

# ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΥΠΟΔΟΜΩΝ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΔΗΜΗΤΡΑ Γ. ΔΟΥΚΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ανάλυση της ενδομεταγραφόμενης περιοχής (ITS) του πυρηνικού ριβοσωμικού (nrDNA) και του χλωροπλαστικού DNA (psbA-trnH) σε είδη του γένους *Salvia*



ΑΘΗΝΑ 2016

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

**Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας**

**Αγρο-βιοτεχνολογία Φυτών και Μικροοργανισμών Γεωργικής Σημασίας**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Ανάλυση της ενδομεταγραφόμενης περιοχής (ITS) του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA (nrDNA) και του χλωροπλαστικού DNA (psbA-trnH) σε είδη του γένους *Salvia***

**ΔΗΜΗΤΡΑ Γ. ΔΟΥΚΑ**

**ΑΘΗΝΑ 2016**

**Επιβλέπων Καθηγητής: Παναγιώτης Κατινάκης**

## **ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Ανάλυση της ενδομεταγραφόμενης περιοχής (ITS) του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA (nrDNA) και του χλωροπλαστικού DNA (psbA-trnH) σε είδη του γένους *Salvia***

**ΔΗΜΗΤΡΑ Γ. ΔΟΥΚΑ**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Παναγιώτης Κατινάκης, Καθηγητής (Επιβλέπων)**

**Δημήτριος Μπουράνης, Καθηγητής (Μέλος)**

**Γεώργιος Καραμπουρνιώτης, Καθηγητής (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.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Παναγιώτη Κατινάκη πρωτίστως για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για την καθοδήγησή του όλο αυτόν τον καιρό. Η βοήθειά του κατά την διεξαγωγή του πειράματος καθώς και κατά την συγγραφή της μεταπτυχιακής μελέτης ήταν καθοριστική.

Θερμές ευχαριστίες στα μέλη της Εξεταστικής και Συμβουλευτικής Επιτροπής Καθηγητή Μπουράνη Δημήτριο και Καθηγητή Καραμπουρνιώτη Γεώργιο, για τη συμμετοχή τους στην τριμελή Επιτροπή και την ανάγνωση της μεταπτυχιακής διατριβής.

Έπειτα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Διδάκτορα Βεζύρη Έλενα για την καθοδήγηση, τις γνώσεις και τις συμβουλές της στην πραγματοποίηση του πειραματικού μέρους, την Λέκτορα Δήμου Μαρία καθώς και την Διδάκτορα Βενιεράκη Αναστασία για την πολύτιμη βοήθεια τους.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον μεταπτυχιακό φοιτητή και φίλο μου Σπαντίδο Τάσο καθώς και το υπόλοιπο επιστημονικό προσωπικό του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία και την βοήθεια τους.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στα άτομα που είναι κοντά μου και κυρίως την οικογένειά μου, τους γονείς μου Γιώργο και Ελένη και τα αδέρφια μου Λευτέρη και Μαριλένα που με στήριζαν ψυχολογικά και οικονομικά.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	9
SUMMARY .....	10
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
1.1 Γενικά για τα ριβοσώματα .....	11
1.2 Μεταγραφή του 45S rDNA και επεξεργασία του πρόδρομου rRNA .....	13
1.3 ITS1 και ITS2 δευτεροταγείς δομές.....	15
1.4 Εναρμονισμένη εξέλιξη .....	17
1.5 Το ITS1 και ITS2 ως γραμμωτός κώδικας DNA.....	19
1.6 Γενικά για τα φαρμακευτικά φυτά.....	23
1.7 Το γένος <i>Salvia</i> .....	24
1.8 Είδη του γένους <i>Salvia</i> στην Ελλάδα .....	26
1.9 Μερικά είδη του γένους <i>Salvia</i> .....	27
1.9.1 <i>Salvia bucharica</i> .....	27
1.9.2 <i>Salvia cadmica</i> .....	27
1.9.3 <i>Salvia calycina</i> .....	28
1.9.4 <i>Salvia digitaloides</i> .....	28
1.9.5 <i>Salvia dominica</i> .....	29
1.9.6 <i>Salvia fruticosa</i> .....	30
1.9.7 <i>Salvia glutinosa</i> .....	30
1.9.8 <i>Salvia hians</i> .....	31
1.9.9 <i>Salvia lavandulaefolia</i> .....	32

1.9.10 <i>Salvia namaensis</i> .....	32
1.9.11 <i>Salvia officinalis</i> .....	33
1.9.12 <i>Salvia pratensis</i> .....	34
1.9.13 <i>Salvia sclarea</i> .....	34
1.9.14 <i>Salvia transsylvanica</i> .....	35
1.9.15 <i>Salvia verbenaca</i> .....	35
1.9.16 <i>Salvia virgata</i> .....	36
2.ΣΚΟΠΟΣ .....	37
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	38
3.1 Φυτικό υλικό .....	38
3.2 Μοριακή ανάλυση.....	39
3.2.1 Απομόνωση ολικού DNA από το φυτικό ιστό.....	39
3.2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) .....	40
3.2.2.1 Αρχή της μεθόδου .....	40
3.2.2.2 Ενίσχυση τμήματος DNA (PCR).....	42
3.2.2.3 Ενίσχυση τμήματος της περιοχής ITS .....	43
3.2.2.4 Ενίσχυση τμήματος της περιοχής psbA- trnH .....	44
3.2.3 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτή αγαρόζης .....	45
3.2.4 Ανάκτηση κλάσματος DNA από πηκτή αγαρόζης.....	47
3.2.5 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων .....	48
3.2.6 Υποκλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακό φορέα .....	49
3.2.6.1 Χαρακτηριστικά πλασμιδιακού φορέα.....	49
3.2.6.2 Ενσωμάτωση τμημάτων DNA με τυφλά άκρα στον πλασμιδιακό φορέα (ligation).....	50

3.2.7 Μετασηματισμός ικανών κυττάρων <i>E. coli</i> με πλασμίδιο .....	51
3.2.7.1 Καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i> σε υγρό και στερεό υπόστρωμα.....	51
3.2.7.2 Δημιουργία βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i> ικανών για μετασηματισμό (Competent cells).....	51
3.2.7.3 Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i> με πλασμίδιο .....	52
3.2.7.4 Επιλογή μοναδικής αποικίας .....	53
3.2.8 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασηματισμένα κύτταρα <i>E. coli</i> .....	53
3.2.8.1 Μέθοδος βρασμού (Boiling Preparation), (Holmes & Quigley, 1981).....	54
3.2.8.2 Μέθοδος απομόνωσης με στήλη (QIA prep).....	55
3.3 Σύγκριση αλληλουχιών και φυλογενετική ανάλυση.....	58
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	59
4.1 Χαρακτηριστικά της περιοχής ITS .....	59
4.1.1 Γενετική παραλλακτικότητα των περιοχών ITS1 και ITS2 .....	61
4.1.2 Φυλογενετική ανάλυση των ειδών του γένους <i>Salvia</i> με βάση τις αλληλουχίες τις περιοχής ITS1 ή της περιοχής ITS2 .....	63
4.1.3 Διερεύνηση της δευτεροταγούς δομής των περιοχών ITS1 και ITS2.....	65
4.1.3.1 Ανάλυση της δευτεροταγούς δομής της περιοχής ITS1.....	65
4.1.3.2 Ανάλυση της δευτεροταγούς δομής της περιοχής ITS2.....	68
4.1.4 Ανάλυση της συναινετικής δευτεροταγούς δομής της περιοχής ITS1και ITS2 .....	72
4.1.5 Ανάλυση της δευτεροταγούς δομής της περιοχής 5.8S.....	73
4.2 Χαρακτηριστικά της περιοχής psbA-trnH. ....	76
4.2.1 Ανάλυση της πρωτοταγούς δομής των αλληλουχιών της psbA-trnH .....	76
4.2.2 Ανάλυση της δευτεροταγούς δομής των αλληλουχιών της psbA-trnH .....	78
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	81
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	84

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α΄ .....	94
ΣΥΝΘΕΣΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ .....	94
ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΕΧΝΗΤΩΝ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΜΕΣΩΝ .....	95
ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ .....	95
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β΄ .....	96
ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ .....	96



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη μελέτη μας, συλλέχθηκαν 15 δείγματα από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές. Αυτά τα δείγματα αντιπροσωπεύονται από 15 διαφορετικά είδη του γένους *Salvia*. Η περιοχή ITS του πυρηνικού γονιδιώματος καθώς και η περιοχή psbA-trnH από το χλωροπλαστικό γονιδίωμα, ενισχύθηκαν με την τεχνική της PCR χρησιμοποιώντας καθολικούς εκκινητές και στην συνέχεια τα προϊόντα της αντίδρασης PCR κλωνοποιήθηκαν και αλληλουχήθηκαν. Η διερεύνηση της βάσης δεδομένων (NCBI) έδειξε ότι τόσο οι ITS αλληλουχίες όσο και οι psbA-trnH αλληλουχίες παρουσιάζουν σημαντική ομολογία αλληλουχιών (>93%) μόνο με είδη του γένους *Salvia*. Φυλογενετική ανάλυση με βάση της περιοχή ITS2 ή την ITS1 έδειξε ότι υπήρχε σημαντική γενετική απόκλιση μεταξύ στα διάφορα είδη του γένους *Salvia*. Επιπλέον, αναλύθηκε η δευτεροταγής δομή των περιοχών ITS1 και ITS2. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η συναινετική δευτεροταγής δομή των περιοχών ITS1 και ITS2 παρείχε σημαντικές πληροφορίες στην διάκριση των ειδών του γένους *Salvia*. Αναλύθηκε επίσης η περιοχή psbA-trnH διαφόρων ειδών *Salvia*. Τα δεδομένα έδειξαν ότι η διαγονιδιακή περιοχή psbA-trnH σε συνεργασία με άλλους μοριακούς δείκτες του γραμμωτού κώδικα DNA μπορεί να προσθέσει κάποιες πληροφορίες και να βελτιώσει την διάκριση των ειδών.

**Λέξεις κλειδιά:** *Salvia sp*, ITS, psbA-trnH, δευτεροταγείς δομές, γραμμωτός κώδικας DNA.

## SUMMARY

In our study, 15 samples were collected from different geographical regions; these samples represented 15 species and contained different species of the genus *Salvia*. The ITS (ITS1, 5.8S και ITS2) and the psbA-trnH region from the nuclear and the chloroplast genome respectively was amplified from these samples using universal primers and reaction conditions, cloned and subsequently sequenced. BLASTN analysis demonstrated that ITS2 or the ITS1 showed high homology (>93%) only with *Salvia* species. Phylogenetic analysis based on ITS1 or ITS2 demonstrated that there was significant genetic divergence among the examined *Salvia* species. In addition, the secondary structure of ITS2 and ITS1 was analyzed. The consensus secondary structure of ITS1 and ITS2 regions provided the means to recognize clear differences among the *Salvia* species. The psbA-trnH region of several *Salvia* species was also analyzed. The data demonstrated that incorporating psbA-trnH intragenomic region to the core DNA barcodes may improve may add some information in species discrimination.

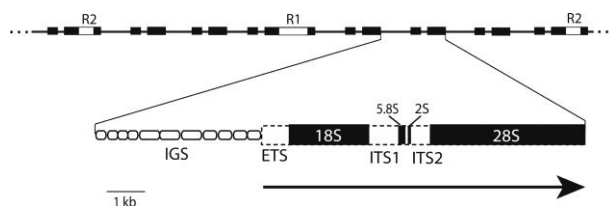
**Keywords:** *Salvia sp*, ITS, psbA-trnH, secondary structures, barcoding DNA.

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Γενικά για τα ριβοσώματα

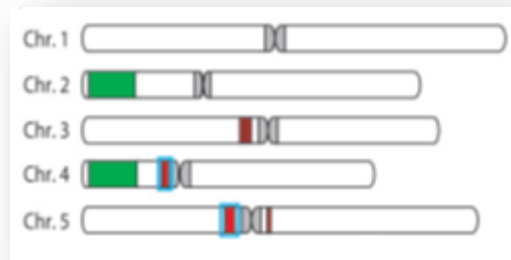
Τα ριβοσώματα αποτελούν τα κέντρα μετατροπής της γενετικής πληροφορίας η οποία κωδικοποιείται στα mRNA σε πρωτεΐνες. Πρόκειται για μικροσκοπικά σωματίδια, με διάμετρο ~20nm και εντοπίζονται με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Αποτελούνται από RNAs και πρωτεΐνες. Το ποσοστό των ριβοσωμικών RNAs, (rRNAs), καταλαμβάνει το ~ 65 % του ριβοσώματος και το υπόλοιπο, αποτελείται από πρωτεΐνες. Τα ριβοσώματα όλων των κυττάρων αποτελούνται από δυο υπομονάδες διαφορετικού μεγέθους, τη μικρή (SSU) και τη μεγάλη (LSU), οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους. Στου ευκαρυώτες το ριβόσωμα είναι γνωστό ως 80S και οι υπομονάδες του ως 40S και 60S, μικρή και μεγάλη υπομονάδα αντίστοιχα. Καθεμία από τις υπομονάδες περιλαμβάνει χαρακτηριστικά rRNAs και ριβοσωμικές πρωτεΐνες (Poczai and Hyvönen, 2010).

Το πυρηνικό γονιδίωμα των ευκαρυωτικών οργανισμών φιλοξενεί δεκάδες ή και χιλιάδες αντίγραφα ριβοσωμικού DNA (rDNA). Κάθε αντίγραφο rDNA αποτελείται από τα 18S, 5.8S και 25-28S rRNAs γονίδια και συχνά αναφέρεται ως rDNA οπερόνιο ή 45S rDNA. Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που βρίσκονται μεταξύ του 18S rRNA 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 των 5.8S και 25-28S rRNA γονιδίων αναφέρονται ως ενδομεταγραφόμενη περιοχή 2 του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA (Internal Transcribed Spacer 2, ITS2). Τα αντίγραφα rDNA οργανώνονται ως διαδοχικές επαναλήψεις σε διάταξη *κεφαλή-ουρά* σε μία ή περισσότερες θέσεις στο γονιδίωμα. Κάθε αντίγραφο rDNA διαχωρίζεται από το γειτονικό του στη συστοιχία με μία αλληλουχία νουκλεοτιδίων η οποία αναφέρεται ως διαγωνιδιακή περιοχή (Integenic Spacer, IGS) (Poczai and Hyvönen, 2010; Lafontaine, 2015) (Εικόνα 1.1).

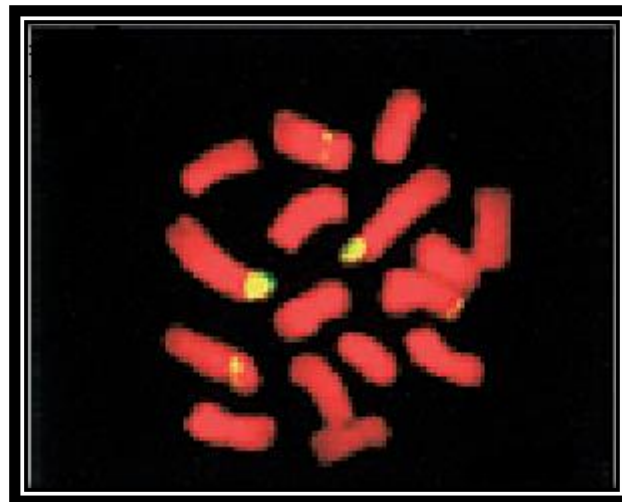


**Εικόνα 1.1:** Διάγραμμα ενός τυπικού γονιδιακού τύπου *Drosophila* rRNA. Στο πάνω μέρος είναι η σειρά που επαναλαμβάνεται η δομή του τύπου με μόνο τα γονίδια 18S και 28S να υποδεικνύονται. Τα R1 και R2 στοιχεία (λευκά κουτιά) που εισάγεται μέσα στο γονίδιο 28S του 25% -50% των μονάδων (Lathe *et al.*, 1995; Lathe και Eickbush, 1997). Η διευρυμένη περιοχή παρουσιάζει μια πιο λεπτομερή εικόνα της οργάνωσης της πλήρους μονάδας rDNA που βρέθηκε σε όλα τα είδη *Drosophila* που μελετήθηκαν. Εκτός από τα 18S, 5.8S, και τα γονίδια 28S, στα έντομα υπάρχουν μονάδες rDNA που περιέχουν επίσης ένα γονίδιο 2S (Jordan *et al.*, 1976). Η μεταγραφόμενη περιοχή της μονάδας υποδεικνύεται από το οριζόντιο βέλος στο κάτω μέρος. Οι γονιδιακές περιοχές εμφανίζονται ως μαύρα κουτιά, η εξωτερική μεταγραφόμενη περιοχή (ETS) και οι εσωτερικές μεταγραφόμενες περιοχές (ITS1 και ITS2) εμφανίζονται ως διακεκομμένα κουτιά. Η διαγονιδιακή περιοχή IGS, κατά κύριο λόγο αποτελείται από επιμέρους εσωτερικές επαναλήψεις (στρογγυλεμένα κουτιά). Η IGS διαφορετικών μονάδων ποικίλλει σε μήκος λόγω των διαφορών στον αριθμό των αντιγράφων κάθε επιμέρους επανάληψης (subrepeat).

Ο πυρηνίσκος αποτελεί μια δυναμική δομή του πυρήνα χωρίς μεμβράνη, και συγκροτείται γύρω από δέσμες διαδοχικά επαναλαμβανόμενων ριβοσωμικών γονιδίων, (rDNA γονιδίων), τα οποία μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση I. Οι περιοχές αυτές ονομάζονται οργανωτές πυρηνίσκου, (Nucleolar Organiser Regions, NOR), και αποτελούν τη βάση της δομικής οργάνωσης του πυρηνίσκου, προκειμένου να στρατολογηθούν όλα τα απαραίτητα συστατικά επεξεργασίας και συγκρότησης που απαιτούνται για τη βιοσύνθεση των ριβοσωμάτων (Dundr *et al.*, 2001; Mélése and Xue, 1995; Olson *et al.*, 2000; Scheer *et al.*, 1999). Τα NORs ενεργοποιούνται όταν αρχίζει η μεταγραφή των rDNA γονιδίων. Τα ενεργά NORs κατά τη διάρκεια της μεσόφασης (interphase), παραμένουν σχετικά αποσυμπυκνωμένα σε μετάφαση σχηματίζοντας μια δομή η οποία αναφέρεται ως δευτερογενής σύσφιξη (Lam *et al.*, 2005; Shaw και Doonan, 2005). Για παράδειγμα, περίπου 570 - 750 αντίγραφα γονιδίων του 45S rDNA ανά απλοειδές γονιδίωμα διατάσσονται σε συστοιχίες κεφαλή-ουρά και βρίσκονται στις άκρες των βραχέων βραχιόνων των χρωμοσωμάτων 2 και 4 (NOR2 και 4) στο *Arabidopsis thaliana* (Εικόνα 1.2).



