



PLANT-NET CY

Δημιουργία Δικτύου Μικρο-Αποθεμάτων Φυτών στην Κύπρο
για τη Διατήρηση Ειδών και Οικοτόπων Προτεραιότητας



LIFE08 NAT/CY/000453

Δράση A.5:

Εκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας και της δομής του πληθυσμού για καθένα από τα τέσσερα υπό μελέτη είδη προτεραιότητας και για το *Cedrus brevifolia*.



Παραδοτέο:

Έκθεση σχετικά με τη γενετική ποικιλότητα και τη δομή του πληθυσμού για καθένα από τα τέσσερα υπό μελέτη είδη προτεραιότητας και του *Cedrus brevifolia*.

PLANT-NET CY

Μάιος 2012

Το παρόν κείμενο εκπονήθηκε από τη Μονάδα Διατήρησης της Φύσης του Πανεπιστημίου Frederick, στο πλαίσιο του έργου LIFE+ 08NAT/CY/000453 με τίτλο «Δημιουργία Δικτύου Μικρο-Αποθεμάτων Φυτών στην Κύπρο για τη Διατήρηση Ειδών και Οικοτόπων Προτεραιότητας». Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή στο πλαίσιο του προγράμματος LIFE+.

The present report has been prepared by the Nature Conservation Unit of the Frederick University and the Faculty of Biology of the University of Athens in the framework of the project LIFE+ 08NAT/CY/000453 entitled 'Establishment of a Plant Micro-Reserve Network in Cyprus for the Conservation of Priority Species and Habitats'. The Project is co-funded by the European Commission in the framework of the project LIFE+.



Η πλήρης αναφορά στο παρόν κείμενο είναι:

Ηλιάδης Ν.-Γ., Ανδρέου Μ., Κωνσταντίνου Κ., Κουζάλη Η., Καδής Κ. 2012. Έκθεση σχετικά με τη γενετική ποικιλότητα και τη δομή του πληθυσμού για καθένα από τα τέσσερα υπό μελέτη είδη προτεραιότητας και του *Cedrus brevifolia*. Πανεπιστήμιο Frederick. Λευκωσία.

This document may be cited as follows:

Eliades N.-G., Andreou M., Constantinou C., Kouzali I., Kadis K. 2012. Report on the genetic diversity and population structure for each of the 4 targeted priority species and *Cedrus brevifolia*. Frederick University. Nicosia.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή	4
2. Αντικείμενο μελέτης και εργασίες πεδίου (δειγματοληψίες) για κάθε ένα από τα υπό μελέτη είδη	6
3. Εργαστηριακές αναλύσεις (μοριακοί δείκτες).....	9
4. Αποτελέσματα (στατιστική ανάλυση μοριακών δεδομένων)	13
4.1. Αποτελέσματα γενετικής ποικιλομορφίας των τριών ποωδών ειδών και του θαμνώδους είδους του έργου	14
4.2. Αποτελέσματα από τη μελέτη του χλωροπλαστικού DNA των τριών ποωδών ειδών και του θαμνώδους είδους του έργου	17
4.3. Αποτελέσματα γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης ατόμων του Κυπριακού κέδρου (<i>Cedrus brevifolia</i>).....	18
5. Συζήτηση - Συμπεράσματα	19
6. Βιβλιογραφία	23

1. Εισαγωγή

Το έργο με τίτλο «Δημιουργία Δικτύου Μικρο-Αποθεμάτων Φυτών στην Κύπρο για τη Διατήρηση Ειδών και Οικοτόπων Προτεραιότητας», υλοποιείται στο πλαίσιο του προγράμματος LIFE+08 της Ευρωπαϊκής Επιτροπής. Το έργο στοχεύει στην ενίσχυση και βελτίωση του καθεστώτος διατήρησης τεσσάρων ενδημικών φυτών προτεραιότητας¹ (**Arabis kennedyae*, **Astragalus macrocarpus* subsp. *lefkarensis*, **Centaurea akamantis* και **Ophrys kotschyi*) και δυο ενδημικών τύπων οικοτόπων προτεραιότητας (9590 *Δάση με *Cedrus brevifolia* -*Cedrocetum brevifoliae* - και 9390 *Θαμνώνες και δασικές συστάδες της *Quercus alnifolia*) της Κύπρου. Ο στόχος αυτός επιτυγχάνεται μέσα από την εγκατάσταση, παρακολούθηση και διαχείριση ενός δικτύου πέντε Μικρο-Αποθεμάτων Φυτών (ΜΑΦ)², μέσα σε περιοχές του Δικτύου Natura 2000.

Η επιτυχημένη υλοποίηση του έργου στηρίζεται σε μια σειρά προπαρασκευαστικών δράσεων που περιλαμβάνει το έργο. Στο πλαίσιο αυτών συμπεριλαμβάνεται και η Δράση Α.5: Εκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας και της δομής του πληθυσμού για καθένα από τα τέσσερα υπό μελέτη είδη προτεραιότητας και για το *Cedrus brevifolia*. Στόχος της Δράσης αυτής είναι η μελέτη της γενετικής παραλλακτικότητας των υπό μελέτη ειδών και του κυρίου είδους του υπό μελέτη τύπου οικοτόπου 9590* (*Cedrus brevifolia*). Θα πρέπει να αναφερθεί ότι πέρα από το *C. brevifolia*, για τα υπόλοιπα υπό μελέτη ενδημικά είδη της Κυπριακής χλωρίδας δεν υπάρχει οποιαδήποτε προηγούμενη πληροφορία σχετικά με τη γενετική τους παραλλακτικότητα. Το κενό στη γνώση της γενετικής παραλλακτικότητας των ειδών αυτών, καθώς και η ανάγκη για εμβάθυνση της γνώσης για την κατανόηση των γενετικών εξελικτικών παραγόντων που επιδρούν στα υπό μελέτη είδη, καταδεικνύουν την ανάγκη για την άμεση μελέτη της γενετικής τους δομής.

Η γενετική παραλλακτικότητα ως βάση της προσαρμοστικότητας των φυσικών πληθυσμών άγριων φυτικών ειδών, εξασφαλίζει την επιβίωση τους στο μέλλον. Για το λόγο αυτό, η σημασία της γενετικής παραλλακτικότητας αποτελεί σημαντικό κομμάτι στη διατήρηση των ειδών. Κατανόηση των εξελικτικών παραμέτρων που επηρέασαν τη γενετική δομή των υπό μελέτη ειδών θα συμβάλει στην ανάπτυξη εξειδικευμένων μέτρων (στρατηγικών) διατήρησης (Δράσεις Γ.1 – Γ.8) των ειδών στόχων, διασφαλίζοντας ταυτόχρονα και την προστασία και διατήρηση των γενετικών τους πόρων, τόσο με μέτρα διατήρησης εντός των φυσικών πληθυσμών τους (*in situ*) όσο και με σειρά μέτρων διατήρησης εκτός των φυσικών ορίων

¹ Ο χαρακτηρισμός ειδών και τύπων οικοτόπων προτεραιότητας γίνεται στη βάση της Οδηγίας των Οικοτόπων 92/43/ΕΟΚ. Στη βάση της Οδηγίας αυτής τα κράτη μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕ) καλούνται να δράσουν άμεσα, λαμβάνοντας εκείνα τα μέτρα που θα ενισχύσουν το καθεστώς διατήρησης απειλούμενων φυτών και οικοτόπων της ΕΕ, και τα οποία βρίσκονται στα σχετικά Παραρτήματα της Οδηγίας.

² Περισσότερες πληροφορίες σχετικά με την προσέγγιση των ΜΑΦ, μπορείτε να βρείτε στον ιστότοπο: www.plantnet.org.cy

εξάπλωσής τους (*ex situ*). Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα αυτά θα καταδείξουν κατά πόσο η εγκατάσταση του ΜΑΦ για κάθε υπό μελέτη είδος θα λειτουργήσει ευεργετικά ως προς τη διατήρηση και του αποθέματος των γενετικών του πόρων.

Η δράση αυτή, μετά από αίτημα της Ομάδας Διαχείρισης Έργου κατά την «*Αρχική Έκθεση*», έχει τροποποιηθεί, τόσο ως προς το τεχνικό της μέρος όσο και ως προς το οικονομικό. Συγκεκριμένα έγινε παραχώρηση σχετικού εργαστηριακού χώρου προς το έργο, από τον εταίρο του έργου UNDP-ACT (το εργαστήριο αξιοποιείται από το Πανεπιστήμιο Frederick για τη διεκπεραίωση σειράς δράσεων του έργου). Ο συγκεκριμένος χώρος καλύπτει ανάγκες εργαστηρίου μοριακής γενετικής και στη βάση αυτή το Πανεπιστήμιο Frederick, ζήτησε την έγκριση για τη μερική αλλαγή της δράσης (τροποποίηση του προϋπολογισμού και τεχνικού μέρους της Δράσης). Συγκεκριμένα, το ποσό δαπάνης της συγκεκριμένης δράσης προβλεπόταν να δαπανηθεί σε *Αγορά Υπηρεσιών* για σκοπούς διεκπεραίωσης γενετικών αναλύσεων από εργαστήριο του εξωτερικού. Εντούτοις, με την παραχώρηση του εργαστηρίου από το UNDP-ACT, θεωρήθηκε ότι θα ήταν προς όφελος του έργου εάν γινόταν μερική τροποποίηση της δράσης, χωρίς αυτή να αλλοιώνει ή να μειώνει σε οποιαδήποτε περίπτωση τα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά της. Η αλλαγή αποσκοπούσε στην ενίσχυση της υφιστάμενης υποδομής του εργαστηρίου που παραχωρήθηκε από το UNDP-ACT, με την αγορά εξειδικευμένου εξοπλισμού για αυτοματοποιημένη διαδικασία απομόνωσης γενωμικού DNA από τα υπό μελέτη είδη. Στη συνέχεια, δείγματα DNA αποστάληκαν σε εργαστήρια μοριακής γενετικής (στη βάση της πρότασης για αγορά υπηρεσιών), όπου διεξήχθη η περαιτέρω εργαστηριακή ανάλυση και υλοποίηση της δράσης, όπως αυτή περιγράφεται στη πρόταση. Πλήρης περιγραφή και ανάλυση των αλλαγών της δράσης σε τεχνικό και οικονομικό επίπεδο αναφέρονται στην *Αρχική Έκθεση* και στην *1^η Έκθεση Προόδου του Έργου*.

