndorff and Pasche 2011, Kerndorff et al. 2011, 2013, Peruzzi and Carta 2011, Randelović et al. 2012, Harpke et al. 2015, Rukšāns J. 2015).

Ο *Crocus sativus*, ή αλλιώς Κρόκος ο ήμερος, πρωτοεμφανίστηκε στην Ασία. Εξαπλώνεται από τη Πορτογαλία και το Μαρόκο μέχρι τη Δυτική Κίνα. Η πλειονότητα των ειδών είναι συγκεντρωμένη στη Βαλκανική χερσόνησο και στην Τουρκία. Το γένος είναι προσαρμοσμένο στα ξηρά καλοκαίρια και στους υγρούς χειμώνες που χαρακτηρίζουν το κλίμα της περιοχής (Heywood and Zohary 1995).

Στην Ελλάδα, μέχρι το 2013 είχαν αναφερθεί ότι φύονται είκοσι εννέα taxa που περιλαμβάνονται σε 25 είδη του γένους *Crocus* (Dimopoulos et al., 2013). Κατά τη διάρκεια του 2014 ανακαλύφθηκαν και περιεγράφηκαν δύο νέα taxa, οι *Crocus orphei* Karamplianis & Constantin (Harpke et al., 2015), και *Crocus flavus* Weston subsp. *atticus* Kit Tan, Zografidis & Mermygkas (Tan, K. & Zografidis, A. 2014), οπότε ο αριθμός των ειδών *Crocus* στην Ελλάδα είναι πλέον 26, ενώ ο αριθμός των taxa 31. Στο νησί της Κρήτης (μια απομονωμένη γεωγραφική οντότητα), αναπτύσσονται πέντε είδη (6 taxa), μεταξύ των οποίων ο *C. cartwrightianus* Herbert, και ο *C. laevigatus* Bory & Chaub. είναι Ελληνικά ενδημικά και *C. oreocreticus* Burttt ένα τοπικό ενδημικό στην Κρήτη.

Πιο συγκεκριμένα, ο *C. oreocreticus* περιορίζεται στην Κεντρική και Ανατολική Κρήτη (όρος Ψηλορείτης, όρος Δίκτης, όρος Θρυπτής), ενώ ο *C. cartwrightianus* ευδοκίμει στην Δυτική Κρήτη, σε αρκετά νησιά των Κυκλάδων, την Αττική, την Νότια Εύβοια και την Νότια Πελοπόννησο (Dimopoulos 2013, Larsen 2015). Ο *C. laevigatus* αναπτύσσεται σε όλη την Κρήτη, τις Κυκλάδες, την Πελοπόννησο, την στερεά Ελλάδα και την Εύβοια (P. Dimopoulos 2013).

Το σαφράν, οι αποξηραμένοι στύλοι του *C. sativus* L., είναι ένα από τα ακριβότερα καλλιεργήσιμα αγροτικά προϊόντα και ένα πολύ σημαντικό φαρμακευτικό φυτό.

Εκτός από τις χρήσεις του ως μπαχαρικό, χρησιμοποιείται επίσης στις αποστάξεις, την ζαχαροπλαστική, τα καλλυντικά και ως βαφή. Το σαφράν και τα κύρια συστατικά του έχουν πολλές ευεργετικές ιδιότητες, οι οποίες έχουν δοκιμαστεί σε κλινικές δοκιμές (Christodoulou 2015), ευεργετικές ιδιότητες έχουν επίσης αποδοθεί σε άλλα είδη *Crocus* (Chryssanthi 2007) δείχνοντας ότι αυτά τα είδη θα μπορούσαν να έχουν πιθανές βιοϊατρικές εφαρμογές.

Σήμερα ο κρόκος καλλιεργείται εκτεταμένα στην Κεντρική και Νότια Ευρώπη, στη Νότιο Αφρική, στη Μέση Ανατολή και κατά πλάτος της Κεντρικής Ασίας μέχρι τη Δυτική Κίνα. Συγκεκριμένες περιοχές καλλιέργειας είναι η Ιταλία, το Μαρόκο, το Αζερμπαϊτζάν, η Ελλάδα, η Ινδία, η Ισπανία και το Ιράν (κατά σειρά αυξανόμενης παραγωγής) με τις δύο τελευταίες να παράγουν το 80%. Καλλιέργειες μικρότερου εύρους υπάρχουν επίσης στην Κίνα, στην Αίγυπτο, στην Γαλλία, στο Ισραήλ, στο Μεξικό, στη Νέα Ζηλανδία, στην Τουρκία και στην Καλιφόρνια (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Περιοχές καλλιέργειας Κρόκου (αριστερά) (πηγή: Wikipedia), παιδιά που βοηθούν στην συλλογή του Κρόκου (δεξιά) (πηγή: <https://perierga.gr/2018/12/ena-fotografiko-taxidi-stin-kalliergia-tou-krokou-kozanis/>).

Καλλιέργεια - Συλλογή Κρόκου

Μοναδική περιοχή στην Ελλάδα που καλλιεργείται ο κρόκος είναι η περιοχή της Κοζάνης και πιο συγκεκριμένα τα χωριά Κρόκος, Καρυδίτσα και Άνω Κόμη όπου το ενδιαφέρον επικεντρώνεται κυρίως στις αρτυματικές και χρωστικές ιδιότητες των στύλων του.

Ο κύκλος καλλιέργειας του κρόκου χαρακτηρίζεται από δύο στάδια κατά τη διάρκεια του έτους: τη φάση δραστηριότητας και τη φάση του λήθαργου. Η περίοδος δραστηριότητας εκτείνεται από τον Αύγουστο ή το Σεπτέμβριο έως τον Απρίλιο. Στην αρχή, το φυτό ανακτά τη μεταβολική του δραστηριότητα, οι ρίζες, ο βλαστός, τα άνθη, τα φύλλα αρχίζουν να αναπτύσσονται και ξεκινά μια νέα φάση βλάστησης. Κατά την περίοδο του λήθαργου οι βολβοί παραμένουν αναλλοίωτοι. Μεταξύ των δύο αυτών περιόδων υπάρχει μια μεταβατική περίοδος κατά την οποία ο βολβός συνεχίζει να παράγει μιτώσεις και να διαφοροποιείται, ακόμη κι αν αυτή η τάση μειώνεται κατά την εξέλιξη του κύκλου

Οι εργασίες που απαιτούνται για τη φύτευση του κρόκου είναι οι συνήθεις εργασίες μιας πολυετής καλλιέργειας. Ξεκινούμε με βαθύ σκάψιμο, στη συνέχεια περνά η σβάρνα, ο δονούμενος ελκυστήρας ή ο κύλινδρος πολλές φορές, έως ότου επιτευχθεί έδαφος εύκαμπτο και χαλαρό.

Η φύτευση πραγματοποιείται με βολβούς μέσου ή μεγάλου μεγέθους, αποκλείοντας τους μικρότερους (< 22 χιλ.), ενώ φυτεύονται σε βάθος 15-25 εκ., ανάλογα με τον αριθμό ετών κατά τους οποίους θα μείνουν στο έδαφος. Στην Ισπανία και τη Σαρδηνία, όπου η περίοδος παραγωγής διαρκεί 3 έως 4 έτη, η φύτευση συνηθίζεται να γίνεται σε βάθος 15-20 εκ., ενώ στη Δυτική Μακεδονία πραγματοποιείται σε βάθος 25 εκ.. Η πυκνότητα φύτευσης επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την απόδοση του πρώτου έτους, ενώ η σημασία του παράγοντα αυτού μειώνεται όσο αυξάνεται η ηλικία της καλλιέργειας. Η φύτευση πραγματοποιείται συνήθως σε αυλάκια που απέχουν 50 εκ. μεταξύ τους. Στη Δυτική Μακεδονία, η απόσταση φύτευσης μεταξύ των αυλακιών ποικίλλει από 20 έως 50 εκ..

Στη Σαρδηνία και τη Δυτική Μακεδονία, οι καλλιέργειες του κρόκου δεν αρδεύονται. Ο κρόκος είναι ιδιαίτερα ανθεκτικός στην ξηρασία, ενώ προσαρμόζεται πολύ καλά στο πότισμα.

Η συλλογή των ανθών του *C. sativus*, που αρχίζουν να βγαίνουν κατά τα μέσα Οκτωβρίου, γίνεται κάτω από πολύ δύσκολες συνθήκες ακόμα και σε απότομες πλαγιές. Η κοπιαστική αυτή εργασία, η οποία απαιτεί σχετική δεξιοτεχνία, αρχίζει από την ανατολή και συνεχίζεται ως τη δύση του ηλίου για διάστημα 20-25 ημερών (Μανώλης Πατσιλιάς, Πρόεδρος Αναγκαστικού Συνεταιρισμού Κροκοπαραγωγών Κοζάνης). Ο κρόκος είναι έτοιμος για συγκομιδή μόλις το λουλούδι ανοίξει τελείως.

Νωρίς το πρωί ή αργά το απόγευμα είναι η καλύτερη ώρα για συγκομιδή, διότι τα φυτικά έλαια βρίσκονται στην υψηλότερη συγκέντρωση. Αφού συλλεχθούν τα άνθη, τοποθετούνται πάνω σε ειδικό τραπέζι, όπου με τη δημιουργία αέρα από ηλεκτροκίνητους ανεμιστήρες ξεχωρίζονται τα πέταλα από τους στήμονες και τους στύλους. Στη συνέχεια, οι εργάτες (συνήθως γυναίκες) (Εικόνα 3) με δεξιοτεχνία ανοίγουν τα πέταλα και αποσπών από το κάθε λουλούδι όσους στύλους απέμειναν από τη προηγούμενη διαδικασία. Οι διαδικασίες συλλογής και απομόνωσης είναι αρκετά επίπονες και πρέπει να γίνονται γρήγορα αλλά αρκετά προσεκτικά μακριά από ήλιο και από υγρασία (Εικόνα 3).