**Εικόνα 1.2:** Σχηματική αναπαράσταση της θέσης των συστοιχιών του 5S και του 45S rDNA στα χρωμοσώματα της *A. thaliana*. Οι συστοιχίες των 5S (κόκκινο) και οι NOR (πράσινο). Το μέγεθος της NOR2 και NOR4 είναι παρόμοιο και εκτείνεται 3.5–4.0 Mbp.



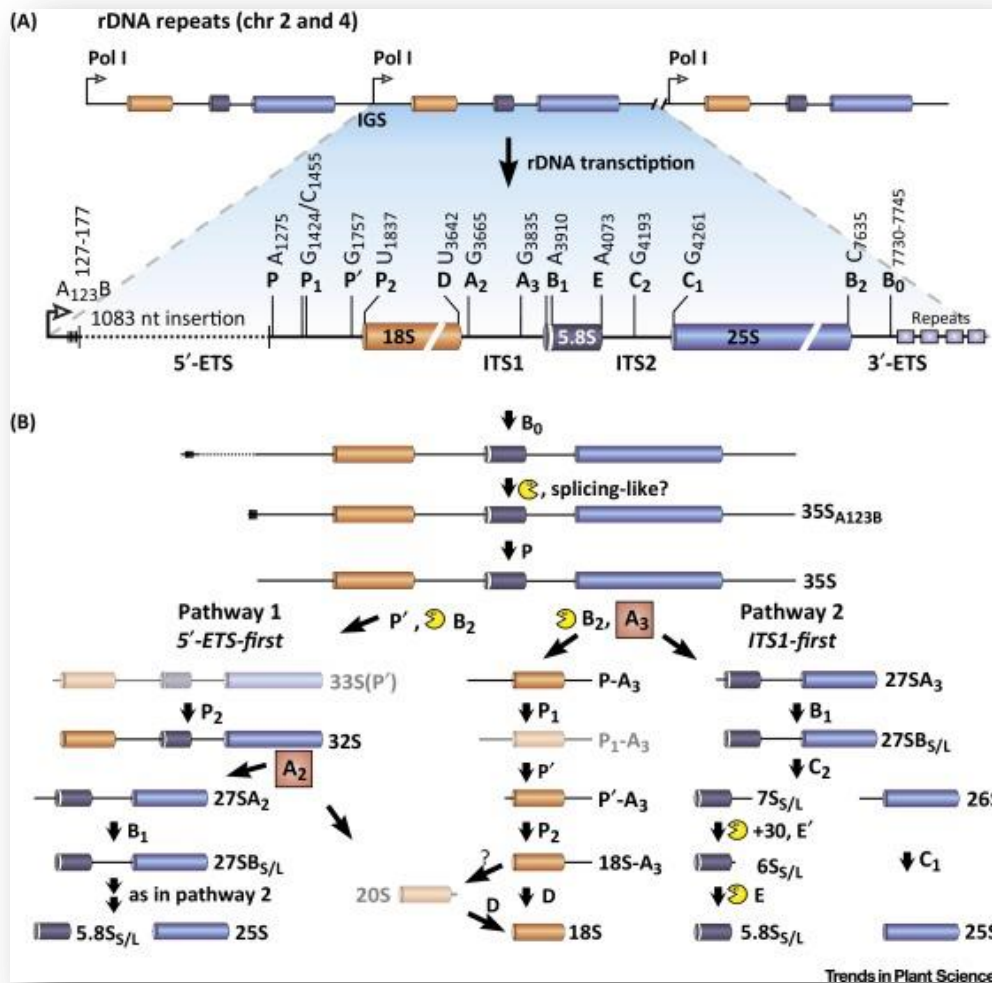
**Εικόνα 1.3:** Προσδιορισμός της θέσης του 45S rDNA στα χρωμοσώματα του *Salvia miltiorrhiza*. Τα χρωμοσώματα βάφτηκαν με DAPI, και το 45S rDNA ανιχνεύθηκε μέσω *in situ* υβριδισμού. (κίτρινο-πράσινο χρώμα).

## 1.2 Μεταγραφή του 45S rDNA και επεξεργασία του πρόδρομου rRNA

Η RNA πολυμεράση I (είναι υπεύθυνη για την μεταγραφή των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ριβοσωμικά RNAs ενώ η πολυμεράση III (PolIII) είναι υπεύθυνη για την μεταγραφή του 5S γονιδίου. Η μεταγραφή ξεκινά από τον υποκινητή που εντοπίζεται στη περιοχή IGS (Εικόνα 1.4). Οι αλληλουχίες που εκτείνονται από τη θέση -55 ανωφερικά σε + 6 κατωφερικά από τη θέση έναρξης της μεταγραφής (+1)

είναι επαρκείς για την έναρξη της μεταγραφής στο *A. thaliana*. Το πρόδρομο μετάγραφο που προκύπτει (pre-rRNA) έχει μήκος περίπου 8-10kb και περιέχει αλληλουχίες για τα δομικά rRNAs (5.8S, 18S και 25-28S rRNAs), τις περιοχές ITS1 και ITS2, καθώς και τις εξωτερικές μεταγραφόμενες περιοχές (5'-ETS και 3'-ETS).

Η διαδικασία επεξεργασίας των pre-rRNAs αρχίζει με την εκτομή του πρώιμου μετάγραφου μέσω της ενδονουκλεολυτικής δράσης ριβονουκλεασών όπως είναι η atRTL2 στην *Arabidopsis thaliana* (Kufel *et al.*, 1999; Comella *et al.*, 2008). Η θέση εκτομής εδράζεται στην περιοχή 3' ETS. Στην συνέχεια, έχουμε την απομάκρυνση του περιοχής 5' ETS η οποία πραγματοποιείται από μια ομάδα ριβονουκλεασών (SSU processome) με αποτέλεσμα την παραγωγή μετάγραφων τα οποία αναφέρονται ως 32S pre-rRNAs μετάγραφο (Εικόνα 1.4, Μονοπάτι 1). Το κάθε ένα 32S pre-rRNAs μετάγραφο υπόκειται σε παραιτέρω επεξεργασία η οποία διαχωρίζει σε δυο τμήματα, το 20S και το 27SA2 pre-rRNA (Henras *et al.*, 2015) τα οποία φέρουν το 18S και το 28S, αντίστοιχα. Τούτο επιτυγχάνεται διότι η θέση της εκτομής A<sub>2</sub> βρίσκεται στην περιοχή ITS1. Στην συνέχεια, το 20S και 27S pre-rRNA υπόκειται σε επιπρόσθετες επεξεργασίες με αποτέλεσμα τον σχηματισμό των ώριμων 18S, 28S και 5.8 S rRNAs. Σημαντικό ρόλο στην επεξεργασία του 27S pre-rRNA παίζουν οι θέσεις εκτομής C1 και C2 που εδράζονται στην περιοχή ITS2. Στα φυτά φαίνεται να υπάρχουν δυο εναλλακτικά μονοπάτια επεξεργασίας του pre-rRNA (Εικόνα 1.4). Τα δυο αυτά εναλλακτικά μονοπάτια τα οποία φαίνεται να λειτουργούν παράλληλα και πιθανόν να ρυθμίζονται με διαφορετικό τρόπο για να διασφαλιστεί η βιογένεση των λειτουργικών ριβοσωμάτων σε διαφορετικούς ιστούς ή και σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες (Henras *et al.*, 2015; Lafontaine, 2015). Στο δεύτερο μονοπάτι, η πρώτη εκτομή στο 32S pre-rRNAs μετάγραφο πραγματοποιείται στη θέση A3 και η περαιτέρω επεξεργασία είναι σε γενικές γραμμές παρόμοια με αυτή που παρατηρήθηκε στο μονοπάτι 1 (Εικόνα 1.4).



Εικόνα 1.4: Η *A. thaliana* διαθέτει δυο εναλλακτικά μονοπάτια επεξεργασίας του pre-rRNA.

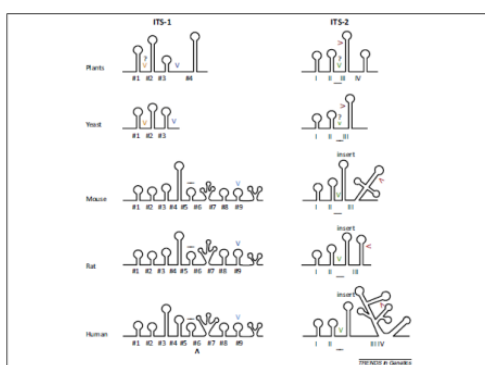
### 1.3 ITS1 και ITS2 δευτεροταγείς δομές

Το μονόκλωνο RNA έχει την ικανότητα να αναδιπλώνεται σε έλικες ανάλογα με την πρωτοταγή του αλληλουχία. Η δευτεροταγής δομή διατηρείται μέσω των αλληλεπιδράσεων των βάσεων και την δημιουργία κανονικών ζεύγων βάσεων (AU, GC) είτε μη κανονικών (GA, AA) (Elgavish *et al.*, 2001).

Η δημιουργία πολλαπλών ελίκων εμφανίζεται και στις δύο αλληλουχίες ITS, φέρνοντας τα 5' και 3' άκρα σε στενή εγγύτητα (Εικόνα 1.5). Οι δευτεροταγείς δομές του μεταγραφόμενου RNA των ITS1 και ITS2 RNA μεταγράφων εξετάστηκαν σε άλγη, πρωτόζωα, μύκητες, φυτά και θηλαστικά. Οι σχηματικές αναπαραστάσεις των

δομών των ITS1 και ITS2 φαίνονται στην εικόνα 1.5. Στους περισσότερους ευκαρυώτες, οι περιοχές αυτές είναι μικρότερες από 500 bp. Στους ασπόνδυλους ευκαρυώτες, η κοινή δευτεροταγής δομή του ITS1 είναι τρεις ή και περισσότερες έλικες. Η περιοχή ITS1 των σπονδυλωτών δεν έχει αναγνωρίσιμη ομοιότητα με την ITS1 που έχει βρεθεί είτε στα φυτά, είτε στους μύκητες, είτε στα ασπόνδυλα και πρώτιστα λόγω της απουσίας συντηρημένων αλληλουχιών. Ωστόσο, στα αγγειόσπερμα έχει εντοπιστεί μια συντηρημένη αλληλουχία περίπου 20bp η οποία πιθανώς να εμπλέκεται στην δευτεροταγή δομή (Goertzen *et al.*, 2003).

Η διερεύνηση της δευτεροταγούς δομής των ITS2 RNA μεταγράφων από διάφορους οργανισμούς έχει δείξει ότι υπάρχει μια γενικά κοινή δευτεροταγής δομή. Η κοινή μορφή της περιοχής ITS2 έχει τέσσερις έλικες. Οι έλικες I και II, (που περιέχουν μια συντηρημένη μονόκλωνη περιοχή πλούσια σε πουρίνες), μια σχετικά μεγάλου μήκους και μερικές φορές διακλαδισμένη έλικα III, και τέλος, μια μικρή έλικα IV η οποία είναι ως επί το πλείστον μεταβλητή. Το κύριο γνώρισμα που διευκολύνει την αναγνώριση των δομικών χαρακτηριστικών της ITS2 είναι ότι στην έλικα II υπάρχει μια διόγκωση ή αλλιώς «φουσαλίδα» (bulge) πυριμιδίνη-πυριμιδίνης κοντά στη βάση της και ενώνει την έλικα III, κοντά στο 5' άκρο της. Η έλικα III περιέχει κοντά στην κορυφή της μια συντηρημένη αλληλουχία 15-20 bp η οποία συμπεριλαμβάνει την αλληλουχία TGGT.



**Εικόνα 1.5:** Σχηματική αναπαράσταση της δευτεροταγούς δομής της περιοχής ITS1 και ITS2 στα φυτά, ζυμομυκήτες και σε τρία θηλαστικά.



## 1.4 Εναρμονισμένη εξέλιξη (Concerted evolution)

Βασική αρχή των μοντέλων που επιχειρούν να ερμηνεύσουν τη διατήρηση της ταυτότητας μεταξύ επαναλαμβανόμενων αντιγράφων αποτελεί η υπόθεση ότι τα μη αλληλόμορφα γονίδια δεν κληρονομούνται ανεξάρτητα. Στην απλούστερη περίπτωση δυο πανομοιότυπων γονιδίων, όταν στο ένα αντίγραφο συμβεί μια μετάλλαξη, τότε αυτή, τυχαία, είτε απαλείφεται είτε διαδίδεται και στο άλλο αντίγραφο. Στη δεύτερη περίπτωση, η μετάλλαξη εκτίθεται στις επιλεκτικές δυνάμεις. Σύμφωνα με τα παραπάνω, τα δυο πανομοιότυπα γονίδια εξελίσσονται μαζί, σαν να υπήρχε μόνο ένας γενετικός τύπος, φαινόμενο που ονομάζεται εναρμονισμένη εξέλιξη (concerted evolution) ή αλλιώς συνεξέλιξη (coevolution). Η αρχή αυτή μπορεί να εφαρμοστεί σε ένα ζεύγος πανομοιότυπων γονιδίων ή με επιπλέον προϋποθέσεις, σε μια συστοιχία που περιέχει πολλά γονίδια (Zhang and Hewitt, 2003). Τα ριβοσωμικά γονίδια είναι διατεταγμένα σε διαδοχικές επαναλήψεις και συνήθως χαρακτηρίζονται από χαμηλή ενδογονιδιωματική ποικιλομορφία ως συνέπεια της εναρμονισμένης εξέλιξης (Hřibová, 2011). Πολλοί μηχανισμοί φαίνεται να ευθύνονται για το φαινόμενο αυτό, αλλά οι πιο σημαντικοί φαίνεται να είναι διάφοροι μηχανισμοί ανασυνδυασμού (unequal crossing over ή gene conversion).

Αφενός η σταθερότητα του rRNA εντός της οικογένειας και εντός του πληθυσμού και αφ' εταίρου η σχετικά γρήγορη εξέλιξη των ITS1 και ITS2 που βρίσκονται κάτω από χαμηλή επιλεκτική πίεση, έκανε την περιοχή ITS έναν από τους πιο δημοφιλείς δείκτες σε φυλογενετικές μελέτες (Hřibová, 2011). Η ανάλυση των ITS χρησιμοποιήθηκε επίσης για τον εντοπισμό προγόνων των υβριδικών ειδών και για την μελέτη της προέλευσης των πολυπλοειδών ειδών. (Sun *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007). Ωστόσο, η εξέλιξη των rRNA σε υβρίδια και σε αλλοπολυπλοειδή, μπορεί να είναι περίπλοκη ως προς το τρόπο που αλληλεπιδρούν τα μητρικά rRNA.

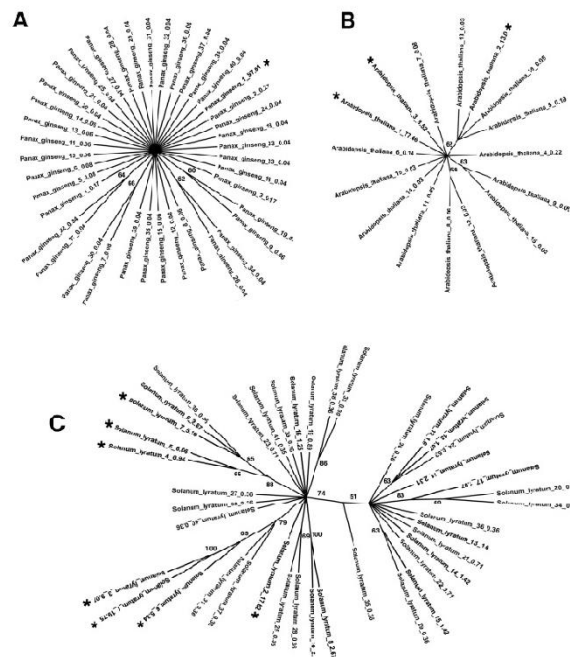
Σε ορισμένα είδη, όπως *Arabidopsis*, *Brassica* ή *Silene*, οι αποκλίνουσες μητρικές αλληλουχίες rDNA εξακολουθούν να παραμένουν συντηρημένες και εξελίσσονται ανεξάρτητα σε υβρίδια χωρίς καμία αλληλεπίδραση (O'Kane *et al.*, 1996; Popp and Oxelman, 2001; Bennett and Smith, 1991). Σε άλλες περιπτώσεις, όπως σε

αλλοπολυπλοειδή του *Nicotiana* ή *Dendrochilum*, τα μητρικά rDNA φαίνεται να ανασυνδυάζονται όπως κρίνεται από την παρουσία χμαιοτικών ITS αλληλουχιών (Barkman and Simpson, 2002; Volkov *et al.*, 2007).

Η κυρίαρχη αλληλουχία rDNA μπορεί να αντικαταστήσει μια από τις γονικές αλληλουχίες rDNA όταν ένας τύπος rDNA χαθεί ή εξαλειφθεί ή μπορεί να είναι μία χμαιοτική αλληλουχία που προκύπτει από ενδογονιδιωμικό ανασυνδυασμό (Hříbová, 2011). Εάν η εναρμονισμένη εξέλιξη δεν ολοκληρωθεί, διαφορετικοί τύποι παραλόγων και ορθολόγων rDNA αλληλουχιών μπορεί να βρεθούν στο γονιδίωμα, που συχνά περιλαμβάνουν σιωπηλές και μη λειτουργικές ITS ακολουθίες rDNA που αναφέρονται ως ψευδογονίδια.