Οι στόχοι της εργασίας αυτής, διεκπεραιώθηκαν μέσα από συγκεκριμένες εργασίες πεδίου και εργασίες σε εργαστήριο μοριακής γενετικής. Συγκεκριμένα, διεξήχθησαν δειγματοληψίες πεδίου, από όπου συλλέχθηκε φυτικός ιστός από συγκεκριμένο αριθμό δειγμάτων των υπό μελέτη ειδών, τόσο εντός των ορίων των ΜΑΦ, όσο και από θέσεις (υποπληθυσμούς) εκτός των ΜΑΦ. Στη συνέχεια το υλικό που συλλέχθηκε μεταφέρθηκε στο εργαστήριο μοριακής γενετικής του Πανεπιστημίου Frederick, όπου έγινε απομόνωση γενωμικού DNA από όλα τα δείγματα. Η ενίσχυση στοχευόμενων τμημάτων του γενωμικού DNA με τη διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), έγινε σε εργαστήρια μοριακής γενετικής του εξωτερικού με τη διαδικασία *αγοράς υπηρεσιών* (όπως περιγράφεται πιο κάτω). Τέλος, η μαθηματική και στατιστική επεξεργασία των εργαστηριακών δεδομένων που λήφθηκαν, έγινε με σειρά στατιστικών πακέτων εργασίας, τα οποία αποσκοπούσαν στο να μετατρέψουν τα δεδομένα αυτά σε μορφή που να διευκολύνει την εξαγωγή συμπερασμάτων για το σύνολο της υπό εξέτασης θέσης (πληθυσμού) των υπό μελέτη ειδών.

Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί ότι παρατηρήθηκε καθυστέρηση ως προς την υλοποίηση της δράσης, γεγονός που οφείλεται σε μια σειρά απρόβλεπτων καταστάσεων που προέκυψαν κατά την υλοποίηση της δράσης:

- Λόγω της εποχικότητας που εμφανίζουν αρκετά από τα είδη στόχοι, οι εργασίες πεδίου (δειγματοληψίες), έγιναν με μια μικρή καθυστέρηση ως προς την προβλεπόμενη περίοδο υλοποίησης.
- Λόγω του γενικού προβλήματος ασταθούς παροχής ηλεκτρικού ρεύματος που παρατηρήθηκε στη Κύπρο κατά την περίοδο Ιουλίου 2011 με Σεπτέμβρη 2011, εκτός από τη διακοπή των εργασιών απομόνωσης DNA που είχαν ξεκινήσει στον εργαστηριακό χώρο του UNDP-ACT, προκλήθηκε σοβαρή τεχνική βλάβη στο μηχανικό εξοπλισμό του εργαστηρίου. Η επισκευή των συσκευών αυτών επιτεύχθηκε μέσα σε εύλογο χρονικό διάστημα. Το χρονικό διάστημα αυτό όμως λειτούργησε αρνητικά ως προς την τήρηση του αρχικού χρονοδιαγράμματος της Δράσης.
- Λόγω της ανάγκης για περαιτέρω επεξεργασία (καθαρισμό) του DNA που στάλθηκε στο εργαστήριο μοριακής γενετικής για την εφαρμογή μοριακών δεικτών για τα υπό μελέτη είδη που μελετήθηκαν για πρώτη φορά. Το στοιχείο αυτό ήταν μια άλλη παράμετρος που οδήγησε σε επιπρόσθετη χρονική καθυστέρηση στην υλοποίηση της Δράσης.

2. Αντικείμενο μελέτης και εργασίες πεδίου (δειγματοληψίες) για κάθε ένα από τα υπό μελέτη είδη

Για τους σκοπούς υλοποίησης των στόχων της δράσης αυτής, σχεδιάστηκε και υλοποιήθηκε συγκεκριμένη δειγματοληψία ανάλογα με το αντικείμενο μελέτης που τέθηκε για κάθε ένα από τα υπό μελέτη είδη.

****Ophrys kotschy* (ΜΑΦ 1)**

Για τη μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας της ενδημικής ορχιδέας **O. Kotschy* κρίθηκε σκόπιμο όπως φυτικός ιστός (φύλλα) συλλεχθεί από όλες τις θέσεις, στις οποίες το είδος σχηματίζει ικανοποιητικού μεγέθους πληθυσμό (πέραν των 50 ατόμων ανά θέση), μιας και το είδος απαντά σήμερα σε πέραν των 30 θέσεων, αλλά με πολύ μικρό αριθμό ατόμων (από 5 - 30 άτομα). Για τους σκοπούς της παρούσας εργασίας, δειγματοληψίες διενεργήθηκαν σε πέντε (5) θέσεις (υποπληθυσμούς) που το είδος απαντά και συνελέγησαν συνολικά 123 άτομα. Η κατανομή των 123 δειγμάτων εντός των πέντε θέσεων διακρίνεται ως εξής:

- Περιοχή Αλάμπρας – 28 δείγματα
- Περιοχή Μάμμαρι (Δυτικά) – 22 δείγματα

- Περιοχή Μάμμαρι (Ανατολικά) – 25 δείγματα
- Περιοχή Μιτσερού (ΜΑΦ) – 48 δείγματα

Η συλλογή του υλικού πραγματοποιήθηκε την περίοδο όπου το φυτό βρίσκεται σε πλήρη ανάπτυξη και πριν την ωρίμανση των κάψων του. Έτσι, για τη περιοχή του Μιτσερού (ΜΑΦ 1) δειγματοληψία φυτικού ιστού έγινε το Μάρτιο του 2010, ενώ για τις άλλες θέσεις η συλλογή του υλικού έγινε κατά τους μήνες Μάρτιο – Απρίλιο του 2011.

**Arabis kenneyae* και *Cedrus brevifolia* (*9590) (ΜΑΦ 3)

Αντικείμενο μελέτης για την ενδημική **Arabis kenneyae* είναι η αποτύπωση της γενετικής της ποικιλομορφίας και η γενετική δομή των θέσεων που αυτή απαντά σήμερα. Προηγούμενη εργασία από Andreou et al. (2011), όπου μελετήθηκε η γενετική δομή της *A. kenneyae* σε δυο γονιδιακούς τόπους, παρουσίασε μια σημαντική γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των θέσεων του είδους, ενώ δυο θέσεις (Τριπύλου και Κρύου Ποταμού) παρουσίασαν μεγαλύτερη γενετική συσχέτιση μεταξύ τους, από ότι με αυτή στη Χιονίστρα (Andreou et al. 2011). Εντούτοις, σημαντικό ερώτημα που χρήζει μελέτης είναι τα επίπεδα γενετικής ποικιλομορφίας εντός του κάθε ενός από τους υποπληθυσμούς του είδους. Αυτή η κατανόηση των γενετικών δομών του είδους θα συμβάλει στο να αναπτυχθούν συγκεκριμένα μέτρα διατήρησης του είδους κατά την υλοποίηση των Δράσεων Γ του έργου, τόσο εντός του φυσικού πληθυσμού (*in situ*) του που βρίσκεται εντός του ΜΑΦ, όσο και σειρά μέτρων εκτός των ορίων (*ex situ*) της φυσικής εξάπλωσης του.

Για το σκοπό αυτό συλλέχθηκε φυτικός ιστός (φύλλα) και από τις τρεις θέσεις που απαντά σήμερα το είδος. Η συλλογή του υλικού έγινε κατά το μήνα Μάιο του 2011 και συνολικά συλλέχθηκε φυτικό υλικό (φύλλα) από 114 άτομα του είδους:

- Τρίπυλος (ΜΑΦ 3) - 39 άτομα
- Χιονίστρα - 73 άτομα
- Κρύος Ποταμός - 2 άτομα (τα άτομα αυτά είναι τα μόνα που βρέθηκαν στην περιοχή του Κρύου Ποταμού, μετά από επισκέψεις στον πληθυσμό αυτό κατά τα έτη 2010 και 2011).