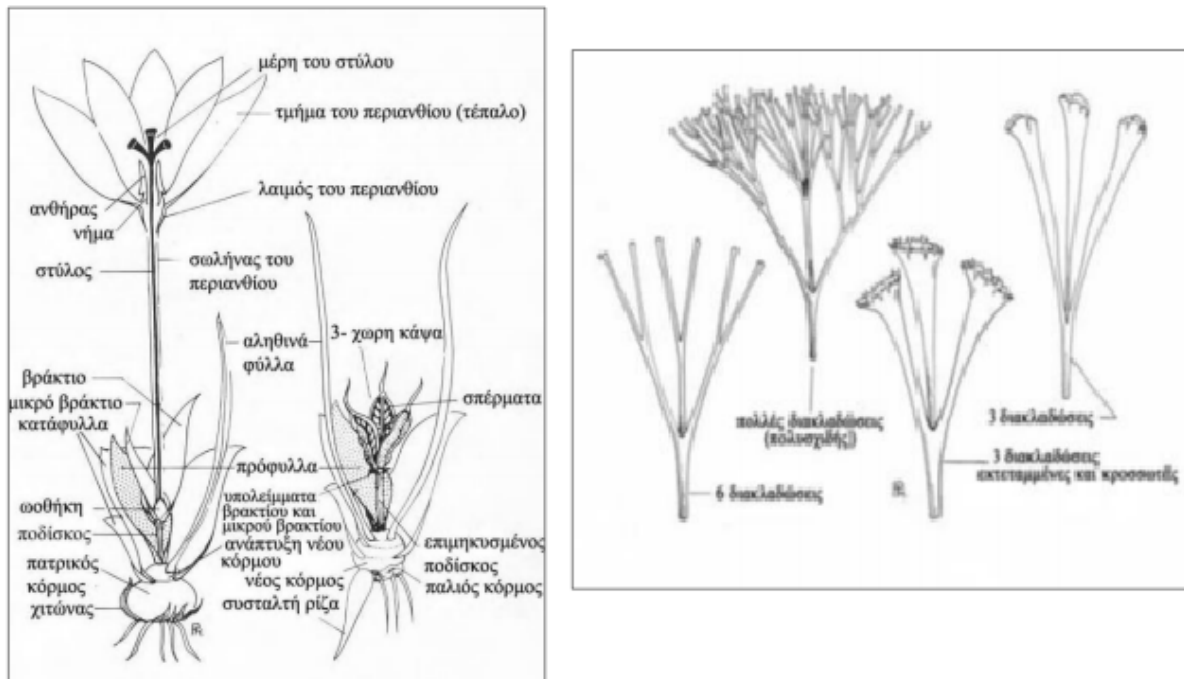
Εικόνα 3. Συλλογή (αριστερά), Διαλογή και Απομόνωση (κέντρο), Ξήρανση (δεξιά).
(πηγή: <https://nemertes.lis.upatras.gr/jsrui/bitstream/10889/9963/6/Lymperopoulou%28pharm%29.pdf>)

Η γεύση και το άρωμα του τελικού προϊόντος εξαρτάται άμεσα από τις διαδικασίες συγκομιδής και ξήρανσης. Στην Ελλάδα η ξήρανση γίνεται σε σκοτεινά δωμάτια που θερμαίνονται με προοδευτικά ανερχόμενη θερμοκρασία έως 40°C για 8-12 h. Η ξήρανση των στύλων είναι η πιο βασική και λεπτή εργασία και απαιτεί πείρα, μεγάλη προσοχή και τέχνη ενώ η διαδικασία της αφυδάτωσης οδηγεί σε απώλεια του συνολικού βάρους κατά ένα ποσοστό 20%. Αν ο κρόκος ξηραθεί κανονικά, διατηρεί αναλλοίωτες τις χαρακτηριστικές του ιδιότητες (χρώμα και άρωμα), ενώ εφαρμόζεται ποιοτικός έλεγχος σύμφωνα με τις τεχνικές προδιαγραφές κατά ISO/TS 3632 (2003), προκειμένου να αποφευχθούν οι νοθείες.

Το χρώμα, το σχήμα και το μέγεθος του άνθους είναι αυτό που μας εντυπωσιάζει με την πρώτη ματιά. Όμως το άνθος δεν είναι ένα σταθερό γνώρισμα για τον βέβαιο προσδιορισμό ενός είδους κρόκου διότι:

- το χρώμα του ίδιου είδους είναι δυνατόν να ποικίλει, με σύνηθες το φαινόμενο των λευκών ανθών σε πολλά είδη (αλφικοί τύποι), όπως στον *C. cartwrightianus* ο οποίος έχει ως επί το πλείστον ανοιχτά βιολετί έως πορφυρά άνθη,
- υπάρχει περίπτωση δύο είδη, για παράδειγμα ο *C. cartwrightianus* και ο *C. oreocreticus*, με την πρώτη ματιά να μοιάζουν πολύ μεταξύ τους, αλλά να διαφέρουν σημαντικά σε άλλα χαρακτηριστικά όπως το μέγεθος του στύλου, η ύπαρξη νηματιδίων στον ανθικό σωλήνα και ο χρόνος εμφάνισης των φύλλων.

Ένα χαρακτηριστικό που είναι σταθερό για τον προσδιορισμό των ειδών του κρόκου είναι τα 3 πεπλατυσμένα στίγματα, τα οποία μπορεί να είναι ακέραια, οδοντωτά, δισχιδή ή πολυσχιδή (έως και 30 ή και 40 βραχίονες) (Εικόνα 4). Τα στίγματα αποτελούν το άνω μέρος του στύλου. Υπάρχουν ενδείξεις ότι τα τελευταία αποτελούν τους χρωμοπλάστες (M. Grilli Caiola, A. Canini 2010).



Εικόνα 4. Μορφολογία Κρόκου και διάφορων στύλων.

(πηγή: [https://nemertes.lis.upatras.gr/jspui/bitstream/10889/9963/6/Lymperopoulou\(pharm\).pdf](https://nemertes.lis.upatras.gr/jspui/bitstream/10889/9963/6/Lymperopoulou(pharm).pdf))

Οι μορφολογικοί χαρακτήρες καθώς επίσης ο χρωμοσωματικός αριθμός, έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στην ταξινόμηση του γένους *Crocus*. Από την άλλη πλευρά, ο γενετικός χαρακτηρισμός είναι απαραίτητος για την κατανόηση των σχέσεων και της ποικιλομορφίας μεταξύ των ειδών (Alsayied et al. 2015). Οι μοριακοί δείκτες δεν επηρεάζονται από το περιβάλλον και τα στάδια ανάπτυξης του φυτού, γι' αυτό είναι αποτελεσματικοί για την αποκάλυψη γενετικής παραλλακτικότητας που υφίσταται στα φυτικά είδη (Nemati et al. 2014). Η χρήση των μοριακών δεικτών για την αξιολόγηση της απόκλισης μεταξύ γενοτύπων διαφόρων ειδών *Crocus*, είναι ένα σημαντικό εργαλείο για την ταξινόμηση τους, την ανάπτυξη στρατηγικών διατήρησης, την δημιουργία νέων ποικιλιών μέσω βελτίωσης και για σκοπούς ταυτοποίησης (Mir et al. 2015).

Η εκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας και ο προσδιορισμός των φυλογενετικών σχέσεων των ειδών *Crocus*, με την χρήση μοριακών δεικτών έχουν αποτελέσει αντικείμενο πολλών μελετών (Harpke et al. 2015, Larsen et al. 2015, Keify et al. 2012, Norbak et al. 2002, Alsayied et al. 2015, Nematı et al. 2014, Mir et al. 2015, Sik et al. 2008). Η εφαρμογή των δεικτών ISSR σε μελέτες γενετικής ποικιλομορφίας φυτών είναι διαδεδομένη, δεδομένου ότι δεν απαιτείται προηγούμενη πληροφορία σχετικά με την αλληλουχία DNA, δεν έχουν ιδιαίτερες απαιτήσεις και μπορούν εύκολα να εφαρμοστούν σε διαφορετικά είδη, ενώ και το κόστος τους είναι χαμηλό (Zeitkiewicz et al. 1994). Οι ISSR δείκτες έχουν χρησιμοποιηθεί επανειλημμένως, για τον προσδιορισμό της ενδο-γενετικής και της δια-γενετικής ποικιλότητας, στα είδη *Crocus* (Sik et al. 2008, Sheidai et al. 2018, Moraga et al. 2010).

Σκοπός

Σκοπός της μελέτης αυτής ήταν να συμβάλει στο χαρακτηρισμό και την μελέτη της γενετικής διαφοροποίησης του καλλιεργούμενου *C. sativus* από τη Δυτική Μακεδονία με τρία διαφορετικά άγρια taxa *Crocus* από την Κρήτη, τον *C. cartwrightianus*, τον *C. oreocreticus* και τον *C. laevigatus*. Ο γενετικός χαρακτηρισμός διεξήχθη με την χρήση δεικτών Inter Simple Sequence Repeats (ISSR). Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης μπορούν να συμβάλουν στη συσχέτιση της γενετικής ποικιλότητας και την αναγνώριση πιθανών γενοτύπων με παρόμοια φυτοχημικά χαρακτηριστικά με αυτά του *C. sativus* τα οποία μπορούν να παράγουν υψηλής ποιότητας σαφράν και ως εκ τούτου να εισαχθούν νέες ποικιλίες που προέρχονται από διαφορετικά είδη αποφεύγοντας τις βλαβερές συνέπειες της μονοκαλλιέργειας. Επιπλέον, θα συλλεχθούν σημαντικά δεδομένα που θα μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν στην κατάρτιση στρατηγικών διαχείρισης για την προστασία και την αξιοποίηση των ειδών αυτών

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Δειγματοληψία

Για την πειραματική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν τα αποξηραμένα στίγματα του *C. sativus* από το "Συνεταιρισμό Σαφράν, Κρόκος Κοζάνη", που είχαν συγκομιστεί το έτος 2009. Ανθη από τα ελληνικά ενδημικά είδη: *C. cartwrightianus*, *C. oreocreticus*, *C. laevigatus* συλλέχθηκαν από την ομάδα του Καθ. Γ. Ιατρού (Τμήμα Βιολογίας Παν. Πατρών) από την Κρήτη κατά τους μήνες Νοέμβριο και Δεκέμβριο του 2009. Συγκεκριμένα, το *C. cartwrightianus* συλλέχθηκε από τη χερσόνησο του Ακρωτηρίου στα Χανιά, το *C. oreocreticus* από το οροπέδιο Καθαρό στο Λασιθί και το *C. laevigatus* από την περιοχή της Αγίας Φωτιάς στη Σητεία, Λασιθίου με τις συντεταγμένες να φαίνονται στον πίνακα 1.



