

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής

ΚΑΠΙΡΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Θέμα: Παραλλακτικότητα αλληλουχιών της ενδομεταγραφόμενης περιοχής (ITS)
στο είδος *Salvia fruticosa* και μεταξύ ειδών του γένους *Salvia***

ΚΑΠΙΡΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ
Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία



Αθήνα 2016

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας

Αγρο-βιοτεχνολογία Φυτών και Μικροοργανισμών Γεωργικής Σημασίας

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Θέμα: Παραλλακτικότητα αλληλουχιών της ενδομεταγραφόμενης περιοχής (ITS)
στο είδος *Salvia fruticosa* και μεταξύ ειδών του γένους *Salvia***

ΚΑΠΙΡΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

ΑΘΗΝΑ 2016

Επιβλέπων Καθηγητής: Παναγιώτης Κατινάκης

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Θέμα: Παραλλακτικότητα αλληλουχιών της ενδομεταγραφόμενης περιοχής (ITS) στο είδος *Salvia fruticosa* και μεταξύ ειδών του γένους *Salvia*

ΚΑΠΙΡΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

Η ανάθεση της Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας με θέμα: «**Παραλλακτικότητα αλληλουχιών της ενδομεταγραφόμενης περιοχής (ITS) στο είδος *Salvia fruticosa* και μεταξύ ειδών του γένους *Salvia***», έγινε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης Ειδικής Σύθεσης του τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής στις 27/10/2015, κατά την οποία ορίστηκε η τριμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Παναγιώτης Κατινάκης, Καθηγητής (Επιβλέπων)

Δημήτριος Μπουράνης, Καθηγητής (Μέλος)

Φάλια Οικονόμου, Αναπλ. Καθηγήτρια (Μέλος)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Αγρο-βιοτεχνολογία Φυτών και Μικροοργανισμών Γεωργικής Σημασίας» του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Ο επιβλέπων καθηγητής της εργασίας αυτής ήταν ο καθηγητής Παναγιώτης Κατινάκης, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω για την ανάθεση της εργασίας αυτής, για την υπομονή, την καθοδήγησή και τις χρήσιμες υποδείξεις του. Η βοήθεια του κατά την συγγραφή της μεταπτυχιακής μελέτης ήταν πολύτιμη.

Θερμές ευχαριστίες στα μέλη της Εξεταστικής και Συμβουλευτικής Επιτροπής, καθηγητή Μπουράνη Δημήτρη και Αναπλ. Καθηγήτρια Οικονόμου Φάλια, για τη συμμετοχή τους στην τριμελή Επιτροπή και την ανάγνωση της μεταπτυχιακής διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την βοήθεια τους και ιδιαίτερα την Λέκτορα κ. Δήμου Μαρία και την Διδάκτορα κ. Βενιεράκη Αναστασία.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ιορδάνη Χατζηπαυλίδη για τη βοήθεια του.

Στο γιο μου
Δημήτρη

Περιεχόμενα

| | |
|--|--------|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ | σελ 8 |
| SUMMARY..... | σελ 9 |
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ..... | σελ 10 |
| 1.1 Τα ριβοσώματα..... | σελ 10 |
| 1.2 Τα γονίδια του πυρηνικού ριβοσωμικού rDNA..... | σελ 11 |
| 1.3 Δευτεροταγής δομή του ITS1 και του ITS2..... | σελ 14 |
| 1.4 Η αντισταθμιστική αλλαγή των βάσεων στις έλικες των ITS1 και ITS2..... | σελ 15 |
| 1.5 Η περιοχή ITS1 και ITS2 ως φυλογενετικός μοριακός δείκτης..... | σελ 17 |
| 1.6 Η περιοχή ITS1 και ITS2 ως γραμμωτός κώδικας DNA..... | σελ 18 |
| 1.7 Αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά..... | σελ 20 |
| 1.8 Ιστορία του γένους <i>Salvia</i> | σελ 22 |
| 1.9 Τα κυριότερα είδη <i>Salvia</i> στην Ελλάδα..... | σελ 24 |
| 1.9.1 <i>Salvia fruticosa</i> | σελ 24 |
| 1.9.2 <i>Salvia pomifera</i> | σελ 25 |
| 1.9.3 <i>Salvia sclarea</i> | σελ 27 |
| 1.9.4 <i>Salvia officinalis</i> | σελ 28 |
| 1.10 Καλλιεργούμενες εκτάσεις και εμπορία ΑΦΦ..... | σελ 29 |
| 2. ΣΚΟΠΟΣ..... | σελ 35 |
| 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ..... | σελ 36 |
| 3.1 Φυτικό υλικό | σελ 36 |
| 3.2 Μοριακή ανάλυση..... | σελ 36 |
| 3.2.1 Απομόνωση ολικού DNA από το φυτικό ιστό..... | σελ 36 |
| 3.2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης..... | σελ 38 |
| 3.2.2.1 Αρχή μεθόδου..... | σελ 38 |
| 3.2.2.2 Ενίσχυση τμήματος DNA μέσω της τεχνικής PCR..... | σελ 38 |
| 3.2.2.3 Ενίσχυση τμήματος της περιοχής ITS..... | σελ 40 |
| 3.2.3 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτή αγαρόζης..... | σελ 41 |
| 3.2.4 Ανάκτηση κλάσματος DNA από πηκτή αγαρόζης..... | σελ 42 |
| 3.2.5 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων | σελ 43 |
| 3.2.6 Υποκλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακό φορέα..... | σελ 44 |
| 3.2.6.1 Χαρακτηριστικά πλασμιδιακού φορέα | σελ 44 |
| 3.2.6.2 Ενσωμάτωση τμημάτων DNA με τυφλά άκρα στον πλασμιδιακό φορέα..... | σελ 45 |
| 3.2.7 Μετασηματισμός ικανών κυττάρων <i>Escherichia coli</i> με πλασμίδια..... | σελ 46 |

| | |
|---------|---|
| 3.2.7.1 | Υγρές και στερεές καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i>σελ 46 |
| 3.2.7.2 | Δημιουργία βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i> ικανών για μετασηματισμό (Competent cells).....σελ 47 |
| 3.2.7.3 | Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων με <i>E. coli</i> πλασμίδιο.....σελ 47 |
| 3.2.8 | Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασηματισμένα κύτταρα <i>E. coli</i>σελ 48 |
| 3.2.8.1 | Μέθοδος βρασμού (Boiling Preparation) (Holmes & Quigley, 1981).....σελ 49 |
| 3.2.8.2 | Μέθοδος απομόνωσης με στήλη (QIAprep).....σελ 50 |
| 3.3 | Σύγκριση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών-φυλογενετική ανάλυση.....σελ 52 |
| 4. | ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ |
| 4.1 | Χαρακτηριστικά της περιοχής ITS.....σελ 53 |
| 4.2 | Ανάλυση των συντηρημένων αλληλουχιών της περιοχής ITS1, ITS2 και 5.8S.....σελ 54 |
| 4.3 | Φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των ειδών του γένους <i>Salvia</i>σελ 57 |
| 4.4 | Ανάλυση της δευτεροταγούς δομής της περιοχής ITS2.....σελ 60 |
| 4.5 | Ανάλυση της δευτεροταγούς δομής της περιοχής ITS1.....σελ 67 |
| 4.6 | Ανάλυση της δευτεροταγούς δομής της περιοχής 5.8Sσελ 71 |
| 5. | ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....σελ 72 |
| | BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....σελ 76 |
| | ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α'.....σελ 82 |
| | ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β'.....σελ 84 |

Περίληψη

Στη παρούσα μελέτη, διερευνήθηκαν οι αλληλουχίες της ενδομεταγραφόμενης περιοχής (ITS) του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA (nrDNA) από πέντε είδη του γένους *Salvia*. Η περιοχή ITS (ITS1, 5.8S και ITS2) του πυρηνικού γονιδιώματος, ενισχύθηκε με την τεχνική της PCR χρησιμοποιώντας καθολικούς εκκινητές. Στη συνέχεια, τα προϊόντα της αντίδρασης PCR κλωνοποιήθηκαν και αλληλουχήθηκαν. Διερεύνηση της βάσης δεδομένων έδειξε ότι τόσο οι ITS1 όσο και οι ITS2 αλληλουχίες παρουσιάζουν σημαντική ομολογία (<91%) αποκλειστικά με είδη του γένους *Salvia*. Φυλογενετική ανάλυση με βάση τις αλληλουχίες της περιοχής ITS2 ή της ITS1 έδειξε ότι υπήρχε σημαντική γενετική απόκλιση μεταξύ των διάφορων ειδών του γένους *Salvia*. Άτομα του ίδιου είδους όπως η *S. fruticosa* εμφάνισαν παραλλακτικότητα. Επιπλέον, αναλύθηκε η δευτεροταγής δομή των περιοχής ITS1 και της ITS2 με τη χρήση του λογισμικού LocaRNA-P. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η συναινετική δευτεροταγής δομή της περιοχής ITS1 και της ITS2 παρείχε πληροφορίες για τον εντοπισμό αντισταθμιστικών πολυμορφισμών, οι οποίες δεν επηρεάζουν τη δευτεροταγή δομή και οι οποίες συνεισφέρουν στη διάκριση τόσο των φυλογενετικά κοντινών όσο των φυλογενετικά απομακρυσμένων ειδών του γένους *Salvia*.

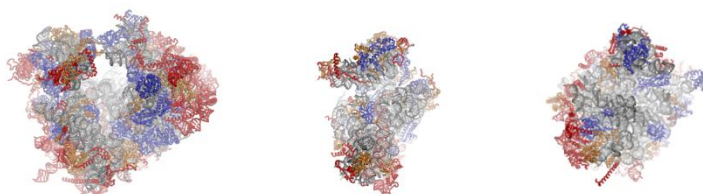
Summary

In our study, the ITS (ITS1, 5.8S και ITS2) sequences from five taxonomically characterized species of the genus *Salvia* (*S. fruticosa*, *S. officinalis*, *S. calycina*, *S. aethiopsis*, *S. hispanica*) were analyzed. The ITS region was successfully amplified from these samples using universal primers and reaction conditions. The amplified products were cloned and subsequently sequenced. BLASTN analysis revealed that all the ITS2 or the ITS1 region showed high sequence homology (<91%) with *Salvia* species whereas individual plants belonging to the same species (e.g. *S. fruticosa*) displayed over 99.5% identity. Phylogenetic analysis based on ITS1 or ITS2 demonstrated that there was significant divergence among the examined *Salvia* species. Searches in the ITS2 database revealed demonstrated that both ITS1 and ITS2 sequences contained all the predicted conserved motifs. Secondary structure analysis of ITS2 and ITS1 regions provided the means to identify common structural domains and compensatory base changes enabling thus the discrimination among phylogenetically closed and diverge *Salvia* species.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Τα ριβοσώματα

Τα ριβοσώματα είναι πολύπλοκα κυτταρικά οργανίδια, αποτελούμενα από RNAs και πρωτεΐνες, τα οποία καταλύουν τη μετατροπή της γενετικής πληροφορίας (mRNAs) σε πρωτεΐνες. Τα ριβοσώματα απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς, ωστόσο η σύσταση τους και η δομή τους ποικίλει σημαντικά μεταξύ των ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών οργανισμών, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι αυτές οι διαφορές σχετίζονται με λειτουργικές διαφορές. Για παράδειγμα η μοριακή μάζα του ριβοσώματος στα ανώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι 4,3MDa ενώ στα βακτήρια είναι 2,3MDa. Τα ριβοσώματα των ευκαρυωτικών κυττάρων είναι γνωστά ως 80S και αποτελούνται από δυο υπομονάδες, την 40S και την 60S γνωστές ως μικρή και μεγάλη υπομονάδα αντίστοιχα (Εικόνα 1). (Melnikon et al., 2012)



Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση κρυσταλλικής δομής του 80S ριβοσώματος και των 40S και 60S υπομονάδων

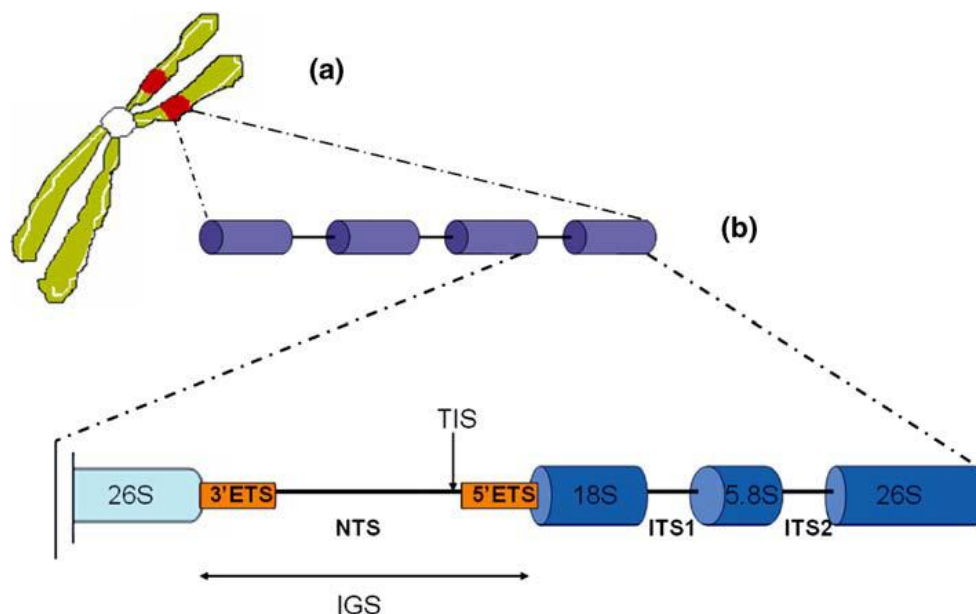
Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, οι ριβοσωμικές υπομονάδες αποτελούνται από πρωτεΐνες και ριβοσωμικά RNAs. Το ποσοστό των ριβοσωμικών RNAs, (rRNAs), καταλαμβάνει περίπου το 65 % του ριβοσώματος ενώ το υπόλοιπο, αποτελείται από πρωτεΐνες. Για παράδειγμα, στο *Sacharomyces cerevisiae* η 60S υπομονάδα αποτελείται από 46 πρωτεΐνες και τρεις τύπους RNA (28S, 5S και 5.8S rRNA) ενώ η 40S υπομονάδα από 33 πρωτεΐνες και ένα τύπο RNA (18S rRNA). Η μικρή υπομονάδα του ριβοσώματος της *E.coli* αναφέρεται ως 30S και αποτελείται από

ένα τύπο RNA (16S rRNA) και 21 πρωτεΐνες. Η μεγάλη υπομονάδα αποτελείται από 34 πρωτεΐνες και δύο τύπους RNA (16S rRNA και 5S rRNA) (Melnikov et al., 2012).

1.2 Τα γονίδια του πυρηνικού ριβοσωμικού rDNA

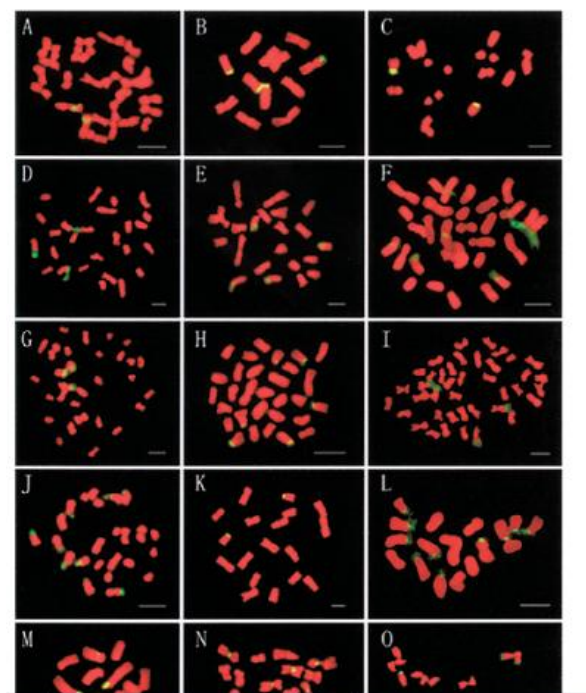
Στα φυτά και στους άλλους ανώτερους οργανισμούς, τα γονίδια που κωδικοποιούν τα 18S, 5.8S και 28S rRNA βρίσκονται το ένα δίπλα στο άλλο με τη σειρά 18S-5.8S-28S. Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που βρίσκονται μεταξύ του 18S γονιδίου και του 5.8S γονιδίου αναφέρονται ως ενδομεταγραφόμενη περιοχή 1 (Internal Transcribed Spacer 1, ITS1) του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA, ενώ οι αλληλουχίες DNA που βρίσκονται μεταξύ του γονιδίου 5.8S και του γονιδίου 28S αναφέρονται ως ενδομεταγραφόμενη περιοχή 2 (Internal Transcribed Spacer 2, ITS2) του πυρηνικού ριβοσωμικού (nr) DNA (Εικόνα 2).

Τα αντίγραφα του rDNA (18S-5.8S-28S) επαναλαμβάνονται εκατοντάδες ή και χιλιάδες φορές, ανάλογα με τον οργανισμό, σε διάταξη κεφαλή – ουρά. Κάθε αντίγραφο rDNA διαχωρίζεται από το γειτονικό του στη συστοιχία με μία αλληλουχία νουκλεοτιδίων, η οποία αναφέρεται ως διαγονιδιακή περιοχή (Intergenic Spacer, IGS, ή not transcribed spacer NTS) (Εικόνα 2) (Poczai and Hyvärinen, 2010).



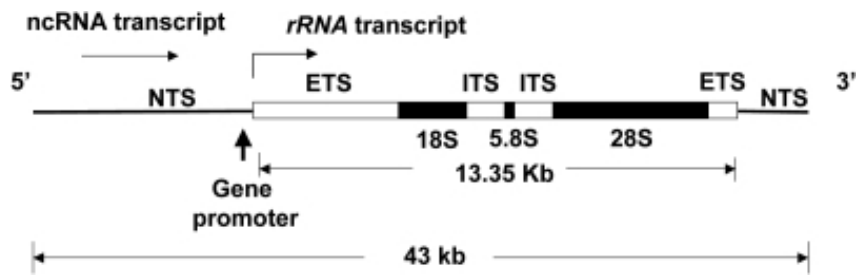
Εικόνα 2. Σχηματική παρουσίαση της περιοχής rDNA(18S-5.8S-28S) στα φυτά. (α) Η θέση του rDNA στα χρωμοσώματα των φυτών (β) συστοιχίες του rDNA .

Τα αντίγραφα του rDNA είναι οργανωμένα σε δύο ή περισσότερες συστάδες και απαντώνται σε δύο ή περισσότερες θέσεις στα χρωμοσώματα σχηματίζοντας τον οργανωτή πυρηνίσκο (nucleolar organizer) που είναι η βάση της δομικής οργάνωσης του πυρηνίσκου, μιας δομής του πυρήνα (Εικόνα 3) (Griffor et al., 1991).



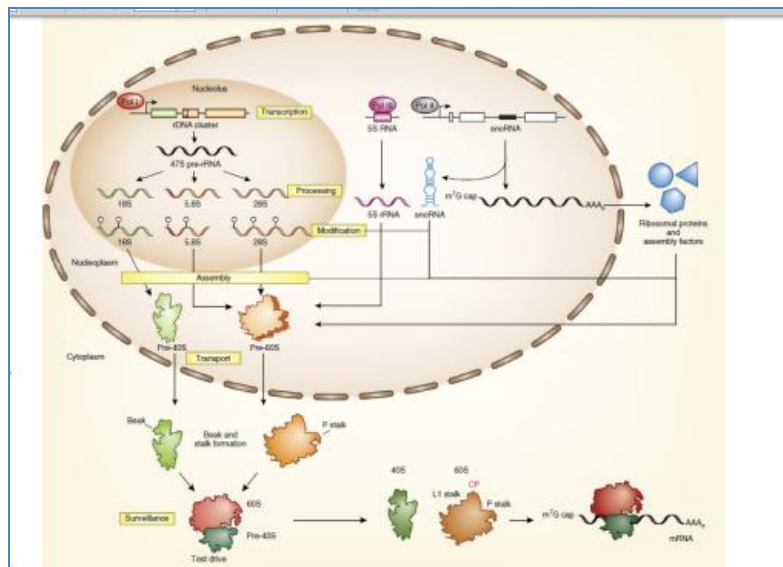
Εικόνα 3. Μεταφασικά χρωμοσώματα από 15 είδη φυτών (A-O) μετά από in situ υβριδισμό με ανιχνευτή το 45S rDNA. Τα χρωμοσώματα έχουν χρωματιστεί με DAPI και φαίνονται να έχουν ένα ροζ χρώμα. Η θέση των 45S rDNA στα χρωμοσώματα φαίνεται ως μια κίτρινο-πράσινη κηλίδα.

Τα rDNAs μεταγράφονται από την πολυμεράση I (Poli), παράγοντας ένα πρόδρομο RNA (45s prer-rRNA) μεγέθους 8-14Kb ανάλογα με τον οργανισμό (Εικόνα 4). Η περιοχή έναρξης της μεταγραφής εδράζεται ανωφερικά του 5' άκρου του 18S rDNA και το πρόδρομο RNA περιλαμβάνει τις αλληλουχίες του 18S, ITS1, 5.8S, ITS2, 28S rDNA και ένα μέρος της περιοχής ETS.



Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση του 45S rRNA γονιδίου. NTS: Μη μεταγραφόμενη περιοχή, επίσης γνωστή ως η διαγονιδιακή περιοχή. ETS: εξωτερική μεταγραφόμενη περιοχή. ITS: ενδομεταγραφόμενη περιοχή. Η θέση έναρξης μεταγραφής (Gene promoter).

Το πρόδρομο RNA υπόκειται σε επεξεργασία (απομάκρυνση της περιοχής ITS1 και ITS2) μέσω της δράσης RNA ενδονουκλεασών σε καθορισμένες θέσεις των περιοχών ITS1 και ITS2. Στη συνέχεια η δράση των ενδονουκλεασών οδηγεί στον σχηματισμό των ωρίμων 18S, 5.8S και 28S rRNA (Εικόνα 5). Επίσης, κατά την επεξεργασία του προδρόμου RNA ορισμένες από τις βάσεις του 18S και του 28S rRNA υπόκεινται σε τροποποιήσεις (π.χ. μεθυλίωση) (Mullineux and Hauser, 2009).



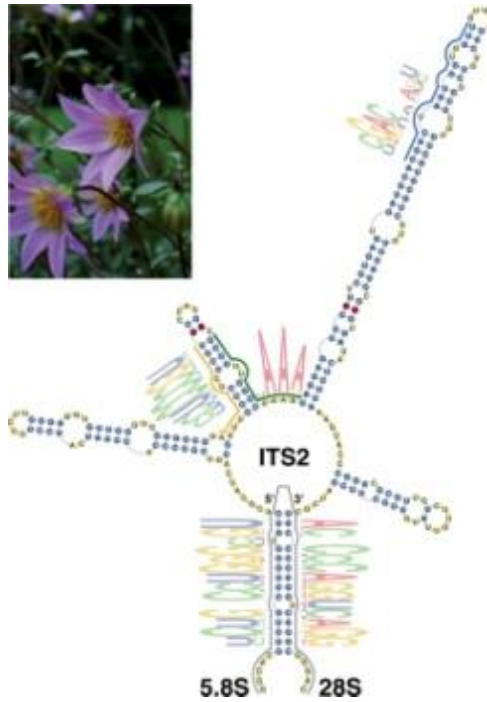
Εικόνα 5. Βιογένεση των ριβοσωμάτων στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Η βιογένεση των ριβοσωμάτων περιλαμβάνει έξι στάδια. Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται η μεταγραφή (transcription) του 45S rDNAs από την πολυμεράση I (Pol II), γονιδίων που κωδικοποιούν τις ριβοσωμικές πρωτεΐνες (ribosomal proteins, RPs) και άλλων παραγόντων (assembly factors, AFs) καθώς και των μικρών RNAs (snoRNAs). Στο δεύτερο και τρίτο στάδιο (processing and modification) πραγματοποιείται η επεξεργασία του πρόδρομου RNA (47S pre-rRNA ή 45S pre-rRNA). Στο τέταρτο στάδιο πραγματοποιείται η συγκρότηση των πρώιμων ριβοσωμάτων (pre40S, pre60S) τα οποία μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα (πέμπτο στάδιο) όπου πραγματοποιείται ο τελικός έλεγχος (έκτο στάδιο) με αποτέλεσμα να προκύπτουν τα ώριμα 40S και 60S σωματίδια.

1.3 Δευτεροταγής δομή του ITS1 και του ITS2

Μελέτες έχουν δείξει ότι στα φυτά, στα σπονδυλωτά και στους μύκητες η προβλεπόμενη δευτεροταγής δομή της ITS2 μεταγραφόμενης περιοχής, σε αντίθεση με αυτή της ITS1 μεταγραφόμενης περιοχής, είναι συντηρημένη (Hershkovitz and Zimmer 1997, Jobes and Thien 1997, Joseph et al., 1999). Τα προγράμματα πρόβλεψης της δευτεροταγούς δομής μιας αλληλουχίας RNA συνήθως βασίζονται σε αλγόριθμους που υπολογίζουν την ελάχιστη ελεύθερη ενέργεια (ΔG) της δομής έτσι ώστε να επιτυγχάνεται η μεγίστη σταθερότητα της (Zuker, 2003).

Η προβλεπόμενη δευτεροταγής δομή ITS2 παρουσιάζει τέσσερις έλικες (Εικόνα 6). Ένα κοινό χαρακτηριστικό της περιοχής ITS2 είναι ότι περιέχει τρία κοινά μοτίβα (motifs) οι αλληλουχίες των οποίων εντοπίζονται πάνω στις έλικες II και III (Εικόνα 6) (Coleman 2007, Schultz et al., 2007, Wolf et al., 2005).

Επίσης ένα κοινό γνώρισμα που διευκολύνει την αναγνώριση των δομικών χαρακτηριστικών της περιοχής ITS2 είναι η παρουσία μιας διόγκωσης ή αλλιώς «φυσαλίδας» (bulge) πυριμιδίνη - πυριμιδίνη κοντά στη βάση της έλικας II και μιας συντηρημένης αλληλουχίας TGGT κοντά στην κορυφή της έλικας III. Συνήθως η έλικα III είναι η μεγαλύτερη. (Εικόνα 6). Επίσης, σημαντικό ρόλο στη δευτεροταγή δομή των ελίκων της ITS2 έχει η αλληλεπίδραση κανονικών ζευγών βάσεων (A-U, G-C), μη- κανονικών αλλά σταθερών (G-U), μη σταθερών (A-C) και ασυνήθιστων ζευγών βάσεων (G-A, A-A) (Elgavish et al., 2001). Αυτά τα δομικά στοιχεία των ελίκων συχνά παρέχουν επιπρόσθετες πληροφορίες, οι οποίες δεν είναι ευδιάκριτες από την πρωτοταγή δομή και περιλαμβάνουν πληροφορίες, οι οποίες διευκολύνουν την ανάλυση των φυλογενετικών σχέσεων (Keller et al., 2010).



Εικόνα 6. Σχηματική αναπαράσταση του μοντέλου της δευτεροταγούς δομής της περιοχής ITS2. Οι συντηρημένες αλληλουχίες καταγράφονται δίπλα από τις έλικες.