Ο *Cedrus brevifolia* (κυπριακός κέδρος) έχει αποτελέσει αντικείμενο μελέτης της επιστημονικής κοινότητας, τα αποτελέσματα της οποίας τον έχουν χαρακτηρίσει ως είδος ιδιαίτερου επιστημονικού ενδιαφέροντος. Παρά το περιορισμένο εύρος εξάπλωσής του και τον ενδημισμό του, αποτελεί ένα δασικό είδος, με ψηλά ποσοστά γενετικής ποικιλομορφίας (Panetsos et al. 1992, Bou-Dagher Kharrat et al. 2007, Eliades et al. 2011). Καθίσταται, έτσι, ένα παράδειγμα στην παγκόσμια βιβλιογραφία, όπου ο ενδημισμός και η περιορισμένη εξάπλωση ειδών δεν συνδέονται απαραίτητα με τη γενετική εκτροπή και την απώλεια της γενετικής

παραλλακτικότητας (Eliades et al. 2011). Τα τμήματα του φυσικού πληθυσμού παρουσιάζουν μια μικρή αλλά στατιστικά σημαντική γενετική διαφοροποίηση, ως επακόλουθο της περιορισμένης ανταλλαγής γενετικής πληροφορίας μεταξύ των κατακερματισμένων τμημάτων του πληθυσμού (Eliades et al. 2011). Δεδομένης της μέχρι σήμερα μελέτης που έγινε για τον κέδρο, το έργο θέλησε να εξετάσει το γενετικό δυναμικό που υπάρχει σε διάφορα στάδια ανάπτυξης του είδους (ώριμα άτομα – νεαρά άτομα – δενδρύλλια). Για το σκοπό αυτό, τέσσερις (4) δειγματοληπτικές επιφάνειες εγκαταστάθηκαν εντός της περιοχής του Τριπύλου (μια εντός των ορίων του ΜΑΦ και τρεις στην περιφέρεια των ορίων του ΜΑΦ). Από κάθε επιφάνεια συλλέχθηκαν βελόνες (φύλλα) από αντιπροσωπευτικό αριθμό ατόμων από κάθε μια από τις τρεις κατηγορίες ανάπτυξης:

- ώριμα άτομα – Δέντρα κέδρου τα οποία είναι αναπαραγωγικά
- νεαρά άτομα – Δέντρα κέδρου τα οποία δεν είναι αναπαραγωγικά
- δενδρύλλια – Άτομα κέδρου σε ύψος μέχρι 50 cm

Συνολικά συλλέχθηκε υλικό από 371 άτομα κέδρου από όλες τις επιφάνειες και όλα τα στάδια ανάπτυξης και η κατανομή τους παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Κατανομή των δειγμάτων κέδρου που συλλέχθηκαν για τους σκοπούς του έργου, ανά δειγματοληπτική επιφάνεια.

Επιφάνεια	Αριθμός ατόμων			Συνολικός αριθμός ατόμων
	Όριμα άτομα	Νεαρά άτομα	Δενδρύλλια	
Επιφ. 1	32	31	28	91
Επιφ. 2	30	31	30	91
Επιφ. 3	24	31	42	97
Επιφ. 4	22	36	31	89

**Centaurea akamantis* (ΜΑΦ 4)

Η μελέτη της γενετικής παραλλακτικότητας της **C. akamantis* βασίστηκε στη συλλογή φυτικού ιστού από άτομα και από τις δυο (2) θέσεις που απαντά το είδος σήμερα, σε δυο φαράγγια στη Χερσόνησο του Ακάμα. Μέχρι στιγμής δεν υπάρχει οποιαδήποτε προηγούμενη εργασία για τη μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας που παρουσιάζει το είδος αυτό εντός των φυσικών θέσεων εξάπλωσής του, καθώς και της γενετικής διαφοροποίησης που τυχόν να έχουν οι θέσεις αυτές. Για το σκοπό

αυτό συλλέχθηκαν 67 άτομα κενταύριας με την κατανομή τους σε κάθε μια από τις δυο θέσεις εξάπλωσης της, να είναι:

- Φαράγγι του Άβακα (ΜΑΦ 4) – 37 άτομα
- Αργάκι των κουφών – 30 άτομα

**Astragalus macrocarpus subsp. lefkarensis*

Το είδος αυτό έχει περιορισμένη εξάπλωση σε πέντε (5) θέσεις στις ελεύθερες περιοχές της Κύπρου, ενώ μια άλλη θέση βρίσκεται στον κατεχόμενο Κορμακίτη. Η γενετική δομή του είδους δεν έχει μελετηθεί προηγουμένως, γεγονός που αποτελεί ένα σημαντικό κενό ως προς την ανάπτυξη αιεφόρων μέτρων διαχείρισης των γενετικών του πόρων, αλλά και του ίδιου του είδους στην ολόκληρη του. Για το σκοπό αυτό, δείγματα (φύλλα) συλλέχθηκαν κατά τον Απρίλιο του 2011 από άτομα του είδους και από τις πέντε θέσεις που αυτό απαντά σήμερα στις ελεγχόμενες από τη Κυπριακή Δημοκρατία περιοχές. Συνολικά έχουν συλλεχθεί δείγματα από 161 άτομα, των οποίων η κατανομή (μέγεθος δείγματος) ανά περιοχή συλλογής εξαρτήθηκε από το μέγεθος του πληθυσμού του είδους σε κάθε θέση (όσο μεγαλύτερος ο πληθυσμός τόσο μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων συλλέχθηκε). Συγκεκριμένα συλλέχθηκαν:

- Ίνεια (Κολώνη) – 3 άτομα
- Κελοκέδαρα – 25 άτομα
- Λεύκαρα – 28 άτομα
- Αλαμινός – 20 άτομα
- Ασγάτα 1 (σε θέση που γειτνιάζει με ΜΑΦ) – 52 άτομα
- Ασγάτα 2 (εντός του ΜΑΦ) – 33 άτομα

3. Εργαστηριακές αναλύσεις (μοριακοί δείκτες)

Στη βάση της αλλαγής του τεχνικού μέρους της δράσης, η απομόνωση γενωμικού DNA από τα δείγματα των ειδών στόχων, έγινε στο εργαστήριο που λειτούργησε για σκοπούς του έργου, στις εργαστηριακές εγκαταστάσεις που παραχώρησε το UNDP-ACT προς το έργο (βλ. Εισαγωγή) και οι οποίες ενισχύθηκαν μερικώς με την αγορά εξειδικευμένου εξοπλισμού. Οι εργασίες απομόνωσης του DNA έγιναν από μέλη του Πανεπιστημίου Frederick (υπεύθυνος εταίρος για την υλοποίηση της δράσης).

Απομόνωση DNA έγινε από 100 mg φυτικού ιστού από τα δείγματα που συλλέχθηκαν για κάθε υπό μελέτη είδος. Η απομόνωση γενωμικού DNA έγινε ακολουθώντας το πρωτόκολλο Qiagen - DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden,

Germany)³, όπως αυτό εφαρμόζεται στην συσκευή QIAcube. Η ποσότητα του DNA που απομονώθηκε από κάθε δείγμα εξετάστηκε μετά από την ηλεκτροφόρηση 2 μl του DNA, σε agar συγκέντρωσης 0,8 %, καταδεικνύοντας συγκεντρώσεις από 5 ng/μl μέχρι 25 ng/μl (ανάλογα με την ποιότητα του υλικού που έγινε η απομόνωση). Το DNA που απομονώθηκε από κάθε δείγμα αποθηκεύτηκε στους -25 °C, μέχρι να σταλεί για την περαιτέρω ανάλυση (εφαρμογή μοριακών δεικτών) σε εξειδικευμένα εργαστήρια μοριακής γενετικής.

Για σκοπούς υλοποίησης της δράσης αποφασίστηκε όπως για τα τρία ποώδη (**Ophrys kotschyi*, **Arabis kennedyae* και **Astragalus macrocarpus* subsp. *lefkarensis*) καθώς και το ένα θαμνώδες είδος (**Centaurea akamantis*) του έργου, για τα οποία δεν υπήρχε οποιαδήποτε προηγούμενη ερευνητική εργασία, γίνει χρήση του ουδέτερου μοριακού δείκτη Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLPs). Επίσης, για τα είδη αυτά αποφασίστηκε όπως μελετηθεί και η γενετική τους ποικιλομορφία σε ένα γονιδιακό τόπο για κάθε είδος, στο χλωροπλαστικό DNA, υιοθετώντας το δείκτη πολυμορφισμού μεμονωμένων νουκλεοτιδίων (Single Nucleotide Polymorphisms – SNPs).

Αντίθετα, για το κύριο δασοπονικό είδος του οικοτόπου *9590, *C. brevifolia* έγινε εφαρμογή του ουδέτερου μοριακού δείκτη των μικροδορυφόρων (SSRs), δείκτης ο οποίος χαρακτηρίζεται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, οι οποίες αποτελούνται από διαφορετικό αριθμό μοτίβων από 1 μέχρι 6 ζεύγη βάσεων (bp). Η εφαρμογή του συγκεκριμένου δείκτη έγινε τόσο σε πυρηνικό όσο και χλωροπλαστικό DNA. Επίσης για τη μελέτη της γενετικής δομής του Κυπριακού κέδρου υιοθετήθηκε και ο δείκτης SNP, σε ένα υποψήφιο προσαρμοστικό γονιδιακό τόπο.