Σύμφωνα με τα φυλογενετικά δέντρα της ενδογονιδιωμικής ποικιλομορφίας όλων των ειδών που ερευνήθηκαν, ο ενδογονιδιωμικός πολυμορφισμός των ITS2 αλληλουχιών οφείλεται στους τρεις καθιερωμένους μηχανισμούς εξέλιξης (Nei and Rooney, 2005). Ο πρώτος μηχανισμός είναι η εναρμονισμένη εξέλιξη, σύμφωνα με την οποία δυο παραλλαγές της ITS2 εξελίχθηκαν ως μία μονάδα σε φυτικά γονιδιώματα από τους μηχανισμούς του ανασυνδυασμού (unequal crossing over) και της μετατροπής του γονιδίου (gene conversion). Μελέτες έδειξαν ότι τα αντίγραφα της ITS2 στο γονιδίωμα του *Panax Ginseng* είναι πανομοιότυπα δηλαδή υπάρχει μόνο μια ομάδα μείζονος σημασίας (one major variant), σύμφωνα με τα αποτελέσματα του μηχανισμού της εναρμονισμένης εξέλιξης (Εικόνα 1.6A). Ο δεύτερος μηχανισμός είναι η εξέλιξη γέννησης και θανάτου (birth-and-death evolution), στην οποία μερικές παραλλαγές της ITS2 παρήχθησαν από διπλασιασμό γονιδίου και ένα κλάσμα από αυτά στη συνέχεια χάθηκε από απαλοιφές (deletions), μετατοπίσεις (translocations) ή και κάποια αλλαγή στον αριθμό των χρωμοσωμάτων. Στο γονιδίωμα του *Arabidopsis thaliana* οι παραλλαγές της ITS2 σχηματίζουν δυο ομάδες και θεωρείται μια περίπτωση του εν λόγω μηχανισμού (Εικόνα 1.6B). Ο τρίτος μηχανισμός είναι η αποκλίνουσα εξέλιξη (divergent evolution), σύμφωνα με την οποία ITS2 παραλλαγές μέσα σε ένα γονιδίωμα φυτού εξελίχθηκαν ανεξάρτητα και με κάποια απόκλιση. Το γονιδίωμα του *Solanum lyratum* έχει πολλαπλές ομάδες και εντός κάθε ομάδας μεγάλες παραλλαγές που μπορεί να εξηγηθεί καλύτερα με αυτόν τον μηχανισμό (Εικόνα 1.6C).

Στη μελέτη των Song και συνεργατών (2012), η εναρμονισμένη εξέλιξη φαίνεται να είναι ο καλύτερος μηχανισμός που εξηγεί την ενδογονιδιωματική παραλλακτικότητα των αλληλουχιών ITS2 για τα περισσότερα είδη των φυτών, ενώ η εξέλιξη γέννησης και θανάτου και η αποκλίνουσα εξέλιξη αποτελούν εναλλακτικούς μηχανισμούς. Η ενδογονιδιωματική παραλλακτικότητα εντός του ίδιου είδους δεν φαίνεται να επηρεάζει την χρήση της περιοχής ITS2 ως φυλογενετικό δείκτη (Song, 2012; Wolf, 2014).



**Εικόνα 1.6:** Φυλογενετικές σχέσεις των ενδογονιδιωματικών ITS2 στα φυτά *Panax ginseng* (A), *Arabidopsis thaliana* (B) και *Solanum lyratum* (C). Στο *Panax ginseng* σχεδόν όλα τα αντίγραφα της ITS2 είναι πανομοιότυπα (one variant), στο *Arabidopsis thaliana* τα αντίγραφα της ITS2 ομαδοποιούνται σε δυο ομάδες ενώ στο *Solanum lyratum* τα αντίγραφα της ITS2 ομαδοποιούνται σε πολλές ομάδες. Τα αντίγραφα της περιοχής ITS2 σε κάθε ομάδα παρουσιάζουν παραλλακτικότητα.

## 1.5 Η περιοχή ITS1 και ITS2 ως γραμμωτός κώδικας DNA

Διάφορες εκτιμήσεις έχουν δείξει ότι στον πλανήτη μας υπάρχουν πάνω από 300.000 είδη φυτών, αν και σχετικά λίγα έχουν ταυτοποιηθεί με τις κλασικές ταξινομικές προσεγγίσεις. Τα τελευταία χρόνια, η προσπάθεια τόσο της διερεύνησης της βιοποικιλότητας όσο και της ταυτοποίησης των φυτικών ειδών επικουρείται από

μοριακές προσεγγίσεις όπως ο γραμμωτός κώδικας DNA (Barcoding DNA) (Gregory, 2005). Ο γραμμωτός κώδικας DNA είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για την αναγνώριση των ειδών με βάση τις διαφορές τους σε μικρές περιοχές του DNA (Hebert *et al.*, 2003).

Αρχικά χρησιμοποιήθηκε η οξειδάση του κυτοχρώματος c 1 (CO1) από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα ως γραμμωτός κώδικας DNA για την ταυτοποίηση των ζώων (Teuchen *et al.*, 2014). Ωστόσο, στα φυτά τα μιτοχονδριακά γονίδια είναι αργά εξελισσόμενα, με πολύ χαμηλά ποσοστά υποκατάστασης και δεν είναι κατάλληλα για barcoding. Ως εκ τούτου, η αναζήτηση για τα φυτικά barcode μετατοπίζεται προς τα χλωροπλαστικά και πυρηνικά γονιδιώματα με υψηλά ποσοστά υποκατάστασης. Μία αλληλουχία DNA που θεωρείται ότι είναι χρήσιμη ως ένας γραμμωτός κώδικας πρέπει να τηρεί τρία βασικά κριτήρια:

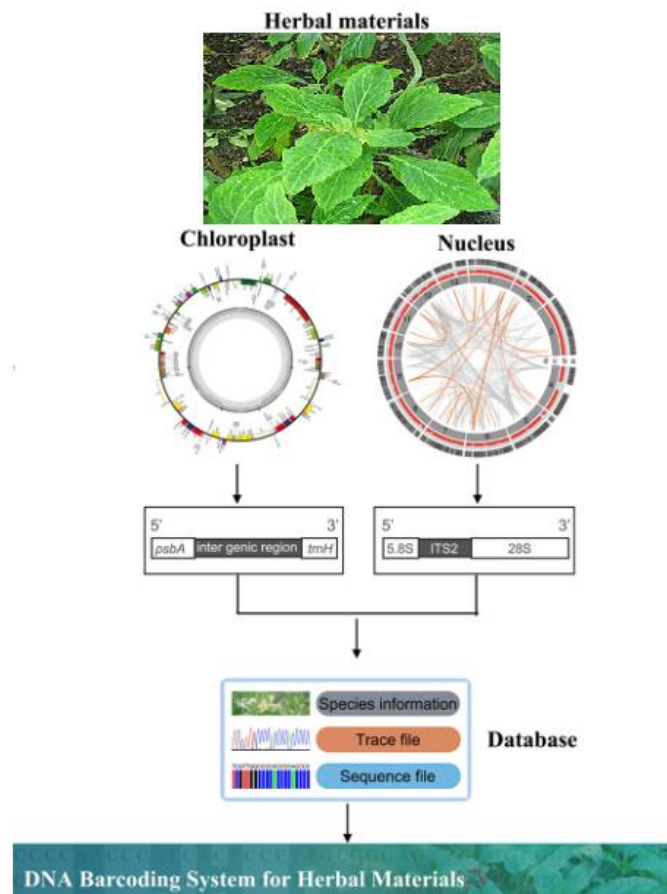
- i) Ύπαρξη ουσιαστικής γενετικής μεταβλητότητας σε επίπεδο είδους για να επιτρέψει διάκριση των ειδών.
- ii) Ύπαρξη μία μικρού μήκους αλληλουχία για να διευκολύνει την εκχύλιση του DNA και την ενίσχυση του.
- iii) Παρουσία συντηρημένων πλευρικών περιοχών για την ανάπτυξη των καθολικών εκκινητών για όλα τα ταξινομικά είδη (Hollingsworth *et al.*, 2009).

Έτσι, ένας άγνωστος οργανισμός ή ιστός θα μπορούσε να αποδοθεί σε ένα είδος όταν μια τέτοια αλληλουχία συγκρίνεται με εκείνες που διατίθενται σε βάσεις δεδομένων σχεδόν όλων των οργανισμών του πλανήτη (Hebert *et al.*, 2003). Ωστόσο, εάν η αλληλουχία DNA από έναν άγνωστο οργανισμό ή ιστό αποτύχει να ταιριάζει με οποιαδήποτε από τις αλληλουχίες που αναφέρονται, το δείγμα θα πρέπει να επισημανθεί ως πιθανό νέο είδος, που απαιτεί μια λεπτομερή μελέτη. Επίσης, εκτός από την παροχή μιας ταχείας αναγνώρισης, χρησιμοποιώντας μόνο ένα μικρό ποσό ιστού από οποιοδήποτε στάδιο ανάπτυξης ενός φυτού ή ζώου, ο γραμμωτός κώδικας DNA θα μπορούσε να ενισχύσει την ανακάλυψη νέων ειδών. Επίσης, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην ταχεία απογραφή της βιοποικιλότητας, στην ταυτοποίηση κρυπτικών και πολυμορφικών ειδών, στον έλεγχο των φυτικών σκευασμάτων και τροφίμων για νοθεία ή προσμίξεις, σε ιατροδικαστικές έρευνες (Ferri and Beduschi,

2009), στην αντιμετώπιση του παράνομου εμπορίου των απειλούμενων φυτικών και ζωικών ειδών (Singh *et al.*, 2012) καθώς και στον έλεγχο νοθείας τροφίμων και ελαίων.

Ένας αριθμός περιοχών από το γονιδίωμα του πλαστιδίου, που περιλαμβάνει τα γονίδια *matK*, *rpoC1*, *rbcL*, *rpoB*, *psbA-trnH*, και *ITS*, έχουν δοκιμαστεί για barcoding DNA των φυτών με διαφορετικούς βαθμούς επιτυχίας. Μέχρι στιγμής, δεν υπάρχει συναίνεση για ένα παγκόσμιο γραμμωτό κώδικα DNA για όλα τα φυτά. Ωστόσο, η πλειοψηφία των επιστημόνων υποστηρίζει ότι για την ακριβή ταυτοποίηση των ειδών απαιτείται η χρήση περισσότερων του ενός φυλογενετικού δείκτη. Η ενδομεταγραφόμενη περιοχή (*ITS*) καθώς και η *psbA-trnH* περιοχή έχουν προταθεί ως ένα πιθανό barcode για ορισμένες ομάδες φυτών όπως τα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά (Εικόνα 1.7). Η περιοχή *ITS2* παρουσίασε ικανότητα διάκρισης 92,7% σε επίπεδο είδους σε περισσότερα από 6.600 δείγματα φυτών, εκ των οποίων τα 4.800 είδη ήταν από 753 ξεχωριστά γένη. Η περιοχή *psbA-trnH* χαρακτηρίστηκε ως συμπληρωματική στην περιοχή *ITS2* για barcode για τα φαρμακευτικά φυτά όπως έχει επίσης τεκμηριωθεί σε πολλές μελέτες (Han *et al.*, 2010; He *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012a, 2012b; Ma *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2011; Yao *et al.*, 2009; Zuo *et al.*, 2011). Ωστόσο, σε πρόσφατες μελέτες *in silico*, η περιοχή *ITS1* έχει σημαντικά υψηλότερες αποδόσεις από την *ITS2* λόγω του μικρότερου μήκους του προϊόντος ενίσχυσης και της χαμηλότερης περιεκτικότητας σε G+C (Wang *et al.*, 2014).

Με βάση την στρατηγική που περιγράφεται στην εικόνα 1.7 έχει κατασκευαστεί μια βάση δεδομένων που περιλαμβάνει πάνω από 79.000 γραμμωτούς δείκτες για 23.262 είδη αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών. Αυτή η βάση δεδομένων περιλαμβάνει σχεδόν όλα τα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά που χρησιμοποιούνται στην φαρμακολογία, φαρμακοβιομηχανία και στην φαρμακευτική πρακτική.



**Εικόνα 1.7** Διαδικασίες ανάλυσης και καταχώρησης στη βάση δεδομένων.

## 1.6 Γενικά για τα φαρμακευτικά φυτά

Τα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά έχουν παίξει σημαντικό ρόλο στη ζωή των λαών ανά τους αιώνες αφού οι θεραπευτικές ιδιότητες που διαθέτουν είναι γνωστές από την αρχαιότητα. Αποτελούσαν πρώτη ύλη στον τομέα των φαρμάκων, της διατροφής και της βιομηχανίας. Τα αρωματικά φυτά αναδύουν ένα χαρακτηριστικό άρωμα το οποίο είναι διαφορετικό για κάθε είδος φυτού και σε αυτό οφείλεται και το όνομά τους. Υπεύθυνες γι' αυτό το χαρακτηριστικό άρωμα είναι κάποιες πτητικές χημικές ουσίες, τα αιθέρια έλαια. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να διασαφηνιστεί η διαφορά των αρωματικών από των φαρμακευτικών φυτών. Τα αρωματικά είναι αυτά από τα οποία προσλαμβάνουμε αιθέρια έλαια, ενώ τα φαρμακευτικά είναι τα φυτά που περιέχουν ένα και περισσότερα δραστικά συστατικά ικανά να θεραπεύσουν και να ανακουφίσουν με τις ιδιότητες τους. (Μαρσέλλος, 1981).

Το κοινό τους είναι ότι και στα δύο είδη τα φυτά περιέχουν αιθέρια έλαια ανεξάρτητα από τον τρόπο που θα χρησιμοποιηθούν. Υπάρχουν και άλλα φυτά που χρησιμοποιούνται για εξαγωγή χρωστικών ουσιών (κρόκος Κοζάνης) ή άλλες φαρμακευτικές ουσίες (βαλεριάνα) και όχι για τα αιθέρια έλαιά τους. Παρ' όλα αυτά συγκαταλέγονται στα αρωματικά – φαρμακευτικά φυτά. (Κανταρτζής, 2007).

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organisation, WHO) έχει καταγράψει 20.000 φαρμακευτικά φυτά σε όλο τον κόσμο, ενώ άλλοι εκτιμούν ότι ο αριθμός των ΑΦΦ κυμαίνεται μεταξύ 35.000 και 70.000 (Bhattarai, 2004). Στην οικογένεια *Lamiaceae* βρίσκονται τα περισσότερα είδη ΑΦΦ (Karousou *et al.*, 1998). Το γένος *Salvia L.*, είναι το κυριότερο της οικογένειας *Lamiaceae*, αφού περιλαμβάνει σε παγκόσμια κλίμακα περίπου 900 είδη φυτών, πόες ή θάμνους (Karousou *et al.*, 1998). Έχει σχεδόν κοσμοπολίτικη εξάπλωση με κέντρο εξάπλωσης την Νοτιοδυτική και Κεντρική Ασία. Το φασκόμηλο είναι αυτοφυές των μεσογειακών χωρών και απατάνται σε όλες τις βουνοπλαγιές και τις ακτές της νότιας Ευρώπης.

## 1.7 Το γένος *Salvia*

Το γένος *Salvia* ανήκει στην οικογένεια *Lamiaceae* (*Labiatae*) της τάξης *Lamiales* (Πίνακας 1.1) και περιλαμβάνει 900 είδη πολυετών ποωδών, ξυλωδών αρωματικών φυτών τα οποία είναι ιθαγενή σε εύκρατες και τροπικές περιοχές. Μορφολογικά, το φυτό μπορεί να φθάσει συνήθως το ύψος των 30-60 cm, διαθέτει τετραγωνικούς βλαστούς, φύλλα έμμισχα αντίθετα και άνθη συνήθως γαλαζοιώδη. Απαντάται σε χώρες της Μεσογείου, της βόρειας Αφρικής, της κεντρικής και νότιας Αμερικής καθώς και σε χώρες της κεντρικής και ανατολικής Ασίας (Davis, 1982).

Το όνομα *Salvia* ("*salviya*") συναντάται από τους ρωμαϊκούς χρόνους αφού προέρχεται από τη λατινική *salvere* ("να αισθάνεσαι υγιής"), το ρήμα που σχετίζονται με *Salus* (υγεία, ευεξία) αναφέρεται σε θεραπευτικές ιδιότητες του βοτάνου. Ο Πλίνιος ο Πρεσβύτερος ήταν ο πρώτος συγγραφέας που περιέγραψε ένα φυτό που ονομάζεται "*Salvia*" από τους Ρωμαίους, πιθανότατα περιγράφει τα είδη τύπου για το γένος *Salvia*, δηλαδή το φασκόμηλο.

Μέχρι σήμερα, οι περισσότερες ποικιλίες του γένους *Salvia* έχουν καταγραφεί και ταξινομούνται με βάση την προέλευσή τους, ενώ διαφοροποιούνται μεταξύ τους με βάση φαινοτυπικά χαρακτηριστικά όπως ο τύπος του φύλλου, το μέγεθος, το σχήμα, το χρώμα των ανθέων καθώς και την περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο. Η σύσταση των αιθέριων ελαίων διαφοροποιείται με βάση την προέλευση του φυτού, γεγονός το οποίο οδηγεί στο συμπέρασμα ότι υπάρχουν ποικίλοι χημειότυποι (Καρούσου, 1995).

Το αιθέριο έλαιο περιέχει πολλές τάξεις χημικών ουσιών με τις κυριότερες να είναι τα τερπενοειδή και οι φαινολικές ουσίες. Στα τερπενοειδή απατώνται ουσίες όπως η ευκαλυπτόλη, η βορνεόλη, trans-καρυοφυλλένιο, καμφένιο, α- και β- πινένιο, α- και β- θουγιόνη, λιναλοόλη καθώς και καρνοσόλη ενώ, στις φαινολικές ουσίες συναντούμε το ροσμανικό οξύ, την λουτεολίνη, απιγενίνη καθώς και την κερκετίνη. (Κατσιώτης, 2010).

Εδαφοκλιματικά, η *Salvia* αναπτύσσεται τόσο σε ψυχρές όσο και σε θερμές περιοχές, αντέχει πολύ στο κρύο μέχρι -25°C. Ως προς τα εδάφη, αναπτύσσεται σε διάφορους τύπους, προτιμά όμως τα μέσης σύστασης, ασβεστούχα με καλή αποστράγγιση και pH= 6,2-6,4.



Ο πολλαπλασιασμός του φυτού γίνεται εγγενώς με σπόρο (το φθινόπωρο κατά τον Οκτώβριο μήνα ή την άνοιξη κατά τον Απρίλιο) και αγενώς με παραφυάδες και μοσχεύματα (τμήματα βλαστού μήκους 10-12 cm που στη συνέχεια ριζοβολούν).

Ως προς τους εχθρούς, η *Salvia* έχει το ημίπτερο *Eupteryx sp.* ενώ οι κύριες ασθένειές της είναι μυκητολογικής φύσης που προκαλούνται από *Oidium salviae*, *Phytophthora cryptogae* και *Fusarium sp.* (Κατσιώτης, 2010).

Στις μέρες μας, χρησιμοποιείται ευρέως ως καταπραϊντικό σε συμπτώματα δυσπεψίας σε φλεγμονές του στόματος και του φάρυγγα, σε ουλίτιδες, ενώ χορηγείται φαρμακευτικά σε διάφορες μορφές γιατί εμφανίζει θεραπευτικές, αντισηπτικές και αντισπασμωδικές ιδιότητες (Barnes *et al.*, 2003). Στον τομέα των τροφίμων χρησιμοποιείται ως φυσική πηγή για την ενίσχυση του αρώματος και της γεύσης τροφίμων και ποτών. Η υψηλή περιεκτικότητα του αιθέριου ελαίου σε φαινόλες καθιστούν το φασκόμηλο συντηρητικό τροφίμων σε επεξεργασμένα τρόφιμα και ποτά. (Zheng *et al.*, 2001) Τέλος συμπεριλαμβάνεται σε αρκετά φυτοθεραπευτικά σκευάσματα κυρίως για την απώθηση εντόμων. (Prakash, 1990).