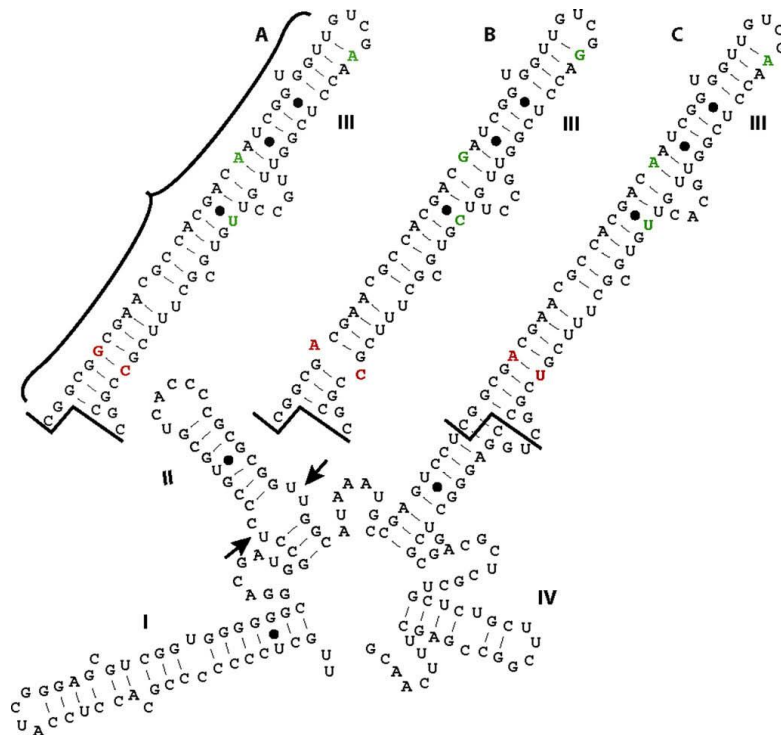
1.4 Η αντισταθμιστική αλλαγή των βάσεων στις έλικες των ITS1 και ITS2

Η παρουσία σταθερών και λειτουργικών δευτεροταγών δομών στους διαφόρους τύπους RNA μπορεί να διερευνηθεί μέσω της σύγκρισης ομολόγων περιοχών της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε διαφόρους οργανισμούς. Η σύγκριση αυτή επέτρεψε και εντοπισμό αλληλουχιών, οι οποίες δεν φαίνεται να είναι συντηρημένες αλλά μπορεί να συν-εξελίσσονται έτσι ώστε να διατηρείται η παρουσία των σωστών ζευγών βάσεων στη δευτεροταγή δομή του ITS1 ή ITS2 μετάγραφου (Coleman 2002, Koetschan et al., 2010). Στις έλικες του RNA μπορεί να διατηρείται η δυνατότητα σχηματισμού ζευγών βάσεων μέσω δύο εξελικτικών διαδικασιών. Η πρώτη διαδικασία περιλαμβάνει την αντικατάσταση και των δύο νουκλεοτιδίων, τα οποία μετέχουν στο σχηματισμό ενός κανονικού ζεύγους βάσεων της έλικας (double-sided changes), έτσι ώστε να μη διαταράσσεται ο αριθμός των κανονικών ζευγών βάσεων. Για παράδειγμα, εάν το νουκλεοτίδιο G, ενός ζεύγους βάσεων (π.χ. C-G), το οποίο βρίσκεται από τη μια πλευρά της έλικας μετατραπεί σε

C, λόγω κάποιας μετάλλαξης, γεγονός το οποίο θα προκαλέσει τη διατάραξη του ζεύγους των βάσεων, τότε το νουκλεοτίδιο C, που βρίσκεται στην άλλη πλευρά της έλικας, υποκαθίσταται από το νουκλεοτίδιο G και έτσι δημιουργείται ένα νέο σταθερό ζεύγος βάσεων, το G-C. Η διαδικασία αυτή αναφέρεται ως αντισταθμιστική αλλαγή των βάσεων (Compensatory Base Change, CBC) (Gutell et al., 1994, Mai and Coleman 1997).

Στη δεύτερη περίπτωση πραγματοποιείται υποκατάσταση του νουκλεοτιδίου που βρίσκεται μόνο από την μια πλευρά της έλικας. Για παράδειγμα, το ζεύγος G-C μετατρέπεται στο ζεύγος G-U. Σε αυτή την περίπτωση επίσης δεν διαταράσσεται σημαντικά η δευτεροταγής δομή της έλικας, διότι το νέο ζεύγος βάσεων (π.χ. G-U) που σχηματίζεται, είναι σχετικά σταθερό. Η διαδικασία αυτή συχνά αναφέρεται ως ημι-αντισταθμιστική αλλαγή των βάσεων (hCBC) (Coleman 2002, Coleman 2003).

Η ανάλυση των CBCs στις έλικες της περιοχής ITS2 από διαφορετικά φυτά έδειξε, ότι η παρουσία CBC υποδηλώνει ότι τα φυτά αυτά ανήκουν σε διαφορετικά είδη (Εικόνα 7) (Müller et al., 2007, Caisová et al., 2011). Ωστόσο, δεν είναι αναγκαία η παρουσία CBC προκειμένου δύο φυτά να ανήκουν σε διαφορετικά είδη (Müller et al., 2007). Η ανάλυση της δευτεροταγούς δομής της περιοχής ITS1 έδειξε ότι η παρουσία CBC έχει επιβοηθητικό χαρακτήρα για τη διάκριση συγγενικών ειδών μεταξύ μυκήτων (Koetschan et al., 2014).



Εικόνα 7. Συγκριτική ανάλυση της δευτεροταγούς δομής της έλικας III του ITS2 RNA μεταγράφου μεταξύ τριών ειδών του γένους *Malus*, (A) *amelanchier*, (B) *mespilus* and (C) *photinia*. Η έλικα III της ITS2 σε αυτά τα είδη παρουσιάζει ένα CBC (κόκκινο) και τρία hemi-CBCs (πράσινο). Το είδος *Amelanchier* δεν διασταυρώνεται με τα άλλα δύο είδη. Τα βέλη καταδεικνύουν τον βρόχο που σχηματίζεται στην έλικα II.

1.5 Η περιοχή ITS1 και ITS2 ως φυλογενετικός μοριακός δείκτης

Η εξαιρετικά συντηρημένη φύση του rDNA αποτέλεσε ένα χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των οργανισμών. Τα εκατοντάδες αντίγραφα του rDNA σε ένα οργανισμό είναι ουσιαστικά πανομοιότυπα και ως εκ τούτου και οι περιοχές ITS αναμένεται να είναι πανομοιότυπες (Elder and Turner, 1995). Οι εξελικτικές μεταβολές που λαμβάνουν χώρα στα γονίδια 28S, 18S και 5.8S των διαφόρων οργανισμών πραγματοποιούνται με εξαιρετικά αργό ρυθμό. Ως εκ τούτου η σύγκριση των αλληλουχιών του γονιδίου 18S καθιστά δυνατή μια εκτίμηση των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ των οργανισμών. Ωστόσο, ο ρυθμός των εξελικτικών μεταβολών στην περιοχή ITS1 και ITS2 είναι περίπου 100 φορές πιο γρήγορος και ως εκ τούτου η σύγκριση αυτών των αλληλουχιών επιτρέπει την

εξέταση των εξελικτικών σχέσεων εντός της οικογενείας, του γένους και του είδους μια ομάδας οργανισμών (Goldman 1983).

Η τεχνολογία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, γνωστή ως PCR, έχει επιτρέψει την ενίσχυση της περιοχής ITS από ένα εξαιρετικά μεγάλο αριθμό οργανισμών. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τις δυνατότητες αλληλούχησης της περιοχής ITS, αποκάλυψε ότι οι περιοχές ITS1 και ITS2 παρουσιάζουν εξαιρετική παραλλακτικότητα και μετέτρεψε αυτήν την περιοχή σε ένα από τους καλύτερους δείκτες διερεύνησης των εξελικτικών σχέσεων για τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Alvarez and Wendel 2003, Li et al., 2011, Chen et al., 2014).

Η φυλογενετική ανάλυση των ευκαρυωτικών οργανισμών με βάση την ομολογία των αλληλουχιών της περιοχής ITS2 απέδωσε εξαιρετικά αποτελέσματα (Li et al., 2011, Álvarez & Wendel 2003, Baldwin et al., 1995, Buchheim et al., 2012, Hillis and Dixon 1991, Keller et al., 2010). Επίσης, η παρουσία συντηρημένων αλληλουχιών στις έλικες της περιοχής ITS2 κατέστησε δυνατή τη σύγκριση τη δευτεροταγής δομής των αλληλουχιών των περιοχών ITS2 ενσωματώνοντας τόσο τον παράγοντα αλληλουχία (πρωτοταγή δομή) αλλά και τον παράγοντα δευτεροταγής δομή (Kjer 1995, Coleman and Mai 1997). Νεότερα προγράμματα όπως το LocRNA (Will et al., 2012) και 4SALE (Seibel et al., 2006), τα οποία κατά την ευθυγράμμιση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών λαμβάνουν υπόψη τόσο την ITS2 πρωτοταγή δομή όσο και την προβλεπόμενη δευτεροταγή δομή, επιτρέπουν την καλύτερη ανάλυση των φυλογενετικών σχέσεων των οργανισμών.

1.6 Η περιοχή ITS1 και ITS2 ως γραμμωτός κώδικας DNA

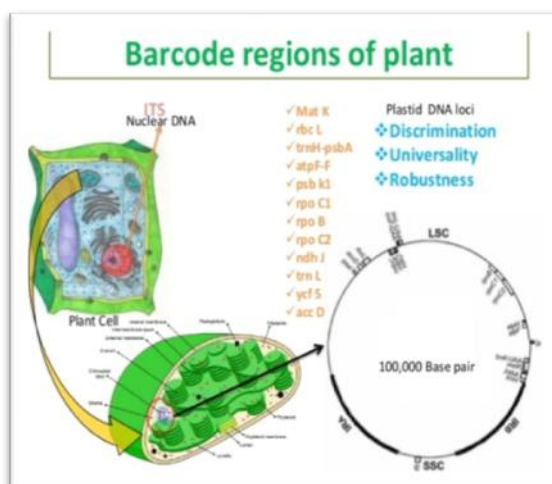
Η χρησιμοποίηση μικρών αλληλουχιών DNA στην μοριακή ταξινόμηση των ειδών στα φυτά, ζώα και μύκητες ονομάζεται DNA barcoding. Ο όρος «barcode DNA» ως αναγνωριστικό ταξινομικής ομάδας προτάθηκε για πρώτη φορά από τον Paul Hebert του Πανεπιστημίου του Guelph, το 2003, οποίος πρότεινε ότι το 5' άκρο του γονιδίου της κυτοχρωμικής οξειδάσης (CO1) από το γονιδίωμα του μιτοχονδρίου ήταν επαρκές για να δημιουργήσει barcode DNA για την αναγνώριση των ζώων. Ωστόσο, στα φυτά τα γονίδια των μιτοχονδρίων είναι αργά

εξελισσόμενα, με πολύ χαμηλά ποσοστά υποκατάστασης και δεν ήταν κατάλληλα για barcoding. Ως εκ τούτου, η αναζήτηση για τα φυτικά barcode μετατοπίστηκε σε μικρά τμήματα χλωροπλαστικών και πυρηνικών γονιδιωμάτων με υψηλά ποσοστά υποκατάστασης. Έτσι, διαφορετικές περιοχές του DNA τόσο από το γονιδίωμα του πλασμιδίου (π.χ., *matK*, *rbcL*, *proB*, *proC1*, *trnH-psbA*, και *ycf1*) (Εικόνα 8) όσο και από πυρηνικό γονιδίωμα (π.χ., η ενδομεταγραφόμενη περιοχή του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA, ITS) (Εικόνα 8) έχουν προταθεί για διάφορες ομάδες φυτών. Για παράδειγμα, τα γονίδια *rbcL*, *matK* και *ycf1* έχουν χρησιμοποιηθεί για τα φυτά (Dong et al., 2016, Hollingsworth et al., 2011, Kress and Erickson 2007, Li et al., 2011). Το *rbcL*, ITS, και *tufA* για τα φύκη (Buchheim et al., 2012) και τα ITS και CO 1 για τα κόκκινα φύκη (Robba et al., 2006).

Η ITS ήταν η πρώτη περιοχή που προτάθηκε ως barcode για τα φυτά (Kress et al., 2005, Hollingsworth et al., 2011, Li et al., 2011, Song et al., 2012).

Η περιοχή ITS2 έχει δοκιμαστεί και χρησιμοποιηθεί ευρέως ως η δείκτης barcode DNA, για τα φύκη και φυτά (Buchheim et al., 2012, Guo et al., 2013), τους μύκητες (Heinrichs et al., 2012), τα πρώτιστα (Guo et al., 2013) και τα ζώα (Yao et al., 2010, Salvi and Mariottini 2012).

Αντίθετα, η περιοχή ITS1 έχει αναφερθεί πως σπάνια χρησιμοποιήθηκε ως barcode DNA για την ταυτοποίηση των ειδών, εκτός από μερικές ομάδες φυτών (Wang et al., 2015), ζώων και μυκήτων (Osmundson et al., 2013), αν και αυτή η περιοχή έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε οικολογικές μελέτες (Blaalid et al., 2013). Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι το ITS1 μπορεί να υπερέχει ως barcode DNA από το ITS2 για ευκαρυωτικά είδη (Wang et al., 2015).



Εικόνα 8. Περιοχές του DNA από το γονιδίωμα του πλασμιδίου και από το πυρηνικό γονιδίωμα

1.7 Αρωματικά και Φαρμακευτικά φυτά

Τα φαρμακευτικά φυτά δεν αποτελούν ταξινομική ομάδα φυτών, αλλά μία ομάδα που οριοθετείται ως προς τη χρήση (Bhattarai and Karki 2004). Κάθε φυτό που χρησιμοποιείται στη φαρμακευτική ή ιατρική μπορεί να κατηγοριοποιηθεί ως φαρμακευτικό φυτό (Bhattarai and Karki 2004). Ο όρος **φαρμακευτικά** αποδίδεται σε φυτά που παράγουν βιολογικές δραστικές ενώσεις με θεραπευτική δράση για τον άνθρωπο.

Ο όρος **αρωματικά** αποδίδεται σε φυτά που περιέχουν αιθέρια έλαια και έχουν αρωματικό χαρακτήρα με ευχάριστη για τον άνθρωπο οσμή και οι χρήσεις αυτών συνδέονται με την παρασκευή αρωμάτων και άλλων εύοσμων προϊόντων (π.χ. φυτά που προσδίδουν οσμή και γεύση στα τρόφιμα). Τα Αρωματικά φυτά μπορεί να είναι ή να μην είναι φαρμακευτικά (Bhattarai and Karki 2004). Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organisation, WHO) έχει καταγράψει 20.000 αρωματικά ή/και φαρμακευτικά φυτά σε όλο τον κόσμο, ενώ άλλοι έχουν εκτιμήσει ότι ο αριθμός των αρωματικών ή/και φαρμακευτικών φυτών (ΑΦΦ) κυμαίνεται μεταξύ 35.000 και 70.000 (Bhattarai and Karki 2004).

Η οικογένεια *Lamiaceae* έχει τα περισσότερα είδη αρωματικών ή/και φαρμακευτικών φυτών (Dalampira 2013). Το γένος *Salvia* L., είναι το μεγαλύτερο της οικογένειας *Lamiaceae*, αφού περιλαμβάνει παγκοσμίως περίπου 900 είδη

φυτών, πόες ή θάμνους (Dalampira 2013). Έχει σχεδόν κοσμοπολίτικη εξάπλωση με κέντρο εξάπλωσης την Νοτιοδυτική και Κεντρική Ασία.

Στην Ελλάδα, υπάρχουν 23 αυτοφυή είδη του γένους, από τα οποία τρία είναι ενδημικά της Ελλάδας (*Salvia eichleriana* Halácsy, *Salvia pomifera* L. subsp. *pomifera* και *Salvia teddii* Turritt) και τα περισσότερα αυτοφύονται σε βραχώδεις πλαγιές, σε βοσκότοπους (grasslands), καλλιεργημένες περιοχές ή παρόμοια ενδιαιτήματα αυτού του τύπου. Πολλά μη ευρωπαϊκά είδη καλλιεργούνται ως καλλωπιστικά φυτά (Dalampira 2013). Στην Ελλάδα, τα κύρια αρωματικά αυτοφυή φυτικά είδη *Salvia* L. είναι τα εξής: *Salvia fruticosa* Mill., *Salvia tomentosa* Mill., *Salvia pomifera* L. και *Salvia sclarea* L. (Dalampira 2013).

Σύμφωνα με το σύστημα APG III της ομάδας Angiosperm Phylogeny Group (APG), η συστηματική Ταξινόμηση του γένους *Salvia* είναι:

Βασίλειο (Kingdom): Φυτά (*Plantae*)

Φύλο ή Διαιρέση (Phylum): Σπερματόφυτα (*Seed plants*)

Κλάδος: *Lamiids* (Λαμίδια), *Euasterids I* (Ευ-αστερίδια I)

Τάξη (Order): *Lamiales*

Οικογένεια (Family): *Lamiaceae* (Χειλανθή, *Labiatae*, Mint Family)

Γένος (Genus): *Salvia*

1.8 Ιστορία του γένους *Salvia*



Η ονομασία του φυτού (*Salvia*) προέρχεται από το λατινικό ρήμα *salvare*, που σημαίνει σώζω και φανερώνει την ιατρική αξία του βοτάνου.

Η *Salvia fruticosa* πιθανόν να έχει χρησιμοποιηθεί από το 1400 π.Χ επειδή αναγνωρίζεται σε τοιχογραφία στο ανάκτορο της Κνωσού. Η ποικιλία αυτή, με τα χαρακτηριστικά αντίθετα τρίλοβα φύλλα απεικονίζεται σε κεραμικά που βρέθηκαν στην Ιβηρική Χερσόνησο, που χρονολογούνται το 400 π.Χ., περίοδο με έντονη την ελληνική επιρροή (Rivera et al., 1994).

Σύμφωνα με τον Desfontaines (1830), η ονομασία "elelisphakos" του Θεόφραστου (VI, 2, 5) αφορά την *S. fruticosa*, η οποία μπορεί να διακρίνονταν σε άγριες και καλλιεργούμενες μορφές (Rivera et al., 1994). Η ερμηνεία αυτή είναι εύλογη, δεδομένου ότι τα κοινά άγρια είδη στην Ελλάδα είναι τα *S. fruticosa*, και λαμβάνοντας υπόψη ότι η *S. officinalis* είναι εξαιρετικά σπάνια στα νότια της Αλβανίας και της Γιουγκοσλαβίας. Στα ελληνικά βότανα του Διοσκουρίδη οι χρήσεις της "elelisphakon" θα μπορούσαν πιθανότατα να ταιριάζουν με εκείνες ενός συμπλέγματος των ειδών που περιλαμβάνει τα *S. fruticosa*, *S. officinalis* L. και *S.*

pomifera L. Η ίδια ερμηνεία μπορεί να γίνει και από τα γραπτά των άλλων Ελλήνων συγγραφέων όπως ο Ιπποκράτης. Το φυτό αυτό δεν φαίνεται να έχει χρησιμοποιηθεί από τους Εβραίους κατά την αρχαιότητα, επειδή δεν αναφέρεται στην Αγία Γραφή και τα συναφή κείμενα. Ο Διοσκουρίδης επικαλέστηκε το αιγυπτιακό όνομα για *Sauge* "*apsi*," το οποίο πρέπει να είναι γραμμένο σωστά "*anusi*" σύμφωνα με τον Loret (1975). Αυτό το τελευταίο όνομα αναφέρεται συχνά στις αιγυπτιακές γραφές σχετικά με την ιατρική, αλλά είναι εξαιρετικά δύσκολο να διαπιστωθεί σε ποια είδη αντιστοιχεί.

Οι Ισπανοί και Μαροκινοί Άραβες βοτανολόγοι χρησιμοποιούν ονόματα όπως "*Salima*" ή "*asphacus*" για αρκετά είδη *Salvia*. Μεταξύ αυτών ήταν ένα με διαμερισμένα φύλλα, το οποίο θα μπορούσε να ήταν *S. fruticosa*, αλλά πιθανότατα είναι *S. interrupta*, ένα άγριο είδος στο Μαρόκο. Ο Διοσκουρίδης σε χειρόγραφο του στο Πανεπιστήμιο του Leiden προσκομίζει ένα αραβικό όνομα "*Ju'abah*" για το φασκόμηλο. Στο βιβλίο «Herbal of Rufinus» παρατίθεται ένα φυτό για παθήσεις της χοληδόχου κάτω από τα ονόματα «άγρια φασκομηλιά,"*Eupatorium*" και "*lilifagus*", το οποίο μπορεί να αντιστοιχεί στο *S. Fruticosa* (Rivera et al., 1994).

Το είδος αυτό απεικονίζεται με το τυπικό τρίλοβο φύλλο στο Hortus Sanitatis, Cube (1485), Κεφ. 347 με το όνομα του φασκόμηλου. Στην Laguna (1566) αναφέρεται ως φασκόμηλο, δηλώνοντας ότι ήταν γνωστό ως «ιερό βότανο», επειδή προκαλεί τη γονιμότητα στις γυναίκες. Το τρίλοβο φασκόμηλο καλλιεργείται στους βοτανικούς κήπους στο Βέλγιο κατά τη διάρκεια του δέκατου έκτου αιώνα και έφτασε εκεί πιο πιθανόν από την Ισπανία σύμφωνα με τον Wildeman (1950). Αυτή η εξαγωγή του συγκεκριμένου είδους το δέκατο έκτο αιώνα θα μπορούσε να εξηγηθεί με την επίκληση της ύπαρξης ενός δευτερογενούς κέντρου για την καλλιέργεια της *S. fruticosa* στην Ιβηρική Χερσόνησο, η προέλευση της οποίας θα πρέπει να αναχθεί σε ελληνικές και φοινικικές αποικίες το 400 π.Χ. Η *S. fruticosa* εισήχθη στη Βρετανία το 1596 σύμφωνα με τον John Claudius Loudon (1841) και ακολουθείται ένα χρόνο αργότερα από την *S. officinalis*.

Ο Parkinson (1629) ανέφερε το φυτό ως «μικρό φασκόμηλο» ή «φασκόμηλο vertue» και δήλωνε ότι το μικρό φασκόμηλο έχει μεγαλύτερη δύναμη. Ο Gerarde (1633) το ανέφερε ως «μικρότερο φασκόμηλο» ενώ παράλληλα ισχυριζόταν «αυτό που είναι το μικρότερο είναι το καλύτερο», όταν σύγκρινε τις ιδιότητες με τη *S.*

officinalis. Ο Miller (1754) που ανέφερε το είδος αυτό στη λίστα των τριών κυριότερων ειδών φασκόμηλου που καλλιεργούνταν για χρήση στην Αγγλία ενώ η *S. officinalis* ήταν σπάνια σε αυτή τη χώρα. Έλληνες σύγχρονοι των Sibthorp και Smith (1806) ονομάζουν το είδος αυτό ως "*phaskos*" ή "*alyphaskia*" παρά το γεγονός ότι έλαβε μια τοπική ονομασία "*phaskomelia*" στην Πελοπόννησο. Αυτό το είδος είναι γνωστό στην Murcia της Ισπανίας ως "*Salvia real*" ή "*Sabia real*" το βασιλικό φασκόμηλο ή η βασιλική σοφός. Στη Μαδέρα, τα φύλλα και οι βλαστοί της *S. fruticosa* πωλούνται με το όνομα "*Salva*" το ίδιο όνομα που δίνεται στο *S. officinalis* L.. Μεταξύ του αραβικού πληθυσμού του Ισραήλ αυτό το είδος είναι κοινώς γνωστό ως «Marami».

1.9 Τα κυριότερα είδη *Salvia* στην Ελλάδα

1.9.1 *Salvia fruticosa* L.

Το είδος *Salvia fruticosa* Mill. είναι θάμνος και ενδημικό φυτό της Ελλάδας και της Ανατολικής Μεσογείου (Karousou et al., 1998). Είναι το πιο εξαπλωμένο είδος του γένους *Salvia* στην Ελλάδα και συναντάται σε περιοχές μακκί και φρύγανα, έως 700 m. Έχει αρκετά συνώνυμα όπως *Salvia libanotica* Boiss and Gail., *Salvia lobryana* Aznav., *Salvia thomasii* Lacaita (Karousou et al., 1998). Είναι θάμνος με ύψος 30-80 εκ., αειθαλής, με ημιξυλώδεις βλαστούς. Φύλλα γκριζοπράσινα, λογχοειδή, χνουδωτά που στη βάση τους φέρουν δύο λοβούς, ένα από κάθε πλευρά ώστε το φύλλο να φαίνεται τρίλοβο (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. *Salvia fruticosa*

Άνθη λευκά έως ιώδη ή ρόδινα 2-6 ανά σπόνδυλο, σχηματίζουν βότρυ 10-15εκ. Ανθίζει από Απρίλιο μέχρι Ιούνιο ανάλογα με το υψόμετρο. Η ευρύτερη γεωγραφική του εξάπλωση είναι οι χώρες της Ανατολικής Μεσογείου.

1.9.2. *Salvia pomifera* L. (κρητικό φασκόμηλο)

Η *Salvia pomifera* συναντάται στην Δυτική και Κεντρική Κρήτη, Νότια Ελλάδα, και τις περιοχές Νοτίου Αιγαίου και σε δάση με πεύκα *Pinus brutia*, ασβεστούχα υποστρώματα, φαράγγια και βραχώδεις θέσεις (υψ. 200-1200 m).

Με βάση τις διαφορές των φύλλων διαχωρίζεται σε δύο διακριτά είδη, την *S. pomifera* L. και την *S. calycina*, αν και αρκετοί τα θεωρούν υποείδη της *S. pomifera* δηλαδή *Salvia subsp. pomifera* και *Salvia subsp. calycina*.

Τα δύο είδη διακρίνονται κυρίως από το σχήμα των φύλλων τους. Η *S. pomifera* έχει επιμήκη, κυματοειδή, σφηνοειδή φύλλα με στρογγυλεμένη βάση (Εικόνα 10) ενώ τα φύλλα της *S. calycina* είναι γενικά επιμήκη ωοειδή καρδιόσχημα στη βάση (Εικόνα 11).



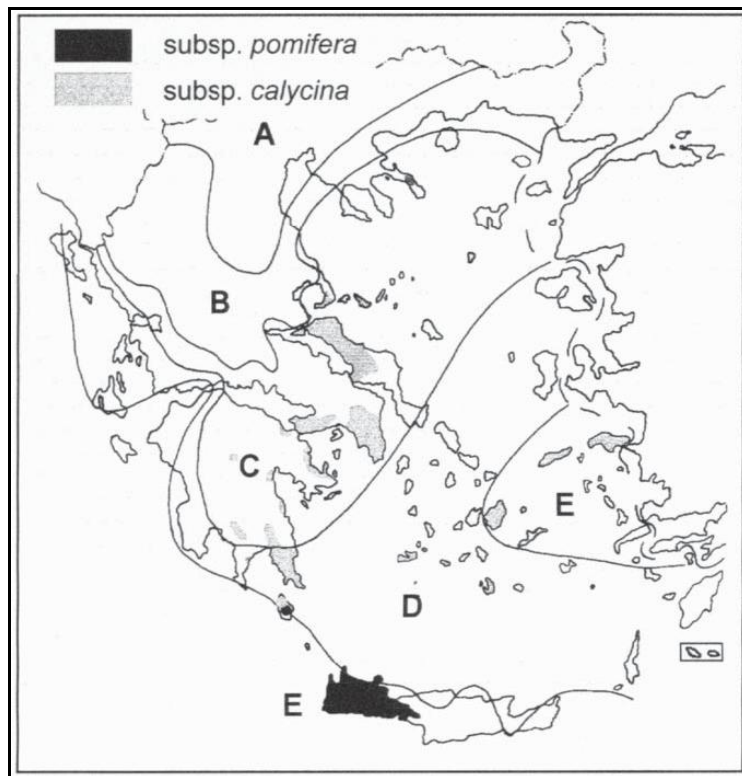
Εικόνα 10. *Salvia pomifera ssp pomifera*



Εικόνα 11. *Salvia calycina syn. Salvia pomifera ssp calycina*

Η *Salvia pomifera subsp. pomifera* είναι ένα ελληνικό ενδημικό και περιορίζεται στο μόνο στο δυτικό τμήμα του νησιού της Κρήτης και στο μικρό νησί των Κυθήρων (Εικόνα 12).