Μελέτη των τριών ποωδών ειδών και του θαμνώδους είδους του έργου

Η εφαρμογή του μοριακού δείκτη AFLP και η ανάλυση των τμημάτων που ενισχύθηκαν για τα είδη **Ophrys kotschyi*, **Arabis kennedyae*, **Centaurea akamantis* και **Astragalus macrocarpus* subsp. *lefkarensis*, έγινε στα εργαστήρια της **Eurofins analytics** στη Γαλλία. Η απουσία οποιασδήποτε προηγούμενης σχετικής πληροφορίας (μοριακού επιπέδου) για τα υπό μελέτη είδη καθώς και το γεγονός ότι η παρούσα δράση δεν αποσκοπούσε σε εξειδικευμένη ερευνητική δραστηριότητα (π.χ. για την ανάπτυξη εξειδικευμένων εκκινητών για ενίσχυση μικροδορυφόρων ή συγκεκριμένου γονιδιακού τόπου) ήταν οι λόγοι που οδήγησαν στην επιλογή ενός ουδέτερου μοριακού δείκτη για τη μελέτη της γενετικής δομής των υπό μελέτη ειδών. Το πρωτόκολλο (PCR mix and PCR program) που ακολουθήθηκε για του σκοπούς εφαρμογής του δείκτη AFLPs στα δείγματα της παρούσας εργασίας, ήταν

³ Πλήρης περιγραφή και ανάλυση των διαφορών σταδίων εργασίας του πρωτοκόλλου αυτού βρίσκεται στον ιστότοπο: www.qiagen.com/products/genomicdnastabilizationpurification/dneasyplantsystem/dneasyplantminikit.aspx#Tabs=t2

στη βάση των σχετικών πρωτοκόλλων που περιγράφονται από τους Keygene (1995) και Vos et al. (1995). Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται: το ζεύγος των περιοριστικών ενζύμων και ο κωδικός των εκκινητών, που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εφαρμογή του δείκτη AFLP, στη παρούσα εργασία για κάθε είδος στόχος.

Πίνακας 2: Αναλυτική παρουσίαση των ενζύμων και εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εφαρμογή του μοριακού δείκτη AFLP στα υπό μελέτη είδη.

Είδος	Περιοριστικά ένζυμα	Εκκινητής στο στάδιο του προ-πολλαπλασιασμού στο μοριακό δείκτη AFLP	Εκκινητής στο στάδιο του πολλαπλασιασμού στο μοριακό δείκτη AFLP
<i>*Ophrys kotschy</i>	Eco / Mse	Eco+C / Mse+A	Eco+CTAT / Mse+ACA (E59+T/M35)
<i>*Arabis kennedyae</i>	Eco / Mse	Eco+A / Mse+A	Eco+AGC / Mse+CAC (E40/M48)
<i>*Centaurea akamantis</i>	Eco / Mse	Eco+A / Mse+C	Eco+ACA / Mse+CAC (E35/M48)
<i>*Astragalus macrocarpus subsp. lefkarensis</i>	Eco / Mse	Eco+A / Mse+A	Eco+ACC / Mse+ACA (E36/M35)

Όλες οι αντιδράσεις PCR, έγιναν σε θερμικό κυκλοποιητή GeneAmp9700 thermocyclers (Applied Biosystems), ενώ η ηλεκτροφόρηση και διαχωρισμός των τμημάτων DNA που ενισχύθηκαν από τη πιο πάνω διαδικασία έγινε με τη χρήση κατακόρυφης ηλεκτροφόρησης σε τριχοειδές (capillary electrophoresis) σε μηχάνημα ABI3130xl, ενώ ο προσδιορισμός του μεγέθους των ζωνότυπων έγινε με τα λογισμικά προγράμματα GeneScan και Genotyper (Applied Biosystems).

Για τα πιο πάνω είδη (**Ophrys kotschy*, **Arabis kennedyae*, **Centaurea akamantis* και **Astragalus macrocarpus subsp. lefkarensis*) η γενετική τους ποικιλομορφία εξετάστηκε και με τη χρήση του μοριακού δείκτη SNPs, όπου η ποικιλότητα περιγράφηκε σε επίπεδο σημειακών μεταλλάξεων βάσεων του DNA σε συγκεκριμένες γονιδιακές θέσεις. Για τους σκοπούς του έργου, εξέταση στοχευμένων γονιδιακών θέσεων του μονογονεϊκού κληρονομούμενου χλωροπλαστικού DNA (μητρικό DNA – κληρονομείται στον απόγονο από το μητρικό άτομο) έγινε με τη χρήση του συγκεκριμένου δείκτη. Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται: (i) Ο αριθμός των δειγμάτων που αναλύθηκαν για κάθε φυτό, (ii) ο γονιδιακός τόπος που ενισχύθηκε (μελετήθηκε) σε κάθε φυτό και (iii) η σχετική βιβλιογραφία στην

οποία υπάρχουν οι πληροφορίες για τα πρωτόκολλα εφαρμογής της PCR καθώς και η ακολουθία των εκκινήτων για τον αντίστοιχο γονιδιακό τόπο.

Πίνακας 3: Παρουσίαση πληροφοριών για την εξέταση της γενετικής ποικιλομορφίας του χλωροπλαστικού DNA στα υπό μελέτη είδη.

Είδος	Αριθμός δείγματος	Γονιδιακός τόπος ⁴	Αναφορά
<i>*Ophrys kotschy</i>	12	Rrn5 - TrnR	Chung and Staub (2003)
<i>*Arabis kennedyae</i>	10	trnLc - trnLd	Karl et al. 2012
<i>*Centaurea akamantis</i>	8	trnT - trnF	Taberlet et al. 1991 (with annealing temperature of 50°C)
<i>*Astragalus macrocarpus subsp. lefkarensis</i>	19	rpoC1-rpoC2	Liston and Wheeler 1994

Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω όλες οι αντιδράσεις πολυμεράσης έγιναν σε θερμικό κυκλοποιητή GeneAmp9700 thermocyclers (Applied Biosystems), ενώ η ηλεκτροφόρηση και ο διαχωρισμός των τμημάτων DNA που ενισχύθηκαν από την πιο πάνω διαδικασία έγινε με τη χρήση κατακόρυφης ηλεκτροφόρησης σε τριχοειδές (capillary electrophoresis) σε μηχάνημα ABI3130xl. Ο προσδιορισμός του μεγέθους των ζωνότυπων έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα GeneScan (Applied Biosystems).

Μελέτη του δασικού είδους *Cedrus brevifolia*

Η εξέταση των σχεδίων γενετικής παραλλακτικότητας που παρατηρείται στα διαφορετικά στάδια ανάπτυξης των ατόμων του Κυπριακού κέδρου σε μικρή κλίμακα, επιτεύχθηκε μέσα από την εγκατάσταση τεσσάρων δειγματοληπτικών επιφανειών (όπως περιγράφεται πιο πάνω). Η εφαρμογή των μοριακών δεικτών που εφαρμόστηκαν για το σκοπό της εργασίας αυτής έγινε στο εργαστήριο Ecologie des Forêts Mediterranees του Ινστιτούτου Γεωργικών Ερευνών της Γαλλίας (**INRA – Unit Avignon**).

Η εφαρμογή του μοριακού δείκτη των SSRs υιοθετήθηκε για τη μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας των δειγμάτων που συλλέχθηκαν τόσο σε πυρηνικό όσο και σε χλωροπλαστικό DNA. Ανάλογη με το γένωμα (πυρηνικό ή πλαστιδιακό) στο οποίο

⁴ Θα πρέπει να αναφερθεί ότι δεν υπάρχει οποιαδήποτε προηγούμενη μελέτη της γενετικής δομής του χλωροπλαστικού DNA για τα υπό μελέτη είδη. Η επιλογή των συγκεκριμένων γονιδιακών τόπων έγινε στη βάση βιβλιογραφικής ανασκόπησης, ενώ η επιλογή τους βασίστηκε στα θετικά αποτελέσματα που παρουσίασαν σε είδη του ίδιου γένους.

εφαρμόζεται ο δείκτης είναι και η σχετική πληροφορία, η οποία προκύπτει για τη διεξαγωγή περαιτέρω στατιστικών αναλύσεων. Εφαρμογή του δείκτη στο πυρηνικό DNA, λειτουργεί ως ο συγκυρίαρχος δείκτης επιτρέποντας, πέρα από τη γενετική ποικιλομορφία του είδους, να εκτιμηθεί ο βαθμός ετεροζυγωτίας του και ο βαθμός ομομιξίας. Αντίθετα, εφαρμογή του δείκτη στο μονογονεϊκά κληρονομούμενο χλωροπλαστικό DNA, δίνει τη δυνατότητα εκτίμησης της γενετικής ποικιλομορφίας του γενώματος αυτού, το οποίο στο γένος *Cedrus* είναι πατρικά κληρονομούμενο (Fady et al. 2003).