**Πίνακας 1.1:** Συστηματική ταξινόμηση του γένους *Salvia*.

Kingdom:	<i>Plantae</i>
Order:	<i>Lamiales</i>
Family:	<i>Lamiaceae</i>
Genus:	<i>Salvia</i>

## 1.8 Είδη του γένους *Salvia* στην Ελλάδα

Στην χώρα μας απατώνται 23 είδη *Salvia* ως αυτοφυή με κοινές ονομασίες φασκομηλιά, αγριοσφακιά, αλισφακιά, μηλοσφακιά κτλ. Σύμφωνα με μελέτες οι ελληνικοί γενότυποι αυτού του γένους αποδείχθηκαν υπέρτεροι και ως προς τα χαρακτηριστικά τους και ως προς την προσαρμοστικότητά τους που μετά από καταγραφή προκύπτουν τα εξής:

(i) Πέντε είδη έχουν ένα πολύ στενό φάσμα, που ευδοκιμεί μόνο στην Ελλάδα (*S. eichleriana* Halácsy, *S. pomifera* L. subsp. *pomifera* και *S. teddi* Turrill), ή στην Ελλάδα και την Τουρκία (*S. napifolia* Jacq., *S. pomifera* L. subsp. *calycina* (Sm. Hayek).

(ii) Τρία είδη βρίσκονται κυρίως στη Βαλκανική Χερσόνησο και επεκτείνονται είτε σε Μικρά Ασία (*S. amplexicaulis* L., *S. forskahlii* L.), ή στην Ιταλία (*S. officinalis* L.).

(iii) Δύο είδη έχουν ευρύτερη διανομή στην περιοχή της Μεσογείου (*S. argentea* L., *S. fruticosa* Miller).

(iv) Δεκατρία είδη έχουν ευρεία παρουσία του στον Παλαιό Κόσμο, ενώ αρκετά από τα αυτά έχουν εισαχθεί και πολιτογραφηθεί στην Αμερική (*S. aethiopsis* L., *S. candidissima* Vahl, *S. glutinosa* L., *S. pinnata* L., *S. pratensis* L., *S. ringens* Sm., *S. sclarea* L., *S. sylvestris* L., *S. tomentosa* Miller, *S. verbenaca* L., *S. verticillata* L. subsp. *verticillata*, *S. virgata* Jacq. και *S. viridis* L.) (Kintzios, 2000).

## 1.9 Μερικά σημαντικά είδη του γένους *Salvia*

### 1.9.1 *Salvia bucharica*



Εικόνα 1.8: *Salvia bucharica*

Η *S. bucharica* φύεται στην Ασία και κυρίως στην περιοχή του Πακιστάν. Τα φύλλα του φυτού είναι χνοώδη και πτεροειδή. Τα άνθη του φυτού βρίσκονται σε ταξιανθία (8-20 άνθη) και είναι ιώδους χρώματος μήκους 1 έως 2 cm. Αποτελούνται από δύο χείλη, το άνω χείλος είναι σε γενικές γραμμές τριγωνικό, ενώ το κάτω χείλος είναι μεγαλύτερο. Τα φύλλα του είναι ωσειδή-λογχοειδή προς ωσειδή, πράσινου χρώματος (Kintzios, 2000).

### 1.9.2 *Salvia cadmica*



Εικόνα 1.9: *Salvia cadmica*

Είναι αυτοφυές της Τουρκίας, και ευδοκίμει σε πετρώδη, καλά στραγγιζόμενα εδάφη, σε υψόμετρο περίπου 1000 έως 1500 m. Προσαρμόζεται σε υψηλές θερμοκρασίες και παρουσιάζει αντοχή στην ξηρασία. Αναπτύσσεται καλά τόσο σε σκιερά μέρη, όσο και σε πλήρη ηλιοφάνεια. Ανθίζει από τα τέλη της άνοιξης μέχρι τις αρχές του καλοκαιριού (Kintzios, 2000).

### 1.9.3 *Salvia calycina*



Εικόνα 1.101: *Salvia calycina*

Η *S. calycina* αποτελεί ένα από τα δύο υποείδη του *S. pomifera* και απαντάται στην Ελλάδα και πιο συγκεκριμένα στις Σποράδες, την Εύβοια, την Αττική, τη Δυτική και Νότια Πελοπόννησο, τα Κύθηρα, τις Κυκλάδες, τη Σάμο, την Ικαρία και τη Μικρά Ασία (Bothmer, 1970; Davis, 1982; Καρούσου, 1995).

### 1.9.4 *Salvia digitaloides*



Εικόνα 1.112: *Salvia digitaloides*

Είναι πολυετής θάμνος και φύεται κυρίως στην Κίνα. Τον συναντούμε σε υψόμετρο στα 2.000-3.000 m σε σκιερά δάση από πεύκα και απο δρεΐς αλλά και σε κοιλάδες. Καθώς και απατάνται και στα ορεινά στο βόρειο και κεντρικό Γιουνάν, σε ολισθηρές πλαγιές ή σε κωνοφόρα δάση, σε υψόμετρο 2.500 – 3.400 m. Τα φύλλα του είναι στενόμακρα στρογγυλεμένα στην κορυφή και τη βάση. Τα άνθη είναι λευκοκίτρινα αποτελούμενα από δύο χείλη, το άνω χείλος είναι σε γενικές γραμμές τριγωνικό, ενώ το κάτω χείλος είναι μεγαλύτερο με μωβ κηλίδες (Clebsch *et al.*, 2003).

### 1.9.5 *Salvia dominica*



Εικόνα 1.123: *Salvia dominica*

Είναι πολυετής θάμνος που βρέθηκαν σε όλη την ανατολική Μεσόγειο, ιδιαίτερα την Ιορδανία, το Ισραήλ, το Λίβανο και τη Συρία. Ανθίζει την άνοιξη ή νωρίς το καλοκαίρι με τα κιτρινόλευκα άνθη του. Μια ομάδα Ιταλών και της Ιορδανών ερευνητών απομόνωσαν είκοσι τέσσερις νέες ουσίες που ανήκουν στα sesterterpenes, μερικά από αυτές είχαν ενδιαφέρουσα βιολογική δράση σε καρκινικά κύτταρα (Clebsch *et al.*, 2003; Dal Piaz *et al.*, 2009).

### 1.9.6 *Salvia fruticosa*



Εικόνα 1. 13: *Salvia fruticosa*

Είναι γνωστό ως ελληνικό φασκόμηλο. Είναι αυτοφυές της κεντρικής και της ανατολικής μεσογειακής λεκάνης (Σικελία, Ελλάδα, Τουρκία) και συχνά συγχέεται με το *S. officinalis*. Είναι έντονα αρωματικό και για αυτόν τον λόγο γίνεται αποδεκτό σε όλη την Ευρώπη σαν άρτυμα ενώ είναι πλούσιο σε 1,8 κινεόλη και θουγιόνη (Κατσιώτης, 2010).

### 1.9.7 *Salvia glutinosa*



Εικόνα 1.14: *Salvia glutinosa*

Είναι εγγενές στην Κεντρική και Ανατολική Ευρώπη και τη Δυτική Ασία. Τα φύλλα του φυτού έχουν ανοιχτό πράσινο χρώμα. Είναι χνοώδη με οδοντώσεις και έχουν μήκος περίπου 13 cm με το μίσχο τους να φτάνει περίπου τα 8-10 cm. Τα άνθη

αναπτύσσονται σε σπείρες από δύο έως έξι ετών, έχουν μήκος από 3 έως 5 cm και περιβάλλονται από μικροσκοπικά βράκτια φύλλα. Η περίοδος ανθοφορίας εκτείνεται από τον Ιούνιο έως τον Σεπτέμβριο (Clebsch *et al.*, 2003).

### 1.9.8 *Salvia hians*



Εικόνα 1.15: *Salvia hians*

Φύεται στην περιοχή των Ιμαλαίων από την περιοχή του Πακιστάν έως το Μπουτάν, ενώ συναντάται και στο Κασμίρ σε υψόμετρο 2.400 έως 4.000 m. Έχουν μελετηθεί οι φαρμακευτικές ιδιότητες του από το 1830. Τα φύλλα του είναι χνοώδη, ωοειδή και γενικά καρδιάσχημα με οδοντώσεις και έχουν μήκος περίπου 25 cm. Τα άνθη είναι χρώματος πορφυρού, ιώδους έως και βαθύ μπλε και είναι τοποθετημένα σε σπείρες. Το μήκος τους μπορεί να φτάσει μέχρι τα 50 mm.

([http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora\\_id=5&taxon\\_id=242425208](http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=5&taxon_id=242425208)) .

### 1.9.9 *Salvia lavandulaefolia*



**Εικόνα 1.16:** *Salvia lavandulaefolia*

Η *S. lavandulaefolia* ή ισπανικό φασκόμηλο φύεται στην Ισπανία και τη νοτιοδυτική Γαλλία. Το ισπανικό φασκόμηλο περιέχει πτητικό έλαιο που αποτελείται από καμφορά (11-34%), 1,8 κινεόλη (17,5-24,1%), λιμονένιο (1-41%), καμφένιο (5-30%), α-πινένιο (4-20%), β-πινενίου (13,8-29,2%). Το φυτό φτάνει στο μισό μέτρο ύψος. Τα φύλλα έχουν γκριζοπράσινο έως πράσινο χρώμα και αναπτύσσονται το ένα απέναντι από το άλλο επί του στελέχους. Τα άνθη του αναπτύσσονται σε ταξιανθίες και η ανθοφορία ξεκινά τέλη της άνοιξης και διαρκεί έως τις αρχές του καλοκαιριού (Clebsch *et al.*, 2003).

### 1.9.10 *Salvia namaensis*



**Εικόνα 1.17:** *Salvia namaensis*



Η *S. namaensis* είναι ένας αειθαλής θάμνος και εγγενής στην περιοχή της Νότιας Αφρικής. βρίσκεται συνήθως σε βραχώδεις πλαγιές, σχιστόλιθους, ασβεστόλιθους λόφους και αμμώδη εδάφη σε 300 m έως 1.500 m υψόμετρο. Είναι ελαφρώς ξυλώδεις θάμνος που φθάνει το 1 m σε ύψος. Τα φύλλα του είναι κίτρινο-πράσινα. Τα άνθη αναπτύσσονται σε μικρές ταξιανθίες, μήκους περίπου 10 cm, ενώ κάθε μία σπείρα έχει 2-6 άνθη (Clebsch *et al.*, 2003).

### 1.9.11 *Salvia officinalis*



Εικόνα 4.18: *Salvia officinalis*

Βρίσκεται σε όλες τις περιοχές της Ελλάδας και ιδιαίτερα σε ξηρά και πετρώδη μέρη. 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. Τα φύλλα είναι το κατεξοχήν χρησιμοποιούμενο τμήμα του φυτού και συλλέγονται λίγο πριν ή κατά την αρχή της ανθοφορίας. Αναπτύσσεται τόσο σε ψυχρές όσο και σε θερμές περιοχές αφού αντέχει σε θερμοκρασίες μέχρι και  $-15^{\circ}\text{C}$ . Ιδανικό για αυτό όμως είναι οι συνθήκες πλήρης ηλιοφάνειας. Όσον αφορά το έδαφος, προτιμά εδάφη καλά στραγγιζόμενα, μέτριας γονιμότητας με pH μέχρι το 8. Ακατάλληλα εδάφη είναι τα αμμώδη και τα πολύ βαριά και συνεκτικά (Κατσιώτης, 2010).

### 1.9.12 *Salvia pratensis*



Εικόνα 1.19: *Salvia pratensis*

Είναι εγγενές στην Ευρώπη, τη δυτική Ασία και τη βόρεια Αφρική. Η συγκεκριμένη *S. pratensis* αναφέρεται για την τάση της να μεγαλώνει σε λιβάδια και δασικές εκτάσεις. Τα φύλλα είναι πράσινα με οδοντώσεις στις άκρες, διατεταγμένα σε αντίθετα ζεύγη. Τα άνθη είναι συνήθως μπλε-ιώδη. Έχει εγκλιματιστεί σε πολλά μέρη των Ηνωμένων Πολιτειών, και θεωρείται ένα επιβλαβόν ζιζάνιο στην πολιτεία της Ουάσινγκτον (Clebsch *et al.*, 2003).

### 1.9.13 *Salvia sclarea*



Εικόνα 1.20: *Salvia sclarea* & *Salvia sclarea* var. *Turkestanica*

Είναι αυτοφυές της νότιας Ευρώπης και συναντάται σε χέρσους και πετρώδεις τόπους και καλλιεργείται σε περιοχές με εύκρατο κλίμα. Τα άνθη του έχουν ιώδες χρώμα και τα φύλλα του είναι χνοώδη πλατιά τα οποία αποστάζονται με ατμό για

παραλαβή αιθέριου έλαιος. Τα συστατικά του είναι κυρίως η λιναλοόλη και η νερόλη και χρησιμοποιείται ιδιαίτερα στην αρωματοποιία, στην φαρμακευτική και στην κοσμετολογία. Η ποικιλία *Salvia sclarea var. Turkestanica* φέρει φύλλα έμμισχα, και λευκά ή ροζ άνθη (Kintzios, 2000).

#### 1.9.14 *Salvia transsylvanica*



Εικόνα 1.21: *Salvia transsylvanica*

Απατάνται στην κεντρική και νότια Ρωσία, τη Ρουμανία, κυρίως στις Άλπεις της Τρανσυλβανίας. Τα άνθη είναι χνοώδη, σκούρου μπλε-μοβ χρώματος και τα φύλλα είναι πράσινα χνοώδη με άρωμα λιγότερα έντονο από τα άλλα είδη της *Salvia*. Ανθίζει το καλοκαίρι και παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε συνθήκες ξηρασίας (Clebsch *et al.*, 2003).

#### 1.9.15 *Salvia verbenaca*



Εικόνα 1.22: *Salvia verbenaca*

Είναι εγγενές στις Βρετανικές Νήσους, ενώ επίσης το συναντούμε στην περιοχή της Μεσογείου στη Δυτική και στη Νότια Ευρώπη, Μικρά Ασία την Κύπρο στην Βόρεια και Δυτική Αφρική και στην Μέση Ανατολή, τη και το Ατζερμπαϊτζάν στον Καύκασο. Μπορεί να βρεθεί ως εισαγόμενο είδος που έχει βρεθεί σε λιβάδια στις ανατολικές Ηνωμένες Πολιτείες (Davis, 1982). Στην Ελλάδα φύεται σε ολόκληρο το νησί της Κρήτης με τη μορφή μεμονωμένων ατόμων ή μικρών συστάδων, σε υψόμετρο 0-1100 m. (Καρούσου, 1995). Τα φύλλα είναι πράσινα με οδοντώσεις μήκους που ποικίλλει από 3 έως 10 cm. Έχει απαλά μωβ και βιολετί άνθη και ανθίζουν στα μέσα του καλοκαιριού. Τα άνθη είναι τέλεια και γονιμοποιούνται από τις μέλισσες. Μερικά είναι επίσης κλειστόγαμα και αυτογονιμοποιούνται. Προτιμά ουδέτερα και αλκαλικά εδάφη και χρειάζεται πλήρης ηλιοφάνεια για να αναπτυχθεί (<http://plantnet.rbgsyd.nsw.gov.au/>).

### 1.9.16 *Salvia virgata*



**Εικόνα 1.23:** *Salvia virgata*

Η *S. virgata* είναι πολυετής και είναι εγγενής στην Ασία και τη Νοτιοανατολική Ευρώπη. Θεωρείται επιβλαβές ζιζάνιο σε πολλά μέρη του κόσμου. Τα άνθη του φυτού είναι συνήθως ιώδους χρώματος, μήκους 1 έως 2 cm και αναπτύσσονται σε σπείρες των 4-6 ανθέων σε κάθε σπείρα. Τα φύλλα του είναι χνοώδη, ωοειδή έως στενόμακρα σκούρου πράσινου χρώματος. (DiTomaso *et al.*, 2007).

## 2. ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να αξιολογήσει κατά πόσο η ανάλυση των αποκλίσεων των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών της ITS περιοχής (που περιέχει την ITS1 και την ITS2) και των ειδικών ITS1 και ITS2 δευτεροταγών δομών, είναι επαρκής για τη διάκριση των ειδών *Salvia* που προέρχονται από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές του κόσμου. Επιπλέον, εξετάστηκε κατά το πόσο η απόκλιση στις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες της διαγονιδιακής περιοχής *psbA-trnH* του χλωροπλάστη, μπορεί να ενισχύσει αυτήν την ανάλυση.

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 Φυτικό υλικό

Το υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την παρούσα μελέτη ήταν φυτά του γένους *Salvia* τα οποία συλλέχθηκαν από τον Βοτανικό Κήπο Ιουλίας & Αλεξάνδρου Ν. Διομήδους, Χαϊδάρι Αττικής και ταυτοποιήθηκαν από την Δρ. Βαλλιανάτου Ειρήνη. Τα 15 είδη του γένους *Salvia* αναφέρονται στον πίνακα 3.1. Έπειτα, τέσσερα με πέντε φύλλα από το κάθε είδος, φυλάχθηκαν στο εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του ΓΠΑ στους -80°C.