Η *Salvia pomifera subsp. calycina* έχει ευρύτερη διανομή και βρίσκεται στο ανατολικό και νότιο τμήμα της ελληνικής ηπειρωτικής χώρας, σε νησιά του Αιγαίου (Εικόνα 12) και στη Μικρά Ασία (Καρούσου, 1995).



Εικόνα 12. Κατανομή της *Salvia pomifera* στις πέντε κλιματικές ζώνες της Ελλάδα

1.9.3 *Salvia sclarea* L.

Το συγκεκριμένο είδος ενδημεί στα βόρεια της λεκάνης της Μεσογείου, στην κεντρική Ασία και σε λίγες εστίες στη Βόρεια Αφρική. Είναι φυτό διετές ή βραχύβιο πολυετές, ποώδες, ύψους σε ανθοφορία 1-1,2 μ. και πλάτους 60 εκ., έχει τετραγωνικούς βλαστούς, αντίθετα φύλλα και άνθη σε ψηλούς στάχτες κατά σπονδυλίσκους. Ο βλαστός στη βάση είναι χοντρός, τριχωτός, με μεγάλα έμισχα φύλλα μήκους έως και 30 εκ., ρυτιδωτά, οδοντωτά και καλυμμένα με αδενώδεις τρίχες, οι οποίες καλύπτουν ολόκληρο σχεδόν το υπόλοιπο φυτό (Εικόνα 13) (https://en.wikipedia.org/wiki/Salvia_sclarea).



Εικόνα 13. *Salvia sclarea*

1.9.4 *Salvia officinalis* L.

Η *Salvia officinalis* L περιορίζεται στο δυτικό τμήμα της Βαλκανικής χερσονήσου, δηλαδή σε Αλβανία, πρώην Γιουγκοσλαβία, Ελλάδα, όσο και στη βόρεια Ιταλία.

Επιπλέον, καλλιεργείται ως μαγειρικό βότανο ή ως διακοσμητικό φυτό, σε όλη την Ευρώπη.



Εικόνα 14. *Salvia officinalis*

Στην Ελλάδα, η *S. officinalis* βρίσκεται σε όλες τις περιοχές κυρίως σε ξηρούς και πετρώδεις τόπους.

Τα φύλλα του είναι επιμήκη και παχιά και έχουν χρώμα λευκοπράσινο. Τα άνθη του έχουν χρώμα ιώδες, φύονται κατά σπονδύλους και ανθίζουν από το Μάιο έως τον Ιούνιο (Εικόνα 14). Τα φύλλα είναι το κατεξοχήν χρησιμοποιούμενο τμήμα του φυτού και συλλέγονται λίγο πριν ή κατά την αρχή της ανθοφορίας. (Κατσιώτης και Χατζοπούλου, 2010).

1.10 Καλλιεργούμενες εκτάσεις και εμπορία Αρωματικών/Φαρμακευτικών Φυτών

Το μεγάλο παγκόσμιο ενδιαφέρον για τη συστηματική καλλιέργεια των Αρωματικών / Φαρμακευτικών Φυτών προκύπτει από το γεγονός ότι αυτά χρησιμοποιούνται στη σύγχρονη εποχή για την παραγωγή διαφόρων κατηγοριών καταναλωτικών προϊόντων (ανάλογα με τους περιορισμούς ή τις ανοχές των εθνικών νομοθεσιών, Commonwealth Secretariat 2001).

Τέτοια είναι τα

- ✓ Διατροφικά φαρμακευτικά προϊόντα (προϊόντα διατροφής που χρησιμοποιούν φαρμακευτικά εκχυλίσματα φυτικής και ζωικής προέλευσης)
- ✓ Διαιτητικά συμπληρώματα (προϊόντα κυρίως φυτικής προέλευσης που συνήθως συμπεριλαμβάνονται στις υγιεινές τροφές, ένα από τα πλέον προσοδοφόρα τμήματα της μη συνταγογραφούμενης φαρμακευτικής αγοράς)
- ✓ Λειτουργικά τρόφιμα (τρόφιμα και ποτά που η κατανάλωσή τους θεωρείται ότι δρα ευεργετικά στις λειτουργίες του σώματος και εκτός από επαρκή θρέψη, συμβάλλουν στην προαγωγή της υγείας και της ευεξίας καθώς και στην πρόληψη των ασθενειών)
- ✓ Βοτανικά φάρμακα (σκευάσματα που διατίθενται σε φαρμακεία των οικονομικά αναπτυγμένων χωρών στη μορφή της κάψουλας, του χαπιού ή του τονωτικού υγρού)

- ✓ Βοτανικά τσάγια και ροφήματα (δημοφιλή προϊόντα για τα οποία συνήθως δεν απαιτείται έγκριση εμπορικής κυκλοφορίας τους, εκτός από τις περιπτώσεις που επισημαίνονται φαρμακευτικές ιδιότητες)
- ✓ Φυτικά φάρμακα (φυτικής βάσης φαρμακευτικά προϊόντα με προσδιορισμένη χημική σύσταση και αποδεδειγμένες φαρμακευτικές ιδιότητες, που έχουν συνήθως υποστεί λεπτομερή τοξικολογικό και κλινικό έλεγχο και διατίθενται με συνταγή)
- ✓ Ομοιοπαθητικά φάρμακα (ειδικά παρασκευασμένα προϊόντα που έχουν φυτική, ορυκτή και ζωική προέλευση και χρησιμοποιούνται σε απόλυτα διαλυτές ποσότητες)
- ✓ Αρωματοθεραπευτικά έλαια (αιθέρια έλαια τα οποία χρησιμοποιούνται περισσότερο για θεραπευτικούς λόγους, παρά στη βιομηχανία της αρωματοποιίας). Επίσης, οι δευτερογενείς μεταβολίτες τους ως αιθέρια έλαια ή υδατικά εκχυλίσματα, μπορούν πλέον να χρησιμοποιηθούν αντί για τα φυτοφάρμακα και τα αντιβιοτικά συνθετικής προέλευσης με πολύ θετικές επιπτώσεις για την υγεία των καταναλωτών αλλά και την προστασία του περιβάλλοντος.

Η ελληνική χλωρίδα είναι πλουσιότατη σε είδη και περιλαμβάνει έναν ιδιαίτερα αξιόλογο αριθμό σπάνιων ειδών που εντοπίζονται μόνο στον ελλαδικό χώρο. Οι αυτόχθονοι φυτογενετικοί πόροι της Ελλάδας περιλαμβάνουν περισσότερα από 6.000 αυτοφυή taxa (φυτικά είδη και υποείδη), τα οποία αποτελούν σχεδόν το 50% των αυτοφυών φυτών ολόκληρης της Ευρώπης. Μεγάλο ποσοστό αυτών (περίπου 13-15%) είναι ενδημικά φυτά της Ελλάδας (δεν απαντούν πουθενά αλλού στον πλανήτη) και πολλά είναι σπάνια ή χαρακτηρίζονται ως απειλούμενα. Εμφανίζονται στη χώρα μας ως αυτοφυή είδη μερικά από τα πλέον εξαιρετικά μπαχαρικά, βότανα και αρωματικά φυτά στον κόσμο, όπως η ρίγανη, το θυμάρι, το θρούμπι, το γλυκάνισο, το μάραθο (μαραθόσπορος), το χαμομήλι, η δάφνη, το δυόσμο, το φλισκούνι, η λεβάντα, το μελισσόχορτο, η μέντα και το φασκόμηλο και τέλος τα μοναδικά και πολύ γνωστά προϊόντα κάποιων περιοχών της Ελλάδας όπως η μαστίχα της Χίου, ο κρόκος της Κοζάνης, το δίκταμο της Κρήτης και το τσάι του βουνού της Βρύναινας (Μαγνησίας).

Οι εξαγωγές στην Ευρώπη αγγίζουν τους 88.600 τόνους ετησίως και η Γερμανία κατέχει την πρώτη θέση στις εξαγωγές αρωματικών φυτών στην Ευρώπη (18%). Στην συνέχεια έρχονται Γαλλία και Βουλγαρία. Σημαντικές παραγωγικές χώρες στην ΕΕ όπου παραδοσιακά καλλιεργούνται Αρωματικά/Φαρμακευτικά Φυτά φυτά είναι η Γαλλία, η Βουλγαρία, η Ρουμανία, η Ιταλία και η Πολωνία. Η Ελλάδα θα μπορούσε να παράγει ανταγωνιστικά ή/και συμπληρωματικά με αυτές αυτοφυή Αρωματικά/Φαρμακευτικά Φυτά είδη σε εξαιρετική ποιότητα καθώς πλεονεκτεί σε σχέση με τις εδαφοκλιματικές συνθήκες και τη βιοποικιλότητα.

Ο κρόκος Κοζάνης, η μαστίχα της Χίου και το τσάι του βουνού της Βρύσαιννας είναι τα μόνα αρωματικά προϊόντα για τα οποία υπάρχει, εδώ και πολλά χρόνια καλά οργανωμένη παραγωγή, επεξεργασία, τυποποίηση και εμπορία από τους παραγωγούς στο πλαίσιο της δραστηριότητας του Συνεταιρισμού Κροκοπαραγωγών Κοζάνης, της Ένωσης Μαστιχοπαραγωγών Χίου και του Αγροτικού Συνεταιρισμού Βρύσαιννας.

Πρόσφατα, παρατηρήθηκε η ίδρυση νέων Αγροτικών Συνεταιρισμών (π.χ. Αιτωλοακαρνανία, Καρδίτσα, Κιλκίς) οι οποίοι άρχισαν να καλλιεργούν Αρωματικά/Φαρμακευτικά Φυτά όπως: δενδρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*), ρίγανη (*Origanum vulgare*), μέλισσα (*Melissa officinalis*), (*Hyssopus officinalis*), φασκόμηλο (*Salvia officinalis*), χαμομήλι (*Matricaria chamomilla*), στέβια (*Stevia rebaudiana*), εχινατσέα (*Echinacea purpurea*), (*Silybum marianum*), (*Trifolium pratense*), μέντα (*Mentha x piperita*), λεβάντα (*Lavandula angustifolia*), βασιλικός (*Ocimum basilicum*) (www.europam.net 2013).

Σύμφωνα με δεδομένα του Οργανισμού Πληρωμών και Ελέγχου Κοινοτικών Ενισχύσεων Προσανατολισμού και Εγγυήσεων (ΟΠΕΚΕΠΕ) για το έτος 2010, η έκταση της καλλιέργειας των Αρωματικών/Φαρμακευτικών Φυτών στην Ελλάδα υπολογίζεται στα 6.200 ha (Πίνακας 1) και τα φυτικά είδη ή «ποικιλίες» όπως αναφέρονται, με την μεγαλύτερη καλλιέργεια σε συνολική έκταση στην Ελλάδα να καταλαμβάνει η ρίγανη, ο γλυκάνισος, ο μάραθος, ο κρόκος και το τσάι του βουνού (ΟΠΕΚΕΠΕ 2010).

Πίνακας 1. Έκταση καλλιέργειας κάθε «ποικιλίας» ΑΦΦ στην Ελλάδα για το έτος 2010 (Οργανισμός Πληρωμών και Ελέγχου Κοινοτικών Ενισχύσεων Προσανατολισμού και Εγγυήσεων, ΟΠΕΚΕΠΕ 2010).

| <i>Ποικιλία</i> | <i>Έκταση (ha)</i> |
|------------------------|---------------------------|
| Ρίγανη | 2179,7 |
| Δασικά | 1474,6 |
| Γλυκάνισος | 974,2 |
| Μάραθος | 472,6 |
| Κρόκος | 370,4 |
| Λοιπά | 330,1 |
| Τσάι του βουνού | 232,8 |
| Λεβάντα | 70,9 |
| Φασκόμηλο | 47,3 |
| Θυμάρι | 25,7 |
| Μέντα | 17,6 |
| Κορίανδρος | 12,4 |
| Γλυκόριζα | 9,8 |
| Δενδρολίβανο | 9,0 |
| Βασιλικός | 3,8 |
| Δίκταμος | 2,9 |
| Μαντζουράνα | 2,2 |
| Ύσσωπος | 1,0 |
| Σάλβια Σκλαρέα | 0,1 |
| Σύνολο | 6237,1 17 |

Το μισό της έκτασης καλλιέργειας όλων των Αρωματικά/Φαρμακευτικά Φυτά στην Ελλάδα, βρίσκεται στην Κεντρική Μακεδονία και ακολουθούν η Στερεά Ελλάδα, η Δυτική Μακεδονία και η Θεσσαλία (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Έκταση καλλιέργειας ΑΦΦ σε κάθε περιφέρεια της Ελλάδας για το έτος 2010 (Οργανισμός Πληρωμών και Ελέγχου Κοινοτικών Ενισχύσεων Προσανατολισμού και Εγγυήσεων, ΟΠΕΚΕΠΕ 2010).

| Περιφέρεια | Έκταση (ha) |
|---------------------------------|-------------|
| Κεντρικής Μακεδονίας | 3689 |
| Στερεά Ελλάδα | 735 |
| Δυτικής Μακεδονίας | 680 |
| Θεσσαλίας | 592 |
| Κρήτης | 171 |
| Ανατολική Μακεδονίας και Θράκης | 159 |
| Πελοποννήσου | 76 |
| Δυτικής Ελλάδας | 74 |
| Αιγαίου | 39 |
| Νοτίου Αιγαίου | 13 |
| Ιονίων | 5 |
| Αττικής | 3 |
| Ηπείρου | 2 |
| Σύνολο | 6.237 |

Η καλλιέργεια φασκόμηλου το 2010 (Πίνακας 3) ήταν 47 ha (χωρίς να αναφέρεται το φυτικό είδος το οποίο καλλιεργούταν) και έγινε κυρίως στην Ανατολική Μακεδονία, στην Κρήτη και στο Νότιο Αιγαίο (ΟΠΕΚΕΠΕ 2010).

Πίνακας 3. Έκταση καλλιέργειας φασκόμηλου στην Ελλάδα ανά περιφέρεια (Οργανισμός Πληρωμών και Ελέγχου Κοινοτικών Ενισχύσεων Προσανατολισμού και Εγγυήσεων, ΟΠΕΚΕΠΕ 2010).

| Περιφέρεια | Έκταση (ha) |
|-----------------------|-------------|
| Ανατολικής Μακεδονίας | 12,52 |
| Κρήτης | 11,96 |
| Νοτίου Αιγαίου | 10,00 |
| Δυτικής Μακεδονίας | 7,24 |
| Δυτικής Ελλάδας | 2,42 |
| Θεσσαλία | 1,26 |
| Βορείου Αιγαίου | 0,80 |
| Στερεάς Ελλάδας | 0,60 |
| Πελοποννήσου | 0,28 |
| Κεντρικής Μακεδονίας | 0,20 |
| Σύνολο | 47,28 |

Μερικά είδη *Salvia* (π.χ. *Salvia fruticosa* Mill., *Salvia sclarea* L., *Salvia officinalis* L., *Salvia pomifera* subsp. *pomifera*, *Salvia lavandulaefolia* Vahl., *Salvia verbenaca* L. είναι οικονομικώς σημαντικά, ενώ άλλα (π.χ. *Salvia tomentosa* Mill.) έχουν πιθανότητες εξέλιξης στην αγορά (Μαλούπα κ.α. 2012)

Όλες οι προσπάθειες των τελευταίων ετών έδειξαν ότι τα Αρωματικά/Φαρμακευτικά Φυτά μπορούν να αποτελέσουν τις νέες δυναμικές και πολλά υποσχόμενες εναλλακτικές καλλιέργειες. Προϋπόθεση σ' αυτό ήταν και παραμένει η πολύ καλή οργάνωση και γνώση των τεχνικών από την καλλιέργεια μέχρι τη μεταποίηση και εμπορία των επώνυμων προϊόντων από τους ίδιους τους παραγωγούς. Η ανάπτυξη του κλάδου των Αρωματικά/Φαρμακευτικά Φυτά στην Ελλάδα μεταξύ άλλων, θα πρέπει να στοχεύσει σε δράσεις που θα αφορούν στη διαμόρφωση ενός συστήματος πιστοποίησης της παραγωγής, καθορισμό των ποιοτικών εμπορικών προδιαγραφών και παραγωγή και πιστοποίηση του πολλαπλασιαστικού υλικού.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να αξιολογηθεί το κατά πόσο η ανάλυση της πρωτοταγούς και δευτεροταγούς δομής της περιοχής ITS1 και ITS2 είναι επαρκές εργαλείο για τη διάκριση των ειδών του γένους *Salvia*.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Φυτικό υλικό

Το υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την παρούσα μελέτη ήταν φυτά του γένους *Salvia*, τα οποία συλλέχθηκαν:

- *S. fruticosa F* από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο και ταυτοποιήθηκε από την καθηγήτρια Οικονόμου Φάλια.
- *S. fruticosa K* από το φυτώριο «Φύση» Βλαχούλης Δημήτρης, Αγ. Παρασκευής 114, Χαλάνδρι.
- *S. hispanica* από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο και ταυτοποιήθηκε από τον καθηγητή Μπιλάλη Δημήτρη.
- *S. officinalis H* από τον Βοτανικό Κήπο Ιουλίας & Αλεξάνδρου Ν. Διομήδους, Χαϊδάρι Αττικής και ταυτοποιήθηκαν από την Δρ. Βαλλιανάτου Ειρήνη.
- *S. officinalis* από το φυτώριο «Φύση» Βλαχούλης Δημήτρης, Αγ. Παρασκευής 114, Χαλάνδρι.
- *S. calycina* από τον Βοτανικό Κήπο Ιουλίας & Αλεξάνδρου Ν. Διομήδους, Χαϊδάρι Αττικής και ταυτοποιήθηκαν από την Δρ. Βαλλιανάτου Ειρήνη.
- *S. aethiopsis* από το φυτώριο «Φύση» Βλαχούλης Δημήτρης, Αγ. Παρασκευής 114, Χαλάνδρι.
- *S. pomifera* από τον Βοτανικό Κήπο Ιουλίας & Αλεξάνδρου Ν. Διομήδους, Χαϊδάρι Αττικής και ταυτοποιήθηκαν από την Δρ. Βαλλιανάτου Ειρήνη.

Τέσσερα με πέντε νεαρά φύλλα, φυλάχθηκαν στο εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του ΓΠΑ στους -80°C.

3.2 Μοριακή ανάλυση

3.2.1 Απομόνωση ολικού DNA από το φυτικό ιστό.

- ✓ Νεαρά φύλλα 100 με 150 mg τοποθετούνται στο γουδί, προστίθεται υγρό

άζωτο και ομογενοποιούνται. Ο ιστός μεταφέρεται σε erpendorf των 2 ml.

- ✓ Προετοιμασία του CTAB¹ (προθέρμανση στους 65°C).
- ✓ Προστίθεται σε κάθε δείγμα 500μl CTAB¹.
- ✓ Επώαση στους 65°C για 30 λεπτά.
- ✓ Στη συνέχεια προστίθεται 500 μl seveg² (χλωροφόρμιο) και πραγματοποιείται ισχυρή ανάδευση.
- ✓ Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 6 λεπτά στις 12.800 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- ✓ Μεταφέρεται το υπερκείμενο σε νέο erpendorf και μετράται ο όγκος του.
- ✓ Ακολούθως, ο ίσος όγκος seveg² (χλωροφόρμιο) με τον όγκο του υπερκειμένου του δείγματος.
- ✓ Επαναλαμβάνεται φυγοκέντρηση για 4 λεπτά στις 13.000 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- ✓ Μεταφέρεται η υπερκείμενη υδατική φάση σε νέο erpendorf και μετράται ο όγκος της.
- ✓ Προστίθεται 0,7 φορές του όγκου του υπερκειμένου 100% ισοπροπανόλη και γίνεται ήπια ανάδευση με το χέρι.
- ✓ Τα erpendorf αφήνονται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- ✓ Στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται για 15 λεπτά στις 12.800 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου για να γίνει κατακρήμνιση του DNA και να δημιουργηθεί ίζημα.
- ✓ Απομακρύνεται το υπερκείμενο αφήνοντας μόνο το ίζημα και προστίθονται 230 μl 70% EtOH (αιθανόλη).
- ✓ Τα δείγματα με την αιθανόλη φυγοκεντρώνονται για 8 λεπτά στις 12.800 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- ✓ Απομακρύνεται η αιθανόλη και στεγνώνει καλά το ίζημα στον επωαστικό θάλαμο στους 37°C για 30 με 40 λεπτά.
- ✓ Επαναδιαλύεται το ίζημα σε 40 με 50 μl PE και τοποθετείται στους 60°C.
- ✓ Προσδιορίζεται η συγκέντρωση και η καθαρότητα των νουκλεϊκών οξέων με την χρήση του σπεκτροφωτομέτρου (nanodrop).
- ✓ Φύλαξη των δειγμάτων στους -20°C.

3.2.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain reaction, PCR)

3.2.2.1 Αρχή της μεθόδου

Η Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια *in vitro* μέθοδος που επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA σε πολλά αντίγραφα σε σύντομο χρόνο. Η τεχνική αυτή (Mullis *et al.*, 1986) αποτελεί την πλέον εξειδικευμένη και ευαίσθητη μέθοδο ενίσχυσης αλληλουχιών DNA και RNA, *in vitro* ή και *in situ*.

Η διαδικασία της PCR χωρίζεται σε τρεις φάσεις:

- **Εκθετική (exponential) φάση:** Είναι η φάση κατά την οποία έχει αρχίσει ο πολλαπλασιασμός της προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA. Σ' αυτή την φάση η αντίδραση είναι πολύ αποτελεσματική και σε κάθε κύκλο διπλασιάζεται η προεπιλεγμένη αλληλουχία DNA .
- **Γραμμική (linear) φάση:** Η φάση στην οποία παρατηρείται μειωμένη παραγωγή αντιγράφων της αλληλουχίας DNA εξαιτίας της μείωσης της ενεργότητας των αντιδραστηρίων.
- **Φάση Plateau:** Στη φάση αυτή έχει σταματήσει η αντίδραση PCR καθώς και η παραγωγή νέων αντιγράφων εξαιτίας της εξάντλησης των αντιδραστηρίων

3.2.2.2 Ενίσχυση τμήματος DNA μέσω της τεχνικής PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση τμημάτων DNA απευθείας από το DNA των υπό μελέτη φυτικών ιστών με τη χρήση ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών.

Οι ακριβείς συνθήκες πραγματοποίησης μιας τυπικής αντίδρασης PCR εξαρτώνται από τις απαιτήσεις του εκάστοτε πειράματος. Η ποσότητα της μήτρας DNA, που προστίθεται κάθε φορά, εξαρτάται από την πηγή προέλευσής του.

Συγκεκριμένα, στην περίπτωση γονιδιωματικού DNA χρησιμοποιείται ποσότητα 30-50 ng. Επίσης, η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών εξαρτάται κάθε φορά από τη θερμοκρασία τήξεώς τους (T_m).

Μια τυπική αντίδραση PCR πραγματοποιείται ως εξής:

1. Σε ειδικό σωλήνα erpendorf προστίθενται τα αντιδραστήρια του πίνακα 4.

| Αντιδραστήρια | Όγκος ανά αντίδραση (μl) |
|---|--------------------------|
| ➤ Γονιδιωματικό DNA | 1 μl |
| ➤ Εκκινητής ευθείας κατεύθυνσης (Forward) (10 μM) | 1 μl |
| ➤ Εκκινητής αντίστροφης κατεύθυνσης (Reverse) (10 μM) | 1 μl |
| ➤ Μίγμα dNTPs (10mM) | 1 μl |
| ➤ PCR ρυθμιστικό διάλυμα | 5 μl |
| ➤ DMSO | 2 μl |
| ➤ Taq DNA πολυμεράση (1unit/μl) | 0.5 μl |
| ➤ ddH ₂ O | έως τελικό όγκο 50 μl |

Πίνακας 4. Αντιδραστήρια μιας τυπικής αντίδρασης PCR

2.Γενικά, οι συνθήκες πραγματοποίησης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης είναι:

| Στάδιο | Γονίδιο | |
|------------------------|----------------------------------|------------------|
| • Αρχική αποδιάταξη | 94 ^o C για 2-4 λεπτά | } για 35 κύκλους |
| • Αποδιάταξη | 94 ^o C για 1 λεπτό | |
| • Υβριδισμός εκκινητών | 45-65 ^o C για 1 λεπτό | |
| • Επιμήκυνση | 72 ^o C για 1 λεπτό | |
| • Τελική επιμήκυνση | 72 ^o C για 5-10 λεπτά | |

Το πρόγραμμα το οποίο χρησιμοποιείται για την PCR προγραμματίζεται στη

συσκευή του ειδικού θερμικού κυκλοποιητή.

3.2.2.3 Ενίσχυση τμήματος της περιοχής ITS

Η περιοχή του ITS ήταν μεγέθους περίπου 700 βάσεων και ενισχύθηκε με την χρήση της τεχνικής PCR. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση με PCR του τμήματος ITS είναι οι ακόλουθοι:

- Forward: ITS-F: 5'- AAGGTTTCCGTAGGTGAAC-3'
- Reverse: ITS-R: 5'- GCATATCAATAAGCGGAGGA-3'

Για την ενίσχυση της περιοχής ITS, χρησιμοποιούνται τα παρακάτω αντιδραστήρια (Πίνακας 5) και οι συνθήκες πραγματοποίησης της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης ήταν οι παρακάτω:

| Στάδιο | ITS | |
|------------------------|--------------------------|------------------|
| ✓ Αρχική αποδιάταξη | 94°C για 3:30 λεπτά | } για 35 κύκλους |
| ✓ Αποδιάταξη | 94°C για 50 δευτερόλεπτα | |
| ✓ Υβριδισμός εκκινητών | 50°C για 50 δευτερόλεπτα | |
| ✓ Επιμήκυνση | 72°C για 50 δευτερόλεπτα | |
| ✓ Τελική επιμήκυνση | 72°C για 8 λεπτά | |

| Αντιδραστήρια | Όγκος ανά αντίδραση (μl) |
|---|--------------------------|
| • Γονιδιωματικό DNA | • 2 μl |
| • Εκκινητής ευθείας κατεύθυνσης (Forward) (10 μM) | • 0.5 μl |
| • Εκκινητής αντίστροφης κατεύθυνσης (Reverse) (10 μM) | • 0.5 μl |
| • Μίγμα dNTPs (10mM) | • 1 μl |
| • PCR ρυθμιστικό διάλυμα | • 6 μl |
| • DMSO | • 1μl |
| • Taq DNA πολυμεράση (1unit/μl) | • 0.3μl |
| • ddH ₂ O | • έως τελικό όγκο 30 μl |

Πίνακας 5. Αντιδραστήρια για την πραγματοποίηση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης.