Εικόνα 5. Χάρτης γεωγραφικού προσανατολισμού δειγματοληψίας (πηγή: Google maps)

Γενετική Ανάλυση

Απομόνωση DNA

Το DNA εξήχθη από στίγματα κάθε ατόμου του είδους *Crocus* που μελετήθηκε ακολουθώντας το πρωτόκολλο CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) (Doyle and Doyle 1990) με μικρές τροποποιήσεις. Η ποσοτικοποίηση και η αξιολόγηση της ποιότητας του καθαρισμένου DNA διεξήχθησαν με ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αγαρόζης και φασματοφωτομετρικά (OD₂₆₀ / 280). Τα δείγματα DNA διαλύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα TE pH 8 και αποθηκεύτηκαν στους -20 ° C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

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

1. Ομογενοποίηση μέσα σε σωληνάριο τύπου erpendorf με προσθήκη 200 μL $\delta/\text{τος}$ CTAB (προθερμασμένο στους 60°C).
2. Προσθήκη 1 μL proteinase k (stock 20 $\text{mg}/\mu\text{L}$) ανάδευση 2-3 φορές.
3. Προσθήκη 300 μL προθερμασμένου CTAB επιπλέον.
4. Επώαση των δειγμάτων στους 60°C για 30 min.
5. Προσθήκη 500 μL $\delta/\text{τος}$ Chloroform:Isoamyl Alcohol 24:1.
6. Ανάδευση για 5 min.
7. Φυγοκέντρηση 6 min στις 10.000x RPM σε θερμοκρασία δωματίου και αφαίρεση του υπερκείμενου.
8. Το υπερκείμενο τοποθετείται σε νέο σωληνάριο erpendorf και προστίθεται 450 μL Chloroform: Isoamyl Alcohol.
9. Ανάδευση για 5 min.
10. Φυγοκέντρηση για 10 min στις 10.000 RPM σε θερμοκρασία δωματίου.
11. Μεταφορά της υδάτινης φάσης σε νέο σωληνάριο τύπου erpendorf με ανοιχτο το tube ώστε να φύγει η περίσσια ατμών του χλωροφόρμιου.
12. Προσθήκη 450 μL Isopropanol στην υδάτινη φάση αυστηρώς παγωμένη.
13. Ανάδευση για 1 min σε Vortex .
14. Τοποθέτηση στους -20°C για 30 min. Εναλλακτικά όλη τη νύχτα.
15. Φυγοκέντρηση για 20 min στους 4°C σε μέγιστη ταχύτητα.
16. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθεται 1 ml αιθανόλης 70% και ελαφριά ανάδευση.
17. Φυγοκέντρηση για 20 min στους 4°C σε μέγιστη ταχύτητα.
18. Το υπερκείμενο απομακρύνεται.
19. Στέγνωμα των σωληναρίων με ξήρανση των δειγμάτων τοποθετώντας τα tubes στους 37°C με τα καπάκια ανοιχτά.
20. Προσθήκη 50 μL ddH₂O ή TE pH8.
21. Αναδιάλυση και αποθήκευση στους -20°C .

Έλεγχος DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός του απομονωθέντος DNA γίνεται με τη μέθοδο ηλεκτροφόρησης. Η ηλεκτροφόρηση είναι μια μέθοδος που στηρίζεται στο γεγονός ότι τα περισσότερα μακρομόρια όπως το DNA, RNA και πρωτεΐνες, διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους καθώς είναι ηλεκτρικά φορτισμένα. Άρα όταν βρεθούν σε ηλεκτρικό πεδίο, κινούνται με ταχύτητα που εξαρτάται από τον λόγο του ηλεκτρικού φορτίου προς την μάζα τους.

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

Παρασκευή της πηκτής αγαρόζης

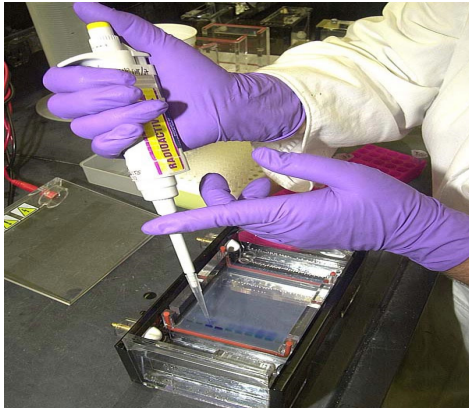
Για την παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης, αρχικά αναμιγνύουμε σε ειδική κωνική φιάλη 1,4 gr αγαρόζης με 70 ml διαλύματος Tris Borate EDTA¹ (TBE) 1X. Στη συνέχεια, το μείγμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι το σημείο βρασμού. Έπειτα ψύχουμε το διάλυμα, αναδεύοντας κυκλικά κάτω από συνεχή ροή νερού. Αμέσως μετά προσθέτουμε 1,8ml διαλύματος 5% βρωμιούχου αιθιδίου και αναδεύουμε. Ακολουθεί η έκχυση του διαλύματος σε ειδικό πλαίσιο, και απομακρύνονται οι φυσαλίδες που πιθανόν έχουν δημιουργηθεί (εικόνα 6).



Εικόνα 6: Δημιουργία πηκτώματος αγαρόζης

¹ Το Tris Borate EDTA (TBE) 1X είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει 89 mM Tris-borate και 2 mM EDTA, με pH 8,3.

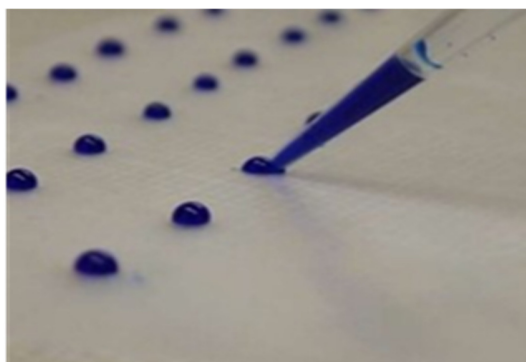
Σε ειδικές εγκοπές του πλαισίου τοποθετούμε μια "χτένα" η οποία δημιουργεί "πηγαδάκια". Αφού πήξει η αгарόζη, αφαιρείται η χτένα προσεκτικά από τη πηκτή. Με αυτόν τον τρόπο έχουν σχηματιστεί τα πηγαδάκια μέσα στην πηκτή στα οποία τοποθετείται η ποσότητα του DNA που επιθυμούμε να ηλεκτροφορηθεί (εικόνα 7).



Εικόνα 7: Φόρτωση δειγμάτων σε πήκτωμα αгарόζης

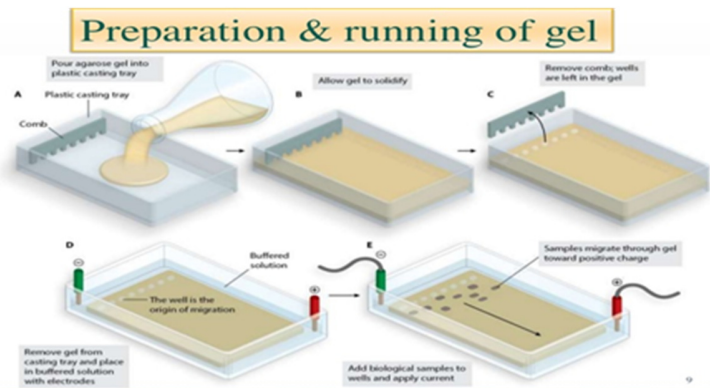
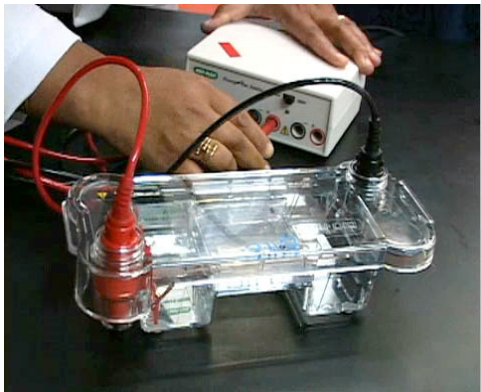
Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων

Τοποθετούμε την πηκτή αгарόζης μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία περιέχει 700 ml διαλύματος TAE 1X. Για κάθε δείγμα, αναμιγνύουμε πάνω σε ειδική επιφάνεια parafilm 5μL διαλύματος DNA με 1μL διαλύματος φόρτωσης (Loading Buffer) (εικόνα 8).



Εικόνα 8. Ανάμιξη DNA και Loading Buffer πάνω σε Parafilm

Κάθε δείγμα τοποθετείται σε ξεχωριστό πηγαδάκι της πηκτής, με τη βοήθεια μιας μικροπιπέτας. Μετά το τέλος της διαδικασίας, συνδέουμε τη συσκευή ηλεκτροφόρησης με τροφοδοτικό μηχανήμα και εφαρμόζουμε ηλεκτρικό πεδίο (110 Volts, 90 mAmps) (Εικόνα 9). Εφόσον γνωρίζουμε ότι το DNA αρνητικά φορτισμένο λόγω της φωσφορικής του ομάδας, τα μόρια του DNA θα μετακινηθούν προς την άνοδο. Η διάρκεια της ηλεκτροφόρησης είναι περίπου 1 ώρα.



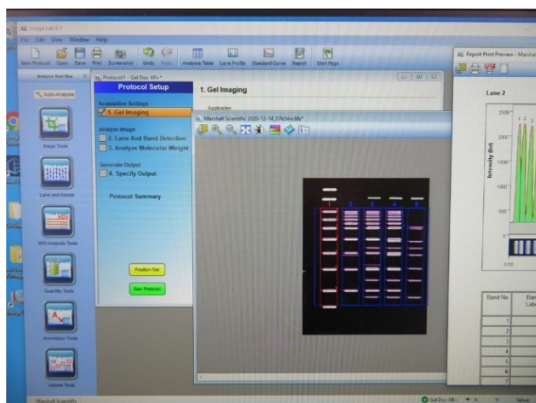
Εικόνα 9. Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων

Έλεγχος της πήκτης αγαρόζης.

Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης γίνεται ορατό με τη βοήθεια συσκευής που εκπέμπει υπεριώδη ακτινοβολία (UV), ώστε να μπορούμε να δούμε με ευκρίνεια τις ζώνες που έχουν δημιουργηθεί εκμεταλλευόμενοι τη δέσμευση του βρωμιούχου αιθιδίου στις φωσφοδιεστερικές ομάδες του DNA. Εάν η απομόνωση είναι επιτυχής, το DNA θα εμφανίζεται σαν μία φωτεινή ζώνη επάνω στην πήκτη αγαρόζης. Το μηχάνημα συνδέεται με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή και με ηλεκτρονικό υπολογιστή (εικόνα 10). Μέσω ενός ειδικού λογισμικού προγράμματος, γίνεται η επεξεργασία και η αποθήκευση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης (εικόνα 11).