Στη βάση των πιο πάνω δεδομένων, έξι πυρηνικοί δορυφόροι (nSSRs) χρησιμοποιήθηκαν για τους σκοπούς του έργου. Οι τέσσερις από τους έξι εκκινητές των nSSRs είναι αυτοί που χρησιμοποιήθηκαν σε παλαιότερη εργασία για το Κυπριακό κέδρο (Eliades et al. 2011), ενώ οι άλλοι δυο εκκινητές (EQJYX_A και DWOTR_A) έχουν αναπτυχθεί από το εργαστήριο στο INRA-Avignon (στα πλαίσια δικών τους ερευνητικών δραστηριοτήτων) και χρησιμοποιούνται για πρώτη φορά στη μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας φυσικών πληθυσμών του γένους *Cedrus*. Για το πλαστιδιακό DNA (χλωροπλάστες) χρησιμοποιήθηκαν τρεις εκκινητές μικροδορυφόρων (cpSSRs) οι οποίοι και σε προηγούμενες εργασίες έδειξαν ικανοποιητικά επίπεδα ποικιλομορφίας (Fady et al. 2003; Eliades et al. 2011). Τα πρωτόκολλα για την αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης (PCR) που υιοθετήθηκαν για τους σκοπούς της παρούσας εργασίας περιγράφονται στους Eliades et al. (2011).

Όλες οι αντιδράσεις πολυμεράσης έγιναν σε θερμικό κυκλοποιητή Eppendorf Mastercycler ep Thermal Cyclers (384-well), ενώ η ηλεκτροφόρηση και διαχωρισμός των τμημάτων DNA που ενισχύθηκαν από τη πιο πάνω διαδικασία έγινε με τη χρήση κατακόρυφης ηλεκτροφόρησης σε τριχοειδές (capillary electrophoresis) σε μηχάνημα ABI3730xl DNA Analyzer και ο προσδιορισμός του μεγέθους των ζωνότυπων έγινε με τα λογισμικά προγράμματα GeneScan και Genotyper (Applied Biosystems).

Μελέτη της γονιδιακής δομής του κυπριακού κέδρου έγινε με την εφαρμογή του μοριακού δείκτη SNPs σε επιλεγμένο γονιδιακό τόπο (INT1) που σχετίζεται με φυσιολογικές διεργασίες του είδους (Ινοσιτόλη - μεταφορείς που συμμετέχουν στην ανάπτυξη των ριζών). Το πρωτόκολλο της PCR που ακολουθήθηκε για την διεξαγωγή αυτού του δείκτη είναι αυτό που περιγράφεται στη Karam (2010).

Επεξεργασία των πρωτογενών δεδομένων που λήφθηκαν κατά την εργαστηριακή ανάλυση έγινε με τη χρήση σειράς εξειδικευμένων στατιστικών πακέτων εργασίας, όπως: Fstat, Arlequin, AFLPsurv, AFLPdiv, Harplotype Analysis V1.5 και Clustal 2.1.

4. Αποτελέσματα (στατιστική ανάλυση μοριακών δεδομένων)

4.1. Αποτελέσματα γενετικής ποικιλομορφίας των τριών ποωδών ειδών και του θαμνώδους είδους του έργου

Εφαρμογή των παραμέτρων των λογισμικών AFLPsurv, AFLPdiv και Arlequin έγινε ώστε να εκτιμηθούν τα επίπεδα γενετικής παραλλακτικότητας τόσο εντός όσο και μεταξύ των ειδών στόχων (**Ophrys kotschy*, **Arabis kennedyae*, **Centaurea akamantis* και **Astragalus macrocarpus* subsp. *lefkarensis*). Για σκοπούς αποτύπωσης της γενετικής ποικιλομορφίας εντός του κάθε πληθυσμού εκτιμήθηκε:

- ο αριθμός των γονιδιακών θέσεων ανά πληθυσμό (L),
- ο αριθμός των πολυμορφικών γονιδιακών θέσεων ανά πληθυσμό (P_L)
- το ποσοστό πολυμορφισμού ανά πληθυσμό (PLP) (στη βάση των αλληλόμορφων που έχουν συχνότητα εμφάνισης εντός του πληθυσμού πέρα του 1%),
- ο αριθμός λειτουργικών αλληλόμορφων (στη βάση της rarefaction ανάλυσης) (Br) και
- ο δείκτης γενετικής ποικιλομορφίας (H_j) για κάθε πληθυσμό, με το τυπικό σφάλμα του (SE).

Επίσης εκτιμήθηκε η συνολική γενετική ποικιλομορφία του είδους (H_T) στο σύνολο των πληθυσμών του που μελετήθηκαν, όπως επίσης η γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών του είδους μαζί τα επίπεδα σημαντικότητάς της (F_{ST}). Τέλος, εκτιμήθηκε η γενετική διαφοροποίηση (και τα επίπεδα σημαντικότητάς της) ανά ζεύγος υποπληθυσμών του είδους (υποπληθυσμών που μελετήθηκαν στο πλαίσιο της εργασίας αυτής), δημιουργώντας μια μήτρα διπλής εισόδου.

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί ότι για τα πλείστα από τα πιο πάνω είδη δεν υπάρχει προηγούμενη γνώση σχετικά με τη διαδικασία επικονίασης και πως αυτή επηρεάζει το δείκτη ομομειξίας του κάθε είδους εντός κάθε πληθυσμού του. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε όπως οι παράμετροι H_j , H_T και F_{ST} εκτιμηθούν με δυο διαφορετικές τιμές του δείκτη ομομειξίας (F_{IS}):

- $F_{IS} = 0$ – τυχαία γονιμοποίηση μεταξύ των ατόμων του πληθυσμού.
- $F_{IS} = 0,5$ – μη τυχαία γονιμοποίηση μεταξύ των ατόμων του πληθυσμού.

**Ophrys kotschy*

Πληθυσμός	n	L	P_L	PLP (1%)	Br (16)	$F_{IS} = 0$			$F_{IS} = 0.5$		
						$H_j(SE)$	H_T	F_{ST}	$H_j(SE)$	H_T	F_{ST}
Αλάμπρα	16	28	28	0,929	1,929	0,452 (0,02)	0,456	0,066*	0,404 (0,02)	0,427	0,097*

Μάμμαρι (Δυτικά)	16	28	27	0,964	1,964	0,391 (0,02)			0,434 (0,02)	
Μάμμαρι (Ανατολικά)	22	28	27	0,929	1,903	0,438 (0,02)			0,370 (0,02)	
Μιτσερό	44	28	27	1,000	1,896	0,426 (0,02)			0,342 (0,02)	

n: Αριθμός δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων.

	Αλάμπρα	Μάμμαρι (Δυτικά)	Μάμμαρι (Ανατολικά)	Μιτσερό
Αλάμπρα	-			
Μάμμαρι (Δυτικά)	0,123*	-		
Μάμμαρι (Ανατολικά)	-0,006 ^{n.s}	0,194*	-	
Μιτσερό	0,024 ^{n.s}	0,255*	-0,011 ^{n.s}	-

**Arabis kennedyae*

Πληθυσμός	n	L	P_L	PLP (1%)	Br (2)	$F_{IS} = 0$			$F_{IS} = 0.5$		
						H_j (SE)	H_T	F_{ST}	H_j (SE)	H_T	F_{ST}
Τρίπυλος	32	28	10	0,179	1,011	0,094 (0,02)			0,065 (0,02)		
Χιονίστρα	65	28	12	0,929	1,195	0,187 (0,03)	0,255	0,124*	0,194 (0,04)	0,265	0,141*
Κρύος Ποταμός	2	28	28	0,00	1,000	0,375 (0,02)			0,405 (0,001)		

n: Αριθμός δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων.

	Τρίπυλος	Χιονίστρα	Κρύος Ποταμός
Τρίπυλος	-		
Χιονίστρα	0,413*	-	
Κρύος Ποταμός	-0,332 ^{n.s}	0,231 ^{n.s}	-

**Centaurea akamantis*

Πληθυσμός	n	L	P_L	PLP (1%)	Br (12)	$F_{IS} = 0$			$F_{IS} = 0.5$		
						H_j (SE)	H_T	F_{ST}	H_j (SE)	H_T	F_{ST}
Άβακας	24	33	32	0,758	1,504	0,366 (0,02)			0,285 (0,02)		
Αρκάτζι των κουφών	12	33	33	0,909	1,909	0,455 (0,02)	0,468	0,121*	0,453 (0,02)	0,433	0,142*

n: Αριθμός δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων.

	Άβακας	Αρκάτζι των κουφών
Άβακας	-	
Αρκάτζι των κουφών	0.184*	-

**Astragalus macrocarpus subsp. lefkarensis*

Πληθυσμός	n	L	P_L	PLP (1%)	Br (3)	$F_{IS} = 0$			$F_{IS} = 0.5$		
						H_j (SE)	H_T	F_{ST}	H_j (SE)	H_T	F_{ST}
Ίνεια	3	45	23	0,333	1,333	0,250 (0,03)			0,228 (0,04)		
Κελοκέδαρα	24	45	33	0,778	1,334	0,246 (0,03)			0,234 (0,03)		
Λεύκαρα	24	45	25	0,467	1,227	0,174 (0,03)	0,256	0,197*	0,162 (0,03)	0,256	0,2562*
Αλαμινός	19	45	25	0,444	1,233	0,171 (0,03)			0,161 (0,03)		
Ασγάτα 1	49	45	27	0,644	1,263	0,186 (0,03)			0,175(0,03)		
Ασγάτα 2	30	45	31	0,689	1,276	0,208 (0,02)			0,188 (0,02)		

n: Αριθμός δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων.