3.2.3 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτή αγαρόζης

Ο διαχωρισμός των δεοξυριβονουκλεϊνικών οξέων γίνεται με βάση το μέγεθος και τη διαμόρφωσή τους με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Το εύρος των μεγεθών που μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτή αγαρόζης εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης και κυμαίνεται από 0,1 έως 100Kb. Στον πίνακα 6 αναφέρονται οι τυπικές συγκεντρώσεις αγαρόζης σε σχέση με το επιθυμητό εύρος διαχωρισμού.

| Αγαρόζη (%) | Εύρος διαχωρισμού γραμμικών μορίων DNA (kb) |
|-------------|---|
| 0.3 | 1.0-70 |
| 0.5 | 0.7-45 |
| 0.8 | 0.4-20 |
| 1 | 0.3-10 |
| 1.2 | 0.2-8 |
| 1.5 | 0.2-6 |
| 2.0 | 0.1-5 |

Πίνακας 6. Συγκέντρωση πηκτής αγαρόζης ανάλογα με το επιθυμητό εύρος διαχωρισμού.

Τα μόρια DNA γίνονται ορατά με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός. Η προετοιμασία της πηκτής αγαρόζης πραγματοποιείται με την ακόλουθη διαδικασία:

- Ποσότητα αγαρόζης αναμειγνύεται σε κωνική φυάλη Erlenmeyer, με ορισμένο όγκο διαλύματος ηλεκτροφόρησης 1xTAE⁷. Η συγκέντρωση της πηκτής αγαρόζης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ανάλογη του μεγέθους των γραμμικών μορίων που ηλεκτροφορούνταν κάθε φορά.
- Ακολουθεί σταδιακή θέρμανση του μίγματος σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι η αγαρόζη να διαλυθεί εντελώς.
- Η θερμοκρασία του διαλύματος αφήνεται να πέσει έως τους 60°C και

αφού προστεθεί διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (10 mg/ml) τελικής συγκέντρωσης 0,5 μg/ml, αφήνεται να στερεοποιηθεί σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης, σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συσκευή προσαρμόζεται η κατάλληλη "χτένα" έτσι ώστε να σχηματιστούν στην πηκτή τα βοηθία φόρτωσης ("πηγαδάκια").

- Αφού η πηκτή έχει σταθεροποιηθεί απομακρύνεται από αυτήν η «χτένα». Η συσκευή ηλεκτροφόρησης συμπληρώνεται με διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE⁷ έτσι ώστε η πηκτή να παραμένει βυθισμένη 1-2mm από την επιφάνειά της.
- Τα δείγματα των νουκλεϊνικών οξέων, αφού αναμιχθούν σε ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης⁷, τοποθετούνται στα βοηθία φόρτωσης ("πηγαδάκια") της πηκτής.
- Τέλος τα δείγματα αναλύονται σε ηλεκτρικό πεδίο με κατάλληλη τάση που εφαρμόζεται στα άκρα της πηκτής, η οποία δεν υπερβαίνει τα 60 Vcm⁻¹.

3.2.4 Ανάκτηση κλάσματος DNA από πηκτή αγαρόζης

Για την ανάκτηση κλάσματος DNA από πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε το κατάλληλο πρωτόκολλο της NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up:

- Έπειτα από το πέρας της ηλεκτροφόρησης, απομονώνεται από την πηκτή αγαρόζης με τη χρήση καθαρού νυστεριού, το τμήμα εκείνο το οποίο περιέχει την επιθυμητή ζώνη DNA. Εν συνεχεία τοποθετείται σε σωλήνα τύπου erpendorf, ζυγίζεται και προστίθενται διπλάσιος όγκος ρυθμιστικού διαλύματος NT (για παράδειγμα για 65mg πηκτής αγαρόζης απαιτούνται 130 μl διαλύματος NT).
- Ακολουθεί επώαση στους 50°C για περίπου 10 λεπτά, έως ότου διαλυθεί η αγαρόζη. Για να διαλυθεί πλήρως, αναδεύουμε ήπια το δείγμα κάθε 2 λεπτά, καθ'όλη τη διάρκεια της επώασης. Εάν χρειαστεί παρατείνεται ο χρόνος

επώασης.

- Το διάλυμα τοποθετείται στη στήλη και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12.600 στροφές/λεπτό για 30 δευτερόλεπτα. Το DNA προσδένεται στην στήλη.
- Η στήλη ξεπλένεται με προσθήκη 700 μl διαλύματος NT3. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 30 δευτερόλεπτα.
- Η διαδικασία της φυγοκέντρησης επαναλαμβάνεται στις 13.000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό, ώστε να απομακρυνθεί τελείως το διάλυμα NT3 καθώς περιέχει αιθανόλη, η οποία αν παραμείνει μπορεί να παρεμποδίσει περαιτέρω ενζυμικές αντιδράσεις.
- Η στήλη τοποθετείται σε νέο σωλήνα τύπου erpendorf και το DNA εκλούεται με την προσθήκη 30 μl διαλύματος NE (5 mM Tris/HCl, pH 8.5).
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση της στήλης στις 13.000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό.
- Το δείγμα φυλάσσεται στους -20°C .

3.2.5 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων

Ο προσδιορισμός τόσο της συγκέντρωσης όσο και της καθαρότητας των νουκλεϊνικών οξέων σε υδατικό διάλυμα, πραγματοποιείται με τη χρήση φασματοφωτομέτρου (NanoDrop® ND1000 Spectrophotometer). Πριν από τη μέτρηση επιλέγεται στο λογισμικό της συσκευής από το χειριστή η ένδειξη DNA.

Η χρήση του μηχανήματος έχει ως εξής:

- ✓ Αρχικά για το μηδενισμό του οργάνου μεταφέρεται 1 μl (ddH₂O ή άλλο διαλύτη) στην υποδοχή της συσκευής.
- ✓ Στη συνέχεια 1 μl από το δείγμα μεταφέρεται στην υποδοχή της συσκευής και λαμβάνονται οι λόγοι OD₂₆₀/OD₂₈₀ και OD₂₆₀/OD₂₃₀ βάσει των οποίων γίνεται η εκτίμηση της καθαρότητας των δειγμάτων των νουκλεϊνικών οξέων.

- ✓ Για να θεωρείται ένα δείγμα νουκλεϊνικών οξέων καθαρό, ο δείκτης OD_{260}/OD_{280} πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 1.8-2.0.
- ✓ Ο λόγος OD_{260}/OD_{230} αποτελεί ένα δεύτερο μέτρο της καθαρότητας των νουκλεϊνικών οξέων. Σε δείγματα υψηλής καθαρότητας ο συγκεκριμένος λόγος κυμαίνεται μεταξύ 1,8 και 2,2. Μικρότερες τιμές αποτελούν συνήθως ένδειξη μόλυνσης.

3.2.6 Υποκλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακό φορέα

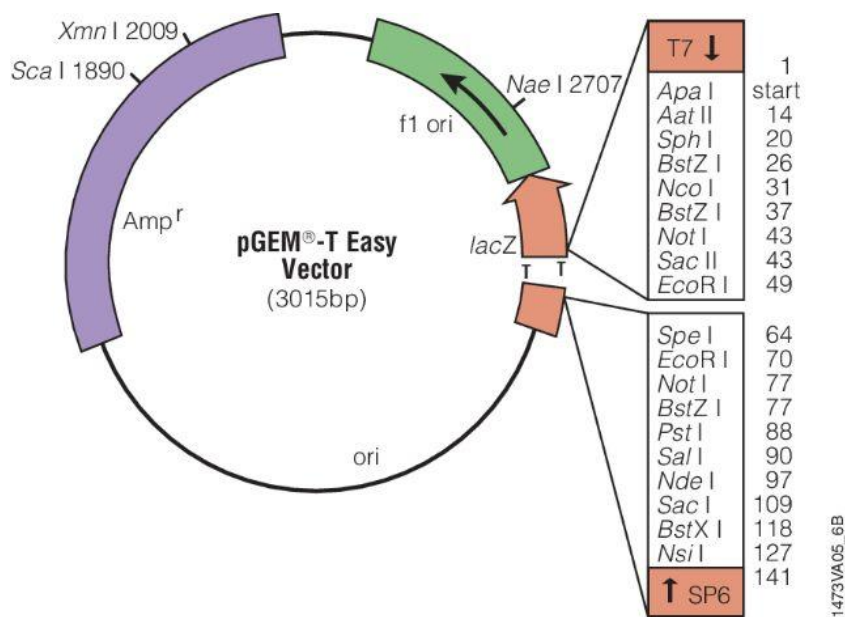
3.2.6.1 Χαρακτηριστικά πλασμιδιακού φορέα

Για την αλληλούχιση ενισχυμένων με PCR τμημάτων DNA χρησιμοποιείται ο πλασμιδιακός φορέας της εταιρείας Promega με την ονομασία pGEM-T Easy Vector. Ο φορέας αυτός είναι μεγέθους 3.015bp (Εικόνα 15). Σκοπός της χρήσης του, είναι η υποκλωνοποίηση των τμημάτων DNA, προκειμένου να καταστεί ευκολότερος ο χειρισμός τους και να επιτραπεί ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων τους και γενικότερα ο χαρακτηρισμός τους.

Τα κυριότερα χαρακτηριστικά του φορέα είναι τα εξής: οι πλασμιδιακοί φορείς pGEM-T easy διαθέτουν μια αρχή αντιγραφής (*ori*), τμήμα του γονιδίου *lacZ* της *E.coli*, που κωδικοποιεί για το α -πεπτίδιο του ενζύμου β -γαλακτοσιδάση. Επιπλέον, φέρουν μια πολλαπλή θέση κλωνοποίησης (πολυσύνδεσμος) εντός του γονιδίου *lacZ* καθώς και τους προαγωγείς της RNA πολυμεράσης, T7 και SP6, οι οποίοι βρίσκονται εκατέρωθεν του πολυσυνδέσμου (Εικόνα 15).

Το τμήμα του γονιδίου της β -γαλακτοσιδάσης βρίσκεται υπό τον μεταγραφικό έλεγχο των παραπάνω προαγωγέων ενώ η μεταγραφή μπορεί και επάγεται παρουσία του χημικού ανάλογου της λακτόζης IPTG¹⁰ (ισοπροπυλοθειογαλακτοσίδιο). Η β -γαλακτοσιδάση μεταβολίζει την οργανική ένωση $X-gal$ ¹¹, παράγοντας μια αδρανή μπλε ουσία. Η ένθεση ξένου DNA στην περιοχή του πολυσυνδέσμου, ωστόσο, διακόπτει τη μεταγραφή του γονιδίου

lacZ με αποτέλεσμα την αδυναμία μεταβολισμού της X-gal¹¹ και, κατά συνέπεια, την απουσία ανάπτυξης μπλε χρώματος στις βακτηριακές καλλιέργειες. Το γεγονός αυτό επιτρέπει τον εντοπισμό των ανασυνδιασμένων κλώνων με βάση το χρώμα των αποικιών όταν σε αυτές προστεθεί X-gal¹¹ και IPTG¹⁰. Ο φορέας φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, γεγονός το οποίο επιτρέπει την επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων.



Εικόνα 15. Χάρτης πλασμιδιακού φορέα PGEM-T easy (Promega).

3.2.6.2 Ενσωμάτωση τμημάτων DNA με τυφλά άκρα στον πλασμιδιακό φορέα (ligation)

Τα προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης φέρουν κολλώδη άκρα, οπότε για την κλωνοποίησή τους χρησιμοποιείται ο πλασμιδιακός φορέας pGEM-T Easy (Promega).

Στην αντίδραση ενσωμάτωσης (ligation), για τη μεγιστοποίηση της πιθανότητας δημιουργίας ανασυνδυασμένων πλασμιδίων, η αναλογία των μορίων του πλασμιδιακού φορέα και του προς ένθεση τμήματος DNA ρυθμίζεται στο 1:3. Η αραίωση τόσο του φορέα όσο και του ένθετου DNA γίνεται με τρόπο ώστε να

διευκολύνεται η επίτευξη της απαιτούμενης αναλογίας. Η αντίδραση ενσωμάτωσης πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 10 μl και φαίνεται στον πίνακα 7.

| Αντιδραστήρια | Όγκος ανά αντίδραση (μl) |
|--|--------------------------|
| ✓ 2x ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης | 5 |
| ✓ DNA πλασμιδιακός φορέας | 0.5 |
| ✓ Ένζυμο λιγάση T4 (1 unit/μl) | 0.5 |
| ✓ DNA ένθεσης | 1 |
| ✓ ddH ₂ O (έως τελικό όγκο 10 μl) | 3 |
| ✓ ΣΥΝΟΛΟ | 10 |

Πίνακας 7. Αντιδραστήρια για την πραγματοποίηση της αντίδρασης ενσωμάτωσης DNA στον πλασμιδιακό φορέα.

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου για 16 ώρες.

3.2.7 Μετασηματισμός ικανών κυττάρων *E. coli* με πλασμίδια

3.2.7.1 Υγρές και στερεές καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων *E. coli*

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *E. coli* XL-Blue, το οποίο καλλιεργήθηκε σε υγρό ή στερεό θρεπτικό μέσο LB¹², παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού (παραρτήματα). Η ανάπτυξη του πραγματοποιήθηκε κατόπιν επώασης στους 37°C για 16h. Στην περίπτωση υγρής καλλιέργειας, η επώαση τελούνταν υπό ανάδευση.

3.2.7.2 Προετοιμασία βακτηριακών κυττάρων *E. coli* ικανών για μετασχηματισμό (Competent cells)

Περιγραφή της προετοιμασίας βακτηριακών κυττάρων *E. coli* ικανών για μετασχηματισμό (Competent cells):

- Εμβολιασμός 10 ml LB¹² με βακτηριολογικό κρίκο από στοκ γλυκερόλης *E. coli* (XL-Blue) και επώαση υπό ανάδευση, για περίπου 18 ώρες στους 37°C.
- 2 ml της παραπάνω καλλιέργειας χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό 200 ml αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού LB¹². Ακολουθεί επώαση, υπό συνεχή ανάδευση, στους 37°C για 2 h. Η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας να κυμαίνεται από 0.3-0,4 (O.D.₆₀₀=0,3-0,4).
- Επώαση στον πάγο για 5 λεπτά και φυγοκέντρηση στις 4.200 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά στους 4 °C.
- Τοποθέτηση στον πάγο και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 50 ml CaCl₂ 80mM.
- Επώαση στον πάγο για 45 λεπτά και φυγοκέντρηση στις 4.200 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά στους 4 °C.
- Επαναιώρηση του ιζήματος σε 5 ml CaCl₂ 80mM.
- Επώαση στον πάγο για 45 λεπτά και προσθήκη 15% γλυκερόλης (900 μl γλυκερόλης στα 5 ml κυττάρων).
- Τα κύτταρα αφού τοποθετηθούν σε σωλήνες τύπου erpendorf φυλάσσονται στους -80°C.

3.2.7.3 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* με πλασμίδιο

Περιγραφή διαδικασίας του μετασχηματισμού των δεκτικών κυττάρων *E. coli* με πλασμίδιο:

- Σε σωλήνα τύπου errendorf μεταφέρονται, μέσα σε πάγο, 60-80μl, δεκτικά για μετασηματισμό κύτταρα *Escherichia coli*.
- Προστίθενται 10-100 ηg πλασμιδιακού DNA (αφού τα κύτταρα ξεπαγώσουν), σε όγκο ο οποίος δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1/10 του όγκου των προς μετασηματισμό κυττάρων.
- Το μίγμα κυττάρων-πλασμιδιακού DNA επωάζεται στον πάγο για περίπου 10 λεπτά.
- Η είσοδος του πλασμιδίου στα κύτταρα επιτυγχάνεται με την υποβολή τους σε θερμικό σοκ στους 42°C για ένα 1-2 λεπτά και την απ'ευθείας μεταφορά τους στη συνέχεια στον πάγο.
- Προστίθενται 200 μl LB¹² θρεπτικού διαλύματος και τα δείγματα επωάζονται στους 37 °C για 1 ώρα.
- Τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό με το κατάλληλο αντιβιοτικό για την επιλογή των μετασηματισμένων κυττάρων. Για τον πλασμιδιακό φορέα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία (pGEM-T Easy) χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία με θρεπτικό υλικό LB¹² και αμπικιλίνη.
- Στην περίπτωση που επιθυμείται η επιλογή αποικιών που φέρουν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, προστίθενται στα κύτταρα 10 μl IPTG¹⁰ 100 mM και 50 μl X-Gal¹¹ 2% (w/v). Οι αποικίες που φέρουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, λόγω της διακοπής του γονιδίου που κωδικοποιεί για τη β-γαλακτοζιδάση από το ένθεμα, εμφανίζονται λευκές. Αντίθετα, οι αποικίες με μη ανασυνδυασμένα πλασμίδια, λόγω της δράσης του ενζύμου, εμφανίζουν μπλε χρώμα.
- Τα κύτταρα επωάζονται στους 37°C για 18 h.

3.2.8 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασηματισμένα κύτταρα *E.coli*

Στην παρούσα μελέτη η απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασηματισμένα κύτταρα *E.coli* πραγματοποιήθηκε με δύο μεθόδους: Η πρώτη μέθοδος (Boiling preparation) ακολουθείται κυρίως για επιβεβαίωση της ενσωμάτωσης του insert

στο πλασμίδιο, ενώ η δεύτερη (Qia Prep) για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA και τον καθαρισμό αυτού, με σκοπό να σταλεί προς αλληλούχιση, για εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του προς μελέτη γονιδίου.

3.2.8.1 Μέθοδος βρασμού (Boiling Preparation), (Holmes & Quigley, 1981)

Περιγραφή διαδικασίας της μεθόδου βρασμού:

- 6 ml θρεπτικού υλικού LB¹², που περιέχουν το αντιβιοτικό αμπικιλίνη, εμβολιάζονται με μία μεμονωμένη αποικία κυττάρων *E.coli*, τα οποία έχουν μετασηματισθεί με το προς απομόνωση πλασμίδιο. Ακολουθεί επώαση, υπό συνεχή ανάδευση στους 37 °C για περίπου 16 ώρες.
- Από την παραπάνω καλλιέργεια μεταφέρονται 2 x 750 μl σε σωλήνα erpendorf και φυγοκεντρώνται στις 13.000 στροφές/λεπτό για 3 λεπτά.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται σχολαστικά αφήνοντας το ίζημα των κυττάρων όσο το δυνατόν στεγνό.
- Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε 150μl διαλύματος STET⁴ παρουσία λυσοζύμης⁵ (Sigma) σε τελική συγκέντρωση 0,5 mg/ml.
- Ακολουθεί βρασμός του δείγματος για 45 δευτερόλεπτα και μετά φυγοκέντρησή του στις 13.000 στροφές/λεπτό για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μετά τη φυγοκέντρωση, το ίζημα που αποτελείται από τα κυτταρικά υπολείμματα απομακρύνεται με τη βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας. Για την κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA προστίθενται στο υπερκείμενο 180 μl ισοπροπανόλης και ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 6 λεπτά.
- Αφού το ίζημα στεγνώσει στον αέρα ώστε να εξατμιστεί πλήρως η ισοπροπανόλη, η οποία αν παραμείνει μπορεί να παρεμποδίσει περαιτέρω ενζυμικές αντιδράσεις, επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο (ρυθμιστικού διαλύματος BE³ή) ddH₂O.

- Το ίζημα φυλάσσεται στους -20°C.

Ακολουθεί πέψη με ενδονουκλεάση περιορισμού (EcoRI). Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και η ποσότητα αυτών ανά αντίδραση περιγράφονται στον πίνακα 8.

| Αντιδραστήρια πέψης | Όγκος ανά αντίδραση (μl) |
|--|--------------------------|
| ✓ 10x buffer | 2 |
| ✓ RNase | 0,5 |
| ✓ EcoRI enzyme | 1 |
| ✓ Πλασμιδιακό DNA | 3 |
| ✓ ddH ₂ O (έως τελικό όγκο 20 μl) | 13,5 |
| ✓ ΣΥΝΟΛΟ | 20 |

Πίνακας 8. Αντιδραστήρια για την πέψη με ενδονουκλεάση περιορισμού (EcoRI).

Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 1:30 ώρα και ηλεκτροφόρηση όλου του προϊόντος πέψης σε πήκτωμα αγαρόζης (1,5%) και επιλογή των αποικιών που φέρουν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο με ένθετο αναμενόμενου μεγέθους.

3.2.8.2 Μέθοδος απομόνωσης με στήλη (QIAprep)

Για την απομόνωση με στήλη χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο της NucleoSpin® Plasmid και έγινε σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία:

- 6 ml θρεπτικού υλικού LB¹², που περιέχουν το αντιβιοτικό αμικιλίνη, εμβολιάζονται με μία μεμονωμένη αποικία κυττάρων *E.coli*, τα οποία έχουν μετασηματισθεί με το προς απομόνωση πλασμίδιο. Ακολουθεί επώαση με συνεχή ανακίνηση στους 37°C για περίπου 16 ώρες
- 2 x 1,5 ml από την παραπάνω καλλιέργεια μεταφέρονται σε σωλήνα erppendorf και φυγοκεντρούνται στις 13.000 στροφές/λεπτό για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

- Το υπερκείμενο απομακρύνεται σχολαστικά και το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 230 μl διαλύματος A1 (περιέχει RNAse A⁶).
- Προστίθενται 230 μl διαλύματος A2, το διάλυμα ανακινείται απαλά και αφήνεται σε ηρεμία σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 3 min.
- Προστίθενται 270 μl διαλύματος A3, ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 6 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά και μεταφέρεται σε στήλη QIAprep.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το διάλυμα που διαπέρασε τη στήλη απορρίπτεται, σε αυτό το στάδιο το πλασμιδιακό DNA είναι προσδεμένο στην στήλη.
- Προστίθενται 600μl διαλύματος A4 (περιέχει αιθανόλη). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα που διαπερνά την στήλη απορρίπτεται και επαναλαμβάνεται φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να απομακρυνθεί τελείως το διάλυμα A4 καθώς περιέχει αιθανόλη, η οποία αν παραμείνει μπορεί να παρεμποδίσει περαιτέρω ενζυμικές αντιδράσεις.
- Η στήλη τοποθετείται σε σωλήνα erpendorf και ακολουθεί έκλουση, του προσδεμένου στη στήλη DNA, με την προσθήκη 30 μl διαλύματος AE (5 mM Tris/HCl, pH 8.5). Το δείγμα επωάζεται για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση της στήλης στις 13.000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολουθεί προσδιορισμός της συγκέντρωσης του πλασμιδιακού DNA με φωτομέτρηση στο σπεκτροφωτόμετρο Το δείγμα φυλάσσεται στους -20°C .

3.3 Σύγκριση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών - φυλλογενετική ανάλυση

Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια εστάλησαν σε αναλυτικό εργαστήριο Βιοχημείας στη Λάρισα για ανάγνωση των αλληλουχιών (sequencing). Οι αλληλουχίες της περιοχής ITS συγκρίθηκαν τις ήδη καταχωρημένες αλληλουχίες της GenBank, με χρήση του λογισμικού BLAST, μέσω της βάσης δεδομένων NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Η ευθυγράμμιση των αλληλουχιών (alignment) έγινε με χρήση του αλγόριθμου ClustalW μέσω του προγράμματος Mega 6.0. (Thompson et al., 1994). Οι συντηρημένες αλληλουχίες της περιοχής ITS2 εντοπίστηκαν μέσω του προγράμματος motif μέσα από την βάση δεδομένων ITS2database (<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/>). Η δευτεροταγής δομή της περιοχής ITS1, 5.8S, ITS2 καθώς και της περιοχής rpsA-trnH προσδιορίστηκε είτε με τη βοήθεια του λογισμικού predict που προσφέρεται από την βάση δεδομένων της περιοχής ITS2 (<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/>), ITS2database, είτε του προγράμματος Freiburg RNA tools (<http://rna.informatik.uni-freiburg.de/>). Η φυλογενετική σχέση μέσω των γενετικών αποστάσεων μεταξύ των δειγμάτων με τη μέθοδο Maximum Composite Likelihood (Tamura et al., 2004) και μέσω του φυλλογενετικού δέντρου που πραγματοποιήθηκε μέσω του προγράμματος MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Χαρακτηριστικά της περιοχής ITS

Η ενίσχυση της περιοχής ITS με χρήση κατάλληλων εκκινητων πραγματοποιήθηκε και στα οκτώ δείγματα (*S.officinalis*, *S.officinalis* H, *S. fruticosa* F, *S. fruticosa* K, *S. pomifera*, *S. aethiopsis*, *S.calycina*, *S.hispanica*). Τα προϊόντα της PCR που προέκυψαν, μεγέθους 710-740bp, ανάλογα με το δείγμα, κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pGEM-T Easy και προσδιορίστηκε η αλληλουχία βάσεων 1 ή 2 κλώνων από κάθε δείγμα. Η αλληλουχία νουκλεοτιδίων της κάθε μια περιοχής ITS περιλαμβάνει το 3' άκρο του 18S rDNA γονιδίου, την περιοχή ITS1, το 5.8S γονίδιο, την περιοχή ITS2 και το 5' άκρο του 28S rDNA γονιδίου. Στην εικόνα 16 παρατίθεται ενδεικτικά η αλληλουχία βάσεων της περιοχής ITS της *S.fruticosa*.

Όλες οι ITS αλληλουχίες αναλύθηκαν μέσω της μεθόδου BLASTN. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και οι οκτώ ITS αλληλουχίες παρουσίασαν μεγάλο ποσοστό ομολογίας (>93%) αποκλειστικά με ITS αλληλουχίες της Genbank οι οποίες είχαν καταχωρηθεί ως αλληλουχίες του γένους *Salvia*.

>*S.fruticosa*F

```
AAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGAAACCTGCAAAGCAGACCGGAACACGTCACTAA  
CACCATCCGACGGTGCATGGCGTGGGGGCGACCCCGTCTGTTCCCGTCAACCCCGCCGCGTGTCCCATCG  
GGTCACGTCGTGTGGGCTAACGAACCCCGGCGCGGAATGCGCCAAGGAAAAACAAACGAAGCATCCTCCCCC  
GCGCCCGTTCGCGGAGTGTGCGGGGGCGTGGATGTCTATCAAAATGTCAAACGACTCTCGGCAACGGATAT  
CTCGGCCCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATC  
GAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCCTGGGCGTCA CGCATCGCGT  
CGCCCCCGCCCTCCGTGCGCACAGCGCCCGTGGGGGAGGGGGGGCGGATATTGGCCTCCCGTGTCTCCTC  
GGCGCGCGGCTGGCCAAATGCGATCCCTCGGCGACTCATGTACGACAAGTGGTGGTTGAACAACCTCAATCT  
CGCGCGCCGTGTGCCACTGCGTGTCCGCTCGGGCATCCATCAACGACCCAACGGTGCCTGCGTGTCCAGCT  
CGCACCTTCGACCGCGACCCAGGTGAGGCGGGATCACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
```

Εικόνα 16. Νουκλεοτιδική αλληλουχία της περιοχής ITS της *S. fruticosa* K. Η αλληλουχία νουκλεοτιδίων της περιοχής ITS περιλαμβάνει το 3' άκρο του 18S rDNA γονιδίου (κόκκινο), την περιοχή ITS1 (μαύρο), το 5.8S γονίδιο (μπλε), την περιοχή ITS2 (μαύρο) και το 5' άκρο του 28S rDNA γονιδίου (κόκκινο).