Εικόνα 10. Ειδικό μηχάνημα απεικόνισης DNA (Biorad USA)



Εικόνα 11. Ειδικό λογισμικό πρόγραμμα (Biorad USA)

Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) αρχή της μεθόδου.

Με τον όρο «αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης» (Polymerase Chain Reaction - PCR) αναφερόμαστε στην τεχνική που χρησιμοποιείται για την *in vitro* παραγωγή μεγάλου αριθμού αντιγράφων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης επινοήθηκε στα μέσα της δεκαετίας του '80 από τον Kary Mullis (1985). Χάρη στη δυνατότητα απομόνωσης καθαρής DNA πολυμεράσης, καθώς και στη χημική σύνθεση ολιγονουκλεοτιδίων, σε μεγάλες ποσότητες, πραγματοποιήθηκε ο πολλαπλασιασμός συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA χωρίς τη χρήση της τεχνικής της κλωνοποίησης και της μεταφοράς σε πλασμιδιακούς φορείς.

Η PCR είναι μια πολύ γρήγορη τεχνική που χρησιμοποιείται για να πολλαπλασιάσει με ακρίβεια μικρά τμήματα του DNA. Κάτι τέτοιο είναι απαραίτητο γιατί για να γίνει ανάλυση του DNA σε μοριακό επίπεδο, είναι απαραίτητες αρκετά μεγάλες ποσότητες του DNA.

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

Αντιδραστήρια της PCR

Τα υλικά που χρησιμοποιήσαμε ήταν τα εξής:

- 1) PCR Buffer 10x
- 2) dNTP's mix
- 3) MgCl₂
- 4) dsDNA
- 5) primer
- 6) H₂O
- 7) Taq

Πρότυπο (template) DNA

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

Taq πολυμεράση

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

Ολιγονουκλεοτίδια έναρξης (primers)

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

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

dNTP's

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

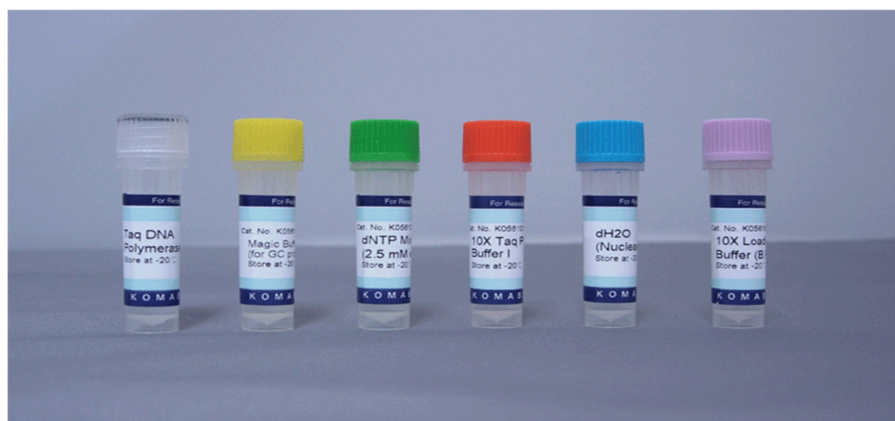
MgCl₂

Διάλυμα ιόντων Mg^{2+} που παρέχονται με τη μορφή διαλύματος $MgCl_2$ και τα οποία δρουν ως προσθετική ομάδα, καθώς είναι απαραίτητα για τη δράση της πολυμεράσης. Η τελική συγκέντρωση των ιόντων αυτών εξαρτάται από την παρουσία EDTA και την αντίστοιχη των dNTPs.

Ρυθμιστικό διάλυμα της πολυμεράσης

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

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



Εικόνα 12. Αντιδραστήρια της PCR (Takara, Japan)

Τα βασικά στάδια της μεθόδου της PCR

1° Στάδιο: Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA (denaturation)

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

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

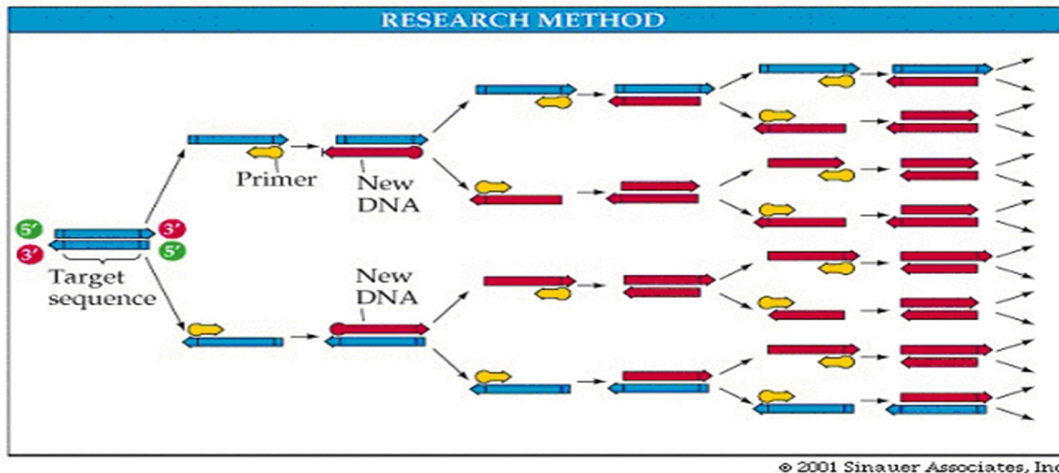
Πραγματοποιείται ο υβριδισμός του αποδιατεταγμένου πλέον DNA με τους εκκινητες, σε θερμοκρασία που κυμαίνεται μεταξύ 37°C και 60°C. Η επιλογή της καταλληλότερης θερμοκρασίας εξαρτάται από το σημείο τήξης (T_m) των εκκινητών και από την εξειδίκευση που εμφανίζουν αυτά ως προς την αλληλουχία - στόχο. Στο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

3° Στάδιο: Επιμήκυνση εκκινητών (extension)

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

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

Αυτή η διαδικασία συνεχίζεται για n κύκλους, που συνήθως κυμαίνονται μεταξύ 30 και 40 κύκλων. Στο τέλος n τέτοιων κύκλων, η αντίδραση περιέχει θεωρητικά $2n$ δίκλιωνα DNA μόρια που είναι αντίγραφα της αλληλουχίας του DNA που υπάρχει ανάμεσα στους εκκινητές.



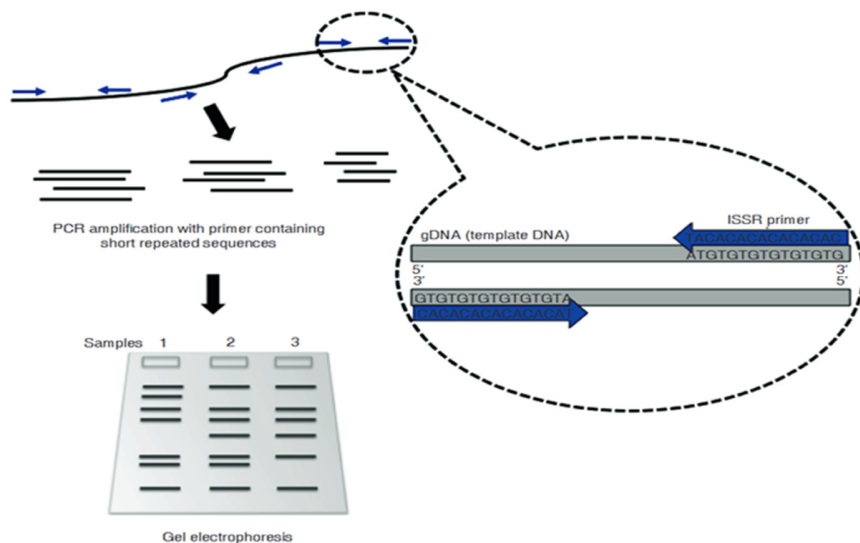
Εικόνα 13. Βασικά στάδια μεθόδου PCR (πηγή: Sinauer Associates Inc. 2001)

Πιο συγκεκριμένα περιέχονται: $(2n-2n) \times$ μόρια όπου: n =αριθμός κύκλων, $2n$ =δίκλινα μόρια με ακαθόριστο μήκος και x =αριθμός αντιγράφων από την αρχική μήτρα. Τέλος για να καλυφθούν τυχόν εναπομείναντες μονόκλωνες περιοχές, το μίγμα αντίδρασης αφήνεται στους 72°C για 5-10 min, για να προσθέσει νουκλεοτίδια η Ταq πολυμεράση.

Δείκτες ISSR

Μικροδορυφορικές αλληλουχίες, δηλαδή απλές επαναλήψεις νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (SSRs) ή μικρές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (STRs), είναι περιοχές του γονιδιώματος που αποτελούνται από μικρά μοτίβα DNA (συνήθως μήκους 2-3 νουκλεοτιδίων) που επαναλαμβάνονται πολλές φορές στη σειρά, π.χ. ...ACACACACACAC...

Οι δείκτες ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) αποτελούνται από τμήματα του DNA που πλαισιώνονται και στα δύο άκρα τους με τέτοιες αλληλουχίες μικροδορυφόρων. Χρησιμοποιώντας αυθαίρετα σχεδιασμένους εκκινητές που περιέχουν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες συμπληρωματικές σε αυτές των μικροδορυφόρων στο γονιδίωμα (ISSR εκκινητές) μπορούμε να ενισχύσουμε με PCR, τυχαία τμήματα DNA στο γονιδίωμα εντός των μικροδορυφορικών αλληλουχιών (με την προϋπόθεση ότι ένα τμήμα είναι εντός της ενισχυόμενης περιοχής που περικλείεται από SSR's και έχει ανάλογο μέγεθος) και να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες για μελέτες γενετικών παραλλαγών. Η εικόνα 14 δείχνει την βασική ιδέα πίσω από την ενίσχυση PCR των ISSRs (= ISSR-PCR).