**Πίνακας 3.1:** Τα είδη του γένους *Salvia* που απομονώθηκαν για την διεξαγωγή του πειράματος.

No	TAXA SALVIA	ΤΟΠΟΘΕΣΙΑ	ΦΥΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ
S1	<i>S. sclarea</i>	Βοτανικός Κήπος Ιουλίας & Αλεξάνδρου Ν. Διομήδους, Χαϊδάρι Αττικής	Φύλλα
S2	<i>S. cadmica</i>		
S3	<i>S. digitaloides</i>		
S4	<i>S. bucharica</i>		
S5	<i>S. dominica</i>		
S6	<i>S. transsylvanica</i>		
S7	<i>S. calycina</i>		
S8	<i>S. sclarea v. Turkestanica</i>		
S9	<i>S. hians</i>		
S10	<i>S. pratensis</i>		
S11	<i>S. glutinosa</i>		
S12	<i>S. verbenaca</i>		
S13	<i>S. virgata</i>		
S14	<i>S. namaensis</i>		
S15	<i>S. lavandulaefolia</i>		

## 3.2 Μοριακή ανάλυση

### 3.2.1 Απομόνωση ολικού DNA από το φυτικό ιστό.

1. Νεαρά φύλλα 100 με 120 mg τοποθετούνται στο γουδί, προστίθεται υγρό άζωτο και ομογενοποιούνται. Ο ιστός μεταφέρεται σε erpendorf των 2 ml.
2. Προετοιμασία του CTAB<sup>1</sup> (προθέρμανση στους 65°C).
3. Προστίθεται σε κάθε δείγμα 500μl CTAB<sup>1</sup>.
4. Επώαση στους 65°C για 30 λεπτά.
5. Στη συνέχεια προστίθεται 500 μl seveg<sup>2</sup> (χλωροφόρμιο) και πραγματοποιείται ισχυρή ανάδευση.
6. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 6 λεπτά στις 12.800 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Μεταφέρεται το υπερκείμενο σε νέο erpendorf και μετράται ο όγκος του.
8. Ακολούθως, ο ίσος όγκος seveg<sup>2</sup> (χλωροφόρμιο) με τον όγκο του υπερκειμένου του δείγματος.
9. Επαναλαμβάνεται φυγοκέντρηση για 4 λεπτά στις 13.000 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
10. Μεταφέρεται η υπερκείμενη υδατική φάση σε νέο erpendorf και μετράται ο όγκος της.
11. Προστίθεται 0,7 φορές του όγκου του υπερκειμένου 100% ισοπροπανόλη και γίνεται ήπια ανάδευση με το χέρι.
12. Τα erpendorf αφήνονται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
13. Στη συνέχεια φυγοκεντρούνται για 15 λεπτά στις 12.800 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου για να γίνει κατακρήμνιση του DNA και να δημιουργηθεί ίζημα.
14. Απομακρύνεται το υπερκείμενο αφήνοντας μόνο το ίζημα και προστίθονται 230 μl 70% EtOH (αιθανόλη).
15. Τα δείγματα με την αιθανόλη φυγοκεντρούνται για 8 λεπτά στις 12.800 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
16. Απομακρύνεται η αιθανόλη και στεγνώνει καλά το ίζημα στον επωαστικό θάλαμο στους 37°C για 30 με 40 λεπτά.
17. Επαναδιαλύεται το ίζημα σε 40 με 50 μl PE και τοποθετείται στους 60°C.

18. Προσδιορίζεται η συγκέντρωση και η καθαρότητα των νουκλεϊκών οξέων με την χρήση του σπεκτροφωτομέτρου (nanodrop).
19. 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 PCR είναι μια σχετικά απλή και ταχεία μέθοδος πολλαπλασιασμού μιας μικρής αλληλουχίας DNA και επιτυγχάνεται με την βοήθεια του ενζύμου DNA πολυμεράση και ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές (primers) σε συνδυασμό και με άλλα αντιδραστήρια τα οποία είναι απαραίτητα για την αντίδραση. Η DNA πολυμεράση είναι ένζυμο που χρησιμοποιεί ως μήτρα το μονόκλωνο DNA για τη σύνθεση μιας καινούργιας συμπληρωματικής αλυσίδας με κατεύθυνση 5'-3', ξεκινώντας από το τμήμα του μορίου που είναι δίκλωνο. Για τη σύνθεση αυτή απαραίτητη είναι η παρουσία μίγματος νουκλεοτιδίων και ιόντων  $Mg^{2+}$ . Η DNA πολυμεράση απομονώνεται από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και παρουσιάζει μεγάλη αντοχή σε υψηλές θερμοκρασίες 72 - 80°C, διατηρώντας επαρκή ενζυματική δραστηριότητα στις συνθήκες της αντίδρασης. Σήμερα με την βοήθεια μεθοδολογιών της Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας έχουν αναπτυχθεί διάφορα παράγωγα της Taq πολυμεράσης με βελτιωμένα χαρακτηριστικά και μεγαλύτερη εξειδίκευση. Αυτές οι πολυμεράσες δεν επιτρέπουν την λάθος τοποθέτηση βάσεων κατά την σύνθεση του DNA, εξαιτίας της 3' προς 5' επιδιορθωτικής ικανότητας (proofreading activity) που έχουν. Η Taq πολυμεράση δεν παρουσιάζει τέτοια ικανότητα και γ' αυτό υπάρχει πιθανότητα να έχουμε παραγωγή προϊόντων με τυχαίες τοποθετήσεις νουκλεοτιδίων στις νέες αλυσίδες DNA (με μικρή συχνότητα) (Berg *et al.*, 2002).



Ακόμη στην αντίδραση απαιτείται ζευγάρι ειδικά σχεδιασμένων ολιγονουκλεοτιδίων εκκινητών (primers), μήκους λίγων βάσεων συμπληρωματικών στις αλληλουχίες των άκρων του προς ενίσχυση τμήματος DNA. Συγκεκριμένα κατά τον σχεδιασμό των εκκινητών, θα πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν τα παρακάτω:

- I. Το μέγεθος των εκκινητών (15-30 νουκλεοτίδια) θα πρέπει να είναι τέτοιο, ώστε η θερμοκρασία για τον υβριδισμό τους στο DNA να κυμαίνεται σε λογικά πλαίσια.
- II. Η αλληλουχία του κάθε εκκινητή να είναι μοναδική και να υβριδίζεται σε μια μόνο περιοχή του DNA.
- III. Η δομή των εκκινητών δεν θα πρέπει να είναι δευτεροταγής. Στην αντίδραση PCR, όπου χρησιμοποιείται ζεύγος εκκινητών δε θα πρέπει τα 3' άκρα τους να είναι συμπληρωματικά.
- IV. Η σύνθεση των βάσεων των εκκινητών θα πρέπει να είναι περίπου 50% σε GC και 50% σε AT.
- V. Ο κάθε εκκινητής θα πρέπει να περιέχει στα άκρα του G ή C.

Η διαδικασία πραγματοποιείται σε κατάλληλη συσκευή ειδικού θερμικού κυκλοποιητή. Πιο συγκεκριμένα η μέθοδος της PCR στηρίζεται στην συνεχή επανάληψη ενός κύκλου που αποτελείται από τρία διαδοχικά στάδια. Σε κάθε στάδιο γίνεται επώαση του δείγματος σε διαφορετική κάθε φορά θερμοκρασία. Ο κυκλοποιητής έχει την δυνατότητα να θερμάνει και να ψύχει τα δείγματα σε σύντομο χρόνο. Τα στάδια που αποτελούν τον επαναλαμβανόμενο κύκλο είναι τα εξής: 1) Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA (denaturation), 2) Υβριδοποίηση εκκινητών (primer annealing) στις αλληλουχίες του DNA-στόχου, 3) Επιμήκυνση εκκινητών (μονόκλωνα ολιγονουκλεοτίδια) (extension).

Κατά την διάρκεια του πρώτου σταδίου το τμήμα DNA που μας ενδιαφέρει επωάζεται σε υψηλή θερμοκρασία (περίπου 95°C), με αποτέλεσμα την αποδιάταξη της διπλής έλικας του DNA (αποδιάταξη/denaturation). Στο δεύτερο στάδιο η θερμοκρασία μειώνεται στους 50-60°C και έτσι οι εκκινητές της αντίδρασης υβριδίζονται με τη συμπληρωματική αλληλουχία του DNA σε κάθε αλυσίδα (υβριδοποίηση εκκινητών/primer annealing). Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C και με την βοήθεια της DNA πολυμεράσης, που

προσθέτει τα νουκλεοτίδια (dNTP's) στο 3' άκρο των εκκινητών, επιτυγχάνεται η σύνθεση των νέων συμπληρωματικών αλυσίδων DNA. Η σύνθεση των αντιγράφων γίνεται από την DNA πολυμεράση πάντα με κατεύθυνση 5' προς 3'.

Η διαδικασία της PCR χωρίζεται σε τρεις φάσεις:

1. **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 .
2. **Γραμμική (linear) φάση:** Η φάση στην οποία παρατηρείται μειωμένη παραγωγή αντιγράφων της αλληλουχίας DNA εξαιτίας της μείωσης της ενεργότητας των αντιδραστηρίων.
3. **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 eppendorf προστίθενται:

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 <sub>2</sub> O	έως τελικό όγκο 50 μl

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

Στάδιο	Γονίδιο	
➤ Αρχική αποδιάταξη	94 <sup>0</sup> C για 2-4 λεπτά	} για 35 κύκλους
➤ Αποδιάταξη	94 <sup>0</sup> C για 1 λεπτό	
➤ Υβριδισμός εκκινητών	45-65 <sup>0</sup> C για 1 λεπτό	
➤ Επιμήκυνση	72 <sup>0</sup> C για 1 λεπτό	
➤ Τελική επιμήκυνση	72 <sup>0</sup> 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 3.2) και οι συνθήκες πραγματοποίησης της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης ήταν οι παρακάτω:

Στάδιο	ITS	
➤ Αρχική αποδιάταξη	94 <sup>0</sup> C για 3:30 λεπτά	} για 35 κύκλους
➤ Αποδιάταξη	94 <sup>0</sup> C για 50 δευτερόλεπτα	
➤ Υβριδισμός εκκινητών	50 <sup>0</sup> C για 50 δευτερόλεπτα	
➤ Επιμήκυνση	72 <sup>0</sup> C για 50 δευτερόλεπτα	
➤ Τελική επιμήκυνση	72 <sup>0</sup> C για 8 λεπτά	

**Πίνακας 3.2:** Αντιδραστήρια για την πραγματοποίηση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης.

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 <sub>2</sub> O	έως τελικό όγκο 30 μl

#### 3.2.2.4 Ενίσχυση τμήματος της περιοχής psbA-trnH

Η περιοχή του psbA-trnH που ενισχύθηκε με την χρήση της τεχνικής PCR ήταν μεγέθους περίπου 500 βάσεων. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση με PCR του τμήματος psbA-trnH είναι οι ακόλουθοι:

- **Forward:** psbA-trnH -F: 5'-GTTTGCATGAACGTAATGCTC-3'
- **Reverse:** psbA-trnH -R: 5'- CGCGCATGGTGGATTCAACAATCC-3'

Για την ενίσχυση της περιοχής psbA-trnH χρησιμοποιούνται ειδικά αντιδραστήρια (Πίνακας 3.3) και οι συνθήκες πραγματοποίησης της αλυσιδωτής αντίδρασης είναι εξής:

Στάδιο	psbA-trnH	
➤ Αρχική αποδιάταξη	94 <sup>0</sup> C για 3:30 λεπτά	} για 35 κύκλους
➤ Αποδιάταξη	94 <sup>0</sup> C για 50 δευτερόλεπτα	
➤ Υβριδισμός εκκινητών	57 <sup>0</sup> C για 50 δευτερόλεπτα	
➤ Επιμήκυνση	72 <sup>0</sup> C για 50 δευτερόλεπτα	
➤ Τελική επιμήκυνση	72 <sup>0</sup> C για 8 λεπτά	

**Πίνακας 3.3:** Αντιδραστήρια για την πραγματοποίηση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης.

Αντιδραστήρια	Όγκος ανά αντίδραση (μl)
✓ Γονιδιωματικό DNA	1 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	1 μl
✓ Taq DNA πολυμεράση (1 unit/μl)	0.3 μl
✓ ddH <sub>2</sub> O	έως τελικό όγκο 30 μl

### 3.2.3 Ηλεκτοφόρηση νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτή αγαρόζης

Ο διαχωρισμός των δεοξυρυβονουκλεϊνικών οξέων γίνεται με βάση το μέγεθος και τη διαμόρφωσή τους με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Σε περίπτωση

γραμμικών κλασμάτων DNA ο διαχωρισμός είναι ανάλογος του μεγέθους τους. 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 1 αναφέρονται οι τυπικές συγκεντρώσεις αγαρόζης σε σχέση με το επιθυμητό εύρος διαχωρισμού.

**Πίνακας 3.4:** Συγκέντρωση πηκτής αγαρόζης ανάλογα με το επιθυμητό εύρος διαχωρισμού.

<b>Αγαρόζη (%)</b>	<b>Εύρος διαχωρισμού γραμμικών μορίων DNA (kb)</b>
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

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:

1. Ποσότητα αγαρόζης αναμειγνύεται σε κωνική φιάλη Erlenmeyer, με ορισμένο όγκο διαλύματος ηλεκτροφόρησης 1xTAE<sup>7</sup>. Η συγκέντρωση της πηκτής αγαρόζης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ανάλογη του μεγέθους των γραμμικών μορίων που ηλεκτροφορούνταν κάθε φορά.
2. Ακολουθεί σταδιακή θέρμανση του μίγματος σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι η αγαρόζη να διαλυθεί εντελώς.
3. Η θερμοκρασία του διαλύματος αφήνεται να πέσει έως τους 60<sup>0</sup>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 βοθρία φόρτωσης ("πηγαδάκια").

4. Αφού η πηκτική έχει σταθεροποιηθεί απομακρύνεται από αυτήν η «χτένα». Η συσκευή ηλεκτροφόρησης συμπληρώνεται με διάλυμα ηλεκτροφόρησης ΤΑΕ<sup>7</sup> έτσι ώστε η πηκτική να παραμένει βυθισμένη 1-2mm από την επιφάνειά του.
5. Τα δείγματα των νουκλεϊνικών οξέων, αφού αναμιχθούν σε ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης<sup>7</sup>, τοποθετούνται στα βοηθία φόρτωσης ("πηγαδάκια") της πηκτικής.
6. Τέλος τα δείγματα αναλύονται σε ηλεκτρικό πεδίο με κατάλληλη τάση που εφαρμόζεται στα άκρα της πηκτικής, η οποία δεν υπερβαίνει τα 60 Vcm<sup>-1</sup>.

### 3.2.4 Ανάκτηση κλάσματος DNA από πηκτική αгарόζης

Για την ανάκτηση κλάσματος DNA από πηκτική αгарόζης χρησιμοποιήθηκε το κατάλληλο πρωτόκολλο της NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up και έγινε σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία:

1. Έπειτα από το πέρας της ηλεκτροφόρησης, απομονώνεται από την πηκτική αгарόζης 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 πηκτικής αгарόζης απαιτούνται 130 μl διαλύματος NT).
2. Ακολουθεί επώαση στους 50°C για περίπου 10 λεπτά, έως ότου διαλυθεί η αгарόζη. Για να διαλυθεί πλήρως, αναδεύουμε ήπια το δείγμα κάθε 2 λεπτά, καθ'όλη τη διάρκεια της επώασης. Εάν χρειαστεί παρατείνεται ο χρόνος επώασης.
3. Το διάλυμα τοποθετείται στη στήλη και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12.600 στροφές/λεπτό για 30 δευτερόλεπτα. Το DNA προσδένεται στην στήλη ενώ το διάλυμα που την διαπέρασε απομακρύνεται.
4. Η στήλη ξεπλένεται με προσθήκη 700 μl διαλύματος NT3. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 30 δευτερολεπτα.
5. Το διάλυμα που διαπέρασε την στήλη απομακρύνεται και η διαδικασία της

φυγοκέντρωσης 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.

6. Η στήλη τοποθετείται σε νέο σωλήνα τύπου erpendorf και το DNA εκλύεται με την προσθήκη 30  $\mu$ l διαλύματος NE (5 mM Tris/HCl, pH 8.5). Το δείγμα επωάζεται για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Ακολουθεί φυγοκέντρωση της στήλης στις 13.000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό.
8. Το δείγμα φυλάσσεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **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 τον χειριστή η ένδειξη DNA.

Η χρήση του μηχανήματος έχει ως εξής:

- ✓ Αρχικά για τον μηδενισμό του οργάνου μεταφέρεται 1  $\mu$ l (ddH<sub>2</sub>O ή άλλο διαλύτη) στην υποδοχή της συσκευής.
- ✓ Στη συνέχεια 1  $\mu$ l από το δείγμα μεταφέρεται στην υποδοχή της συσκευής και λαμβάνονται οι λόγοι OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> και OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> βάσει των οποίων γίνεται η εκτίμηση της καθαρότητας των δειγμάτων των νουκλεϊνικών οξέων.
- ✓ Για να θεωρείται ένα δείγμα νουκλεϊνικών οξέων καθαρό, ο δείκτης OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 1.8-2.0. Μικρότερες τιμές της τιμής αυτής αποτελούν ένδειξη μόλυνσης, π.χ. από την παρουσία πρωτεϊνών, φαινόλης ή άλλων ουσιών.
- ✓ Ο λόγος OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> 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

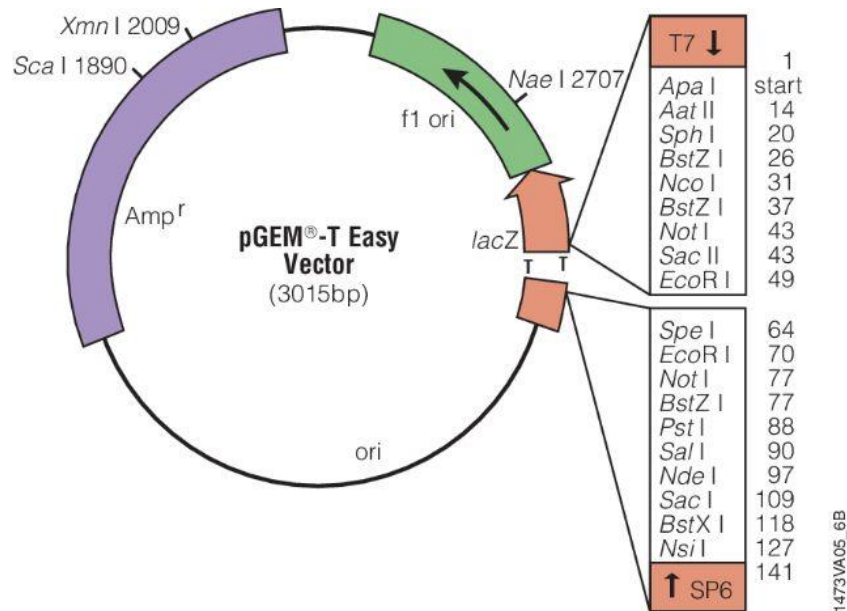
#### 3.2.6.1 Χαρακτηριστικά πλασμιδιακού φορέα

Για την αλληλούχηση ενισχυμένων με PCR τμημάτων DNA χρησιμοποιείται ο πλασμιδιακός φορέας της εταιρείας Promega με την ονομασία pGEM-T Easy Vector. Ο φορέας αυτός είναι μεγέθους της τάξης των 3.015bp (Εικόνα 3.1). 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 του *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 ένθεν και ένθεν του πολυσυνδέσμου (Εικόνα 3.1).