Τα γενικά χαρακτηριστικά (μέγεθος, περιεχόμενο G+C) των αλληλουχιών της περιοχής ITS1, ITS2 και 5.8S γονιδίου καταγράφονται στον Πίνακα 7. Το μέγεθος της περιοχής ITS1 κυμαίνεται από 224 έως 231bp με την περιεκτικότητα σε G+C να κυμαίνεται από 66,1 έως 70,6%. Το μέγεθος της περιοχής ITS2 κυμαίνεται από 219 μέχρι 246 bp και το περιεχόμενο σε G+C που ξεκινάει από 66,8 και φθάνει στο 69,3%. Το μέγεθος του 5.8S γονιδίου είναι 165 bp και το περιεχόμενο του σε G+C κυμαίνεται από 53,9 έως 54,5% (Πίνακας 9).

| Είδη του γένους <i>Salvia</i> | ITS1 | | ITS2 | | 5.8S | |
|-------------------------------|-------------|---------|-------------|---------|-------------|---------|
| | Μέγεθος(bp) | G+C (%) | Μέγεθος(bp) | G+C (%) | Μέγεθος(bp) | G+C (%) |
| <i>S. fruticosa F</i> | 230 | 65.2 | 244 | 69.3 | 165 | 54.5 |
| <i>S. fruticosa K</i> | 230 | 65.2 | 244 | 69.3 | 165 | 54.5 |
| <i>S. officinalis H</i> | 230 | 66.1 | 236 | 68.2 | 165 | 53.9 |
| <i>S. officinalis</i> | 230 | 66.1 | 236 | 68.2 | 165 | 53.9 |
| <i>S. aethiopica</i> | 231 | 70.6 | 219 | 68.5 | 165 | 53.9 |
| <i>S. calycina</i> | 230 | 66.1 | 246 | 68.3 | 165 | 53.9 |
| <i>S. hispanica</i> | 224 | 69.2 | 235 | 66.8 | 165 | 54.5 |
| <i>S. pomifera</i> | 230 | 66.1 | 238 | 68.1 | 165 | 53.9 |

Πίνακας 9. Η ποικιλότητα στο μέγεθος και στο περιεχόμενο σε G+C της περιοχής ITS1 και της ITS2 καθώς και του 5.8S γονιδίου των ειδών του γένους *Salvia*.

4.2 Ανάλυση των συντηρημένων αλληλουχιών της περιοχής ITS1, ITS2 και 5.8S γονιδίου

Στην βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η περιοχή ITS2 σε όλα τα φυτά φέρει τρεις διακριτές συντηρημένες περιοχές (Schultz et al., 2005, Rampersad, 2014). Επίσης έχει αναφερθεί ότι η περιοχή ITS1 φέρει μια διακριτή συντηρημένη περιοχή σε όλα τα αγγειόσπερμα (Liu et al., 1994).

Η παρουσία των συντηρημένων περιοχών στις ITS2 αλληλουχίες σε όλα τα είδη της *Salvia* διερευνήθηκε μέσω του προγράμματος motif της ITS2 database. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλα τα motifs, M1, M2, και M3, είναι μήκους 15 bp και

περιλαμβάνουν τις εξής αλληλουχίες: M1, 5'-TA(T/G)TGGCCTCCCGT(G/T)-3', M2 5'-CGGCTGGCCCAAATG- 3', M3 5'-G(G/A)CAAGTGGTGGTTG-3' (Εικόνα 17). Στην εικόνα 17 παρουσιάζεται η ευθυγράμμιση των ITS αλληλουχιών των διαφόρων ειδών του γένους *Salvia* και σημειώνεται η θέση των διακριτών συντηρημένων αλληλουχιών.

```

S.oficinalisH      CGCATCGCGTCGCC----CCCCCACCCTGCGCACAGCGCCCGCTGT-----GGGGGG
S.oficinalis      CGCATCGCGTCGCC----CCCCCACCCTGCGCACAGCGCCCGCTGT-----GGGGGG
S.fruticosaF      CGCATCGCGTCGCC-CCCCCGCCCTCCGTGCGCACAGCGCCCGTTGG--GGGAGGGGGGG
S.fruticosaK      CGCATCGCGTCGCC-CCCCCGCCCTCCGTGCGCACAGCGCCCGTTGG--GGGAGGGGGGG
S.pomifera        CGCATCGCGTCGCC---CCCCCCTCCGTGCGCACAGCGCCCGCTGT-----GGGGGGGG
S.calycina        CGCATCGCGTCGCCTCCCCCCCCCTCCGTGCGCACAGCGCCCGCTGTGGGGGGGGGGGG
S.aethiopsis      CGCATCGCGTCGCC-----CCCCACCATGTGC-----GGGGGGGGGGGGGG
S.hispanica       CGCATCGCGTCGCC----CCCCGCCCGCGCGCTTAGCGAAAG-----GGCGGGGA
*****          * * * * *

S.oficinalisH      GCGGATATTGGCCTCCCGTGTCC-TCGGCGTGGCGTGGCCCAAATGCGATCCCTCGGC
S.oficinalis      GCGGATATTGGCCTCCCGTGTCC-TCGGCGTGGCGTGGCCCAAATGCGATCCCTCGGC
S.fruticosaF      GCGGATATTGGCCTCCCGTGTCC-TCGGCGCGCGGCTGGCCCAAATGCGATCCCTCGGC
S.fruticosaK      GCGGATATTGGCCTCCCGTGTCC-TCGGCGCGCGGCTGGCCCAAATGCGATCCCTCGGC
S.pomifera        GCGGATATTGGCCTCCCGTGTCC-TCGGCGTGGCGTGGCCCAAATTCGATCCCTCGGC
S.calycina        GCGGATATTGGCCTCCCGTGTCC-TCGGCGTGGCGTGGCCCAAATGCGATCCCTCGGC
S.aethiopsis      GCGGATACTGGCCTCCCGTGTCC-CCGGCGCGCGGCTGGCCCAAATGCGATCCCTCGGC
S.hispanica       GCGGAGACTGGCCTCCCGTTCGCCATTGGTGTGGCGTGGCCCAAATGCGATCCCTCGGC
***** * ***** * ** * ***** ***** *****

S.oficinalisH      GACTCATGTACGACAAGTGGTGGTTGAACAACCTCAATCTCGCGCGCCGTGTCGCACTG
S.oficinalis      GACTCATGTACGACAAGTGGTGGTTGAACAACCTCAATCTCGCGCGCCGTGTCGCACTG
S.fruticosaF      GACTCATGTACGACAAGTGGTGGTTGAACAACCTCAATCTCGCGCGCCGTGTCGCACTG
S.fruticosaK      GACTCATGTACGACAAGTGGTGGTTGAACAACCTCAATCTCGCGCGCCGTGTCGCACTG
S.pomifera        GACTCATGTACGACAAGTGGTGGTTGAACAACCTCAATCTCGCGCGCCGTGTCGCACTG
S.calycina        GACTCATGTACGACAAGTGGTGGTTGAACAACCTCAATCTCGCGCGCCGTGTCGCACTG
S.aethiopsis      GACTCATGTACGACAAGTGGTGGTTGAA-ATCTCAATCTCTGCGCGCCGTGTCGCACTG
S.hispanica       GACTCGCGTACGGCAAGTGGTGGTTGAACA-CTCAATCTCTGCGCGCCGTGTCGCGTTG
***** ***** ***** * ***** ***** *****

S.oficinalisH      CGTCGTCCGCTTGGGCATCCATCAACGACCCAACGGTGCCCGTGCCTCGCAGCACCC--A
S.oficinalis      CGTCGTCCGCTTGGGCATCCATCAACGACCCAACGGTGCCCGTGCCTCGCAGCACCC--A
S.fruticosaF      CGTCGTCCGCTCGGGCATCCATCAACGACCCAACGGTGCCCGTGCCTCACAGCTCGC--A
S.fruticosaK      CGTCGTCCGCTCGGGCATCCATCAACGACCCAACGGTGCCCGTGCCTCACAGCTCGC--A
S.pomifera        CGTCGTCCGCTTGGGCATCCATCAACGACCCAACGGTGCCG-TGCCTCACAGCACCC--A
S.calycina        CGTCGTCCGCTTGGGCATCCATCAACAACCCAACGGTGCCG-TGCCTCACAGCACCC--A
S.aethiopsis      CGTCGTCCGTAAGGGCATCCATCAACGACCCAACGGTGCCGCTCGCGCGCCCGGCGA
S.hispanica       TGTCGTTCTTACGGGTGTCGAAAAACGACCCGTCGGTGGCGGGGCTCACGGCTCCTC-A
***** * ** * * * * * * * * * *

S.oficinalisH      CCTTCGACCG
S.oficinalis      CCTTCGACCG
S.fruticosaF      CCTTCGACCG
S.fruticosaK      CCTTCGACCG
S.pomifera        CCTTCGACCG
S.calycina        CCTTCGACCG
S.aethiopsis      CCTTCGACCG
S.hispanica       CCTTCGACCG
*** *****

```

Εικόνα 17. Ευθυγράμμιση των αλληλουχιών περιοχής ITS2 με χρήση του προγράμματος Clustal W. Οι αλληλουχίες των motif σημειώνονται με κόκκινο χρώμα.

Η διερεύνηση της περιοχής ITS1, όσον αφορά στην παρουσία του συντηρημένου motif 5'-GGCRY(4-7n)GYGYCAAGGAA-3' (Liu και Schardl, 1994) πραγματοποιήθηκε μέσω της ευθυγράμμισης των περιοχών ITS1. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το motif

απαντάται σε όλα τα είδη *Salvia* με τη μορφή 5'-GGCGC(GGAA)TGCGCCAAGGAA-3'. Σάρωση της Genebank με ανιχνευτή τις αλληλουχίες του motif (συντηρημένων αλληλουχιών) έδειξε ότι αυτές οι αλληλουχίες είναι εξαιρετικά συντηρημένες σχεδόν σε όλα τα είδη *Salvia* τα οποία είναι καταχωρημένα στη δημόσια βάση δεδομένων (Εικόνα 18).

```

S.officinalis      GTCGAAACCTGCAAAGCAGACCCGCGAACACGTGACTAACACCCGACTGACGGTGCATGGCG
S.officinalisH    GTCGAAACCTGCAAAGCAGACCCGCGAACACGTGACTAACACCCGACTGACGGTGCATGGCG
S.fruticosaF      GTCGAAACCTGCAAAGCAGACCCGCGAACACGTGACTAACACCCATCCGACGGTGCATGGCG
S.fruticosaK      GTCGAAACCTGCAAAGCAGACCCGCGAACACGTGACTAACACCCATCCGACGGTGCATGGCG
S.pomifera        GTCGAAACCTGCAAAGCAGACAGCGAACCCGTGACTAACACCCGACCGGTCACGGCG
S.calycina        GTCGAAACCTGCAAAGCAGACAGCGAACCCGTGACTAACACCCGACCGGTCACGGCG
S.aethiopsis      GTCGAAACCTGCAAAGCAGACCCGCGAACACGTGTTTAAACACCCGACCGGTCACGGCT
S.hispanica       GTCGATACCTGCAAAGCAGACAGCGAACTCGTGTTAAACAC----GGCGCGTGCGGC-
*****
S.officinalis      TGGGGGCGACCCC-CGTCCGTGTTCCCGTCAACCCCGCCCGCGTGTCCCATCGGGTCACG
S.officinalisH    TGGGGGCGACCCC-CGTCCGTGTTCCCGTCAACCCCGCCCGCGTGTCCCATCGGGTCACG
S.fruticosaF      TGGGGGCGACCCC-CGTCCGTGTTCCCGTCAACCCCGCCCGCGTGTCCCATCGGGTCACG
S.fruticosaK      TGGGGGCGACCCC-CGTCCGTGTTCCCGTCAACCCCGCCCGCGTGTCCCATCGGGTCACG
S.pomifera        TGGGGGCGACCCC-CGTCCGTGTTCCCGTCAACCCCGCCCGCGTGTCCCATCGGGTCACG
S.calycina        TGGGGGCGACCCC-CGTCCGTGTTCCCGTCAACCCCGCCCGCGTGTCCCATCGGGTCACG
S.aethiopsis      CGGGGGCGACCCCGTCCGTGCGCGCGTGCACCCCGCCCGCGGTTCCG-TCCGGTCGCG
S.hispanica       -GGGGGCGATCCC-CGTCCCGCGTCCGTCTCCCGCCCGCGTGTCCG-TCCGGTCGCG
*****
S.officinalis      TCGTGCGGGCTAACGAACCCCGGCGCGGAATGCGCCAAGGAAAACCAAACGAAGCATCCT
S.officinalisH    TCGTGCGGGCTAACGAACCCCGGCGCGGAATGCGCCAAGGAAAACCAAACGAAGCATCCT
S.fruticosaF      TCGTGCGGGCTAACGAACCCCGGCGCGGAATGCGCCAAGGAAAACCAAACGAAGCATCCT
S.fruticosaK      TCGTGCGGGCTAACGAACCCCGGCGCGGAATGCGCCAAGGAAAACCAAACGAAGCATCCT
S.pomifera        TCGTGCGGGCTAACGAACCCCGGCGCGGAATGCGCCAAGGAAAACCAAACGAAGCATCCT
S.calycina        TCGTGCGGGCTAACGAACCCCGGCGCGGAATGCGCCAAGGAAAACCAAACGAAGCATCCT
S.aethiopsis      CGGCGCGGGCTAACGAACCCCGGCGCGGAATGCGCCAAGGAAAACCAAACGAAGCATCCT
S.hispanica       CCGTGCGGGCTAACGAACCCCGGCGCGGAATGCGCCAAGGAACTACTCAACGAAGCATCCT
* * *****
S.officinalis      CCCCC-GCGCCCCGTTCGCGGAGTGTGCGGGGGCG-TCCGATGTCTATCAAA
S.officinalisH    CCCCC-GCGCCCCGTTCGCGGAGTGTGCGGGGGCG-TCCGATGTCTATCAAA
S.fruticosaF      CCCCC-GCGCCCCGTTCGCGGAGTGTGCGGGGGCG-TCCGATGTCTATCAAA
S.fruticosaK      CCCCC-GCGCCCCGTTCGCGGAGTGTGCGGGGGCG-TCCGATGTCTATCAAA
S.pomifera        CCCCC-GCGCCCCGTTCGCGGAGTGTGCGGGGGCG-TCCGATGTCTATCAAA
S.calycina        CCCCC-GCGCCCCGTTCGCGGAGTGTGCGGGGGCG-TCCGATGTCTATCAAA
S.aethiopsis      CCCCCCGCGCCCCGTTCGCGGAGTGTGCGGGGGGTG-TCCGGCGTCTATCAAA
S.hispanica       CCCCC-GCACCCCGTTCGCGGACCGTGTGGGGGCGACCGGATGTCTCGCAA
*****

```

Εικόνα 18. Ευθυγράμμιση των αλληλουχιών περιοχής ITS1 με χρήση του προγράμματος Clustal W. Οι αλληλουχίες του συντηρημένης αλληλουχίας σημειώνονται με κόκκινο χρώμα.

Οι αλληλουχίες του 5.8S γονιδίου παρουσιάζουν μικρή παραλλακτικότητα μεταξύ των ειδών του ίδιου γένους αλλά και μεταξύ διαφορετικών γενών στα φυτά. Ευθυγράμμιση των αλληλουχιών του 5.8 S γονιδίου έδειξε ότι παρουσιάζουν εξαιρετικά μικρή παραλλακτικότητα και τα τρία μοτίβα, M1 (5'-CGATGAAGAACGTAGC-3'), M2 (5'-GAATTGCAGAATCC-3') και M3 (5'-TTTGAACGCA-3'), που παρατηρούνται στα αγγειόσπερμα (Harpe and Peterson, 2008) είναι συντηρημένα (Εικόνα 19).

| | |
|----------------|--|
| S.fruticosaK | TGTCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCCCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGA |
| S.pomifera | TGTCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGA |
| S.calycina | TGTCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGA |
| S.officinalis | TGTCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGA |
| S.fruticosaF | TGTCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCCCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGA |
| S.hispanica | TGTCATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGA |
| S.officinalisH | TGTCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGA |
| S.aethiopica | TGTCATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGA |
| | *****.***** |
| S.fruticosaK | AATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGT |
| S.pomifera | AATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGT |
| S.calycina | AATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGT |
| S.officinalis | AATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGT |
| S.fruticosaF | AATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGT |
| S.hispanica | AATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGT |
| S.officinalisH | AATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGT |
| S.aethiopica | AATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGT |
| | *****.***** |
| S.fruticosaK | TGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA |
| S.pomifera | TGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA |
| S.calycina | TGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA |
| S.officinalis | TGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA |
| S.fruticosaF | TGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA |
| S.hispanica | TGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA |
| S.officinalisH | TGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA |
| S.aethiopica | TGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA |
| | *****.***** |

Εικόνα 19. Ευθυγράμμιση των αλληλουχιών περιοχής του 5.8 S με χρήση του προγράμματος Clustal W. Οι αλληλουχίες των motif σημειώνονται με κόκκινο χρώμα.

4.3 Φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των ειδών του γένους *Salvia*

Οι γενετικές αποστάσεις μεταξύ των ITS1 και μεταξύ των ITS2 εκτιμήθηκαν με βάση τον τύπο του Kimura-2 (Tamura et al., 2013). Για την περιοχή ITS1, οι γενετικές αποστάσεις κυμαίνονταν από 0,014 έως 0,213 με μια μέση τιμή 0.081. Η μέγιστη γενετική απόσταση παρατηρήθηκε μεταξύ των ειδών *S. aethiopsis* και *S. hispanica*, ενώ η ελάχιστη μεταξύ των ειδών *S. pomifera* και *S. calycina* ή *S. fruticosa* και *S. officinalis* (Πίνακας 10).

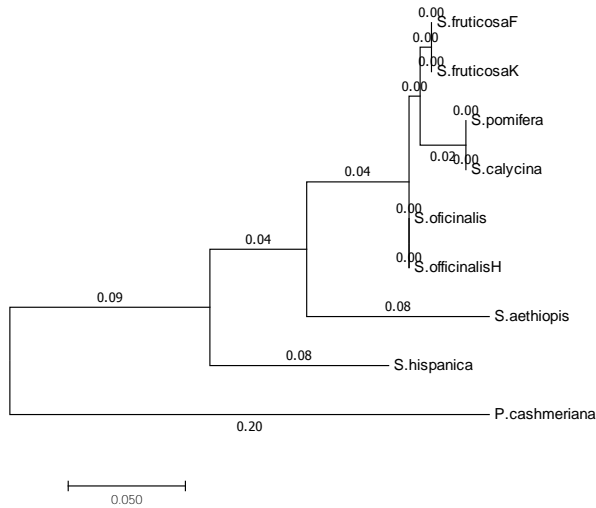
Πίνακας 10: Γενετικές αποστάσεις της ITS1 περιοχής των ειδών του γένους *Salvia*.

| | | | | | | | |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <i>S.fruticosa F</i> | | | | | | | |
| <i>S.fruticosa K</i> | 0,000 | | | | | | |
| <i>S.officialis</i> | 0,014 | 0,014 | | | | | |
| <i>S.officialis H</i> | 0,014 | 0,014 | 0,000 | | | | |
| <i>S.aethiopsis</i> | 0,132 | 0,132 | 0,126 | 0,126 | | | |
| <i>S.pomifera</i> | 0,023 | 0,023 | 0,028 | 0,028 | 0,127 | | |
| <i>S.calycina</i> | 0,023 | 0,023 | 0,028 | 0,028 | 0,127 | 0,000 | |
| <i>S.hispanica</i> | 0,181 | 0,181 | 0,163 | 0,163 | 0,213 | 0,167 | 0,167 |

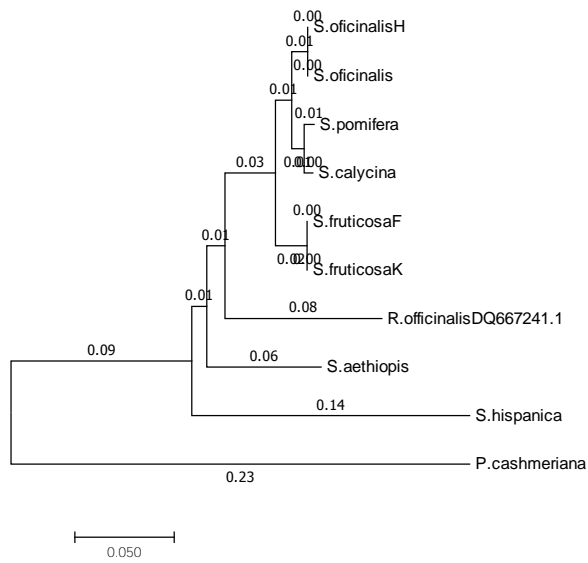
Στην περιοχή ITS2, οι γενετικές αποστάσεις κυμαίνονταν από 0,033 έως 0,199 με μια μέση τιμή 0.084. Η μέγιστη γενετική απόσταση παρατηρήθηκε μεταξύ των ειδών *S. pomifera* και *S. hispanica*, ενώ η ελάχιστη μεταξύ των ειδών *S.pomifera* και *S. fruticosa* (Πίνακας 11).

Πίνακας 11: Γενετικές αποστάσεις της περιοχής ITS2 περιοχής των ειδών του γένους *Salvia*.

| | | | | | | | |
|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <i>S.fruticosaF</i> | | | | | | | |
| <i>S.fruticosaK</i> | 0,000 | | | | | | |
| <i>S.officialisH</i> | 0,034 | 0,034 | | | | | |
| <i>S.officialis</i> | 0,034 | 0,034 | 0,000 | | | | |
| <i>S.aethiopsis</i> | 0,112 | 0,112 | 0,095 | 0,095 | | | |
| <i>S.pomifera</i> | 0,033 | 0,033 | 0,019 | 0,019 | 0,117 | | |
| <i>S.calycina</i> | 0,033 | 0,033 | 0,019 | 0,019 | 0,117 | 0,009 | |
| <i>S.hispanica</i> | 0,193 | 0,193 | 0,193 | 0,193 | 0,193 | 0,199 | 0,198 |



Εικόνα 20: Εξελικτικές σχέσεις των ειδών του γένους *Salvia* οι οποίες βασίζονται στις αλληλουχίες της περιοχής ITS1. Το *Phlomis cashmeriana* ανήκει στο γένος *Phlomis*.



Εικόνα 21: Εξελικτικές σχέσεις των ειδών του γένους *Salvia* οι οποίες βασίζονται στις αλληλουχίες της περιοχής ITS2. Το *Phlomis cashmeriana* ανήκει στο γένος *Phlomis*.

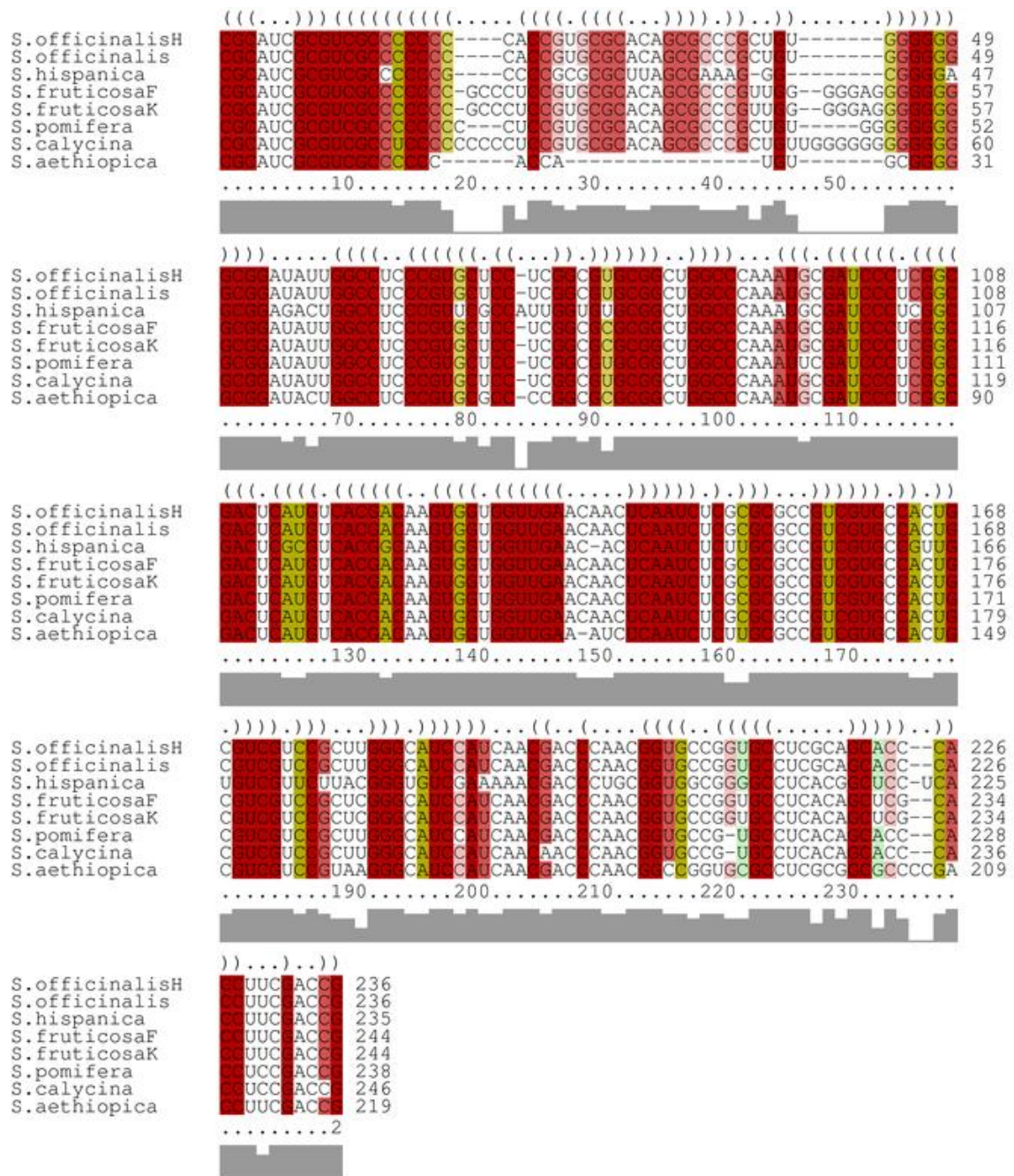
4.4 Ανάλυση της δευτεροταγούς δομής της περιοχής ITS2

Η χρήση του λογισμικού LocaRNA-P (Will et al., 2012) επέτρεψε την ευθυγράμμιση των αλληλουχιών της περιοχής ITS2 από τα έξι είδη της *Salvia* με βάση την αλληλουχία (πρωτοταγή δομή) και τη δευτεροταγή δομή τους (Εικόνα 22) και οδήγησε στην κατασκευή της βέλτιστης συναινετικής δευτεροταγούς δομής τους (Εικόνα 23), η οποία, ανεξάρτητα από την παραλλακτικότητα των αλληλουχιών και τη διαφορά σε μέγεθος της περιοχής ITS2, αποτελείται από τέσσερις έλικες (Εικόνα 23). Ανάλυση της συναινετικής δευτεροταγούς δομής έδειξε η προβλεπόμενη διαμόρφωση έχει όλα τα γενικά και ειδικά χαρακτηριστικά της αποδεκτής ITS2 δευτεροταγούς δομής των ευκαρυωτικών οργανισμών (Coleman 2007, Schultz et al., 2007, Wolf et al., 2005). Οι έλικες I και IV επιδεικνύουν το μεγαλύτερο αριθμό μη-κανονικών ζευγών βάσεων σε σύγκριση με τις έλικες II και III υποδηλώνοντας ότι αυτές οι έλικες παρουσιάζουν μεγαλύτερη εξελικτική απόκλιση από τις άλλες δύο.