Εικόνα 14. ISSR-PCR (Wei Lun Ng, Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: Are we doing it right? , 2015)

Αρκετοί εκκινητές ISSR προερχόμενοι από το σύνολο εκκινητών UBC # 9 (University of British Columbia) εξετάστηκαν για την ανάλυση ISSR. Με βάση την ποιότητα της ενίσχυσης, την επαναληψιμότητα των ζωνών και τα υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού που αποκαλύφθηκαν, επιλέξαμε έξι εκκινητές ISSR που έδωσαν το μέγιστο αριθμό αξιόπιστων και αναπαραγωγίμων πολυμορφικών ζωνών για τον έλεγχο των πληθυσμών, όπως φαίνεται στον Πίνακας 2.

Η PCR πραγματοποιήθηκε με όγκο 20 μ L διαλύματος που περιείχε: 20 ng DNA, 1x ρυθμιστικό διάλυμα PCR (80 mM Tris-HCl, 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM MgCl_2 , 0,02% w/v Tween-20), 10 pmol από κάθε εκκινητή, 300 μ M το καθένα dNTP, 1 U θερμοσταθερή DNA πολυμεράση (Promega). Για την PCR χρησιμοποιήσαμε τον θερμοκυκλωτή MyCycler™ (Biorad) (εικόνα 15) με τις ακόλουθες συνθήκες: μια αρχική αποδιάταξη του DNA στους 95 °C για 4 λεπτά και στη συνέχεια 35 κύκλους αποδιάταξης στους 95 °C για 30s, υβριδοποίηση στους 50–58 °C (ανάλογα με τον Primer) για 45 s, επιμήκυνση στους 72 °C για 60s. Το πρόγραμμα ολοκληρώθηκε με μία τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 5 λεπτά. Για να βελτιστοποιήσουμε τη θερμοκρασία υβριδοποίησης για κάθε Primer εφαρμόσαμε τη λειτουργία διαβάθμισης θερμοκρασίας του θερμοκυκλωτή.



Εικόνα 15. MyCycler™ (Biorad USA)

Τα μοριακά βάρη υπολογίστηκαν συγκριτικά χρησιμοποιώντας αλληλουχίες DNA γνωστού μεγέθους με έναν 100-bp και έναν 1-kb DNA ladder (New England Biolabs). Τα ενισχυμένα θραύσματα (ζώνες) ISSR που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση κυμαίνονταν σε μέγεθος μεταξύ 300 bp και 1200 bp και παρουσίαζαν σταθερά μοτίβα ενίσχυσης. Το σκοράρισμα έγινε με το χέρι. Σε κάθε δείγμα οι ζώνες χαρακτηρίστηκαν με 1 (παρούσα) ή 0 (απούσα) υποθέτοντας πως κάθε ζώνη αντιστοιχεί σε έναν γενετικό τόπο με δυο αλληλόμορφα ώστε τελικά να σχηματιστεί μια δυαδική μήτρα (0,1).

Επεξεργασία και Ανάλυση των Δεδομένων

Η αναπαραγωγιμότητα των δεδομένων μας αξιολογήθηκε επαναλαμβάνοντας δύο φορές ενίσχυση PCR και γονοτυπική απόδοση ISSR πέντε τυχαία επιλεγμένων δειγμάτων από κάθε είδος. Χρησιμοποιήσαμε για γονοτύπηση μόνο τις ζώνες που ενισχύονταν με συνέπεια.

Οι παράμετροι γενετικής ποικιλότητας εκτιμήθηκαν χρησιμοποιώντας τα προγράμματα POPGENE έκδοση 1.31 (Yeh et al. 1997) και AFLPsurv 1.0 (Vekemans et al. 2002). Οι παράμετροι γενετικής ποικιλομορφίας περιλάμβαναν το ποσοστό των πολυμορφικών τόπων στο επίπεδο του 5% (PLP, δείκτης ισοδύναμος με αριθμό πολυμορφικών τόπων), την γονιδιακή ποικιλότητα (gene diversity) κατά Nei (Hj) μετά την τροποποίηση από τους Lynch και Milligan (1994) και τον δείκτη ποικιλομορφίας του Shannon (I) που δεν προϋποθέτει την ύπαρξη ισορροπίας Hardy-Weinberg σε επίπεδο ειδών.

Τρέξαμε το πρόγραμμα AFLPSurv 1.0 με δύο διαφορετικές τιμές Fis (0 αντιστοιχεί σε Hardy-Weinberg ισορροπία και 0,5 υποθέτοντας ενδιάμεση έλλειψη ετεροζυγωτικών ατόμων) δεδομένου ότι δεν υπήρχε καμία προηγούμενη πληροφορία σχετικά με το επίπεδο της ενδογαμίας σε επίπεδο πληθυσμού.

Το πρόγραμμα AFLPSurv 1.0 χρησιμοποιήθηκε για να υπολογίσει τη γενετική απόσταση κατά Nei, βασισμένο σε Lynch και Milligan με 1000 επαναλήψεις bootstrap. Το δένδρογραμμα UPGMA κατασκευάστηκε με το πρόγραμμα Neighbor στο πακέτο PHYLIP και οπτικοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Treeview.

Το υπολογιστικό πακέτο προγραμμάτων Genalex 6.5. χρησιμοποιήθηκε για την εκτέλεση της ανάλυσης της μοριακής διακύμανσης (AMOVA) και επίσης την ανάλυση κύριων συντεταγμένων (PCoA). Για την PCoA, ακολουθήθηκε η μέθοδος που αφορά στους υπερέχοντες χαρακτήρες, σύμφωνα με τους Huff et al. (1993). Η εφαρμογή του PCoA έγινε με ολόκληρο το σύνολο δεδομένων, τόσο μεταξύ των δειγμάτων όσο και μεταξύ των ατόμων. Η αξιοπιστία της ανάλυσης AMOVA δοκιμάστηκε με τη διενέργεια 9999 παραλλαγών (permutations) των δεδομένων.

Η δοκιμή κατά MANTEL, προκειμένου να εκτιμηθεί η συσχέτιση μεταξύ της γεωγραφικής και της γενετικής απόστασης μεταξύ των τριών ειδών, πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα TFGA 1.3 (Miller 1997) με 9999 παραλλαγές.

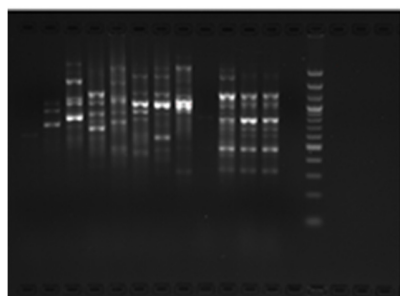
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Δείκτες ISSR

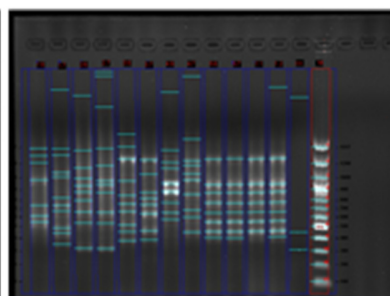
Μετά από προκαταρκτική δοκιμή επιλέχθηκαν τελικά έξι δείκτες ISSR, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν με επιτυχία για την γονοτύπηση 50 ατόμων που ανήκουν στα τέσσερα είδη που μελετήθηκαν. Η επαναληψιμότητα εμφάνισης των ζωνών στα άτομα που ο γενοτυπικός έλεγχος έγινε 2 φορές κυμαίνονταν από 90.9% έως 100%.

Γενετική ποικιλότητα εκτιμώμενη με δείκτες ISSR

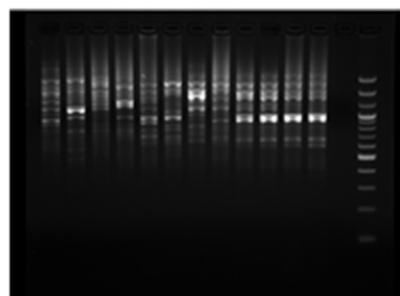
Ένας συνολικός αριθμός 203 ζωνών μεγέθους από 230 έως 1280 bp έχει αποτυπωθεί για όλους τους χρησιμοποιούμενους δείκτες (κατά μέσο όρο 33,83 ζώνες ανά δείκτη). Ο μεγαλύτερος αριθμός ζωνών, σύμφωνα και με τον Πίνακα 2, έχει αποτυπωθεί για τους δείκτες UBC-807 (Εικόνα 16) και τον UBC-812 (Εικόνα 17), ενώ ο χαμηλότερος για UBC-826 (Εικόνα 18).



Εικόνα 16. UBC-812



Εικόνα 17. UBC-807

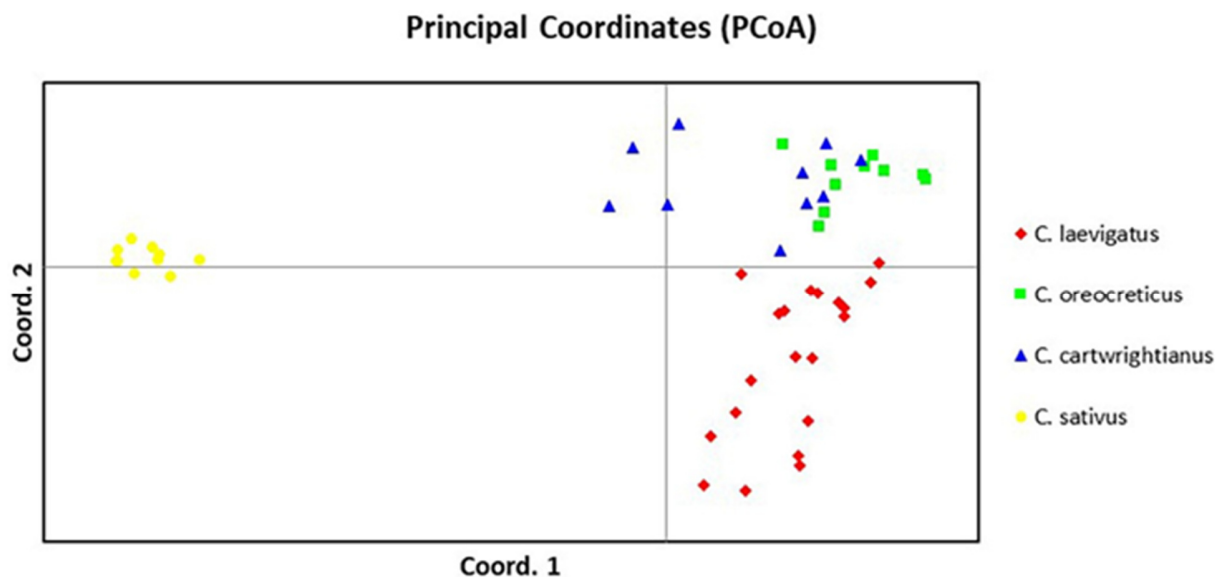


Εικόνα 18. UBC-826

Σε επίπεδο είδους, έχουν καταγραφεί 55 ζώνες για το *C. sativus*, 101 για το *C. cartwrightianus*, 114 για το *C. oreoreticus* και 187 για το *C. laevigatus*. Η αναλογία των πολυμορφικών τόπων σύμφωνα με τον Πίνακα 3 κυμαίνεται από 11,3 για το *C. sativus* έως 75,4 για το *C. Laevigatus*. Επιπλέον, πολλές μοναδικές ζώνες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διάκριση μεταξύ τους, έχουν αποκαλυφθεί σε όλα τα είδη που μελετήθηκαν.