Το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης βρίσκεται υπό τον μεταγραφικό έλεγχο των παραπάνω προαγωγέων ενώ η μεταγραφή μπορεί και επάγεται παρουσία του χημικού ανάλογου της λακτόζης IPTG<sup>10</sup> (ισοπροπυλοθειογαλακτοσίδιο). Η β-γαλακτοσιδάση μεταβολίζει την οργανική ένωση X-gal<sup>11</sup>, 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-gal<sup>11</sup> 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-gal<sup>11</sup> και IPTG<sup>10</sup>.

Τέλος, οι συγκεκριμένοι φορείς φέρουν γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, γεγονός το οποίο επιτρέπει την επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων.



Εικόνα 3.1: 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  $\mu$ l και φαίνεται στον πίνακα 3.5

**Πίνακας 3.5:** Αντιδραστήρια για την πραγματοποίηση της αντίδρασης ενσωμάτωσης DNA στον πλασμιδιακό φορέα.

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 <sub>2</sub> O (έως τελικό όγκο 10 μl)	3
✓ ΣΥΝΟΛΟ	10

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου για 16 ώρες.

### 3.2.7 Μετασχηματισμός ικανών κυττάρων *E. coli* με πλασμίδια

#### 3.2.7.1 Καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων *E. coli* σε υγρό και στερεό υπόστρωμα

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *E. coli* XL-Blue, το οποίο καλλιεργήθηκε σε υγρό ή στερεό θρεπτικό μέσο LB<sup>12</sup>, 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 Δημιουργία βακτηριακών κυττάρων *E. coli* ικανών για μετασχηματισμό (Competent cells)

Περιγραφή διαδικασίας δημιουργίας βακτηριακών κυττάρων *E. coli* ικανών για μετασχηματισμό (Competent cells):

1. Εμβολιασμός 10 ml LB<sup>12</sup> με βακτηριολογικό κρίκο από στοκ γλυκερόλης *E. coli* (XL-Blue) και επώαση υπό ανάδευση, για περίπου 18 ώρες στους 37°C.

2. 2 ml της παραπάνω καλλιέργειας χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό 200 ml αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού LB<sup>12</sup>. Ακολουθεί επώαση, υπό συνεχή ανάδευση, στους 37°C για 2 h, εωσότου η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας να κυμαίνεται από 0.3-0,4 (O.D.<sub>600</sub>=0,3-0,4).
3. Επώαση στον πάγο για 5 λεπτά. Μοίρασμα της καλλιέργειας και φυγοκέντρηση στις 4.200 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά στους 4 °C.
4. Τοποθέτηση στον πάγο και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 50 ml CaCl<sub>2</sub> 80mM.
5. Επώαση στον πάγο για 45 λεπτά και φυγοκέντρηση στις 4.200 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά στους 4 °C.
6. Επαναιώρηση του ιζήματος σε 5 ml CaCl<sub>2</sub> 80mM.
7. Επώαση στον πάγο για 45 λεπτά και προσθήκη 15% γλυκερόλης (900 μl γλυκερόλης στα 5 ml κυττάρων).
8. Τα κύτταρα αφού τοποθετηθούν σε σωλήνες τύπου erpendorf φυλάσσονται στους -80°C.

### 3.2.7.3 Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* με πλασμίδιο

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

1. Σε σωλήνα τύπου erpendorf μεταφέρονται, μέσα σε πάγο, 60-80μl, δεκτικά για μετασηματισμό κύτταρα *Escherichia coli*.
2. Προστίθενται 10-100 ng πλασμιδιακού DNA (αφού τα κύτταρα ξεπαγώσουν), σε όγκο ο οποίος δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1/10 του όγκου των προς μετασηματισμό κυττάρων.
3. Το μίγμα κυττάρων-πλασμιδιακού DNA επωάζεται στον πάγο για περίπου 10 λεπτά.
4. 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.
5. Προστίθενται 200 μl LB<sup>12</sup> θρεπτικού διαλύματος και τα δείγματα επωάζονται στους 37 °C για 1 ώρα.

6. Έπειτα τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό με το κατάλληλο αντιβιοτικό για την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων. Για τον πλασμιδιακό φορέα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία (pGEM-T Easy) χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία με θρεπτικό υλικό LB<sup>12</sup> και αμπικιλίνη.
7. Στην περίπτωση που επιθυμείται η επιλογή αποικιών που φέρουν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, προστίθενται στα κύτταρα 10 μl IPTG<sup>10</sup> 100 mM και 50 μl X-Gal<sup>11</sup> 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.
8. Τέλος, τα τρυβλία με το θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα επωάζονται στους 37<sup>0</sup>C για 18 h.

#### 3.2.7.4 Επιλογή μοναδικής αποικίας

Επιλογή μοναδικής λευκής αποικίας, (επιλέγονται 2 αποικίες). Οι επιλεγμένες αποικίες εμβολιάζονται σε θρεπτικό υγρό μέσο LB<sup>12</sup> παρουσία αμπικιλίνης. Επώαση των αποικιών με ανακίνηση στους 37<sup>0</sup>C για το πολύ 18 ώρες.

#### 3.2.8 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένα κύτταρα *E.coli*

Στην παρούσα μελέτη η απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένα 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 δείγμα αυτού 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:

1. 6 ml θρεπτικού υλικού LB<sup>12</sup>, 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.
2. Από την παραπάνω καλλιέργεια μεταφέρονται 2 x 750 μλ σε σωλήνα erpendorf και φυγοκεντρώνται στις 13.000 στροφές/λεπτό για 3 λεπτά.
3. Το υπερκείμενο απομακρύνεται σχολαστικά αφήνοντας το ίζημα των κυττάρων όσο το δυνατόν στεγνό.
4. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε 150μl διαλύματος STET<sup>4</sup> παρουσία λυσοζύμης<sup>5</sup> (Sigma) σε τελική συγκέντρωση 0,5 mg/ml.
5. Ακολουθεί βρασμός του δείγματος για 45 δευτερόλεπτα και μετά φυγοκέντρωσή του στις 13.000 στροφές/λεπτό για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
6. 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.
7. 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 BE<sup>3</sup>ή) ddH<sub>2</sub>O.
8. 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 3.6.

**Πίνακας 3.6:** Αντιδραστήρια για την πέψη με ενδονουκλεάση περιορισμού (EcoRI).

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

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 έδωσαν την καλύτερη εικόνα μετά την πέψη.

### 3.2.8.2 Μέθοδος απομόνωσης με στήλη (QIAprep)

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

1. 6 ml θρεπτικού υλικού LB<sup>12</sup>, 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. 2 x 1,5 ml από την παραπάνω καλλιέργεια μεταφέρονται σε σωλήνα erpendorf και φυγοκεντρώνται στις 13.000 στροφές/λεπτό για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Το υπερκείμενο απομακρύνεται σχολαστικά και το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 230 μl διαλύματος A1 (περιέχει RNase A<sup>6</sup>).
4. Προστίθενται 230 μl διαλύματος A2, το διάλυμα ανακινείται απαλά και αφήνεται σε ηρεμία σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 3 min.
5. Προστίθενται 270 μl διαλύματος A3, ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 6 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

6. Το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά και μεταφέρεται σε στήλη QIAprep.
7. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Το διάλυμα που διαπέρασε τη στήλη απορρίπτεται, σε αυτό το στάδιο το πλασμιδιακό DNA είναι προσδεδεμένο στην στήλη.
9. 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.
10. Η στήλη τοποθετείται σε σωλήνα erpendorf και ακολουθεί έκλουση, του προσδεδεμένου 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.
11. Ακολουθεί φυγοκέντρηση της στήλης στις 13.000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
12. Το δείγμα φυλάσσεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$  .

Ακολουθεί πέψη με ενδονουκλεάση περιορισμού (EcoRI) για επαλήθευση. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και η ποσότητα αυτών ανά αντίδραση περιγράφονται στον πίνακα 3.7.



**Πίνακας 3.7:** Αντιδραστήρια για την πέψη με ενδονουκλεάση περιορισμού (EcoRI) για επαλήθευση.

Αντιδραστήρια πέψης	Όγκος ανά αντίδραση (μl)
✓ 10x buffer	2
✓ EcoRI enzyme	1
✓ Πλασμιδιακό DNA	2
✓ ddH <sub>2</sub> O (έως τελικό όγκο 20 μl)	15
✓ ΣΥΝΟΛΟ	20

Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 1:30 ώρα και ηλεκτροφόρηση όλου του προϊόντος πέψης σε πήκτωμα αγαρόζης (1,5%) για επιβεβαίωση της πέψης. Ακολουθεί προσδιορισμός της συγκέντρωσης του πλασμιδιακού DNA με φωτομέτρηση στο σπεκτροφωτόμετρο καθώς και στέγνωμα 1000 ng πλασμιδιακού DNA για χρήση στις επακόλουθες αντιδράσεις αλληλούχισης.

### 3.3 Σύγκριση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών - φυλλογενετική ανάλυση

Τα δείγματα εστάλησαν σε αναλυτικό εργαστήριο Βιοχημείας στη Λάρισα για ανάγνωση των αλληλουχιών (sequencing). Ο προσδιορισμός των αλληλουχιών έγινε με σύγκριση αυτών με 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). Ακολούθως προσδιορίστηκαν οι συντηρημένες αλληλουχίες της περιοχής ITS2 μέσω του προγράμματος motif μέσα από την βάση δεδομένων ITS2database (<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/>).

Στην συνέχεια αναλήθηκαν οι δευτεροταγείς δομές των περιοχών ITS1, 5.8S, ITS2 καθώς και της περιοχής rpsA-trnH είτε με την βοήθεια του λογισμικού predict που προσφέρεται από την βάση δεδομένων της περιοχής ITS2, ITS2database, είτε του προγράμματος Freiburg RNA tools (<http://rna.informatik.uni-freiburg.de/>).

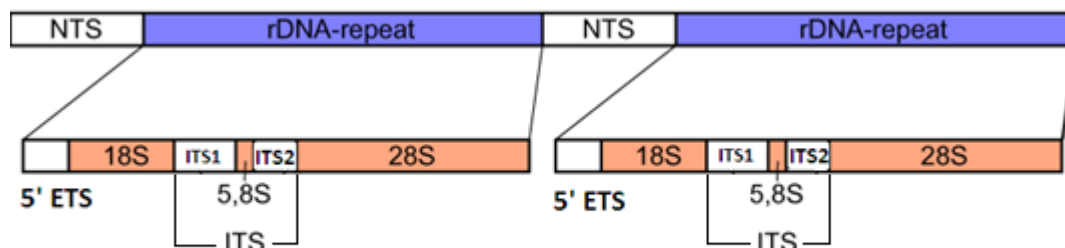
Τέλος, αναλύθηκε η φυλογενετική σχέση μέσω των γενετικών αποστάσεων μεταξύ των δειγμάτων με τη μέθοδο Maximum Composite Likelihood (Tamura K. *et al.*, 2004) και μέσω του φυλογενετικού δέντρου που πραγματοποιήθηκε μέσω του προγράμματος MEGA 6.0 (Tamura K. *et al.*, 2013).

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 Γενικά χαρακτηριστικά της περιοχής ITS

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε η ενίσχυση της περιοχής ITS με τη χρήση της τεχνικής της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και μήτρα ολικό πυρηνικό DNA που απομονώθηκε από 15 είδη του γένους *Salvia*. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν ο ITS1 και ο ITS4. Το μέγεθος του προϊόντος της PCR αντίδρασης να κυμαίνεται από 700 bp μέχρι 730bp. Τα προϊόντα της PCR που προέκυψαν κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακό φορέα pGEM-T Easy και προσδιορίστηκε η αλληλουχία βάσεων 1 και 2 κλώνων από κάθε είδος.

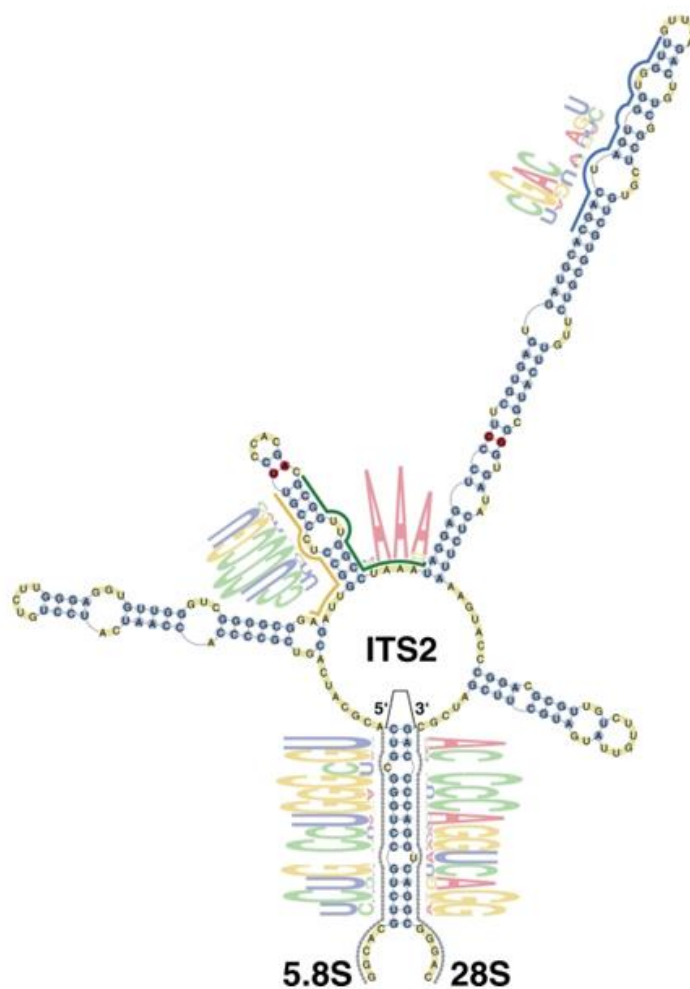
Η περιοχή ITS περιλαμβάνει το 3' άκρο του γονιδίου 18S rDNA (35 bp), την περιοχή ITS1, το 5.8S γονίδιο, την περιοχή ITS2 και το 5' άκρο του γονιδίου 28S rDNA (54 bp) (Εικόνα. 4.1).



Εικόνα 4.1: Οργάνωση της περιοχής ITS.

Οι ακριβείς ακολουθίες των συνοριακών αλληλουχιών ITS2 (borders sequences) της περιοχής ITS2 ταυτοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό «annotate» της ITS2 βάση δεδομένων. Αυτή η προσέγγιση επιτρέπει επίσης τον ακριβή προσδιορισμό του 3' άκρου του 5.8S rDNA και του 5' άκρου του 28S rDNA διότι οι αλληλουχίες αυτές είναι συντηρημένες και παρουσιάζουν μια δίκλωνη διάταξη σε μορφή κοτσανιού (Εικόνα 4.2). Ο ακριβής καθορισμός του 5' άκρου του 5.8S rDNA στηρίχτηκε στις καταχωρημένες αλληλουχίες του 5.8S γονιδίου των ειδών του γένους

*Salvia* που είναι διαθέσιμες στη δημόσια βάση δεδομένων (GenBank). Επίσης προσδιορίστηκαν επακριβώς οι αλληλουχίες που αποτελούν το 18S rDNA με αποτέλεσμα τον ακριβή προσδιορισμό των αλληλουχιών της περιοχής ITS1. Ο ακριβής προσδιορισμός των αλληλουχιών των περιοχών ITS1 και ITS2 είναι απαραίτητος τόσο για την φυλογενετική ανάλυση των διαφόρων ειδών, όσο και την ανάλυση της προβλεπόμενης δευτεροταγούς δομής τους.



**Εικόνα 4.2:** Σχηματική αναπαράσταση του μοντέλου της δευτεροταγούς δομής της περιοχής ITS2 η οποία επιπρόσθετα φέρει τις σχετικά συντηρημένες αλληλουχίες του 3' άκρου του 5.8S και του 5' άκρου του 28S rDNA. Το ζευγάρι των βάσεων του 3' άκρου του 5.8S και του 5' άκρου του 28S rDNA επιτρέπει το σχηματισμό μιας δίκλωνης διάταξης που ομοιάζει με «κοτσάνι» (stem loop structure).

Τα χαρακτηριστικά (μέγεθος, περιεχόμενο G+C) των αλληλουχιών της περιοχής ITS συνοψίζονται στον Πίνακα 4.1. Το μέγεθος της περιοχής ITS1 κυμαίνεται από 229 έως 231bp με την περιεκτικότητα σε G+C να κυμαίνεται από 62,9 έως 70,9%.

Το μέγεθος της περιοχής ITS2 κυμαίνεται από 219 μέχρι 246 bp και το περιεχόμενο σε G+C που ξεκινάει από 63,8 και φθάνει στο 70,5%. Το μέγεθος του 5.8S γονιδίου είναι 165 bp και το περιεχόμενο του σε G+C κυμαίνεται από 53,3 έως 53,9%.

**Πίνακας 4.1:** Η ποικιλότητα στο μέγεθος και στο περιεχόμενο σε G+C της περιοχής ITS1 και της ITS2 καθώς και της 5.8S των ειδών του γένους *Salvia*.

No	Salvia species	ITS1		ITS2		5.8S	
		Length(bp)	G+C (%)	Length(bp)	G+C (%)	Length(bp)	G+C (%)
S1	<i>S. sclarea</i>	230	70,9	220	70,5	165	53,3
S2	<i>S. cadmica</i>	230	69,6	221	68,3	165	53,9
S3	<i>S. digitaloides</i>	229	70,3	220	66,8	165	53,9
S4	<i>S. bucharica</i>	231	70,6	221	67,9	165	53,9
S5	<i>S. dominica</i>	231	70,6	219	68,5	165	53,3
S6	<i>S.transsylvanica</i>	230	70,4	222	68,9	165	53,9
S7	<i>S. calycina</i>	230	66,1	246	68,3	165	53,9
S8	<i>S. sclarea v. turk</i>	230	70,9	220	70,9	165	53,3
S9	<i>S. hians</i>	229	63,3	232	63,8	165	53,9
S10	<i>S. pratensis</i>	230	70,9	222	68,5	165	53,9
S11	<i>S. glutinosa</i>	229	70,3	219	66,2	165	53,9
S12	<i>S. verbenaca</i>	229	69,4	220	66,8	165	53,9
S13	<i>S. virgata</i>	229	69,9	221	68,8	165	53,9
S14	<i>S. namaensis</i>	230	66,5	237	68,4	165	53,9
S15	<i>S.lavandulaefolia</i>	229	62,9	233	65,7	165	53,9

#### 4.1.1 Γενετική παραλλακτικότητα των περιοχών ITS1 και ITS2

Οι γενετικές αποστάσεις στις αλληλουχίες ITS1 και ITS2 εκτιμήθηκαν με βάση με τον τύπο του Kimura-2. Οι γενετικές αποστάσεις στις αλληλουχίες ITS1 εκτιμήθηκαν με βάση με τον τύπο του Kimura-2 (Πίνακας 4.2). Οι γενετικές αποστάσεις κυμαίνονταν από 1,384 (μέγιστο) έως 0,09 (ελάχιστο). Η μέγιστη απόσταση

παρατηρήθηκε μεταξύ των ειδών *S. hians* και *S. sclarea*, ενώ η ελάχιστη μεταξύ των ειδών *S. glutinosa* και *S. digitaloides*. Όλα τα υπόλοιπα είδη παρουσίασαν ενδιάμεσες τιμές στις αποστάσεις τους.