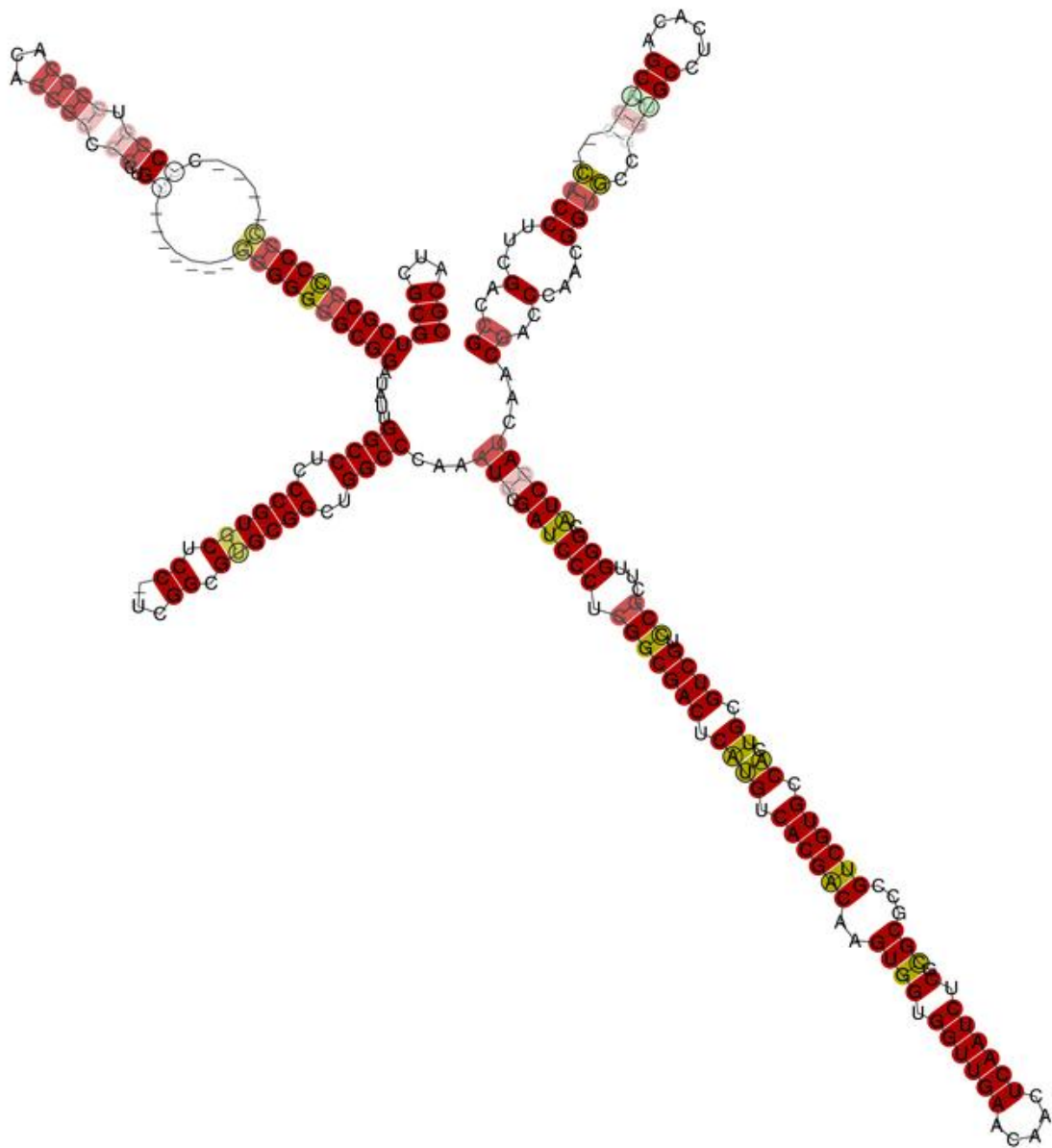
Τούτο γίνεται εμφανές στην Εικόνα 24, όπου παρουσιάζονται αποτελέσματα της ITS2 συναινετικής δευτεροταγούς δομής για 2, 3, 4 ή 5 είδη της *Salvia*. Η ανάλυση αυτή καταδεικνύει ότι ο αριθμός των κανονικών ζευγών βάσεων (G-C, A-U) μειώνεται στις έλικες I και IV ταχύτερα από ότι στις έλικες II και III. Η έλικα II παρουσιάζει το μεγαλύτερο βαθμό σταθερότητας από την έλικα III και φέρει το χαρακτηριστικό βρόχο πυριμιδίνης-πυριμιδίνης (Schultz et al., 2007) κοντά στην κορυφή της έλικας (Coleman 2007). Οι σχετικά συντηρημένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων εντοπίστηκαν στην έλικα I και έλικα II, η πλούσια σε αδενοσίνη αλληλουχία επίσης εντοπίστηκε μεταξύ της έλικας II και έλικας III (Koetschan et al., 2010). Η έλικα III είναι μεγαλύτερη από όλες τις άλλες έλικες και φέρει το συντηρημένο motif TGGT ενσωματωμένο σε μια μεγαλύτερη και σχετικά συντηρημένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων, η οποία απαντάται κοντά στην κορυφή της έλικας III (Coleman 2007).

Η διαθεσιμότητα μιας αποδεκτής συναινετικής δευτεροταγούς δομής της περιοχής ITS2 επέτρεψε την διερεύνηση της παρουσίας αντισταθμιστικής παραλλακτικότητας, CBC ή hemi-CBC (Coleman 2002, Muller et al., 2007) μεταξύ των φυλογενετικά κοντινών ή απομακρυσμένων ειδών της *Salvia*. Τα αποτελέσματα της καταμέτρησης των CBC ή hemi-CBC στην συναινετική δευτεροταγή δομή δύο φυλογενετικά κοντινών ή απομακρυσμένων ειδών της *Salvia* έδειξαν ότι η γενετική

απόσταση μεταξύ των ειδών *Salvia* είναι ανάλογη του αριθμού των CBC ή hemi-CBC.

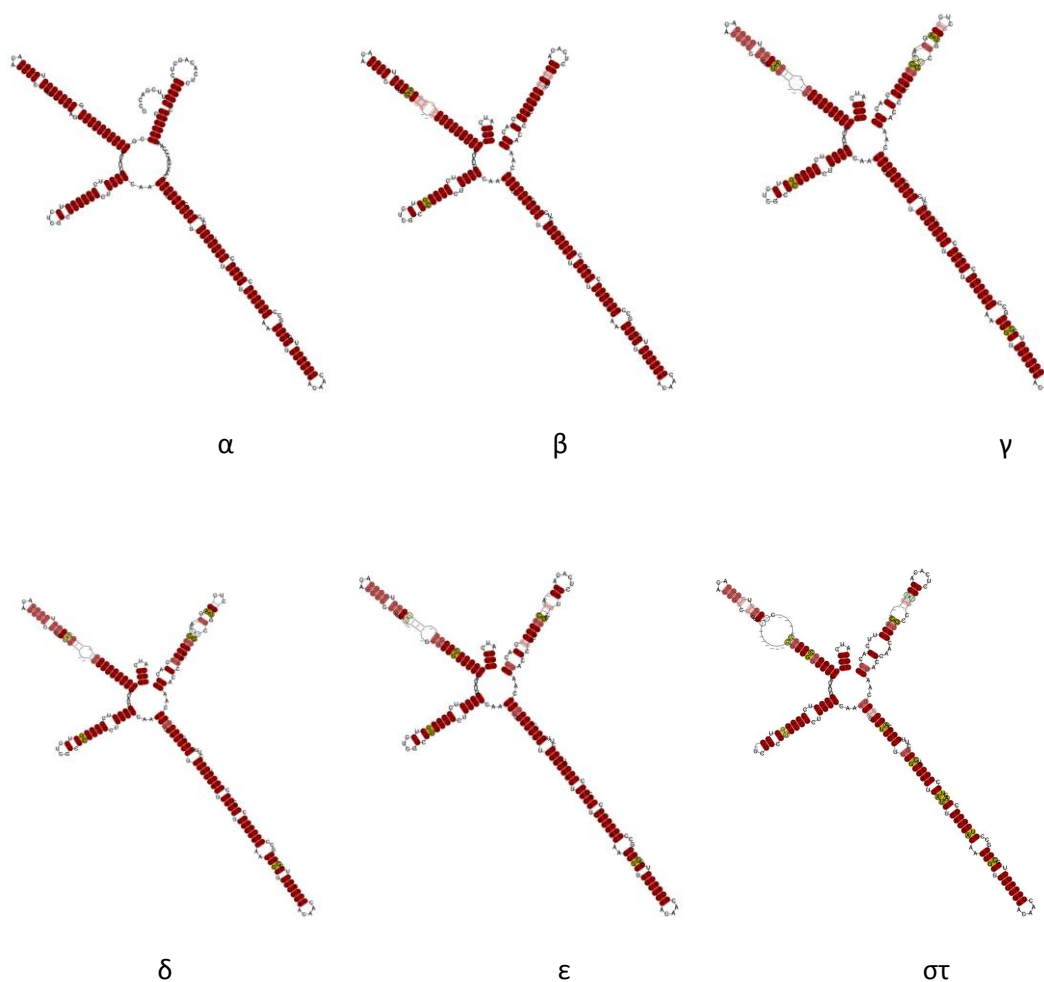


Εικόνα 22. Ευθυγράμμιση των ITS2 αλληλουχιών έξι ειδών του γένους *Salvia* με βάση τις ομοιότητες στην πρωτοταγή και δευτεροταγή δομή με τη χρήση του λογισμικού LocARNA-P. Οι τελείες αντιστοιχούν σε μονόκλωνες αλληλουχίες βάσεων και οι παρενθέσεις σε ζεύγη βάσεων που εδράζονται στις έλικες. Οι βάσεις που δεν παρουσιάζουν παραλλακτικότητα κατά την ευθυγράμμιση και ανήκουν σε έλικες έχουν μπορντό χρώμα ενώ οι βάσεις οι οποίες ανήκουν σε έλικες αλλά παρουσιάζουν αντισταθμιστική παραλλακτικότητα (CBC ή hemi-CBC) έχουν άλλο χρώμα (π.χ. σκούρο ή ανοικτό πράσινο). Οι μονόκλωνες περιοχές μεταξύ των ελίκων καθώς και οι μονόκλωνες περιοχές εντός των ελίκων (π.χ. βρόχοι ή φυσαλίδες) δεν είναι χρωματισμένες. Η παρουσία μη-κανονικού ζεύγους βάσεων στις έλικες έστω και ενός από τα πέντε είδη υποδηλώνεται με άλλο χρώμα (π.χ. ροζ)



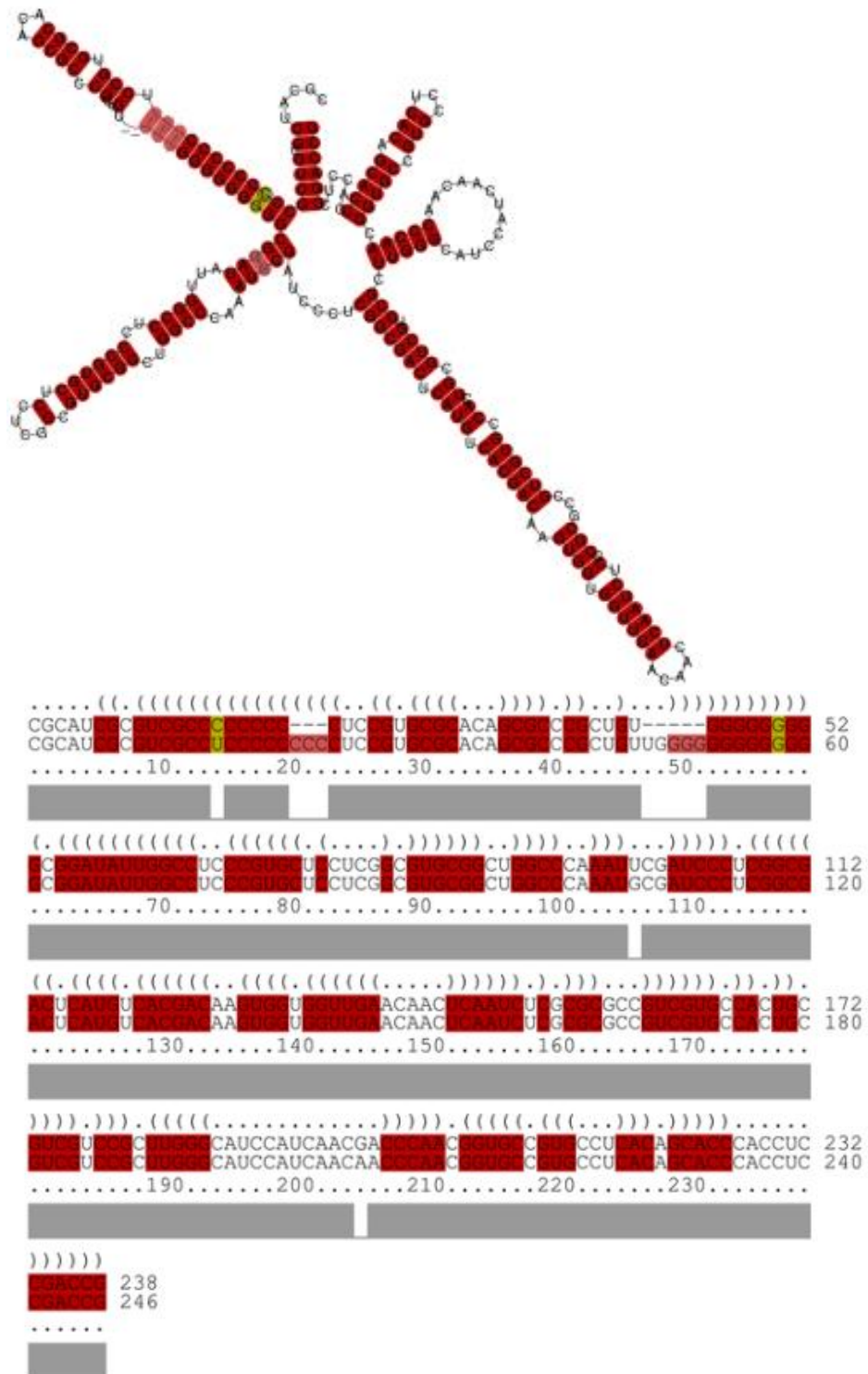
Εικόνα 23. Προβλεπόμενη συναινετική δευτεροταγής δομή της περιοχής ITS2 των έξι ειδών του γένους *Salvia*. Τα συντηρημένα ζεύγη βάσεων τα οποία μετέχουν στον σχηματισμό των ελίκων είναι χρωματισμένα μπορντό. Οι μονόκλωνες αλληλουχίες που μετέχουν στη δομή της έλικας αλλά σχηματίζουν φυσαλίδες (bulges) ή εσωτερικούς βρόχους (internal loops) καθώς και οι αλληλουχίες μεταξύ των ελίκων δεν είναι χρωματισμένες. Τα ζεύγη βάσεων εντός της έλικας τα όποια λόγω αντισταθμιστικής παραλλακτικότητας μπορεί να σχηματίζουν κανονικά ζεύγη είναι χρωματισμένα πράσινα. Η παρουσία μη-κανονικού ζεύγους βάσεων στις έλικες έστω και ενός από τα πέντε είδη υποδηλώνεται με άλλο χρώμα (π.χ.ροζ). Η ευθυγράμμιση των αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε με βάση τις ομοιότητες στην πρωτοτοταγή και δευτεροταγή δομή μέσω του λογισμικού LocARNA-P.

Για παράδειγμα, η γενετική απόσταση μεταξύ των ειδών *S. fruticosa* and *S. officinalis* είναι 0,034 και τα CBC που εντοπίζονται μεταξύ αυτών των ειδών είναι δύο (Εικόνα 25). Η γενετική απόσταση μεταξύ των ειδών *S. fruticosa* και *S.aethiopsis* είναι 0,112 και τα CBC είναι τέσσερα (Εικόνα 26). Η γενετική απόσταση μεταξύ *S. calicina* και *S. pomifera* είναι 0.019 και υπάρχει ένα hCBC (Εικόνα 24). Σημειώνεται ότι η *S. calicina* και η *S. pomifera* είναι δύο υποείδη του ίδιου είδους *S. pomifera* και αναφέρονται ως *S. pomifera spp.pomifera* και *S. pomifera spp.calycina* (Kintzios, 2003).

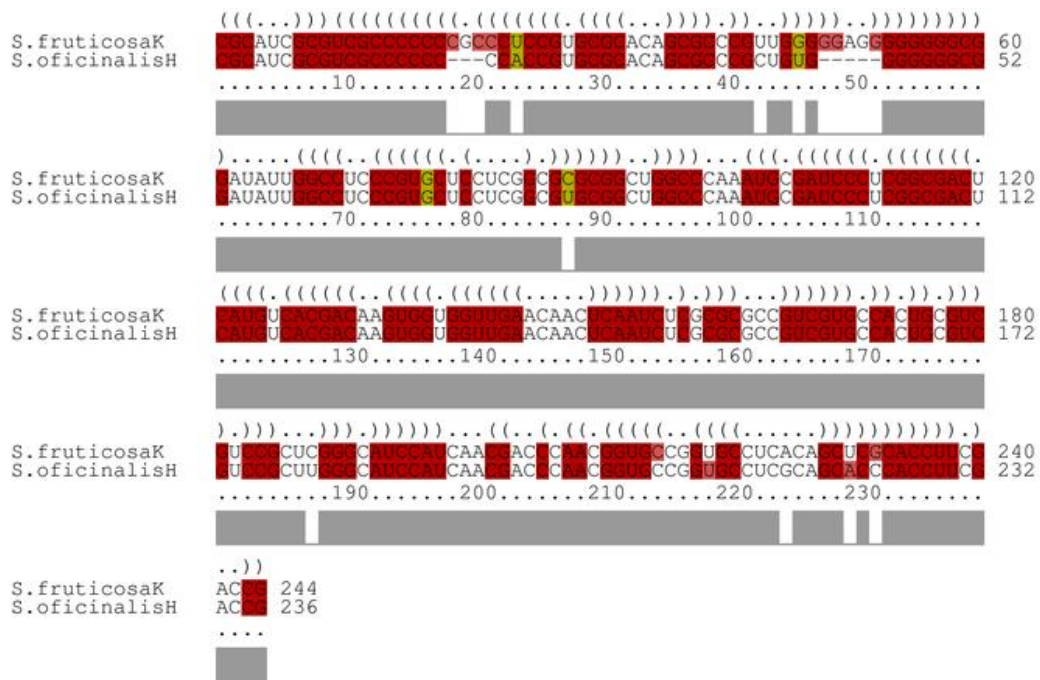
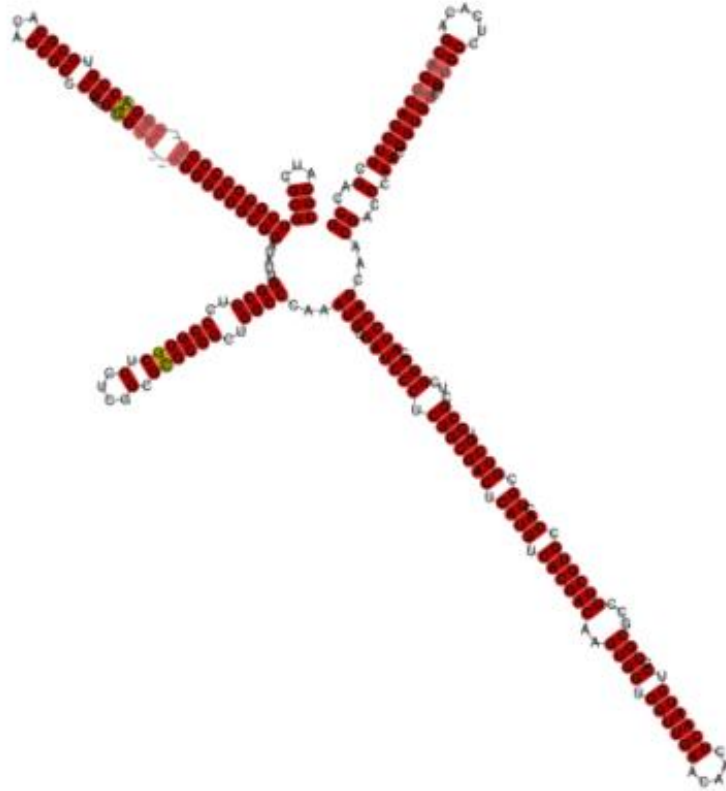


Εικόνα 24. Στα είδη της *Salvia* οι έλικες I και IV εξελίσσονται ταχύτερα από τις Έλικες II και III.

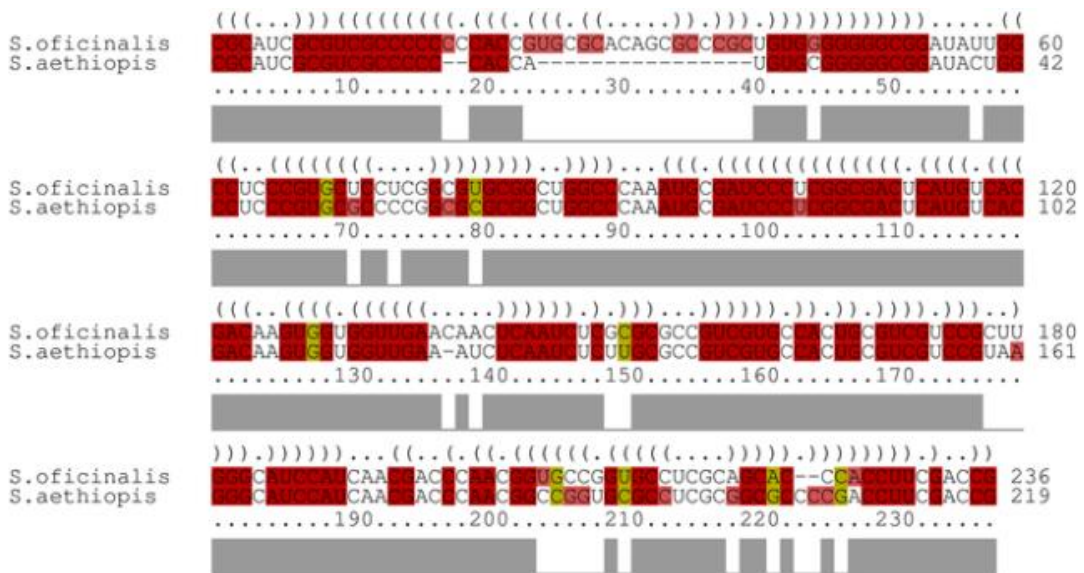
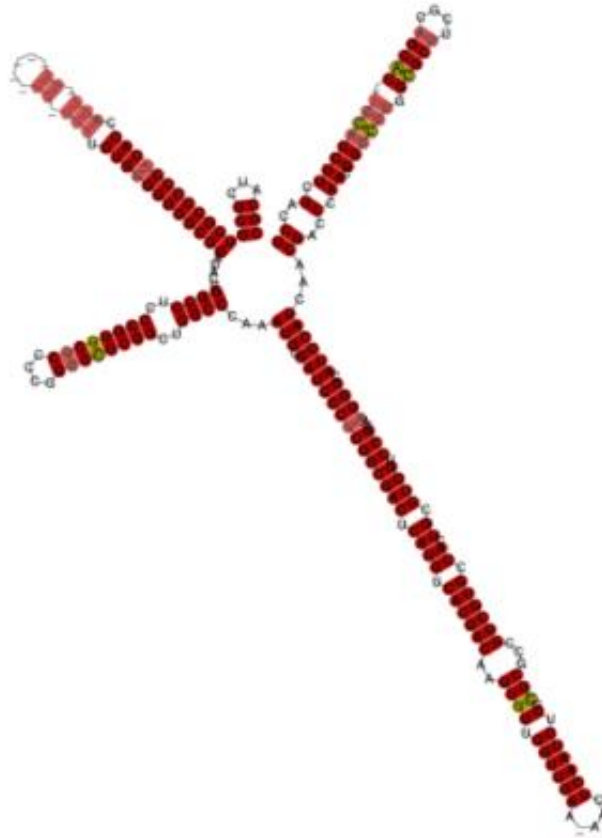
Συναυετική δευτεροταγής δομή της περιοχής ITS2 των ειδών *S. fruticosa* K και *S. fruticosa* F (α), *S. fruticosa* K *S. fruticosa* F, *S. officinalis* και *S. officinalis* H (β) *S. fruticosa* K, *S. fruticosa* F, *S. officinalis*, *S. officinalis* H και *S.aethiopsis* (γ), *S. fruticosa* K, *S. fruticosa* F, *S. officinalis*, *S. officinalis* H, *S.aethiopsis* και *S.pomifera* (δ), *S. fruticosa* K, *S. fruticosa* F, *S. officinalis*, *S. officinalis* H, *S.aethiopsis* και *S.pomifera* και *S.calycina* (ε), *S. fruticosa* K, *S. fruticosa* F, *S. officinalis*, *S. officinalis* H, *S.aethiopsis* *S.pomifera*, *S.calycina* και *S.hispanica* (στ).



Εικόνα 25. Εντοπισμός των CBC and hemi-CBC στην περιοχή ITS2 μεταξύ της *S. pomifera* και της *S. calycina* ITS2. Εντοπίζεται ένα hemi-CBC (το ζεύγος βάσεων C-G μετατρέπεται στο ζεύγος βάσεων σε U- G στην έλικα I). Τα ζεύγη βάσεων που παρουσιάζουν αντισταθμιστική παραλακτικότητα (CBC) είναι χρωματισμένα πράσινα.



Εικόνα 26. Εντοπισμός των CBC and hemi-CBC στην περιοχή ITS2 μεταξύ της *S. fruticosa* και της *S. officinalis*. Εντοπίζονται δύο hemi-CBC. Το ζεύγος βάσεων G-U μετατρέπεται στο ζεύγος βάσεων A-U στην έλικα I και το ζεύγος βάσεων G-C μετατρέπεται σε G-U. Τα ζεύγη βάσεων που παρουσιάζουν CBC είναι χρωματισμένα πράσινα.