Η γονιδιακή ποικιλότητα κατά Nei (Hj) για τους 203 γενετικούς τόπους, όταν υπολογίσθηκαν σε συνθήκες ισορροπίας κατά Hardy-Weinberg (HW), ήταν $0,0118 \pm 0,0054$ για τον *C. sativus*, $0,1798 \pm 0,0142$ για τον *C. cartwrightianus*, $0,2036 \pm 0,0169$ για τον *C. oreocreticus* και $0,2358 \pm 0,0154$ για τον *C. laevigatus*. Οι τιμές της γονιδιακής ποικιλότητας διέφεραν σε συνθήκες μη ισορροπίας κατά Hardy-Weinberg (non HW) ($F_{is} = 0,5$). Ωστόσο, το πρότυπο ποικιλότητας σε όλα τα είδη ήταν παρόμοιο με εκείνο που επιτεύχθηκε στο πλαίσιο του μοντέλου ισορροπίας κατά Hardy-Weinberg (HW). Ο δείκτης πληροφοριών της Shannon (I) κυμαινόταν από $0,0469 \pm 0,1470$ για το *C. sativus* έως $0,2853 \pm 0,1636$ για το *C. laevigatus*, γεγονός που δείχνει ότι η διαφοροποίηση μεταξύ τους ήταν χαμηλή.

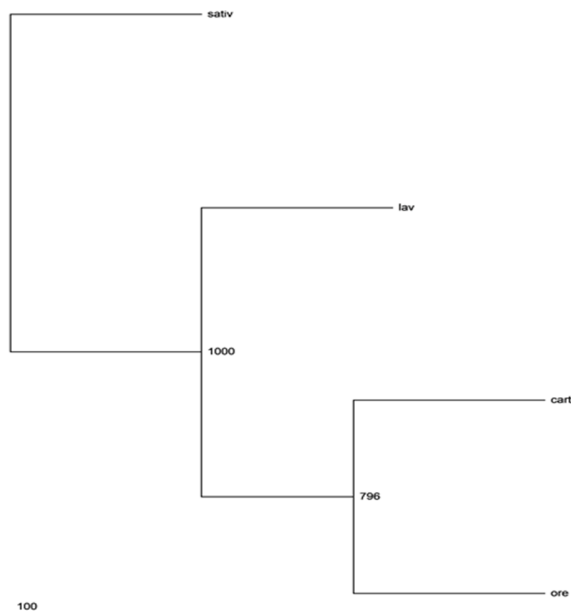
Η γενετική σχέση μεταξύ των τεσσάρων ειδών που μελετήθηκαν απεικονίστηκε επίσης με την εκτέλεση της Αρχής Ανάλυσης Συντεταγμένων (PCoA) με βάση τα δεδομένα ISSR (Σχήμα 1). Οι τρεις πρώτες συνιστώσες αντιστοιχούσαν στο 34,56% της διακύμανσης που παρατηρήθηκε στα άτομα (20,19%, 7,44% και 6,93% αντίστοιχα). Το δισδιάστατο γράφημα (Σχήμα 1) που δημιουργήθηκε από την PCoA υποστήριξε επίσης το μοτίβο ομαδοποίησης του δενδρογράμματος UPGMA. Όπως παρουσιάζεται το *C. sativus* και το *C. laevigatus*, συγκεντρώνονται στα αντίστοιχα είδη τους, ενώ τα άτομα του *C. cartwrightianus* και του *C. oreocreticus* αναμειγνύονται. Η συντεταγμένη 1 χωρίζει το *C. sativus* από τα υπόλοιπα είδη *Crocus*, ενώ η συντεταγμένη 2, το *C. laevigatus* από τα *C. cartwrightianus* και *C. oreocreticus*.



Σχήμα 1. Δισδιάστατο διάγραμμα της ανάλυσης των κυρίων συντεταγμένων (PCoA) των δεδομένων ISSR που απεικονίζει την κατανομή των ειδών *Crocus*.

Επίσης, σύμφωνα με την τοπολογία που προέκυψε στο δενδρόγραμμα UPGMA (Σχήμα 2) με βάση τις τιμές γενετικής απόστασης του Nei που υπολογίστηκαν από το AFLPsurv 1.0, τα *C. cartwrightianus* και *C. oreocreticus* ομαδοποιήθηκαν μαζί με σχετικά υψηλές τιμές bootstrap (796/1000), ενώ τα *C. sativus* και *C. laevigatus* τοποθετούνται σε ξεχωριστούς κλάδους. Παρόμοια τοπολογία λήφθηκε επίσης όταν οι πληθυσμοί δεν βρίσκονταν σε ισορροπία Hardy-Weinberg (non HW).

Η ανάλυση της μοριακής διακύμανσης (AMOVA) έδειξε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό διακύμανσης (69%) οφείλεται στη μεταβλητότητα εντός των ειδών, ενώ το υπόλοιπο (31%) αποδόθηκε σε διαφορές μεταξύ των τεσσάρων ειδών. Το μικρό ποσοστό παραλλακτικότητας που παρατηρείται μεταξύ των ειδών μπορεί να οφείλεται σε μια πρόσφατη χωρική επέκταση ή την ύπαρξη γονιδιακής ροής μεταξύ τους. Μια παρόμοια παρατήρηση μεταξύ των *C. cartwrightianus*, *C. oreocreticus* και ο *C. hadriaticus* έχουν αναφερθεί από τους Larsen et al. (2015), ο οποίος δήλωσε επίσης ότι παρά την περιορισμένη ποικιλομορφία που παρατηρείται στα είδη που μελετήθηκαν, υπάρχει υψηλή γενετική διαφοροποίηση στα άλλα είδη του γένους *Crocus*. Αυτό δεν συμβαίνει ωστόσο με το *C. sativus* όπου πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει μικρή έως καθόλου γενετική παραλλακτικότητα, αν και άλλοι ανέφεραν ότι υπάρχει σημαντική γενετική ποικιλομορφία εντός αυτού του είδους.



Σχήμα 2 Δενδρόγραμμα UPGMA.

Σε μια μελέτη των Alsayied et al. (2015) που χρησιμοποίησαν Inter-retrotransposon Amplified Polymorphism (IRAP) εκκινητές για τη μελέτη της ποικιλομορφίας και των σχέσεων, του *C. sativus* και των συγγενών του, ο *C. cartwrightianus* και ο *C. oreocreticus* κατατάχθηκαν μαζί εκτός του *C. sativus*. Επίσης, οι Harpke et al. (2015) με τη χρήση μερικών αλληλουχιών του χλωροπλαστικού trnL-F, του Internal Transcribed Spacer (ITS) και μέρος του γονιδίου pCOSAt103, έδειξαν ότι ο *C. sativus*, ο *C. cartwrightianus* και ο *C. oreocreticus* τοποθετούνται στον ίδιο κλάδο, διαφορετικά από τον *C. laevigatus*, αν και σε διαφορετικές ομάδες ανάλογα με τη γονιδιωματική περιοχή που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση. Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν επίσης από τους Petersen et al. (2008), ο οποίος χρησιμοποίησε νουκλεοτιδικές αλληλουχίες από τρεις κωδικοποιούσες και δύο μη κωδικοποιούσες πλαστιδιακές περιοχές.

Ο *C. sativus* έδειξε μορφολογικές και κυτταρολογικές ομοιότητες με τον *C. cartwrightianus* και τον *C. oreocreticus* (Larsen 2015). Επιπλέον, ο *C. cartwrightianus* έχει προταθεί ως πλησιέστερο είδος στον *C. sativus* από προηγούμενες μοριακές (Larsen 2015, Moraga 2010, Frizzi et al. 2007), κυτταρολογικές (Agayev 2010) και μορφολογικές (Grilli - Caiola 2010) μελέτες. Οι ταξινομικές ομοιότητες μεταξύ των *C. sativus*, *C. cartwrightianus* και *C. oreocreticus* έχουν μελετηθεί λεπτομερώς από τον Mathew (1977), ο οποίος έδωσε έμφαση στη στενή συγγένεια μεταξύ του *C. cartwrightianus* και του *C. oreocreticus*.

Τα φυτοχημικά και γενετικά δεδομένα μας, υποδηλώνουν ότι ο *C. cartwrightianus* σχετίζεται στον *C. oreocreticus*. Επιπλέον, τα αποτελέσματά μας, δείχνουν ότι ο *C. oreocreticus* μπορεί να μην είναι ξεχωριστό είδος και θα μπορούσε να ταξινομηθεί ως υποείδος του *C. cartwrightianus*, όπως προτάθηκε νωρίτερα (D. Harpke 2015). Επιπροσθέτως, η γενετική απόσταση που υπολογίζεται μεταξύ του *C. cartwrightianus* και του *C. oreocreticus* είναι πολύ μικρή ($D = 0,0070$), δείχνοντας ότι αυτά τα δύο είδη διαφέρουν μόνο κατά ένα πολύ μικρό ποσοστό, υποδεικνύοντας πιθανώς μια πρόσφατη διαφοροποίηση όπως επισημάνθηκε από τους G. Frizzi et al. (2007). Αυτό το εύρημα θα μπορούσε να αποδοθεί είτε στο σύστημα μοριακών δεικτών που χρησιμοποιήθηκε είτε στον περιορισμένο αριθμό του πληθυσμού των ειδών που μελετήθηκαν, οι οποίοι επίσης προέρχονταν από μία μόνο γεωγραφική περιοχή (Κρήτη).