	Ίνεια	Κελοκέδαρα	Λεύκαρα	Αλαμινός	Ασγάτα 1	Ασγάτα 2
Ίνεια	-					
Κελοκέδαρα	0,367*	-				
Λεύκαρα	0,416*	0,261*	-			
Αλαμινός	0,423*	0,143*	0,323*	-		
Ασγάτα 1	0,465*	0,155*	0,302*	0,231*	-	

Ασγάτα 2	0,420*	0,187*	0,241*	0,251*	0,064*	-
-----------------	--------	--------	--------	--------	--------	---

4.2. Αποτελέσματα από τη μελέτη του χλωροπλαστικού DNA των τριών ποικυλών ειδών και του θαμνώδους είδους του έργου

Για κάθε ένα από τα πιο πάνω είδη εξετάστηκε η γενετική ποικιλομορφία που παρουσιάζει συγκεκριμένη γονιδιακή θέση του πλαστιδιακού DNA (βλ. Πίνακα 3), το οποίο έχει μητρική προέλευση. Στοιχίση των ακολουθιών και μελέτη για SNP έγινε με το λογισμικό Clustal 2.1. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν κατέδειξαν τα εξής συμπεράσματα:

**Ophrys kotschy*

Ανάλυση της ακολουθίας βάσεων στο γονιδιακό τόπο Rrn5 – TrnR για το είδος της ορχιδέας *Ophrys kotschy*, κατέδειξε την ύπαρξη δυο διαφορετικών απλοτύπων, συνολικού μεγέθους 220 βάσεων νουκλεοτιδίων (bp) (Παράρτημα Α) ο κάθε ένας. Εντούτοις, το γεγονός ότι οι δυο αυτοί απλότυποι σχηματίζονται λόγω της μη ευδιάκριτης ανάγνωσης του χρωματογραφήματος στη θέση 213 bp (W/T) και 221 bp (Y/T), δεν μας επιτρέπει την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

**Arabis kennedyae*

Για το είδος αυτό η γενετική ποικιλομορφία στο μητρικά κληρονομούμενο, χλωροπλαστικό DNA, εξετάστηκε στο γονιδιακό τόπο trnL intron. Ενίσχυση του γονιδιακού τόπου έδωσε τμήμα ενίσχυσης cpDNA μεγέθους 395 bp (Παράρτημα Α). Σύγκριση μεταξύ των αποτελεσμάτων παρουσιάζει δυο διαφορετικούς απλοτύπους στη θέση 255 bp (A / T). Ο ένας από τους δύο απλότυπους παρατηρείται αποκλειστικά στη θέση της Χιονίστρας, ενώ ο άλλος αποτελεί κοινό απλότυπο και για τις δυο θέσεις από όπου αναλύθηκαν δείγματα (Χιονίστρα και Τρίφυλλος).

**Centaurea akamantis*

Για το είδος αυτό η γενετική ποικιλομορφία στο μητρικά κληρονομούμενο, χλωροπλαστικό DNA, εξετάστηκε στο γονιδιακό τόπο trnT-trnF. Ενίσχυση του γονιδιακού τόπου έδωσε τμήμα ενίσχυσης cpDNA μεγέθους 1430 bp (Παράρτημα Α). Εντούτοις, σύγκριση μεταξύ των δειγμάτων από τις δυο διαφορετικές θέσεις που απαντά το είδος δεν είναι δυνατό λόγω του μη ευδιάκριτου χρωματογραφήματος που παρατηρήθηκε στις ακολουθίες από τη θέση στο Αργάκι των κουφών.

**Astragalus macrocarpus* subsp. *lefkarensis*

Εξετάστηκε η ποικιλομορφία του γονιδιακού τόπου *groC1-groC2* στο χλωροπλαστικό DNA του **A. macrocarpus* subsp. *lefkaensis*. Εντούτοις δεν μπορεί να εξαχθεί αποτέλεσμα, αφού παρ' όλες τις προσπάθειες που έγιναν δεν έγινε εφικτή η λήψη καθαρών και ευδιάκριτων αποτελεσμάτων μετά από την PCR. Η δοκιμή κάποιου άλλου γονιδιακού τόπου του χλωροπλαστικού DNA στο συγκεκριμένο είδος, θα μπορούσε να παρέχει περισσότερη πληροφορία.

4.3. Αποτελέσματα γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης ατόμων του Κυπριακού κέδρου (*Cedrus brevifolia*)

Εφαρμογή των παραμέτρων των λογισμικών Fstat, Haplotype Analysis V.1.5 και Arlequin έγινε ώστε να εκτιμηθούν τα επίπεδα γενετικής παραλλακτικότητας εντός των σταδίων ανάπτυξης των ατόμων του κέδρου για κάθε δειγματοληπτική επιφάνεια. Οι ακόλουθοι γενετικοί παράμετροι εκτιμήθηκαν:

Πυρηνικό DNA

- ο αριθμός των αλληλόμορφων σε κάθε στάδιο ανάπτυξης εντός κάθε επιφάνειας (A_N),
- ο αριθμός λειτουργικών αλληλόμορφων (στη βάση της rarefaction ανάλυσης) σε κάθε στάδιο ανάπτυξης εντός κάθε επιφάνειας (A_r),
- ο βαθμός ετεροζυγωτίας (H_e) των ατόμων σε κάθε στάδιο ανάπτυξης εντός κάθε επιφάνειας και
- ο βαθμός ομομειξίας (F_{IS}) των ατόμων σε κάθε ομάδα και βαθμός σημαντικότητας.

Χλωροπλαστικό DNA

- ο αριθμός των απλοτύπων σε κάθε στάδιο ανάπτυξης εντός κάθε επιφάνειας (H_N),
- ο αριθμός ιδιωτικών (μοναδικό) απλοτύπων σε κάθε στάδιο ανάπτυξης εντός κάθε επιφάνειας (P_H),
- ο αριθμός λειτουργικών απλοτύπων (στη βάση της rarefaction ανάλυσης) (H_r) και
- ο δείκτης ποικιλομορφίας σε κάθε στάδιο ανάπτυξης εντός κάθε επιφάνειας των ατόμων σε κάθε ομάδα (H_E).

		A_N	$A_r(26)$	H_e	F_{IS}	H_N	P_H	$H_r(26)$	H_E
Επιφάνεια 1	Ώριμα άτομα	40	6,320	0,615	-0,025 ^{n.s}	9	1	7,375	0,829
	Νεαρά άτομα	40	6,404	0,629	-0,051 ^{n.s}	12	3	10,412	0,869

	Δενδρύλλια	39	6,440	0,580	-0,023 ^{n.s}	9	1	8,000	0,841
		A_N	A_r(29)	H_e	F_{IS}	H_N	P_H	H_r(29)	H_E
Επιφάνεια 2	Ώριμα άτομα	39	6,433	0,556	0.081 ^{n.s}	10	1	6,000	0,862
	Νεαρά άτομα	39	6,390	0,577	-0.081 ^{n.s}	12	2	8,076	0,905
	Δενδρύλλια	36	5,972	0,571	0.023 ^{n.s}	9	2	5,844	0,857
		A_N	A_r(23)	H_e	F_{IS}	H_N	P_H	H_r(23)	H_E
Επιφάνεια 3	Ώριμα άτομα	34	5,583	0,603	0.036 ^{n.s}	11	2	7,579	0,906
	Νεαρά άτομα	39	5,934	0,593	-0.028 ^{n.s}	8	0	6,750	0,789
	Δενδρύλλια	42	5,785	0,632	-0.019 ^{n.s}	11	1	7,813	0,821
		A_N	A_r(22)	H_e	F_{IS}	H_N	P_H	H_r(22)	H_E
Επιφάνεια 4	Ώριμα άτομα	34	5,574	0,593	0.009 ^{n.s}	10	1	7,200	0,899
	Νεαρά άτομα	40	6,118	0,648	0.006 ^{n.s}	10	0	6,750	0,876
	Δενδρύλλια	41	6,360	0,655	-0.005 ^{n.s}	14	3	7,200	0,901

Εξέταση των επιπέδων στατιστικής σημαντικότητας των τιμών, της κάθε μιας από τις γενετικές παραμέτρους του πιο πάνω πίνακα μεταξύ των διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης του κέδρου, δεν παρουσίασαν οποιαδήποτε στατιστικά σημαντικές μεταβολές (two-sided).

Η ανάλυση των SNPs στο γονιδιακό τόπο INT1 έδειξε διαφοροποίηση στη βάση νουκλεοτιδίου σε δυο διαφορετικές θέσεις του κέδρου. Εντούτοις, η διαφοροποίηση αυτή δεν φαίνεται να συνδέεται με τα διαφορετικά στάδια ανάπτυξης του είδους.

5. Συζήτηση - Συμπεράσματα

Το παρόν παραδοτέο αποτελεί μια πρώτη προσπάθεια για αποτύπωση της γενετικής ποικιλομορφίας για τα τέσσερα υπό μελέτη είδη καθώς και της γενετικής δομής που σχηματίζεται εντός τμημάτων μικρής έκτασης του φυσικού πληθυσμού του κυπριακού κέδρου.