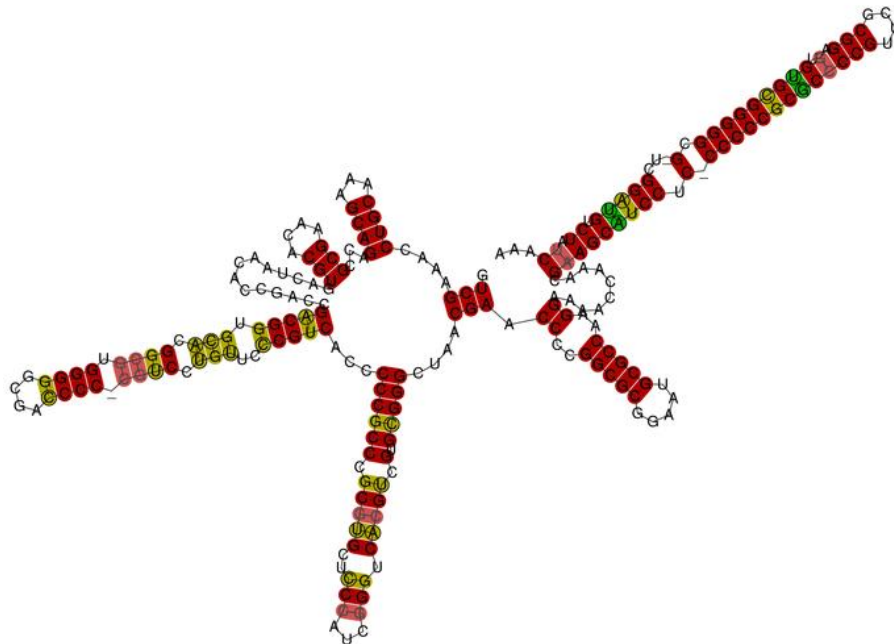
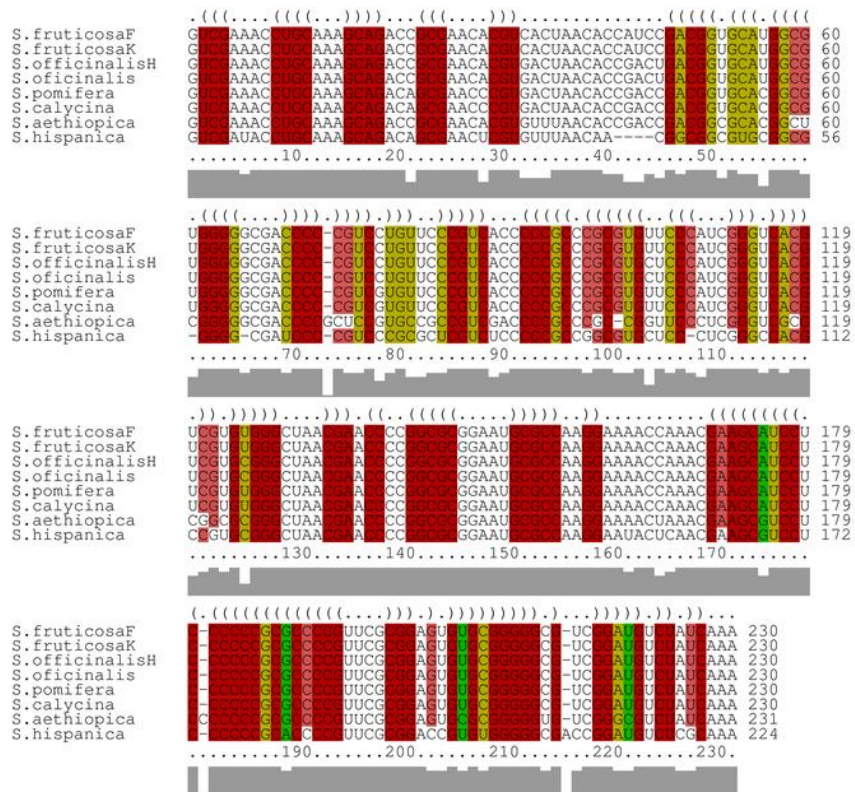


Εικόνα 27. Εντοπισμός των CBC and hemi-CBC στην περιοχή ITS2 μεταξύ της *S. aethiopsis* και της *S. officinalis*. Εντοπίζονται δύο hemi-CBC και δύο CBC. Το ζεύγος βάσεων G-U μετατρέπεται σε ζεύγος βάσεων G-C στην έλικα II και στην έλικα III. Το ζεύγος βάσεων G-C μετατρέπεται σε C-G και το ζεύγος βάσεων U-A μετατρέπεται σε C-G στην Έλικα IV. Τα ζεύγη βάσεων που παρουσιάζουν CBC είναι χρωματισμένα πράσινα.

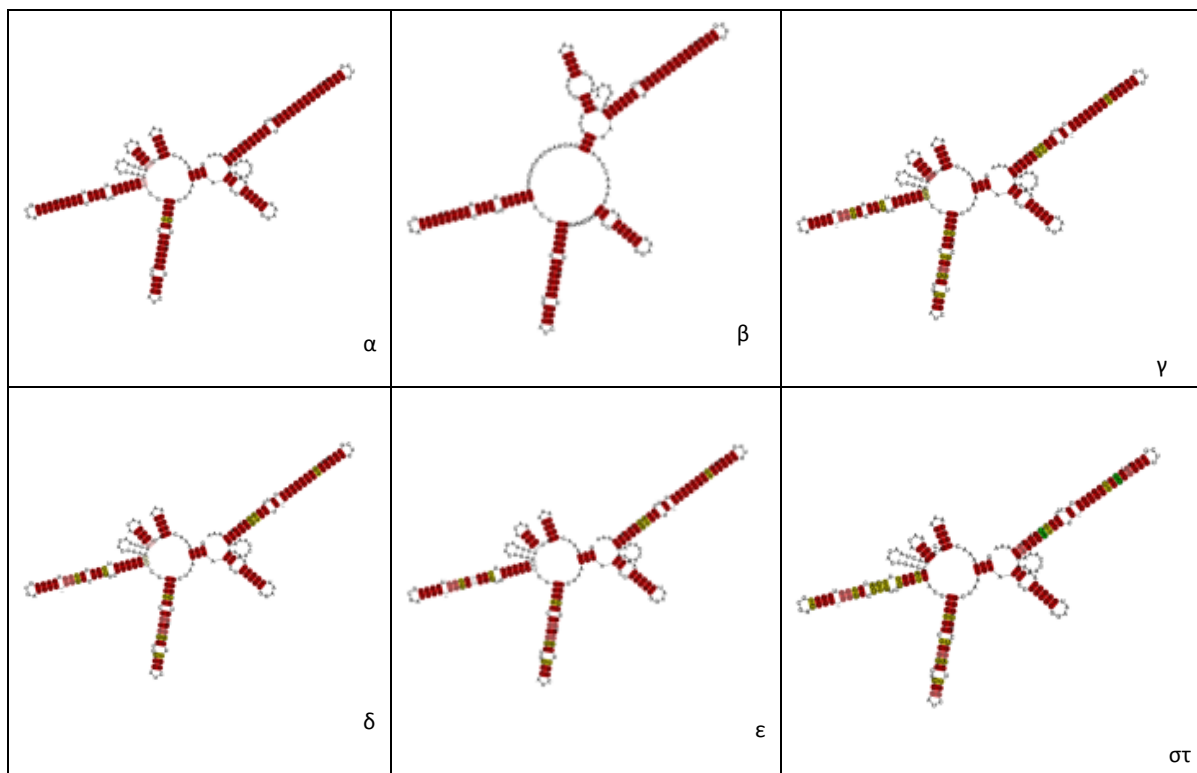
4.5 Ανάλυση της δευτεροταγούς δομής της περιοχής ITS1

Η δευτεροταγής δομή της περιοχής ITS1 στα φυτά και γενικότερα στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς δεν έχει μελετηθεί επαρκώς διότι δε φαίνεται να επιδεικνύει την συντηρημένη διαμόρφωση της περιοχής ITS2 (Koetschan et al., 2014, Coleman, 2015). Ανάλυση της συναινετικής δευτεροταγούς δομής της περιοχής ITS1 από έξι διαφορετικά είδη της *Salvia* με χρήση του προγράμματος LocaRNA-P έδειξε ότι η πλειονότητα των νουκλεοτιδίων εμπλέκονται στη δημιουργία κανονικών ζευγών βάσεων ή μη-κανονικών αλλά σταθερών ζευγών βάσεων (π.χ. G-U), τα οποία μετέχουν στο σχηματισμό μιας ανοικτής δομής με έξι έλικες (Εικόνα 28). Οι έλικες I, II και V φαίνεται να είναι πιο συντηρημένες ενώ οι έλικες III, IV και VI επιδεικνύουν μεγαλύτερη απόκλιση η οποία εκφράζεται με το παρατηρούμενο μεγάλο ποσοστό μη-κανονικών ζευγών βάσεων το οποίο συσσωρεύεται όσο αυξάνεται ο αριθμός των υπό μελέτη δειγμάτων (Εικόνα 29). Στον σχηματισμό της έλικας V εμπλέκεται μια αλληλουχία νουκλεοτιδίων 20 bp, η οποία παρουσιάζει συντηρημένη πρωτοταγή και δευτεροταγή δομή σε όλα τα αγγειόσπερμα (Liu and Schardl 1994, Goertzen et al., 2003). Ως εκ τούτου ήταν ενδιαφέρον να διερευνηθεί εάν οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που απαρτίζουν τις έλικες I και II είναι συντηρημένες στα είδη της *Salvia*. Πράγματι, η ανάλυση BlastN έδειξε ότι οι αλληλουχίες αυτές αποτελούν ένα συντηρημένο motif για σχεδόν όλα τα είδη της *Salvia*.

Η διαθεσιμότητα μιας αποδεκτής συναινετικής δευτεροταγούς δομής της περιοχής ITS1 επέτρεψε τη διερεύνηση της παρουσίας CBC ή hemi-CBC. Τα αποτελέσματα έδειξαν την παρουσία ενός μεταξύ *S. fruticosa* και της *S. officinalis* (Εικόνα 30) και σχετικά μεγάλου αριθμού CBC μεταξύ της *S. fruticosa* και της *S. aethiopsis* (Εικόνα 30).

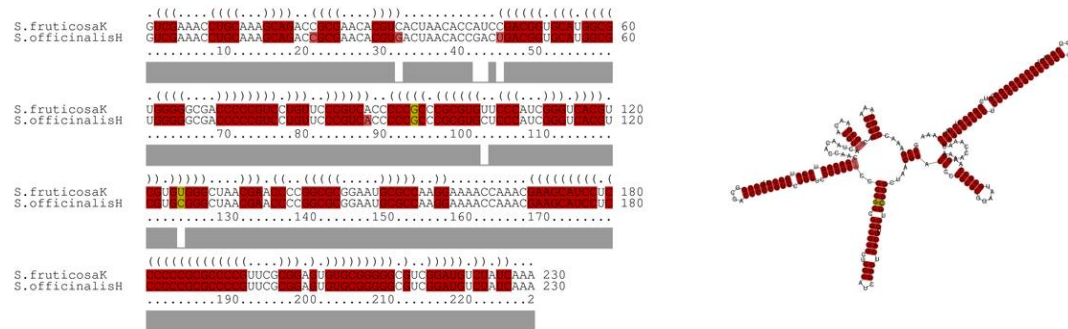


Εικόνα 28 .Προβλεπόμενη συναινετική δευτεροταγής δομής της περιοχής ITS1 των έξι ειδών του γένους *Salvia*.

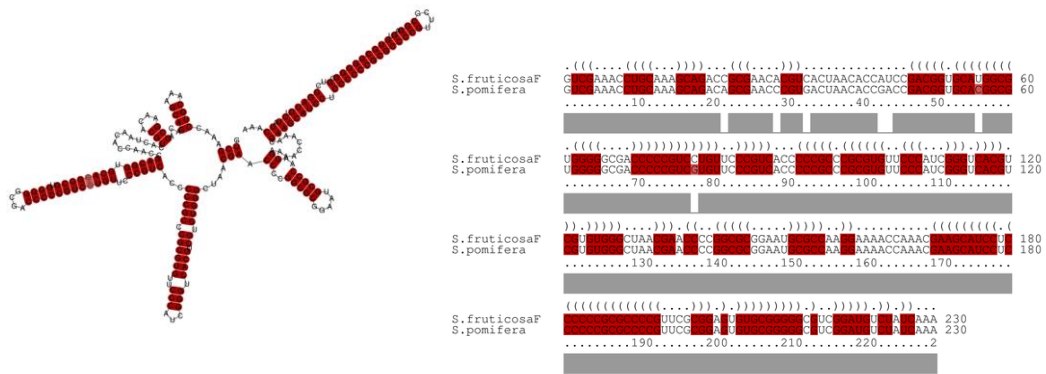


Εικόνα 29. Στα είδη της *Salvia* οι έλικες I, II και IV εξελίσσονται ταχύτερα από τις έλικες III, IV και VI. Συναινετική δευτεροταγής δομή της περιοχής ITS1 των ειδών *S. fruticosa* K και *S. fruticosa* F (α), *S. fruticosa* K, *S. fruticosa* F, *S. officinalis* και *S. officinalis* H (β), *S. fruticosa* K, *S. fruticosa* F, *S. officinalis*, *S. officinalis*H και *S. aethiopsis* (γ), *S. fruticosa* K, *S. fruticosa* F, *S. officinalis*, *S. officinalis* H, *S. aethiopsis* και *S. pomifera* (δ), *S. fruticosa* K, *S. fruticosa* F, *S. officinalis*, *S. officinalis* H, *S. aethiopsis* και *S. pomifera* και *S. calycina* (ε), *S. fruticosa* K, *S. fruticosa* F, *S. officinalis*, *S. officinalis* H, *S. aethiopsis*, *S. pomifera*, *S. calycina* και *S. hispanica* (στ)

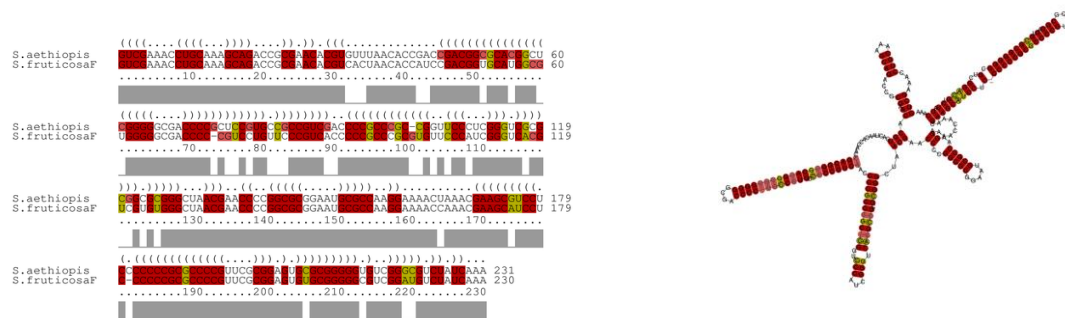
α



β



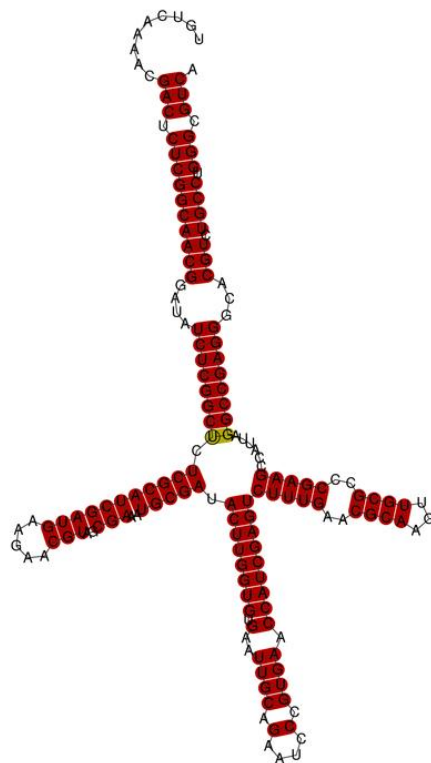
γ



Εικόνα 30. Εντοπισμός των CBC and hemi-CBC στην περιοχή ITS2 μεταξύ α) *S. fruticosa* F. και *S. officinalis* β) *S. fruticosa* F. και *S. pomifera* γ) της *S. aethiopsis* και της *S. fruticosa* F. Τα ζεύγη βάσεων που παρουσιάζουν CBC είναι χρωματισμένα πράσινα.

4.6 Ανάλυση της δευτεροταγούς δομής του 5.8S γονιδίου

Η ανάλυση της συναινετικής δευτεροταγούς δομής του 5.8S γονιδίου έδειξε την παρουσία τεσσάρων ελίκων. Ο σχηματισμός οφείλεται στην παρουσία εξαιρετικά συντηρημένων ανεστραμμένων επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών στην πρωτοταγή δομή.



Εικόνα 31 . Συναινετική δευτεροταγής δομή του 5.8S γονιδίου των έξι ειδών του γένους *Salvia*.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αρωματικά/φαρμακευτικά φυτά απαριθμούν περισσότερα από 70.000 διαφορετικά είδη και έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στη φαρμακοβιομηχανία, στην βιομηχανία τροφίμων, μπαχαρικών και καλλυντικών (Farka et al., 2005). Τα είδη των φυτών που ανήκουν στο γένος *Salvia* καταλαμβάνουν ένα σημαντικό τμήμα της βιοποικιλότητας των αρωματικών/φαρμακευτικών φυτών απαριθμώντας τουλάχιστον 700 είδη. Εξαιτίας του μεγάλου αριθμού και της ποικιλίας των φαρμακευτικών φυτών, αποτελεί πρόκληση η ικανότητα αξιόπιστης διάκρισης τους από στενά συγγενικά είδη, προσμίξεις ή κατώτερα υποκατάστατα. Σε παγκόσμιο επίπεδο έχει προκύψει μια σειρά θεμάτων που σχετίζονται με την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα φυτικών φαρμακευτικών σκευασμάτων εξαιτίας του ανακριβούς προσδιορισμού του φυτικού υλικού. Για παράδειγμα, το φυτικό συστατικό *Stephaniae Tetrandrae Radix* (Fangji) που προέρχεται από το *Stephania tetrandra* S. Moore και χρησιμοποιείται σε χάπια μείωσης βάρους αντικαταστάθηκε από το *Aristolochiae Fangchi Radix* (Guangfangji) που προέρχεται από το *Aristolochia fangchi* με αποτέλεσμα την προοδευτική νεφρική ανεπάρκεια σε γυναίκες που έπαιρναν τα χάπια (Debelle et al., 2008). Θέματα ασφαλείας έχουν αναφερθεί και με τη χρήση *Periplocae Cortex* (Xiangjiari) που προέρχεται από το *Periploca sepium* Bge. Προέκυψαν ζητήματα δηλητηρίασης που βρέθηκε πως οφείλονταν σε αντικατάσταση του *Periplocae Cortex* με *Acanthopanax Cortex* (Wujiari) που προέρχεται από το *Acanthopanax gracilistylus* W.W. Smith (Gao et al., 2015). Σε αυτά τα παραδείγματα, η αιτία του προβλήματος ήταν ο ανακριβής προσδιορισμός των φυτικών συστατικών, καταδεικνύοντας πως για την ασφαλή χρήση των φυτικών φαρμάκων είναι αναγκαία προϋπόθεση η σωστή αναγνώριση των φυτικών συστατικών τους.

Οι παραδοσιακές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των φυτών περιλαμβάνουν μορφολογικές, μικροσκοπικές μεθόδους και χημική ταυτοποίηση. Οι μέθοδοι αυτές απαιτούν καταρτισμένο προσωπικό ενώ η αποτελεσματικότητά τους επηρεάζεται από παρόμοιες μορφολογικές ή χημικές δομές που εντοπίζονται

σε στενά συγγενικά είδη. Η ταυτοποίηση ειδών σε επίπεδο DNA παρέχει μεγαλύτερη αξιοπιστία διότι είναι ένα σταθερό μακρομόριο και βρίσκεται σε όλους τους ιστούς. Ως εκ τούτου, η ανάπτυξη δεικτών που βασίζονται σε DNA είναι σημαντική για την εξακρίβωση της γνησιότητας των φαρμακευτικών φυτών. Η τεχνική αυτή βασίζεται στη χρήση μικρού μεγέθους (<1000 nt) αλληλουχιών DNA είτε από το πυρηνικό γονιδίωμα είτε από πλασμιδιακό γονιδίωμα (Shilin et al., 2014).

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε η ανάλυση της περιοχής ITS1 και ITS2 σε ταξινομικά ταυτοποιημένα είδη του γένους *Salvia*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες τόσο της περιοχής ITS1 όσο και της περιοχής ITS2 αποτελούν εξαιρετικούς μοριακούς δείκτες για τη φυλογενετική ανάλυση των ειδών του γένους *Salvia*, γεγονός το οποίο συνάδει με τα συμπεράσματα άλλων ερευνητικών ομάδων (Wang et al., 2015).

Στην παρούσα μελέτη μοντελοποιήθηκε η συναινετική δευτεροταγής δομή της περιοχής ITS2. Λεπτομερής ανάλυση γενικών και ειδικών χαρακτηριστικών έδειξε ότι η συναινετική δευτεροταγής δομής της περιοχής ITS2 φέρει τόσο όλα τα γενικά χαρακτηριστικά όσο και τα συντηρημένα motifs, τα οποία έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία (Joseph et al., 1999, Coleman 2015). Η έλικα II είναι η περισσότερο συντηρημένη από τις άλλες έλικες και φέρει το μη-κανονικό ζεύγος βάσεων πυριμιδίνης-πυριμιδίνης (C-U ή U-U) (Mai and Coleman 1997, Schultz et al., 2005). Η έλικα III είναι μεγαλύτερη από όλες τις άλλες έλικες και φέρει κοντά στην κορυφή της μια συντηρημένη αλληλουχία TGGT (Coleman 2007, Schultz et al., 2005). Σημειώνεται το motif TGGT βρίσκεται κοντά στο σημείο εκτομής C2, το οποίο αποτελεί καθοριστικής σημασίας αλληλουχία για την επεξεργασία του πρόδρομου rRNA (Babiano et al., 2010). Η σταθερότητα της συναινετικής δομής μεταξύ αλληλουχιών της ITS2 περιοχής από διαφορετικά είδη φυτών τα οποία παρουσιάζουν σημαντική παραλλακτικότητα στην πρωτοταγή τους νουκλεοτιδική αλληλουχία, πιθανά να οφείλεται τόσο στην παρουσία των συντηρημένων motif τα οποία μετέχουν στη δημιουργία ελίκων όσο και στην παρουσία αντισταθμιστικών αλλαγών των βάσεων οι οποίες συντελούν στη διατήρηση της δομής και διαμόρφωσης κάθε μίας έλικας.

Σύγκριση της συναινετικής δευτεροταγούς δομής της περιοχής ITS2 με τα καταχωρημένα στη ITS2 Database II ατομικά μοντέλα δευτεροταγούς δομής της ITS2 της *S. fruticosa* ή της *S. officinalis* κατέδειξε ότι το συναινετικό μοντέλο παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα. Για παράδειγμα, η έλικα II της *S. officinalis I* φέρει το σωστό βρόχο (C-U) ενώ στην ITS2 δευτεροταγή δομή της *S. officinalis II* ο βρόχος απουσιάζει από την έλικα II, καταδεικνύοντας ότι στις καταχωρημένες στην ITS2 Database III δευτεροταγείς δομές της περιοχής ITS2 μπορεί να υπάρχουν παρεκκλίσεις. Ανάλυση της συναινετικής δευτεροταγούς δομής των καταχωρημένων *S. officinalis* ITS2 νουκλεοτιδικών αλληλουχιών έδειξε ότι αυτά τα λάθη εντοπίζονται και απαλείφονται (Εικόνα 23).

Η περιοχή ITS1, σε αντίθεση με την περιοχή ITS2, δε φαίνεται να διατηρεί μια ομοιόμορφη δευτεροταγή δομή στους διαφόρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Για παράδειγμα, στα Chlorobionta (Coleman et al., 1998, Gottschling et al., 2001), Cyphellophora (Gao et al., 2015), Dinoflagellates (Gottschling et al., 2004, Thornhill and Lord 2010) και στις ζύμες (vanNues et al., 1994) απαντώνται τέσσερις έλικες, στους Platyhelminthes (von der Schulenburg et al., 1999) επτά έλικες, στα Symbiodinium πέντε έλικες (Hunter et al., 2007) και στα αγγειόσπερμα τρεις έλικες (Goertzen et al., 2003). Η παρούσα μελέτη κατέδειξε ότι οι αλληλουχίες της περιοχής ITS1 στα είδη του γένους *Salvia* σχηματίζουν μια συναινετική δευτεροταγή δομή, η οποία φέρει έξι έλικες. Οι αλληλουχίες, οι οποίες μετέχουν στο σχηματισμό των ελίκων I, II και V φαίνεται να είναι συντηρημένες σε ένα μεγάλο αριθμό ειδών του γένους *Salvia* ενώ οι έλικες III, IV και VI παρουσιάζουν σημαντικό αριθμό CBCs γεγονός που υποδηλώνει ότι οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες σε αυτές τις έλικες μπορούν να αξιοποιηθούν στην διάκριση των ειδών του γένους *Salvia*.

Αρχικά, η έννοια του CBC αναφερόταν στην παρατήρηση ότι εφόσον οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες της περιοχής ITS2 δύο οργανισμών παρουσίαζαν έστω και μια αντισταθμιστική μεταβολή σε ένα ζεύγος βάσεων στις έλικες II και III, τότε οι δύο αυτοί οργανισμοί αποτελούσαν διακριτά είδη (Coleman, 2000). Ωστόσο, δύο οργανισμοί οι οποίοι δεν παρουσίαζαν CBC σε αυτές τις έλικες της περιοχής ITS2

δεν ήταν αναγκαίο να ανήκουν σε διαφορετικά είδη (Coleman, 2000). Το 2007, οι Müller et al. πρότειναν ότι η παρουσία CBC σε οποιαδήποτε έλικα της περιοχής ITS2 δύο οργανισμών μπορεί να αποτελεί κριτήριο για το διαχωρισμό τους σε δυο διακριτά είδη. Η αξιοποίηση και των δύο προσεγγίσεων στη μοριακή συστηματική οδήγησε στην ανακάλυψη νέων ειδών στα πράσινα φύκη (Bock et al., 2011, Demchenko et al., 2012).

Τα αποτελέσματα της φυλογενετικής ανάλυσης έδειξαν ότι η *S. officinalis* και η *S. fruticosa* ομαδοποιούνται σε δύο διακριτούς κλάδους ενώ η *S. calycina* και η *S. pomifera* ομαδοποιούνται σε ένα κλάδο. Τα αποτελέσματα αυτά σε συνδυασμό με την ανάλυση CBC καταδεικνύουν ότι η *S. officinalis* και η *S. fruticosa* αποτελούν διακριτά είδη εντός του γένους *Salvia* ενώ φαίνεται ότι η *S. pomifera* και η *S. calycina* να αποτελούν δύο πολύ συγγενικά είδη και πιθανά υποείδη.

Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της περιοχής ITS1 και ITS2 ειδών του γένους *Salvia* σε συνδυασμό με τη διερεύνηση της δευτεροταγούς δομής φαίνεται να παρέχουν αξιόπιστα εργαλεία για τη μοριακή ταυτοποίηση των ειδών και τη διάκριση συγγενικών ειδών. Ως εκ τούτου εκτιμάται ότι η περιοχή ITS1 και η περιοχή ITS2 συνδυαστικά αποτελούν εξαιρετικούς DNA barcoding δείκτες. Ωστόσο, είναι απαραίτητο η διερεύνηση αυτή να επεκταθεί σε περισσότερα είδη και υποείδη της *Salvia*, ώστε να επιβεβαιωθεί ότι η συναινετική δευτεροταγής δομή της περιοχής ITS1 παραμένει σταθερή όταν ο αριθμός των εξεταζόμενων ειδών της *Salvia* γίνει μεγάλος και φυλογενετικά πιο πολύπλοκος.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Alvarez I. and Wendel JF.,(2003). Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol Phylogenet Evol.* 29(3): 417–434.