**Πίνακας 4.2:** Γενετικές αποστάσεις της περιοχής ITS1 περιοχής των ειδών του γένους *Salvia*. Με κόκκινο φαίνεται ενδεικτικά η ελάχιστη γενετική απόσταση μεταξύ δύο ειδών του γένους *Salvia*, ενώ με κίτρινο η μέγιστη.

Γενότυποι	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15
<i>S. sclarea</i>	0,000														
<i>S. cadmica</i>	0,608	0,000													
<i>S. digitaloides</i>	1,342	0,224	0,000												
<i>S. bucharica</i>	1,261	0,189	0,175	0,000											
<i>S. dominica</i>	0,197	1,224	1,042	0,530	0,000										
<i>S. transsylvanica</i>	0,563	0,013	0,210	0,177	1,175	0,000									
<i>S. calycina</i>	0,231	0,472	0,843	0,899	0,505	0,437	0,000								
<i>S. sclarea v. turk</i>	0,000	0,608	1,342	1,261	0,197	0,563	0,231	0,000							
<i>S. hians</i>	1,384	0,285	0,105	0,216	1,086	0,268	0,832	1,384	0,000						
<i>S. pratensis</i>	0,572	0,018	0,217	0,182	1,189	0,004	0,445	0,572	0,274	0,000					
<i>S. glutinosa</i>	1,342	0,224	0,000	0,175	1,042	0,210	0,843	1,342	0,105	0,217	0,000				
<i>S. verbenaca</i>	1,372	0,236	0,009	0,186	1,068	0,223	0,866	1,372	0,115	0,229	0,009	0,000			
<i>S. virgata</i>	1,300	0,182	0,046	0,132	0,960	0,183	0,923	1,300	0,105	0,189	0,046	0,055	0,000		
<i>S. namaensis</i>	0,209	0,470	0,899	0,892	0,467	0,435	0,027	0,209	0,827	0,443	0,899	0,922	0,916	0,000	
<i>S. lavandulaefolia</i>	1,384	0,307	0,111	0,230	1,066	0,290	0,832	1,384	0,041	0,296	0,111	0,121	0,100	0,811	0,000

Στην περιοχή ITS2, οι γενετικές αποστάσεις κυμαίνονταν από 0,146 (μέγιστο) έως 0,005 (ελάχιστο). Η μέγιστη απόσταση παρατηρήθηκε μεταξύ των ειδών *S. calycina* και *S. sclarea*, ενώ η ελάχιστη μεταξύ των ειδών *S. hians* και *S. digitaloides*. Όλα τα υπόλοιπα είδη παρουσίασαν ενδιάμεσες τιμές στις αποστάσεις τους (Πίνακας 4.3) .

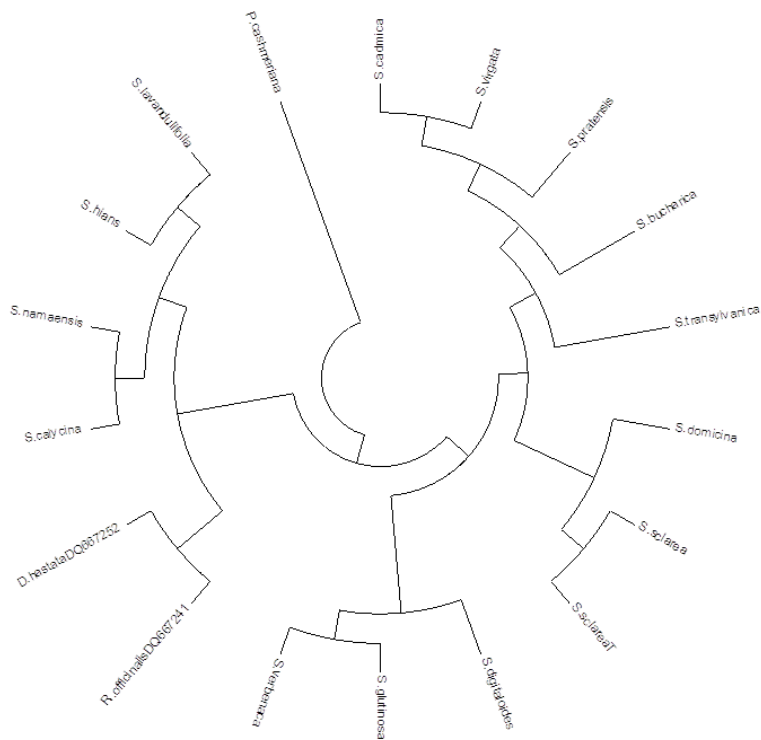
**Πίνακας 4.3:** Γενετικές αποστάσεις της περιοχής ITS2 περιοχής των ειδών του γένους *Salvia*. Με κόκκινο φαίνεται ενδεικτικά η ελάχιστη γενετική απόσταση μεταξύ δύο ειδών του γένους *Salvia*, ενώ με κίτρινο η μέγιστη.

Γενότυποι	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15
<i>S. sclarea</i>	0,000														
<i>S. cadmica</i>	0,058	0,000													
<i>S. digitaloides</i>	0,063	0,024	0,000												
<i>S. bucharica</i>	0,063	0,014	0,028	0,000											
<i>S. dominica</i>	0,028	0,029	0,033	0,034	0,000										
<i>S. transsylvanica</i>	0,063	0,014	0,028	0,019	0,033	0,000									
<i>S. calycina</i>	0,146	0,112	0,101	0,112	0,130	0,106	0,000								
<i>S. sclarea v. turk</i>	0,005	0,053	0,058	0,058	0,023	0,058	0,141	0,000							
<i>S. hians</i>	0,122	0,073	0,063	0,079	0,090	0,078	0,074	0,116	0,000						
<i>S. pratensis</i>	0,058	0,009	0,024	0,014	0,029	0,005	0,101	0,053	0,073	0,000					
<i>S. glutinosa</i>	0,068	0,028	0,005	0,033	0,038	0,033	0,096	0,063	0,058	0,028	0,000				
<i>S. verbenaca</i>	0,063	0,024	0,000	0,028	0,033	0,028	0,101	0,058	0,063	0,024	0,005	0,000			
<i>S. virgata</i>	0,053	0,005	0,019	0,009	0,024	0,009	0,106	0,048	0,068	0,005	0,024	0,019	0,000		
<i>S. namaensis</i>	0,123	0,090	0,090	0,090	0,107	0,085	0,019	0,118	0,074	0,079	0,085	0,090	0,085	0,000	
<i>S. lavandulaefolia</i>	0,117	0,079	0,079	0,095	0,107	0,095	0,079	0,112	0,064	0,089	0,074	0,079	0,084	0,080	0,000

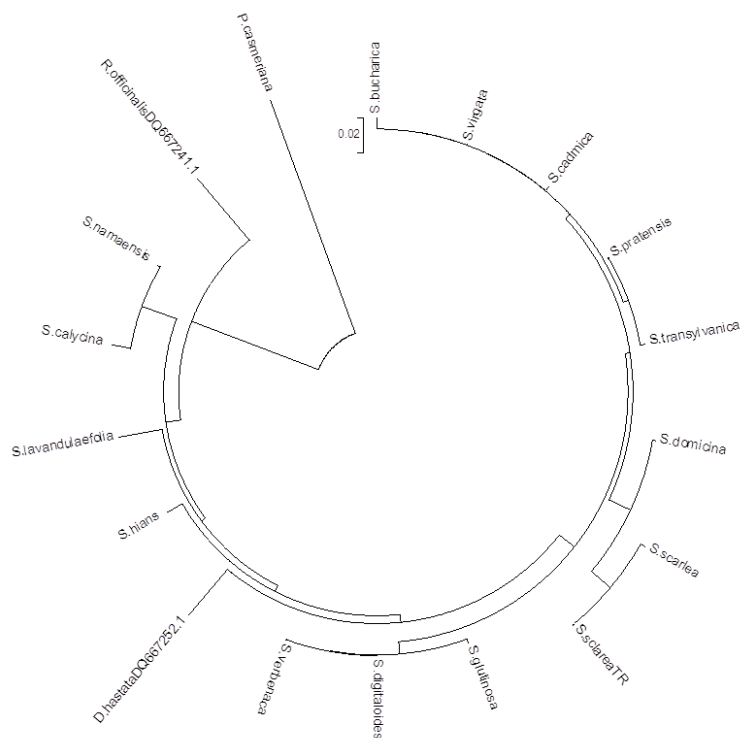
#### 4.1.2 Φυλογενετική ανάλυση των ειδών του γένους *Salvia* με βάση τις αλληλουχίες της περιοχής ITS1 και της περιοχής ITS2

Όλες οι ITS αλληλουχίες διερευνήθηκαν μέσω της μεθόδου BLASTN. Τα αποτελέσματα έδειξαν και οι 15 ITS αλληλουχίες παρουσίασαν μεγάλο ποσοστό ομοιότητας (>93%) αποκλειστικά με ITS αλληλουχίες της Genbank οι οποίες είχαν καταχωρηθεί ως αλληλουχίες του γένους *Salvia*.

Στη συνέχεια, κατασκευάστηκε φυλογενετικό δένδρο με βάση την ανάλυση neighbor-joining (NJ) των αλληλουχιών της περιοχής ITS1 και της περιοχής ITS2 rDNA των υπό μελέτη ειδών του γένους *Salvia* καθώς και της περιοχής ITS1 και της περιοχής περιοχής ITS2 του είδους *R. officinalis* και του είδους *D. hastata* τα οποία ανήκουν στα γένη *Rosmarinus* και *Dorystaechas*, αντίστοιχα. Τα 15 είδη του γένους *Salvia* στην μελέτη μας ομαδοποιούνται σε τρεις κλάδους sensu Walker and Sytsma (2007) και τα είδη *R. officinalis* και *D. hastata* αποτελούν διακριτό σημείο διαχωρισμού του κλάδου I από τους κλαδους II και III (Walker and Sytsma, 2007) (Εικόνα 4.4 και Εικόνα 4.5). Η φυλογενετική ανάλυση, τόσο στο ITS1 όσο και στο ITS2, έδειξε ότι τα είδη *S. glutinosa*, *S. verbenaca* και *S. digitaloides* ομαδοποιούνται στον κλάδο II. Ο κλάδος I περιλαμβάνει τέσσερα είδη όπως τα *S. calycina*, *S. namaensis*, *S. hians* και *S. lavandulaefolia*, και ο κλάδος III τα υπόλοιπα είδη.



**Εικόνα 4.4:** Εξελικτικές σχέσεις των ειδών του γένους *Salvia* οι οποίες βασίζονται στις αλληλουχίες της περιοχής ITS1.



**Εικόνα 4.5:** Εξελικτικές σχέσεις των ειδών του γένους *Salvia* οι οποίες βασίζονται στις αλληλουχίες της περιοχής ITS2.



### 4.1.3 Διερεύνηση της δευτεροταγούς δομής των περιοχών ITS1 και ITS2

Η δευτεροταγής δομή των μεταγραφημάτων ITS1, ITS2 καθώς και του 5.8S των διαφόρων ειδών του γένους *Salvia* διερευνήθηκε είτε μέσω των δυνατοτήτων πρόβλεψης από το λογισμικό «predict» που προσφέρεται από την βάση δεδομένων της περιοχής ITS2, (ITS2database) (<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/>), είτε μέσω των δυνατοτήτων που προσφέρονται στην εργαλειοθήκη ανάλυσης της δευτεροταγούς δομής του RNA, Freiburg RNA tools (<http://rna.informatik.uni-freiburg.de/>) είτε των δυνατοτήτων πρόβλεψης της δομής που παρέχονται από το λογισμικό RNA fold server (<http://rna.tbi.univie.ac.at/>).

#### 4.1.3.1 Ανάλυση της δευτεροταγούς δομής της περιοχής ITS1

Η ανάλυση της δευτεροταγούς δομής των περιοχών ITS1 των ευκαρυωτικών κυττάρων έχει δείξει ότι δεν υπάρχει σταθερό μοντέλο όπως αυτό που παρατηρείται για την περιοχή ITS2 (Coleman, 2015). Στα αγγειόσπερμα στις αλληλουχίες του ITS1 υπάρχει μια συντηρημένη περιοχή (motif), 5'-GGCRY(4-7n) GYGYCAAGGAA-3' (Liu and Schardl, 1994). Στην μελέτη μας, όλα τα δείγματα του γένους *Salvia* περιείχαν αυτή την συντηρημένη περιοχή M1, μήκους 15 bp και περιλαμβάνει την εξής αλληλουχία: M1 (5'-GGCGCGGAATGCGCCAAGGAA-3') (Εικόνα 4.5).

**A**

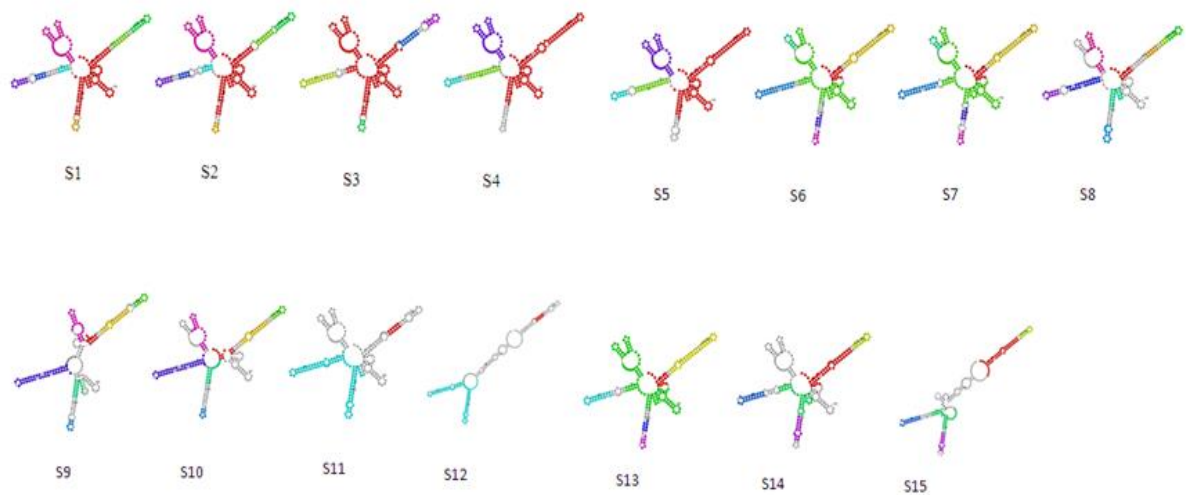
```
GTCGAAACCTGCAAAGCAGACCGCGAACACGTGTTTAAACCGACCGACGGCGCACGGCTCGGGGGCGACCCCG  
CTCCGTGCCGCGTGCACCCCGCCCGCGCGTTCCTCGGGTCGCGCGGCGCGGGCTAACGAACCCCGCGCGGA  
ATGCGCCAAGGAAAACCTAAACGAAGCGTCCGCCCCCGCGCCCGTTTCGCGGAGTGCGCGGGGGCGTCGGACGT  
CTATCAAA
```

**B**

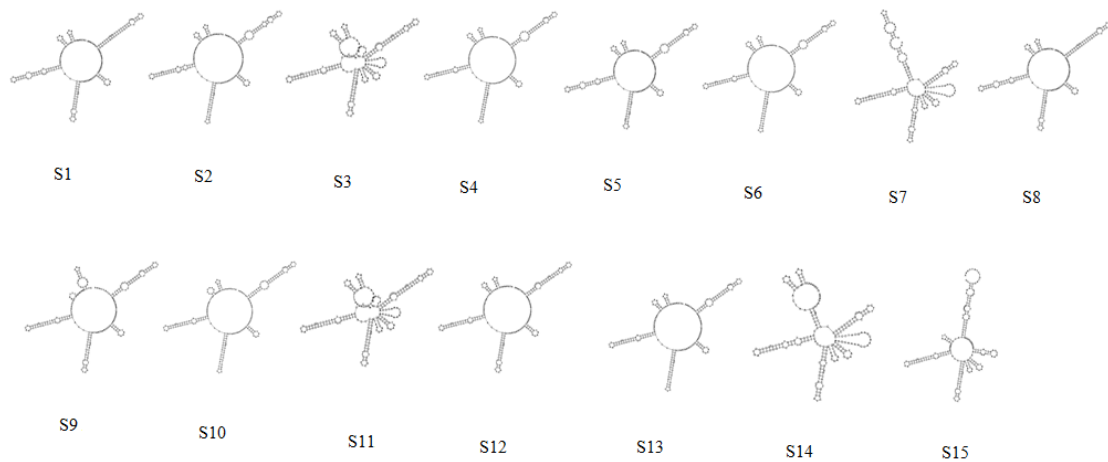
<i>S.bucharica</i>	GGCGCGGAATGCGCCAAGGAA
<i>S.cadmica</i>	GGCGCGGAATGCGCCAAGGAA
<i>S.calycina</i>	GGCGCGGAATGCGCCAAGGAA
<i>S.digitaloides</i>	GGCGCGGAATGCGCCAAGGAA
<i>S.domicina</i>	GGCGCGGAATGCGCCAAGGAA
<i>S.glutinosa</i>	GGCGCGGAATGCGCCAAGGAA
<i>S.hians</i>	GGCGCGGAATGCGCCAAGGAA
<i>S.lavandulaefolia</i>	GGCGCGGAATGCGCCAAGGAA
<i>S.namaensis</i>	GGCGCGGAATGCGCCAAGGAA
<i>S.pratensis</i>	GGCGCGGAATGCGCCAAGGAA
<i>S.sclarea</i>	GGCGCGGAATGCGCCAAGGAA
<i>S.transylvanica</i>	GGCGCGGAATGCGCCAAGGAA
<i>S.sclarea v. turk</i>	GGCGCGGAATGCGCCAAGGAA
<i>S.virgata</i>	GGCGCGGAATGCGCCAAGGAA
<i>S.verbenaca</i>	GGCGCGGAATGCGCCAAGGAA
	*****

**Εικόνα 4.5:** A) Ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της ITS1 περιοχής και της συντηρημένης αλληλουχίας (motif) που φαίνεται με κίτρινο χρώμα στη *S. sclarea*. B) Ευθυγράμμιση των συντηρημένων motifs στην ITS1 περιοχή για τα υπο μελέτη είδη.