Συμπεράσματα

Σε αυτήν την μελέτη, δείκτες ISSR χρησιμοποιήθηκαν για να αποκαλύψουν τον βαθμό γενετικής διαφοροποίησης και να ερμηνεύσουν το πρότυπο της γενετικής ποικιλότητας σε τέσσερα είδη *Crocus* στην Ελλάδα. Τα αποτελέσματα μας αποκάλυψαν την υπάρχουσα απόκλιση ανάμεσα στα τέσσερα είδη αναδεικνύοντας τα επίπεδα της γενετικής διαφοροποίησης που υφίστανται μεταξύ τους.

Οι δείκτες ISSR έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε αναλύσεις γενετικής ποικιλότητας καθώς και φυλογενετικές μελέτες σε πολλά είδη φυτών σε επίπεδα πληθυσμού, είδους ή γένους: π.χ. μουσμουλιά (Xu, et al. 2006), *Gonolobus complex* (Klings and Qiu-yun Xiang, 2005), κ.α..

Οι δείκτες ISSR μπορούν να παρέχουν ένα σταθερό διαγνωστικό εργαλείο για την διάκριση ανάμεσα στα τέσσερα είδη *Crocus*, αφού κατάφεραν να διακρίνουν τα τέσσερα είδη μεταξύ τους.

Η γενετική ποικιλότητα ενός είδους ή πληθυσμού καθορίζεται από τις συνδυασμένες επιδράσεις της γενεαλογίας και των διαφόρων εξελικτικών διαδικασιών (Comes and Kadereit 1998; Ge et al. 2005). Εξαιτίας της περιορισμένης εξάπλωσης, τα ενδημικά είδη χαρακτηρίζονται συνήθως από χαμηλό επίπεδο γενετικής ποικιλότητας (Ellstrand and Elam 1993; Gitzendanner and Soltis 2000; Segarra-Moragues et al. 2005). Ωστόσο, αρκετές εξαιρέσεις έχουν αναφερθεί (Batista et al. 2001; Hoebee and Young 2001) επιβεβαιώνοντας την ανάγκη για μελέτη κάθε περίπτωσης ξεχωριστά.

Τα σχεδόν μηδενικά επίπεδα γενετικής ποικιλότητας που αποκαλύφθηκαν στο *C. sativus* θα μπορούσαν να αποδοθούν σε διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων της επίδρασης της τυχαίας γενετικής εκτροπής καθώς και της μακροχρόνιας συστηματικής καλλιέργειας του είδους, που έχουν πιθανότατα επηρεάσει τα επίπεδα γενετικής ποικιλότητας που παρατηρούνται σήμερα στο *C. sativus*.

Προοπτικές χρήσης των ειδών για εναλλακτικές καλλιέργειες.

Από ότι είδαμε τα τρία ενδημικά είδη κρόκου της Κρήτης, είναι αρκετά διαφοροποιημένοι με τον *C. sativus* που λήφθηκε από την Κοζάνη. Πιθανόν, κάποια από τα τρία αυτά είδη (*C. laevigatus*, *C. cartwrightianus* και *C. oreocreticus*) θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για καλλιέργεια, ωστόσο απαιτούνται κατάλληλες χημικές αναλύσεις για τον προσδιορισμό της χημικής τους σύστασης, ώστε να δούμε αν και ποιοτικά μπορούν να έχουν παρόμοιες ιδιότητες με το *C. sativus*.

ΠΙΝΑΚΕΣ - ΧΑΡΤΕΣ

Πίνακας 1. Σύμβολα που χρησιμοποιήθηκαν για τους πληθυσμούς που μελετήθηκαν, περιοχές συλλογής των *C. sativus*, *C. oreocreticus*, *C. laevigatus* και *C. cartwrightianus* και εκτιμώμενος αριθμός ατόμων ανά πληθυσμό.

Πληθ.	Είδος	Αριθμός ατόμων ανά πληθυσμό	Συντεταγμένες	Τοποθεσία
Co	<i>C. oreocreticus</i>	250	35°08'47.0"N 25°33'57.8"E	Κρήτη, Καθαρό Λασιθίου
Cs	<i>C. sativus</i>	250	40°15'39.1"N 21°48'56.6"E	Συνεταιρισμό Σαφράν, Κρόκος Κοζάνη
Cl	<i>C. laevigatus</i>	250	35°11'19.7"N 26°09'22.6"E	Κρήτη, Αγ. Φωτιά Σητείας
Cc	<i>C. cartwrightianus</i>	250	35°34'34.2"N 24°08'12.9"E	Κρήτη, Ακρωτήρι Χανίων

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

Εκκινητής	Αλληλουχία (5'-3')	Τ υβριδοπ. (°C)	Αρ. Ζωνών	Εύρος (bp)
ISSR				
UBC-807	(AG) ₈ T	51	37	330-1190
UBC-808	(AG) ₈ C	53	34	400-1200
UBC-811	(GA) ₈ C	50	35	300-1200
UBC-812	(GA) ₈ A	55	37	330-1200
UBC-826	(AC) ₈ C	58	27	400-1200
UBC-840	(GA) ₈ Y#T	52	33	300-1200

Πίνακας 3. Γενετική ποικιλότητα στους πληθυσμούς των ειδών *Crocus* όπως υπολογίστηκαν από τους δείκτες ISSR.

N = αριθμός ατόμων που μελετήθηκαν από κάθε πληθυσμό

No.B = αριθμός ζωνών που σημειώθηκαν

PLP = ποσοστό πολυμορφικών γενετικών τόπων στο 1% μετά την προσαρμογή στο ελάχιστο μέγεθος δείγματος(10)

PrB = μοναδικές ζώνες που σημειώθηκαν

Hj = γονιδιακή ποικιλότητα κατά Nei μετά την τροποποίηση από τους Lynch και Milligan (1994), πληθυσμοί σε ισορροπία HW (Hj-HW) ή μη (Hj- non HW)

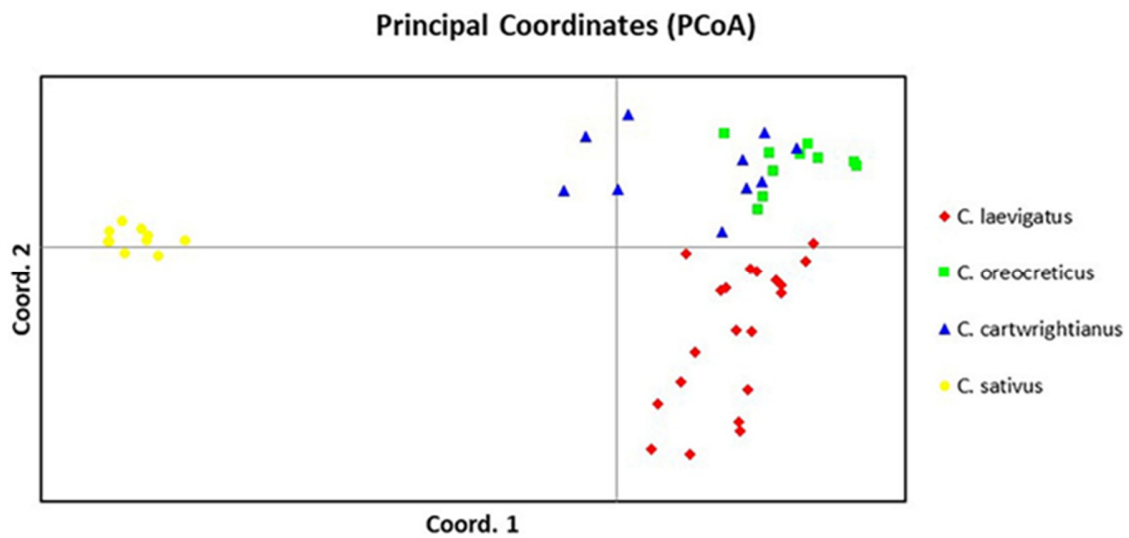
I = Δείκτης ποικιλότητας του Shannon.

Pop/Id	N	No. B	PLP	PrB	Hj-hw	Hj-non HW	I
<i>C. sativus</i>	10	55	11.3	2	0.0511±0.0074	0.0512±0.0078	0.0469±0.1470
<i>C. oreocreticus</i>	10	114	56.2	3	0.1430±0.0100	0.1587±0.0124	0.2089±0.2274
<i>C. laevigatus</i>	20	187	75.4	22	0.1729±0.0067	0.2183±0.0076	0.2853±0.1636
<i>C. cartwrightianus</i>	10	101	51.7	4	0.1371±0.0094	0.1509±0.0120	0.2013±0.2240

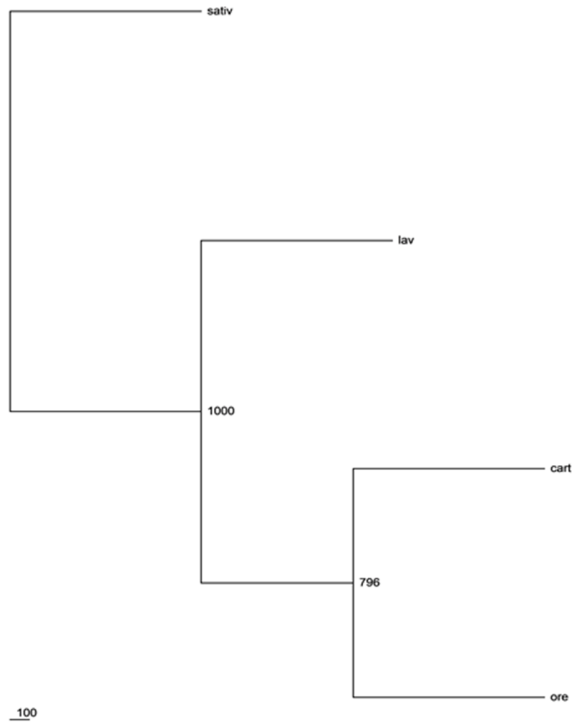
Εικόνα 5. α): Χάρτης κατανομής των ειδών *C. cartwrightianus* (Κρήτη, Ακρωτήρι Χανίων), *C. Oreocreticus* (Κρήτη, Καθαρό Λασιθίου), *C. laevigatus* (Κρήτη, Αγ. Φωτιά Σητείας) και *C. sativus* (Συνεταιρισμό Σαφράν, Κρόκος Κοζάνη).



Σχήμα 1. Δισδιάστατο διάγραμμα της ανάλυσης των κυρίων συντεταγμένων (PCoA) των δεδομένων ISSR που απεικονίζει την κατανομή των ειδών *Crocus*.