Babiano R. and de la Cruz J.,(2010). Ribosomal protein L35 is required for 27SB prerRNA processing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research* , 38(15):5177-5192

Baldwin TO., Christopher JA., Raushel FM. et al., (1995). Structure of bacterial luciferase. *Curr Opin Struct Biol.* 5(6):798-809.

Bhattarai N. and Karki M., (2004). Medicinal and Aromatic Plants: Ethnobotany and Conservation Status. p. 523-532. In: Jeffery Burley (ed) *Medicinal, Food and Aromatic Plants —Encyclopedia of Forest Sciences.* Elsevier, Oxford.

Blaalid R., Kumar S., Nilsson RH. et al., (2013). ITS1 versus ITS2 as DNA metabarcodes for fungi. *Mol Ecol Resour.* 13(2):218-24.

Bock C., Krienitz L. and Pröschold T., (2011). Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (Trebouxiophyceae) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species. *Fottea* 11:293–312

Buchheim MA., Sutherl DM., Schleicher T. et al., (2012). Phylogeny of Oedogoniales, Chaetophorales and Chaetopeltidales (Chlorophyceae): inferences from sequence-structure analysis of ITS2. *Ann Bot.* 109(1):109-16.

Caisová L., Marin B., and Michael Melkonian M., (2011). A close-up view on ITS2 evolution and speciation - a case study in the *Ulvophyceae* (Chlorophyta, Viridiplantae). *BMC Evolutionary Biology*, 11:262.

Chen J., Chen F., Wang X. et al.,(2014). The forward and backward transport processes in the AOT/hexane reversed micellar extraction of soybean protein. *J Food Sci Technol.* 51(10):2851-6.

Coleman AW.,(2015). Nuclear rRNA transcript processing versus internal transcribed spacer secondary structure. *Trends Genet.* 31(3):157-63.

Coleman AW., (2007). Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure. *Nucleic Acids Res.* 35: 3322–3329.

Coleman AW.,(2003). ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends in Genetics.* 19(7):370-375.

Coleman AW., (2002). Comparison of Eudorina/Pleodorina ITS sequences of isolates from nature with those from experimental hybrids. *American Journal of Botany.* 89(9):1523-1530

Coleman AW., (2000). The significance of a coincidence between evolutionary landmarks found in mating affinity and a DNA sequence. *Protist.* 151(1):1-9

Coleman,AW., Preparata M., Mehrotra B. et al., (1998).Derivation of the secondary structure of the ITS-1 transcript in Volvocales and its taxonomical correlations. *Protist.* 149, 135±146.

Coleman AW. and Mai JC.,(1997). Ribosomal DNA and ITS-2 sequence comparisons as a tool for predicting genetic relatedness. *J Mol Evol.* 45(2): 168–177.

Dalampira E., (2013). Cultivation of plants of the genus *Salvia* (sage) Master's Thesis

Debelle FD., Vanherweghem JL. and Nortier JL., (2008). Aristolochic acid nephropathy: a worldwide problem. *Kidney Int*74:158-69

Demchenko E., Mikhailyuk T., Coleman AW. et al., (2012). Generic and species concepts in *Microglena* (previously the *Chlamydomonas monadina* group) revised using an integrative approach. *Eur J Phycol* 47:264–290

Dong W., Lu G., Yan L. et al., (2016). Characteristics of pellets with immobilized activated sludge and its performance in increasing nitrification in sequencing batch reactors at low temperatures. *J Environ Sci (China).* 42:202-9.

Elder F. and Turner J., (1995). Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *Q. Rev. Biol.* 70, 297–320

Elgavish T., Cannone J., Lee C., et al., (2001). AA. AG@ and helix ends: A: A and A: G basepairs at the ends of 16 S and 23 S rRNA helices. *J Mol Biol.* 310(4): 735–753.

Farka P., Holla M., Tekei J. et al., (2005). Composition of the essential oils from the flowers and leavers of *Salvia sclarea* L (Lamiaceae) cultivated in Slovak Republic *J. Essent. Oil Res* 17 (2). 141-144.

Gao L., Ma Y., Zhao W. et al.,(2015). Three New Species of Cyphellophora (Chaetothyriales) Associated with Sooty Blotch and Flyspeck. *PLoS ONE* 10(9):e0136857

Goertzen LR., Cannone JJ., Gutell RR., et al., (2003). ITS secondary structure derived from comparative analysis:implications for sequence alignment and phylogeny of the Asteraceae. *Mol Phylogenet Evol* 29:216–234

Goldman E., (1983). Mouse rDNA: sequences and evolutionary analysis of spacer and mature RNA regions. *Mol. Cell. Biol.* 3, 1488– 1509

Gottschling M. and Plotner J., (2004). Secondary structure models of the nuclear internal transcribed spacer regions and 5.8S rRNA in Calciodinelloideae (Peridiniaceae) and other dinoflagellates. *Nucl. Acids Research.* 32, 307-315.

Guo H., Mao H., Pan G. et al.,(2013). Antagonism of Cortex Periplocae extractinduced catecholamines secretion by Panax notoginseng saponins in cultured bovine adrenal medullary cells by drug combinations. *J Ethnopharmacol* 147; 447-55

Gutell R., Larsen L. and Woese R., (1994). Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiological Reviews* 58(1):10-26.

Griffor C., Vodkin, O., Singh, J., et al., (1991). Fluorescent in situ hybridization to soybean metaphase chromosomes. *Plant molecular biology*, 17(1), 101-109.

Harpke D. and Peterson A., (2008). Extensive 5.8S nrDNA polymorphism in *Mammillaria* (Cactaceae) with special reference to the identification of pseudogenetic internal transcribed spacer regions *J Plant Res.* 121(3):261-70.

Heinrichs L., Schmitz J., Flügge Ul. et al.,(2012). The Mysterious Rescue of *adg1-1/tpt-2* - an *Arabidopsis thaliana* Double Mutant Impaired in Acclimation to High Light - by Exogenously Supplied Sugars. *Front Plant Sci.* 30;3:265.

Hershkovitz A. and Zimmer A., (1996). Conservation patterns in angiosperm ITS2 sequences. *Nucleic Acids Res* 24: 2857–2867

Hollingsworth M., Graham W. and Little P., (2011). Choosing and using a plant DNA barcode. *PLoS One.* 6(5):e19254

Hillis M. and Dixon T., (1991). Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q Rev Biol.* 66(4):411-53.

Hunter L., LaJeunesse C. and Santos R., (2007). Structure and evolution of the rdna internal transcribed spacer (its) region 2 in the symbiotic dinoflagellates (symbiodinium, dinophyta) . *Journal of Phycology*, 43(1), 120-128.

Jobs V. and Thien B., (1997). A conserved motif in the 5.8S ribosomal RNA (rRNA) gene is a useful diagnostic marker for plant internal transcribed spacer (ITS) sequence. *Plant Mol Biol Rep* 15: 326–334.

Joseph N., Krauskopf E., Vera I., et al.,(1999). Ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) exhibits a common core of secondary structure in vertebrates and yeast. *Nucleic Acids Res.* 27(23): 4533–4540.

Karousou R., Vokou D. and Kokkini S., (1998). Variation of *Salvia fruticosa* essential oils on the island of Crete (Greece). *Bot Acta.* 111: 250-254.

Keller A., Forster F., Müller T., et.al., (2010). Including RNA secondary structures improves accuracy and robustness in reconstruction of phylogenetic trees. *BiolDirect*

Kintzios E. (Ed.). (2003). Sage: the genus *Salvia*. CRC Press.

Kress WJ. and Erickson DL., (2007). A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcl* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS One.* 6;2(6):e508.

Kress WJ., Wurdack KJ., Zimmer EA. et al., (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 7;102(23):8369-74.

Koetschan C., Förster F., Keller A. et al., (2010). The ITS2 Database III—sequences and structures for phylogeny. *Nucleic Acids Research*, 38(suppl 1), D275-D279.

Koetschan C., Kittelmann S., Lu J. et al., (2014). Internal transcribed spacer 1 secondary structure analysis reveals a common core throughout the anaerobic fungi (Neocallimastigomycota). *PLoS one*, 9(3), e91928.

Kjer KM., (1995). Use of rRNA secondary structure in phylogenetic studies to identify homologous positions: an example of alignment and data presentation from the frogs. *Mol Phylogenet Evol.* 4(3): 314–330

Li DZ., Gao LM., Li HT. et al.,(2011). Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108(49): 19641–19646.

Liu H., J Kohler J. and Fink GR., (1994) Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a STE12 homolog. *Science* 266(5191):1723-6

Liu JS. and Schardl CL., (1994).A conserved sequence in internal transcribed spacer 1 of plant nuclear rRNA genes. *Plant Mol Biol.* 26(2):775-8.

Mai C. and Coleman AW., (1997). The internal transcribed spacer 2 exhibits a common secondary structure in green algae and flowering plants.*Journal of Molecular Evolution*, 44(3):258-271

Melnikov S., Ben-Shem A., de Loubresse G. et al., (2012). One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nature structural & molecular biology*, 19(6), 560-567.

Müller T., Philippi N., Dandekar T. et al., (2007). Distinguishing species.*RNA*, 13(9):1469-1472.

Mullineux T. and Hausner G., (2009). Evolution of rDNA ITS1 and ITS2 sequences and RNA secondary structures within members of the fungal genera *Grosmannia* and *Leptographium*.*Fungal Genet Biol*, 46(11):855-67.

Osmundson J., Dewell S. and Darst SA., (2013). RNA-Seq reveals differential gene expression in *Staphylococcus aureus* with single-nucleotide resolution. *PLoS One.* 7;8(10):e76572.

Poczai, P. and Hyvönen, J., (2010). Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: problems and prospects. *Mol. Biol. Rep.* 37, 1897-1912.

Rampersad N., (2014). ITS1, 5.8 S and ITS2 secondary structure modelling for intra-specific differentiation among species of the *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* species complex. *Spriger Plus*, 3, 10.

Rivera D., Obon C. and Cano F., (1994). The botany, history and traditional uses of three-lobed sage (*salvia fruticosa* miller) (labiatae). *Economic Botany* 48(2):190-195.

Robba L., Russell S.J., Barker G.L. et al., (2006). Assessing the use of the mitochondrial *cox1* marker for use in DNA barcoding of red algae (Rhodophyta). *Am J Bot.* 93(8):1101-8.

Salvi D. and Mariottini P., (2012). Molecular phylogenetics in 2D: ITS2 rRNA evolution and sequence-structure barcode from Veneridae to Bivalvia. *Mol Phylogenet Evol.* 65(2):792-8.

Seibel P.N., Krüger J., Hartmeier S. et al., (2006). XML schemas for common bioinformatic data types and their application in workflow systems. *BMC Bioinformatics.* 6;7:490.

Schultz J., Stefanie M., Gerlach D., et al., (2007). A common core of secondary structure of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) throughout the Eukaryota. *RNA* 11: 361–364.

Schultz J., Maisel S., Gerlach D. et al., (2005). A common core of secondary structure of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) throughout the Eukaryota. *RNA* 11(4): 361–364.

Shilin C., Xiaohui P., Jingyuan S. et al., (2014). A renaissance in herbal medicine identification: From morphology. *Biotechnology Advances* 32 1237-1244

Song J., Shi L., Li D. et al., (2012). Extensive pyrosequencing reveals frequent intra-genomic variations of internal transcribed spacer regions of nuclear ribosomal DNA. *Plos One* 7, e43971

Tamura K., Stecher G., Peterson D. et al., (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*30: 2725-2729.

Tamura K., Nei M. and Kumar S., (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method, *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 101: 11030-11035.

Thornhill J. and Lord J.B., (2010). Secondary Structure Models for the Internal Transcribed Spacer(ITS) Region1 from Symbiotic Dinoflagellates. *Protist* 161, 434–451

Thompson J.D., Higgins D.G. and Gibson T.J., (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.

van Nues W., Rientjes J., van der Sande et al., (1994). Separate structural elements within internal transcribed spacer 1 of *Saccharomyces cerevisiae* precursor ribosomal RNA direct the formation of 17S and 26S rRNA. *Nucleic Acids Res.*, 22, 912-919.

von der Schulenburg J.H.G., Englisch U. and WaÈgele J.W., (1999). Evolution of ITS1 rDNA in the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda): 3' end sequence conservation and its phylogenetic utility. *J. Mol. Evol.*, 48, 2-12.

Wang C., Liu C., Huang, L. et al., (2015). ITS1: a DNA barcode better than ITS2 in eukaryotes?. *Molecular ecology resources*, 15(3), 573-586

Will S., Joshi T., Hofacker IL. et al., (2012). LocARNA-P: Accurate boundary prediction and improved detection of structured RNAs for genome-wide screens. *RNA* 18:900-14;

Wolf M., Achziger M., Schultz J., et al., (2005). Homology modeling revealed more than 20,000 rRNA internal transcribed spacer 2 (ITS2) secondary structures. *Bioinformatics* 11: 1616–1623.

Yao H., Song J., Liu C. et al.,(2010). Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. *PLoS One* 5(10): e13102.

Zuker M., (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31(13): 3406–3415

Δρ. Μαλούπα Ε., Δρ.Γρηγοριάδου Κ.,και Δρ. Λάζαρη Δ., (2012) Καλλιέργεια, μεταποίηση και διασφάλιση ποιότητας των ελληνικών αρωματικών-φαρμακευτικών φυτών: βασικές αρχές καθετοποιημένης παραγωγής.
www.sv2bbo.com/download/medplants2012.pdf

Καρούσου Ρ. (1995). Ταξινόμηση προσέγγιση της οικογένειας *Labiatae* στην Κρήτη. Εξάπλωση, μορφολογία και αιθέρια έλαια. Διαθέσιμο online <http://hdl.handle.net/10442/hedi/10670>

Κατσιώτης Σ. και Χατζοπούλου Π. (2010). Αρωματικά φαρμακευτικά φυτά και αιθέρια έλαια: Παραγωγή, επεξεργασία, μεταποίηση, αξιοποίηση, διεθνείς αγορές, αρωματοθεραπεία, 976σ. · 27x18εκ. ISBN 978-960-467-186-1.

ΣΥΝΘΕΣΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

Διαλύματα απομόνωσης ολικού γονιδιωματικού DNA από φυτικό ιστό

1. CTAB: 2% CTAB, 100 mM Tris-HCl (pH 8), 20 mM EDTA (Ph 8), 1.4 M NaCl, 1% PVP-40
2. SEVEG: χλωροφόρμιο: ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογία 25:24:1
3. BE: 100 mM Tris-HCl pH 8,0 , 1 mM EDTA.

Διαλύματα για εκχύλιση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο βρασμού

4. STET Medium: Σακχαρόζη 8%, Triton-X 100 5%, 50 mM Tris-HCl pH 8,50 mM EDTA pH 8 5. Διατήρηση στους 4 °C.
5. Διάλυμα λυσοζύμης: Ανά 1 ml αποστειρωμένου ddH₂O διαλύονται 50 mg λυσοζύμης. Διατήρηση στους -20 °C.

Διαλύματα ανάλυσης νουκλεϊνικών οξέων

6. RNAse A: 10 mg RNAse A διαλύονται σε 1 ml 10 mM Tris-HCl pH 7,5/15 mM NaCl. Το διάλυμα θερμαίνεται στους 100⁰C για 15 λεπτά, με σκοπό την αδρανοποίηση τυχόν δράσης DNase, αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου και φυλάσσεται στους -20°C.
7. 1 x TAE: Αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα 50 x TAE το οποίο αραιώνεται 50 φορές. 50 x TAE: διαλύονται 242g Tris base, 57,1 ml οξικού οξέος και 100ml 0,5 M EDTA pH 8,0 σε ddH₂O, μέχρι τελικό όγκο 1lt.
8. Βρωμιούχο αιθίδιο: Το βρωμιούχο αιθίδιο παρασκευάζεται ως πυκνό διάλυμα 0,5 mg/ml σε dH₂O και φυλάσσεται στους 4 °C. Η τελική συγκέντρωση του βρωμιούχου αιθιδίου στην πηκτή είναι 0,5μg/ml.
9. Διάλυμα φόρτωσης (Loading buffer): 0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανό του ξυλενίου και 30% γλυκερόλη.

Διαλύματα μετασχηματισμού κυττάρων *E.coli*

10. IPTG 1M (Μοριακό Βάρος: 238.31): Ανά 1 ml αποστειρωμένου ddH₂O διαλύονται 0,23831 g IPTG. Αποστείρωση του διαλύματος με φιλτράρισμα αυτού μέσα από διηθητικό φίλτρο (0.22 μm). Διατήρηση στους -20 °C.
11. 2% X-Gal: 0,02 g X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosidase, SIGMA) προστίθενται σε 1 ml διμεθυλ-φορμαμίδιο (Sigma). Διατήρηση στους -20 °C.

ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΕΧΝΗΤΩΝ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΜΕΣΩΝ

12. LB: Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης βακτηρίων *E. coli*

Για την παρασκευή 1 lt θρεπτικού διαλύματος LB, σε τελικό όγκο 1 lt dH₂O προστίθενται 10 g NaCl, 10 g Bacto-Trypton (Casein) και 5 g Yeast extract. Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου σε τρυβλία, προστίθεται στο διάλυμα 1,5% άγαρ. Ακολουθεί αποστείρωση για 20 λεπτά στους 121°C. Μετά την αποστείρωση του υλικού, αφήνουμε το θρεπτικό να κρυώσει, και μετά προστίθεται αντιβιοτικό αμπικιλίνης (100 mg/ml) σε αναλογία 1:1000. Το υγρό θρεπτικό μέσο φυλάσσεται σε φιαλίδια MacCartney σε θερμοκρασία δωματίου ενώ τα τρυβλία με το στερεό μέσο φυλάσσονται στους 4°C

ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Διάλυμα αμπικιλίνης (100 mg/ml): Ανά 1 ml αποστειρωμένου ddH₂O διαλύονται 100 mg αμπικιλίνης. Αποστείρωση του διαλύματος με φιλτράρισμα αυτού μέσα από διηθητικό φίλτρο (0,22 μm). Διατήρηση στους -20 °C.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β΄

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ

5.8S

>*S.sclarea*

TGTCATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCC
GTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA

>*S.fruticosaF*

TGTCAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCCCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCC
GTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA

>*S.fruticosaK*

TGTCAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCCCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCC
GTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA

>*S.officinalisH*

TGTCAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCC
GTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA

>*S.officinalis*

TGTCAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCC
GTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA

>*S.aethiopica*

TGTCATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCC
GTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA

>*S.calycina*

TGTCAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCC
GTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA

>*S.hispanica*

TGTCATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCC
GTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA

>*S.pomifera*

TGTCAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCC
GTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA

ITS1

>*S.fruticosa*F

GTCGAAACCTGCAAAGCAGACCGCGAACACGTCACTAACACCATCCGACGGTGCATGGCGTGGGGGCGACCCCGTCCTGTTCCCGTCACCC
CCGCCCGCGTGTTCATCGGGTACGTCTGTGGGCTAACGAACCCCGGCGCGGAATGCGCCAAGGAAAACCAAACGAAGCATCCTCCCC
CGCGCCCGTTCGCGGAGTGTGCGGGGGCGTCGGATGTCTATCAA

>*S.fruticosa*K

GTCGAAACCTGCAAAGCAGACCGCGAACACGTCACTAACACCATCCGACGGTGCATGGCGTGGGGGCGACCCCGTCCTGTTCCCGTCACCC
CCGCCCGCGTGTTCATCGGGTACGTCTGTGGGCTAACGAACCCCGGCGCGGAATGCGCCAAGGAAAACCAAACGAAGCATCCTCCCC
CGCGCCCGTTCGCGGAGTGTGCGGGGGCGTCGGATGTCTATCAA

>*S.officinalis*H

GTCGAAACCTGCAAAGCAGACCGCGAACACGTGACTAACACCGACTGACGGTGCATGGCGTGGGGGCGACCCCGTCCTGTTCCCGTCACCC
CCGCCCGCGTGTTCATCGGGTACGTCTGTGGGCTAACGAACCCCGGCGCGGAATGCGCCAAGGAAAACCAAACGAAGCATCCTCCCC
CCCGCCCGTTCGCGGAGTGTGCGGGGGCGTCGGATGTCTATCAA

>*S.officinalis*

GTCGAAACCTGCAAAGCAGACCGCGAACACGTGACTAACACCGACTGACGGTGCATGGCGTGGGGGCGACCCCGTCCTGTTCCCGTCACCC
CCGCCCGCGTGTTCATCGGGTACGTCTGTGGGCTAACGAACCCCGGCGCGGAATGCGCCAAGGAAAACCAAACGAAGCATCCTCCCC
CCCGCCCGTTCGCGGAGTGTGCGGGGGCGTCGGATGTCTATCAA

>*S.aethiopica*

GTCGAAACCTGCAAAGCAGACCGCGAACACGTGTTAACACCGACCGGCGCACGGCTCGGGGGCGACCCCGTCCGTGCCCGCTCGA
CCCCGCCCGCGTTCCTCGGGTGCAGCGGGCGGGCTAACGAACCCCGGCGCGGAATGCGCCAAGGAAAACCAAACGAAGCATCCTCCCC
CCCGCGCCCGTTCGCGGAGTGTGCGGGGGCGTCGGGCGTCTATCAA

>*S.calycina*

GTCGAAACCTGCAAAGCAGACAGCGAACCCGTGACTAACACCGACCGGCGCACGGCGTGGGGGCGACCCCGTCCGTGTTCCCGTCACC
CCGCCCGCGTGTTCATCGGGTACGTCTGTGGGCTAACGAACCCCGGCGCGGAATGCGCCAAGGAAAACCAAACGAAGCATCCTCCCC
CCCGCCCGTTCGCGGAGTGTGCGGGGGCGTCGGATGTCTATCAA

>*S.hispanica*

GTCGATACCTGCAAAGCAGACAGCGAACTCGTGTAAACACCGGCGGCGGCGGGGGCGATCCCGTCCCGGCTCGTCTCCCCGGCC
GGCGTGCTCCCTCGGGCCACGGTGCAGGGCTAACGAACCCCGGCGCGGAATGCGCCAAGGAATACTCAACGAAGCGTCTCCCCCGCAC
CCCGTTCGCGGACCGTGTGGGGGCGACCGATGTCTCGAAA

>*S.pomifera*

GTCGAAACCTGCAAAGCAGACAGCGAACCCGTGACTAACACCGACCGGCGCACGGCGTGGGGGCGACCCCGTCCGTGTTCCCGTCACC
CCGCCCGCGTGTTCATCGGGTACGTCTGTGGGCTAACGAACCCCGGCGCGGAATGCGCCAAGGAAAACCAAACGAAGCATCCTCCCC
CCCGCCCGTTCGCGGAGTGTGCGGGGGCGTCGGATGTCTATCAA

ITS2

>*S.fruticosa*F

CGCATCGCGTCGCCCCCGCCCTCCGTGCGCACAGCGCCCGTTGGGGGAGGGGGGGCGGATATTGGCCTCCCGTGCTCCTCGGCGCGCG
GCTGGCCCAAATGCGATCCCTCGGCGACTCATGTACGACAAGTGGTGGTTGAACAACCTCAATCTCGCGCGCCGTCGTGCCACTGCGTCGTC
CGCTCGGGCATCCATCAACGACCCAACGGTGCCGGTGCCTCACAGCTCGCACCTTCGACCG

>*S.fruticosa*K

CGCATCGCGTCGCCCCCGCCCTCCGTGCGCACAGCGCCCGTTGGGGGAGGGGGGGCGGATATTGGCCTCCCGTGCTCCTCGGCGCGCG
GCTGGCCCAAATGCGATCCCTCGGCGACTCATGTACGACAAGTGGTGGTTGAACAACCTCAATCTCGCGCGCCGTCGTGCCACTGCGTCGTC
CGCTCGGGCATCCATCAACGACCCAACGGTGCCGGTGCCTCACAGCTCGCACCTTCGACCG

>*S.officinalis*H

CGCATCGCGTCGCCCCCACCGTGCACAGCGCCCGCTGTGGGGGGGCGGATATTGGCCTCCCGTGCTCCTCGGCGTGC GGCTGGCCCA
AATGCGATCCCTCGGCGACTCATGTACGACAAGTGGTGGTTGAACAACCTCAATCTCGCGCGCCGTCGTGCCACTGCGTCGTCGGCTGGGC
ATCCATCAACGACCCAACGGTGCCGGTGCCTCGCAGCACCCACCTTCGACCG

>*S.officinalis*

CGCATCGCGTCGCCCCCACCGTGCACAGCGCCCGCTGTGGGGGGGCGGATATTGGCCTCCCGTGCTCCTCGGCGTGC GGCTGGCCCA
AATGCGATCCCTCGGCGACTCATGTACGACAAGTGGTGGTTGAACAACCTCAATCTCGCGCGCCGTCGTGCCACTGCGTCGTCGGCTGGGC
ATCCATCAACGACCCAACGGTGCCGGTGCCTCGCAGCACCCACCTTCGACCG

>*S.aethiopica*

CGCATCGCGTCGCCCCACCATGTGCGGGGGCGGATACTGGCCTCCCGTGCGCCCCGGCGCGGGCTGGCCCAAATGCGATCCCTCGGCG
ACTCATGTACGACAAGTGGTGGTTGAAATCTCAATCTCTTGCGCCGTCGTGCCACTGCGTCGTCGGTAAGGGCATCCATCAACGACCCAACG
GCCGGTGCCTCGGGCGCCCCGACCTTCGACCG

>*S.calycina*

CGCATCGCGTCGCTCCCGCCCTCCCGTGCACAGCGCCCGCTGTGGGGGGGGGGGGCGGATATTGGCCTCCCGTGCTCCTCGGCGTG
CGGCTGGCCCAAATGCGATCCCTCGGCGACTCATGTACGACAAGTGGTGGTTGAACAACCTCAATCTCGCGCGCCGTCGTGCCACTGCGTCG
TCCGCTTGGGCATCCATCAACAACCCAACGGTGCCGTGCCTCACAGCACCCACCTTCGACCG

>*S.hispanica*

CGCATCGCGTCGCCCCCGCCCGCGCGCTTAGCGAAAGGGCGGGGAGCGGAGACTGGCCTCCCGTTGCCATTGGTGTGCGGCTGGCCCA
AATGCGATCCCTCGGCGACTCGCGTCACGGCAAGTGGTGGTTGAACAACCTCAATCTTGCGCCGTCGTGCCGTTGTGTCGTTCTTACGGGTGT
CGAAAAACGACCTGCGGTGCGGGGCCTCACGGCTCCTCACCTTCGACCG

>*S.pomifera*

CGCATCGCGTCGCCCCCGCCCTCCGTGCGCACAGCGCCCGCTGTGGGGGGGGGGGGCGGATATTGGCCTCCCGTGCTCCTCGGCGTGC GGCTGG
CCCAAATTCGATCCCTCGGCGACTCATGTACGACAAGTGGTGGTTGAACAACCTCAATCTCGCGCGCCGTCGTGCCACTGCGTCGTCGGCTTG
GGCATCCATCAACGACCCAACGGTGCCGTGCCTCACAGCACCCACCTTCGACCG