Ανάλυση των αποτελεσμάτων για την **Ophrys kotschyi*, δείχνουν μια αντίθετη εικόνα από αυτή που είχε αρχικά εκτιμηθεί για τη γενετική δομή και παραλλακτικότητα του είδους. Η απουσία του επικονιαστή του είδους, που έχει παρουσιαστεί τα τελευταία χρόνια, σε συνδυασμό με τον κατακερματισμό του πληθυσμού του έδιναν την εντύπωση για ένα είδος με έντονα τα φαινόμενα της γενετικής διάβρωσης και της γενετικής εκτροπής. Εντούτοις τα αποτελέσματα από την εργασία αυτή δείχνουν ότι το είδος αυτό χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερα ψηλά επίπεδα γενετικής παραλλακτικότητας, στοιχείο που συνάδει με άλλα είδη *Ophrys*

και τις εργασίες των Nybom and Bartish (2000) και Nybom (2004) για ενδημικά πολυετή είδη. Αντίθετα η γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των θέσεων που μελετήθηκαν είναι σε χαμηλότερα επίπεδα από αυτή που αναμενόταν για είδη με βιολογικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά με αυτά της **Ophrys kotschyi*. Το γεγονός ότι το είδος είναι πολυετές σε συνδυασμό με το ότι η επικονίασή του πραγματοποιείται από συγκεκριμένο επικονιαστή, υποδεικνύει ότι αποτελούν τους κύριους παράγοντες που συντέιναν στη διατήρηση αυτών των υψηλών επιπέδων γενετικής ποικιλομορφίας. Εντούτοις η παρατηρούμενη απουσία (εξαφάνιση) του επικονιαστή σήμερα, ίσως είναι ένα σημαντικός παράγοντας που θα συντείνει στην γενετική διάβρωση του είδους σε βάθος χρόνου (π.χ. 5 με 10 αναπαραγωγικές γενιές του είδους από σήμερα) και με την παρέλευση της συμμετοχής στο γενετικό δυναμικό του είδους από τις παλαιότερες γενιές. Τέλος, παρ' όλο που το είδος παρουσιάζει στατιστικά σημαντική γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των θέσεων που μελετήθηκαν, εντούτοις η μήτρα της γενετικής διαφοροποίησης ανά ζεύγος θέσεων δείχνει μια μη στατιστικά σημαντική γενετική διαφοροποίηση μεταξύ κάποιων εκ' των θέσεων που μελετήθηκαν.

Παρόμοια αποτελέσματα με αυτά της **Ophrys kotschyi* παρουσίασαν και τα άλλα δυο πολυετή είδη που μελετήθηκαν σε αυτή την εργασία. Η **Centaurea akamantis* επίσης παρουσιάζει αρκετά υψηλά επίπεδα γενετικής ποικιλομορφίας και στις δυο θέσεις που απαντά σήμερα το είδος, συνηγορώντας στη παραδοχή ότι το είδος δεν χαρακτηρίζεται από φαινόμενο γενετικής εκτροπής. Τέτοια αποτελέσματα πιθανότατα είναι το αποτέλεσμα της απρόσκοπτης ροής γονιδίων (γύρης) εντός του πληθυσμού καθώς και το ότι το είδος έχει ένα τυχαίο αναπαραγωγικό σύστημα (random mating system). Επίσης, το μέγεθος του πληθυσμού του είδους δεν φαίνεται να είναι σε κρίσιμα επίπεδα για τη γενετική του ποικιλομορφία. Εντούτοις μεταξύ των δυο θέσεων που βρίσκεται το είδος καταγράφηκε στατιστικά σημαντική γενετική διαφοροποίηση συνηγορώντας στο γεγονός ότι σειρά διαφορετικών εξελικτικών παραγόντων να επιδρούν εντός κάθε μιας από τις θέσεις αυτές, επηρεάζοντας τη γενετική δομή τους.

Ο **Astragalus macrocarpus* subsp. *lefkarensis* είναι είδος που επίσης παρουσιάζει σχετικά υψηλά ποσοστά ποικιλομορφίας. Εντούτοις, μεταξύ των διαφόρων θέσεων που εξετάστηκαν παρατηρείται διακύμανση ως προς τα επίπεδα γενετικής ποικιλομορφίας, που σε αρκετές των περιπτώσεων η διακύμανση των επιπέδων ποικιλομορφίας να οδηγεί και στη γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των θέσεων του είδους. Είναι χαρακτηριστικό ότι στις θέσεις Αλαμινός και Λεύκαρα, τα επίπεδα γενετικής ποικιλομορφίας του είδους είναι περιορισμένα, ενώ τα ψηλά επίπεδα ποικιλομορφίας που καταγράφονται στην Ίνεια δεν μπορούν να οδηγήσουν σε κάποιο ασφαλές συμπέρασμα, λόγω του μικρού μεγέθους δείγματος που αναλύθηκε.

Αντίθετα με τα πιο πάνω είδη η **Arabis kennedyae* είναι μονοετές φυτό και με ιδιαίτερα περιορισμένη εξάπλωση, ακόμη και εντός των θέσεων που απαντά. Χαρακτηριστικό αποτελεί η θέση του Κρουού ποταμού όπου σε δυο διαφορετικές χρονικές περιόδους δεν παρατηρήθηκε οποιαδήποτε αύξηση στον αριθμό των ατόμων που εμφανίστηκαν (2 άτομα μόνο). Ο πολύ μικρός αριθμός δείγματος που αναλύθηκε από τη θέση αυτή, καθιστά το αποτέλεσμα της γενετικής ποικιλομορφίας του είδους στη θέση αυτή, ιδιαίτερα δύσκολο ως προς την εξαγωγή ασφαλών αποτελεσμάτων. Επίσης, ο υποπληθυσμός του είδους στη θέση Τριπύλου παρουσιάζει τα χαμηλότερα ποσοστά γενετικής ποικιλομορφίας.

Τα αποτελέσματα της γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ των θέσεων αυτών δεν είναι στατιστικά σημαντικά, αποτέλεσμα απρόσμενο δεδομένου ότι οι θέσεις αυτές είναι σε διαφορετικές περιοχές και το είδος είναι μονοετές, παράγοντες που αναμενόταν να επηρεάζουν σημαντικά τη διαφοροποίηση μεταξύ των θέσεων του είδους. Αντίθετα με τα αποτελέσματα του ουδέτερου δείκτη των AFLPs, ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αποτελέσματα από τη μελέτη του χλωροπλαστικού DNA (μητρικά κληρονομούμενο γένωμα) ως προς τη διαφοροποίηση μεταξύ των θέσεων του είδους, όπου παρατηρήθηκαν δυο διαφορετικοί απλότυποι (Παράρτημα Α). Ο ένας από τους δυο απλότυπους εμφανίζεται αποκλειστικά στη θέση της Χιονίστρας, ενώ ο άλλος είναι κοινός μεταξύ των θέσεων Χιονίστρας και Τριπύλου.

Γενικό συμπέρασμα από τη μελέτη των αποτελεσμάτων που εξάχθηκαν για κάθε ένα από τα υπό μελέτη είδη είναι ότι παρόλο που πρόκειται για ενδημικά είδη με έντονο το χαρακτηρισμό του κατακερματισμού του πληθυσμού τους και σε μερικές περιπτώσεις με περιορισμένη εξάπλωση, διατηρούν ικανοποιητικά ποσοστά γενετικής ποικιλομορφίας. Το συμπέρασμα αυτό εξάγεται από τη σύγκριση των επιπέδων γενετικής ποικιλομορφίας των υπό μελέτη ειδών με τιμές που παρουσιάζονται σε εργασίες ανασκόπησης για είδη με παρόμοια βιολογικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά με αυτά των ειδών στόχων (Nybom and Bartish 2000, Nybom 2004). Επίσης, ένα άλλο γενικό συμπέρασμα που προκύπτει είναι το γεγονός ότι ο έντονος κατακερματισμός των πληθυσμών των υπό μελέτη ειδών, σε κάποιες περιπτώσεις φαίνεται να οδηγεί σε μια στατιστικά σημαντική γενετική διαφοροποίηση των θέσεων που το είδος απαντά σήμερα. Τέτοιο αποτέλεσμα θα μπορούσε να είναι το επακόλουθο της περιορισμένης ροής γονιδίων μεταξύ των θέσεων του είδους ή / και των διαφορετικών εξελικτικών παραγόντων που επιδρούν σε κάθε μια από τις θέσεις του είδους. Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί ότι η μελέτη του χλωροπλαστικού DNA στα υπό μελέτη είδη (εκτός από το *Cedrus brevifolia*), χρήζει επιπρόσθετης μελέτης με μεγαλύτερο αριθμό γονιδιακών τόπων, οι οποίοι θα μπορέσουν να παρέχουν όσο το δυνατό περισσότερη γενετική πληροφορία και να καταδείξει κατά πόσο οι θέσεις που τα υπό μελέτη είδη βρίσκονται σήμερα είναι το αποτέλεσμα κατακερματισμού ενός ενιαίου πληθυσμού ή η συρρίκνωση διαφορετικών πληθυσμών του είδους.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η γενετική δομή του κυπριακού κέδρου έχει μελετηθεί σε προηγούμενη εργασία (Eliades et al. 2011). Εντούτοις η δειγματοληψία της εργασίας από τους Eliades et al. (2011) βασίστηκε στη λήψη δειγμάτων μόνο από ενήλικα άτομα. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας καταδεικνύουν ότι δεν παρατηρείται μείωση ή στατιστική διαφοροποίηση της γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ των διαφόρων σταδίων ανάπτυξης του είδους. Το αποτέλεσμα αυτό ενισχύει την παραδοχή για ένα τυχαίο αναπαραγωγικό σύστημα του είδους αυτού καθώς και μια αποτελεσματική ροή γονιδίων (γύρης) σε μικρής κλίμακα ανάλυση, γεγονός που αποτρέπει τη δημιουργία ενός ομομεικτικού πληθυσμού.