Σχήμα 2. Δενδρόγραμμα UPGMA βασισμένο στην γενετική απόσταση του Nei's μετά την τροποποίηση των Lynch and Milligan (1994)



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- Alexander Krings and Jenny Qiu-yun Xiang, 2005 Taxonomy of the *Gonolobus* complex (Apocynaceae, Asclepiadoideae) in the southeastern United States: ISSR evidence and parsimony analysis
- B. Larsen, J. Orabi, C. Pedersen, M. Ørgaard, Large intraspecific genetic variation within the Saffron-Crocus group (*Crocus* L., Series *Crocus*; Iridaceae), *Plant Syst. Evol.* 301 (2015) 1–13, <https://doi.org/10.1007/s00606-014-1083-z>.
- C.M. Xu, D. Liu, Z. Zhang, Z.J. Shen (2006) Genetic relationship of Loquat analyzed by ISSR
- Comes HP, Kadereit JW. 1998. The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends in Plant Sciences* 3: 432–438
- D. Harpke, A. Carta, G. Tomovic, V. Randelovic, N. Randelovic, F.R. Blattner, L. Peruzzi, Phylogeny, karyotype evolution and taxonomy of *Crocus* ser. *Verni* (Iridaceae), *Plant Syst. Evol.* 301 (2015) 309–325, <https://doi.org/10.1007/s00606-014-1074-0>.
- D.G. Chryssanthi, F.N. Lamari, G. Iatrou, A. Pylara, N.K. Karamanos, P. Cordopatis, Inhibition of breast cancer cell proliferation by style constituents of different *Crocus* species, *Anticancer Res.* 27 (2007) 357–362.
- D.R. Huff, R. Peakall, P.E. Smouse, RAPD variation within and among populations of outcrossing buffalograss (*Buchloë dactyloides* (Nutt.) Engelman), *Theor. Appl. Genet* 96 (1993) 827–834, <https://doi.org/10.1007/BF00211043>.
- E. Christodoulou, N.P. Kadoglou, N. Kostomitsopoulos, G. Valsami, Saffron: a natural product with potential pharmaceutical applications, *J. Pharm. Pharmacol.* 67 (2015) 1634–1649, <https://doi.org/10.1111/jphp.12456>.
- E. Zeitkiewicz, A. Rafalski, D. Abuda, Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification, *Genomics* 20 (1994) 176–183 <https://doi.org/10.1006/geno.1994.1151>.
- Ellstrand NC, Elam DR (1993) Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annu Rev Ecol Syst* 24: 217–242
- F. Keify, A.H. Beiki, Exploitation of random amplified polymorphic DNA (RAPD) and sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers for genetic diversity of saffron collection, *J. Med. Plants Res.* 12 (2012) 2761–2768, <https://doi.org/10.5897/JMPR11.834>.
- F.C. Yeh, R.C. Yang, T.B.J. Boyle, Z.H. Ye, J.X. Mao, POPGENE, the User-Friendly Shareware for Population Genetic Analysis, Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada, 1997, p. 1997.

- F.D. Batista, D. Iber, M.S. Neuberger (2001) B cells acquire antigen from target cells after synapse formation, *Nature*, 411
- Frankham R (2005) Genetics and extinction. *Biol Conserv* 126: 131-140
- Frankham R, Ballou, JD, Briscoe DA (2010) Introduction to conservation genetics. 2nd Ed, Cambridge University Press, Cambridge
- G. Petersen, O. Seberg, S. Thorsøe, T. Jørgensen, B. Mathew, A phylogeny of the genus *Crocus* (Iridaceae) based on sequence data from five plastid regions, *Taxon* 57 (2) (2008) 487–499, <https://doi.org/10.2307/25066017> <http://www.jstor.org/stable/25066017>.
- Ge Z., Feng, Y., Whary, M. T., Nambiar, P. R., Xu, S., Ng, V., et al. (2005). Cytolethal distending toxin is essential for *Helicobacter hepaticus* colonization in outbred Swiss Webster mice. *Infect. Immun.* 73, 3559–3567. doi:10.1128/IAI.73.6.3559-3567.2005
- Gitzendanner MA, Soltis PS (2000) Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *Am J Bot* 87: 783-792
- G. Frizzi, M. Miranda, C. Pantani, F. Tammaro,(2007) Allozyme differentiation in four species of the *Crocus cartwrightianus* group and in cultivated saffron (*Crocus sativus*)
- Hoebee and Young (2001) Low neighbourhood size and high interpopulation differentiation in the endangered shrub *Grevillea iaspicula* McGill (Proteaceae)
- Holsinger KE, Gottlieb LD (1991) Conservation of rare and endangered plants: principles and prospects. In: Falk DA, Holsinger KE (eds) *Genetics and Conservation of Rare Plants*. Oxford University Press, Oxford, pp 195-223
- J. Rukšāns, Some New *Crocus* Taxa (Iridaceae) from Western Turkey and East Aegean Islands. - *International Rock Gardener*, Vol. 64 (2015), pp. 2–36.
- J.I. Mir, N. Ahmed, M.H. Khan, T.A. Mokhdomi, S.H. Wani, S. Bukhari, A. Asif, R.A. Qadri, Molecular characterization of saffron-potential candidates for crop improvement, *Not. Sci. Biol.* 7 (2015) 81–89 <https://dx.doi.org/10.15835/nsb.7.1.9346>.
- J.J. Doyle, J.L. Doyle, Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue, *Focus* 12 (1990) 13–15.
- Kerndorff & Pasche, E. (2013): Fourteen new species of *Crocus* from Turkey. — *Stapfia* 99: 145-158
- Kerndorff, H. & Pasche, E. (2011): Two new taxa of *Crocus* from Turkey. *Stapfia* 95: 2-5.
- L. Sik, F. Candan, S. Soya, C. Karamenderes, T. Kesercioglu, B. Tanyolac, Genetic variation among *Crocus sativus* L. species from western Turkey as revealed by RAPD and ISSR markers, *JABS* 2 (2008) 73–78.
- M. Grilli Caiola, A. Canini, Looking for saffron's (*Crocus sativus* L.) Parents, in: A.M. Husaini (Ed.), *Saffron. Functional Plant Science and Biotechnology* 2010, 4 2010, pp. 1–14

- M. Lynch, B.G. Milligan, Analysis of population genetic structure with RAPD markers, *Mol. Ecol.* 3 (1994) 91–99, <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1994.tb00109.x>.
- M. Sheidai, M. Tabasi, M.R. Mehrabian, F. Koohdar, S. Ghasemzadeh-Baraki, Z. Noormohammadi, Species delimitation and relationship in *Crocus* L. (Iridaceae), *Acta Bot. Croat.* 77 (1) (2018) 10–17, <https://doi.org/10.1515/botcro-2017-0015>.
- Mathew, B (1982): *The Crocus. A revision of the genus Crocus (Iridaceae).* — Timber Press, Portland
- Miller MP (1997) *Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA), 1.3: A Windows Program for the Analysis of Allozyme and Molecular Population Genetic Data.* Distributed by the author.
- N.F. Alsayed, J.A. Fernandez, T. Schwarzacher, J.S. Heslop-Harrison, Diversity and relationships of *Crocus sativus* and its relatives analysed by interretroelement amplified polymorphism (IRAP), *Ann. Bot.* 116 (2015) 359–368, <https://doi.org/10.1093/aob/mcv103>.
- Nicoletti F, De Benedetti L, Airò M, Ruffoni B, Mercuri A, Minuto L, Casazza G (2012) Spatial genetic structure of *Campanula sabatia*, a threatened narrow endemic species of the Mediterranean Basin. *Folia Geobot* 47:249-262
- P. Dimopoulos, T. Raus, E. Bergmeier, T. Constantinidis, G. Iatrou, S. Kokkini, A. Strid, D. Tzanoudakis, *Vascular Plants of Greece. An annotated checklist.*- Englera 31. 375 pp., 24 colour plates, (2013) (Berlin. Germany).
- Paschke M, Abstract C, Schmid B (2002) Relationship between population size, allozyme variation, and plant performance in the narrow endemic *Cochlearia bavarica*. *Conserv Genet* 3: 131–144.
- Peruzzi, L. & Carta, A. 2011. *Crocus ilvensis* sp. nov. (sect. *Crocus*, Iridaceae), endemic to Elba Island (Tuscan Archipelago, Italy). *Nordic Journal of Botany* 29(1): 6–13
- R. Moraga, A. Trapero-Mozos, L. Gómez-Gómez, O. Ahrazem, Intersimple sequence repeat markers for molecular characterization of *Crocus cartwrightianus* cv. *albus*, *Ind. Crop. Prod.* 32 (2010) 147–151, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.04.012>.
- R. Norbak, K. Brandt, J.K. Nielsen, M. Orgaard, N. Jacobsen, Flower pigment composition of *Crocus* species and cultivars used for a chemotaxonomic investigation, *Biochem. Syst. Ecol.* 30 (2002) 763–791, [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(02\)00020-0](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(02)00020-0).
- R. Peakall, P.E. Smouse, GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update, *Bioinformatics* 28 (2012) 2537–2539, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>.
- Randjelović, N., Randjelović, V. & Hristovski, N. 2012. *Crocus jablanicensis* (Iridaceae), a New Species from the Republic of Macedonia, Balkan Peninsula. *Annales Botanici Fennici* 49(1–2): 99–102
- Segarra-Moragues JG, Palop-Esteban A, Gonzales-Candelas F, Catalan P (2005) On the verge of extinction: genetics of the critically endangered Iberian plant species, *Borderea chouardii* (Dioscoreaceae) and implications for conservation management. *Mol Ecol* 14: 969–982
- X. Vekemans, T. Beauwens, M. Lemaire, I. Roldan-Ruiz, Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size, *Mol. Ecol.* 11 (2002) 139–151, <https://doi.org/10.1046/j.0962-1083.2001.01415.x>.

- Y.M. Agayev, E. Zarifi, J.A. Fernández, A study of karyotypes in the *Crocus sativus* L. aggregate and origin of cultivated saffron, *Acta Hort.* (850) (2010) 47–54, <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.850.5>.
- Yang J, Yang J, Yang M, Qing H (2012) Genetic diversity of *Caragana* species of the Ordos Plateau in China. *Plant Syst Evol* 298: 801–809
- Z. Nemati, M. Mardi, P. Majidian, M. Zeinalabedin, S.M. Pirseyedi, M. Bahadori, Saffron (*Crocus sativus* L.), a monomorphic or polymorphic species? *Span. J. Agric. Res.* 12 (2014) 753–762 <https://doi.org/10.5424/sjar/2014123-5564>