Στο παραδοτέο *«Έκθεση σχετικά με την αναγκαιότητα και την σκοπιμότητα της ενίσχυσης των υφιστάμενων πληθυσμών»* γίνεται πλήρης αναφορά και αξιολόγηση των επιπέδων γενετικής παραλλακτικότητας των υπό μελέτη ειδών καθώς και αξιολόγηση της υφιστάμενης κατάστασής τους, προτείνοντας μέτρα για την ενίσχυση του πληθυσμού τους με σκοπό τη διατήρηση ή και την ενίσχυση της γενετικής τους δομής.

6. Βιβλιογραφία

Andreou M, Delipetrou P, Kadis C, Tsiamis G, Bourtzis K, Georghiou K (2011) An integrated approach for the conservation of threatened plants: the case of *Arabis kennedyae* (Brassicaceae). *Acta Oecologica* 37: 239-248.

Bou Dagher-Kharrat M, Mariette S, Lefèvre F, Fady B, Grenier-de March G, Plomion C, Saviouré A (2007) Geographical diversity and genetic relationships among *Cedrus* species estimated by AFLP. *Tree Genetics & Genomes* 3: 275–285.

Chung S-M, Staub JE (2003) The development and evaluation of consensus chloroplast primer pairs that possess highly variable sequence regions in a diverse array of plant taxa. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 757-767.

Eliades N-G, Gailing O, Leinemann L, Fady B, Finkeldy R (2011) High genetic diversity and significant population structure in *Cedrus brevifolia* Henry, a narrow endemic Mediterranean tree from Cyprus. *Plant Systematics and Evolution* 294: 185–198.

Fady B, Lefère F, Reynaud M, Vendramin GG, Bou Dagher-Kharrat M, Anzidei M, Pastorelli R, Saviouré A, Bariteau M (2003) Gene flow among different taxonomic units: evidence from nuclear and cytoplasmic markers in *Cedrus* plantation forests. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 1132–1138.

Karl R, Kiefer C, Ansell SW, Koch MA (2012) Systematics and evolution of arctic-alpine *Arabis alpine* (Brassicaceae) and its closest relatives in the eastern Mediterranean. *American Journal of Botany* 99: 778-794.

Liston A, Wheeler JA (1994) The phylogenetic position of the genus *Astragalus* (Fabaceae): Evidence from the chloroplast genes rpoC1 and rpoC2. *Biochemical Systematics and Ecology* 22: 377-388.

Panetsos KP, Christou A, Scaltsoyiannes A (1992) First analysis on allozyme variation in Cedar species (*Cedrus* sp.). *Silvae Genetica* 41: 339–342.

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

Παράρτημα Α: Ανάλυση ακολουθιών DNA από τα υπό μελέτη είδη σε συγκεκριμένους γονιδιακούς τόπους.

****Ophrys kotschy* (locus: rpoC1-rpoC2, one haplotype, size: 220 bp)**

CACACCAATCCATCCCGAACCTGGTGGTGAACTCTACTGCGGTGACGATACTGTAGGGGGGGCCCTGCGGAA
AAATAGCTCGACGCCAGAATGATAAAAAGCTTAACACCTCTATTTTCCCTATTTCAAAGATCAAATAAAAAA
TGCAAAGGTCGTCTTATTCAAAACCCCAATTAGAACATCTCTCTCNCCCACWTCACACCTCGGAACGCACC

****Arabis kennedyae* (locus trnL intro, two haplotypes, size: 395 bp)**

Haplotype I CGAAATCGGTAGACGCTACGGACTTAATTGGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTACTAAG 60
Haplotype II CGAAATCGGTAGACGCTACGGACTTAATTGGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTACTAAG 60

Haplotype I TGATAACTTTCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAACAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC 120
Haplotype II TGATAACTTTCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAACAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC 120

Haplotype I CTGGTTTACGCGAACAACCCAGAGTTTAGAAAGCGAGAAAAGAGGGATAGGTGCAGAGAC 180
Haplotype II CTGGTTTACGCGAACAACCCAGAGTTTAGAAAGCGAGAAAAGAGGGATAGGTGCAGAGAC 180

Haplotype I TCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAGTTCACTACCTTGATTGATCAAATGATTCAC 240
Haplotype II TCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAGTTCACTACCTTGATTGATCAAATGATTCAC 240

Haplotype I TCATAGTCTGATAGTTCCTTGGTGGAACTTATTAATCGGACGAGAATAAAGATAGAGTCC 300
Haplotype II TCATAGTCTGATAGATCCTTGGTGGAACTTATTAATCGGACGAGAATAAAGATAGAGTCC 300

Haplotype I CATTCTACATGTCAATACTGACAACAATGAAATTTATAGTAAGATGAAAATCCGTTGACT 360
Haplotype II CATTCTACATGTCAATACTGACAACAATGAAATTTATAGTAAGATGAAAATCCGTTGACT 360

Haplotype I TTTAAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCC 395
Haplotype II TTTAAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCC 395

****Centaurea akamantis* (trnT-trnF, one haplotype, size: 1430 bp)**

TAACATAAATTCGACATGCATAGGAATTCAATAAATCTTAGAATCTTTGCTATTAACCTAATTAAGCTATTCATATT
CGCTATTCATAATTAATATGAATATATTAAGAATAGAATATAGAATTTCAAATAACTGTTAAATATTATAGAAC
ATAATAATTAATCTAGCGATATATAATTTCAATTTTTTTTATCACAATGAAATATTATTTTTTTCTTTTTAATTA
AAAAAGAAAAAAGGAGTCGACCGTTCAAGTATTCGAAATTCGATCGGTAAATGAGTGGAAAGCGAGACAGA
TGTATAGGGTATGTATCCACCTATATTGAATTTTCGATACAGAAATGATAAAAATCGTTTTTGGATTGGACCAAAGA
TGAGCCTCCCATAGAAGATGAAAGAAGATAGACAATAAATCAAAGACAAAGGGGAGAAAACCTTTTTCGAGA
CAGGATTCGGCATCTATCTAATGAATTCGCGGTATAAATGAAAGAAAAAAGGGAACGAGATCAAATGAGATT
TTCATCTCAAAAAGGGGATATGGCGAAATTTGGTAGACGCTACGGACTTAATTGGATTGAGCCTTGGTATGGA
AACTTACTAAGTGATAACTTTCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC
ACGTTTTCCGAAAACAAACAAAGGTTTCAGAAAGCGAAAATCAAAGGATAGGTGCAGAGACTCGATGGAAG
CTGTTCTAACGAATGGAGTTGATTGTCTTACGTTGGTAGAGGAATCCTTCTATCGAACTTCATAAAAGATGAA
GGATAAACCTGTATACATAATATAGAAGAATTGTTGTGAATCGATTCCATATTGAAGAATCGAATATGCATTGA
TCAAACAATTCCTCATAATCTGATAGATCTTTGAAGAATGATTAATCGGACGAGAATAAAGATAGAGTCC
CGTTCTACATGTCAATACCGGCAACAATGAAATTTATAGTAAGAGGAAAATCCGTCGATTTAAAAAATCGTGAG
GGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAAAAGACCTTTGACTCCCTAATTTCTCTATCCTTTATTGTTTATTTATCC
TTTTCTTAGCGGTTCAAATTCCTTATCTTTCTTCTCATTCACTACTCTTTATACAAATGGGTCTGAGCGGAA
ATGCTGTTCTTATACATGTGATATATGATACATATACAAATGAACATCTTTGAGCAAGGAATCCCCATTTG
AATGATTCACGATCGATATTTTATCATACTGAACTTACAAAGTTGTTCTTTGACAAATATAGGACCTGGAT
GAGGCTTTGTAATACCCTTTCAATTGACATAGACCAAGTTATCTAGTAAAATGAAAATGAGGATGAGACATCA
GGAATAGTTGGG

**Cedrus brevifolia* (INT1)

TTTTCTCAGTTTCTGCCAGGAGCCTGTTTACTGTCCAATTCAACAGTGAAGCATGTTTGTAAGGCGATGCTCGA
CCTTGGTTCACCCGAGGATGCCCAAGCCAGTATGGTTGGTTGGCTGTTCTTGGATTGGCACTGTACATTATTTTC
TTTGCCCTGGCATGGGAACACTTCCTTGGGTAATCAACTCTGAGATTTATCCTTTGAGGTACAGGGGTACCTGT
GGAGGTGTAGCTGCAACATCGAATTGGGTTTCTAATTTGATTGTGGCACAACATTTCTACAATGACTGTAACC
ATT