Ωστόσο, μια προβλεπόμενη και κατά προσέγγιση δευτεροταγής δομή της ITS1 θα μπορούσε να δημιουργηθεί χρησιμοποιώντας το λογισμικό ExpaRNA και το λογισμικό RNA fold server. Στην εικόνα 4.6 και στην εικόνα 4.7 παραθέεται η πλησιέστερη δευτεροταγής δομή της περιοχής ITS1 των διαφόρων υπό μελέτη ειδών του γένους *Salvia* σύμφωνα με την μοντελοποίηση του ExpaRNA και του RNA fold server. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι με βάση το λογισμικό ExpaRNA οι περισσότερες ITS1 παρουσιάζουν παρόμοιες δευτεροταγείς δομές (Εικόνα 4.6). Το λογισμικό RNAfold Vienna RNA Package έδειξε επίσης την παρουσία παρόμοιων δευτεροταγών δομών μεταξύ των ITS1 (Εικόνα 4.7).



**Εικόνα 4.6:** Συγκριτική ανάλυση της δευτεροταγούς δομής της ITS1 του είδους *S. sclarea* και άλλων υπό μελέτη ειδών του γένους *Salvia* με το λογισμικό ExpaRNA.



**Εικόνα 4.7:** Δευτεροταγούς δομής της περιοχής ITS1 περιοχής των υπο μελέτη ειδών του γένους *Salvia* σύμφωνα με το λογισμικό RNA fold.

#### 4.1.3.2 Ανάλυση της δευτεροταγούς δομής της περιοχής ITS2

Όλες οι αλληλουχίες της περιοχής ITS2 φέρουν τρεις συντηρημένες αλληλουχίες (motifs) οι οποίες προσδιορίστηκαν μέσω του προγράμματος motif της ITS2 database. Όλα τα motifs, M1, M2, και M3, είναι μήκους 15 bp και περιλαμβάνουν τις εξής αλληλουχίες: M1: 5'-TA(C/T)TGGCCTCCCGT(G/A)-3'), M2: 5'-CGGCTGGCCCAAATG-3', M3: 5' -GACAAGTGGTGGTTG-3' (Εικόνα 4.8A). Στην εικόνα 4.8B παρουσιάζεται η αλληλουχία των συντηρημένων motifs καθώς και η ευθυγράμμιση των συντηρημένων motifs της ITS2 περιοχής στα διάφορα είδη του γένους *Salvia* που εξεταστήκαν στην παρούσα μελέτη.

**A**

```
CGCATCGCGTCGCCCCCAACACATGCGGGGGCGGATACTGGCCTCCCGTGC GCCCCGGCGCGCGGGCTGGCCC
AAATGCGATCCCTCGGCGACTCGTGTCACGACAAGTGGTGGTTGAAATCTCAATCTCTTGC GCGCTGTCGCGCGT
GCGTCTCCGCGAGGGCATCCATCAACGACCCAACGGCCGGTGC GCGCTCGGGCGCCCGACCTTCGACCG
```

**B**

M1	M2	M3		
digitaloides	TATTGGCCTCCCGTG	sclarea	CGGCTGGCCCAAATG	GACAAGTGGTGGTTG
calycina	TATTGGCCTCCCGTG	sclarea v.turk	CGGCTGGCCCAAATG	GACAAGTGGTGGTTG
hians	TATTGGCCTCCCGTG	cadmica	CGGCTGGCCCAAATG	GACAAGTGGTGGTTG
glutinosa	TATTGGCCTCCCGTG	digitaloides	CGGCTGGCCCAAATG	GACAAGTGGTGGTTG
verbecana	TATTGGCCTCCCGTG	bucharica	CGGCTGGCCCAAATG	GACAAGTGGTGGTTG
nanaensis	TATTGGCCTCCCGTG	dominicade	CGGCTGGCCCAAATG	GACAAGTGGTGGTTG
sclarea	TACTGGCCTCCCGTG	transsylvanica	CGGCTGGCCCAAATG	GACAAGTGGTGGTTG
sclarea v.turk	TACTGGCCTCCCGTG	calycina	CGGCTGGCCCAAATG	GACAAGTGGTGGTTG
cadmica	TACTGGCCTCCCGTG	hians	CGGCTGGCCCAAATG	GACAAGTGGTGGTTG
transsylvanica	TACTGGCCTCCCGTG	pratensis	CGGCTGGCCCAAATG	GACAAGTGGTGGTTG
pratensis	TACTGGCCTCCCGTG	glutinosa	CGGCTGGCCCAAATG	GACAAGTGGTGGTTG
dominica	TACTGGCCTCCCGTG	verbecana	CGGCTGGCCCAAATG	GACAAGTGGTGGTTG
virgata	TACTGGCCTCCCGTG	virgata	CGGCTGGCCCAAATG	GACAAGTGGTGGTTG
bucharica	TACTGGCCTCCCGTG	lavandulaefolia	CGGCTGGCCCAAATG	GACAAGTGGTGGTTG
lavandulaefolia	TATTGGCCTCCCGTAA	nanaensis	CGGCTGGCCCAAATG	GACAAGTGGTGGTTG
	** *****		*****	*****

**Εικόνα 4.8:** Α) Ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της ITS2 περιοχής και τα συντηρημένα motifs στο είδος *S. sclarea*. Με γαλάζιο χρώμα φαίνεται το M1, με πράσινο το M2 και με κόκκινο το M3. Β) Ευθυγράμμιση των συντηρημένων motifs στην ITS2 περιοχή για τα υπο μελέτη είδη.

Σύμφωνα με το επικρατέστερο μοντέλο της δευτεροταγούς δομής, οι αλληλουχίες της περιοχή ITS2 φαίνεται να σχηματίζουν τέσσερις έλικες (I, II, III και IV) (Εικόνα 4.9). Η βάση δεδομένων ITS2 (ITS2 database) παρέχει μια κεντρική πηγή πληροφοριών που αφορά τις αλληλουχίες της περιοχής ITS2 σε φυτά και άλλους ευκαρυωτικούς οργανισμούς καθώς και ένα μοντέλο δευτεροταγούς δομής για κάθε

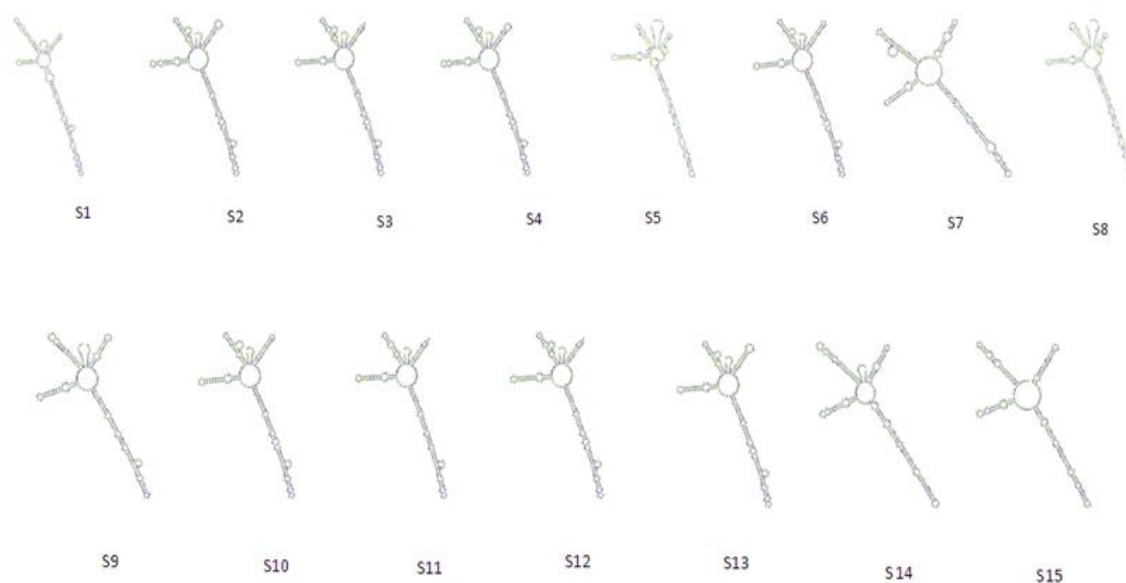
μια από καταχωρημένες ITS2 αλληλουχίες. Επίσης, μέσω του προγράμματος «predict», παρέχεται η δυνατότητα προσομοίωσης της δευτεροταγούς δομής μιας νέας μη καταχωρημένης αλληλουχίας ITS2 με τις ήδη υπάρχουσες και την επιλογή της πλησιέστερης. Η επιλογή της πλησιέστερης παρόμοιας δευτεροταγούς δομής βασίζεται στο ποσοστό ομολογίας αλληλουχίας-δομής που παρουσιάζουν οι έλικες I, II, III και IV (Helix transfer) των ήδη καταχωρημένων και μοντελοποιημένων ITS2 αλληλουχιών σε σύγκριση με το άγνωστο δείγμα των ITS2 αλληλουχιών.

Η ανάλυση του ποσοστού ομολογίας των ελίκων (Helix transfer) των αλληλουχιών της ITS2 των διαφόρων υπό μελέτη ειδών του γένους *Salvia* έδειξε το ποσοστό ομολογίας των ελίκων να κυμαίνεται από 78,571% έως 100% γεγονός το οποίο δείχνει ότι σημαντικό μέρος της παραλλακτικότητας των αλληλουχιών της περιοχής ITS2 βρίσκονται στις έλικες I, II, III και IV (Πινάκας 4.4).

**Πίνακας 4.4:** Βέλτιστες τιμές ομολογίας των ελίκων της περιοχής ITS2 των διαφόρων υπό μελέτη ειδών φυτών του γένους *Salvia* (S1-S15) σε σύγκριση με τις μοντελοποιημένες μήτρες (*Salvia* model templates).

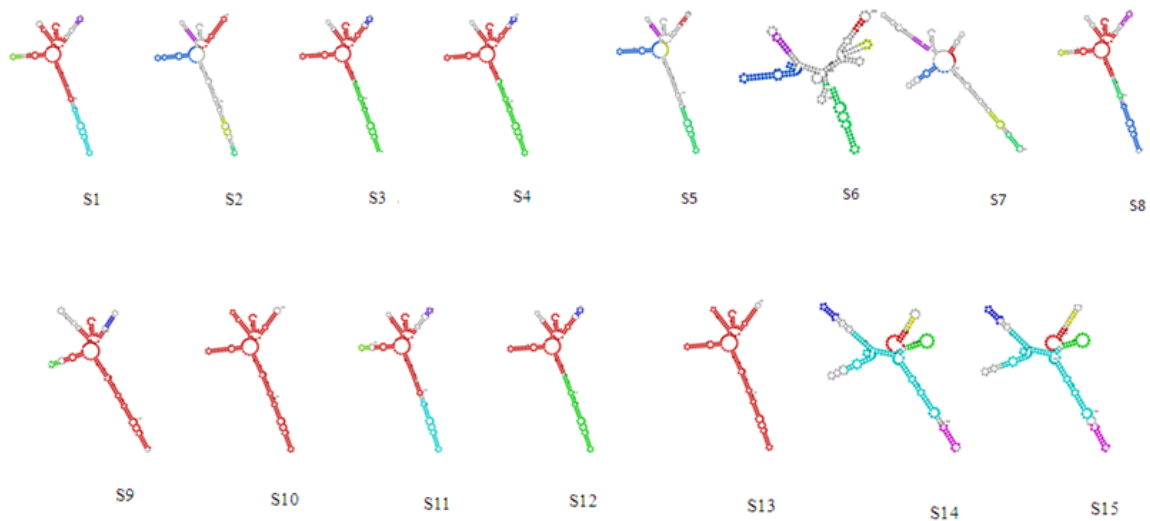
Είδη του γένους <i>Salvia</i>	<i>Salvia</i> model template	HelixI	HelixII	HelixIII	HelixVI
<i>S.sclarea</i> (S1)	<i>S. sclarea</i>	100	100	100	100
<i>S.cadmica</i> (S2)	<i>S. farinaceae</i>	100	91,667	100	90,909
<i>S. digitaloides</i> (S3)	<i>S. farinaceae</i>	90,909	100	100	90,909
<i>S. bucharica</i> (S4)	<i>S. deserta</i>	91,667	100	100	90,909
<i>S. dominica</i> (S5)	<i>S. aethiopsis</i>	90	100	100	100
<i>S. transylvanica</i> (S6)	<i>S. farinaceae</i>	100	100	100	100
<i>S. calycina</i> (S7)	<i>S. officinalis</i>	100	100	100	78,571
<i>S. sclarea v. turk</i> (S8)	<i>S. sclarea</i>	100	100	97,297	100
<i>S. hians</i> (S9)	<i>S. sclarea</i>	92,857	100	100	100
<i>S. pratensis</i> (S10)	<i>S. pratensis</i>	100	100	100	100
<i>S. glutinosa</i> (S11)	<i>Salvia X superba</i>	90,909	100	100	90,909
<i>S. verbenaca</i> (S12)	<i>S. pratensis</i>	90,9	100	100	90,909
<i>S. virgata</i> (S13)	<i>S. farinaceae</i>	100	100	100	90,909
<i>S. namaensis</i> (S14)	<i>S. officinalis</i>	100	100	100	100
<i>S. lavandulaefolia</i> (S15)	<i>S. rugosa</i>	100	91,667	100	81,25

Η πλησιέστερη δευτεροταγής δομή της περιοχής ITS2 των διαφόρων υπό μελέτη ειδών της *Salvia* δίνεται στην εικόνα 4.9.



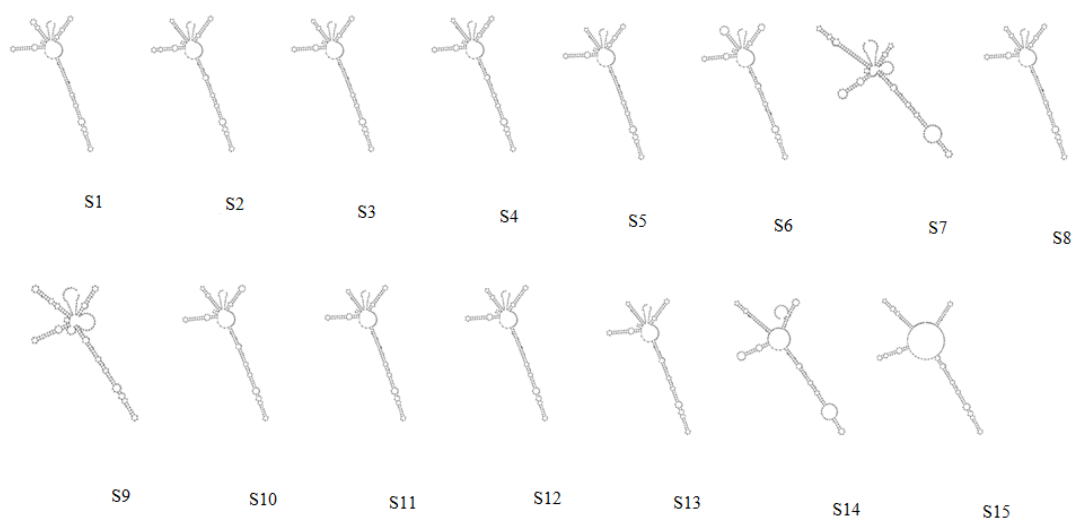
**Εικόνα 4.9:** Η πλησιέστερη δευτεροταγής δομή της περιοχής ITS2 στα διάφορα των υπό μελέτη ειδών του γένους *Salvia* που ανευρέθηκε στη βάση δεδομένων ITS2.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η μοντελοποίηση της δευτεροταγούς δομής με βάση του προγράμματος ExraRNA (Εικόνα 4.10). Το πρόγραμμα ExraRNA παρέχει μια εκτίμηση της δευτεροταγούς δομής δυο RNA ή DNA αλληλουχιών με έμφαση στις κοινές τους συντηρημένες περιοχές αλληλουχίας και δομής (sequence-structure motifs). Αυτή η προσέγγιση της μοντελοποίησης παρουσίασε δευτεροταγείς δομές οι οποίες φέρουν τέσσερις έλικες.



**Εικόνα 4.10:** Δευτεροταγής δομή της περιοχής ITS2 των υπο μελέτη ειδών του γένους *Salvia* σύμφωνα με το λογισμικό ExpaRNA.

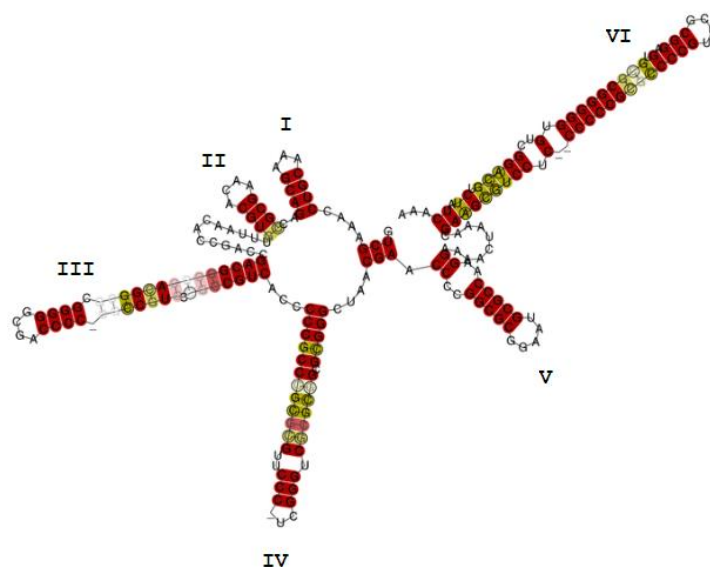
Το λογισμικό RNA fold server παρέχει επίσης τη δυνατότητα πρόβλεψης της δευτεροταγούς δομής RNA ή DNA αλληλουχιών. Στην εικόνα 4.11 παραθέτεται η πλησιέστερη δευτεροταγής δομή της περιοχής ITS2 των διαφόρων υπό μελέτη ειδών του γένους *Salvia*. Αυτή η προσέγγιση της μοντελοποίησης έδειξε ότι όλες οι ITS2 αλληλουχίες έχουν την τυπική δομή των τεσσάρων ελίκων.



**Εικόνα 4.11:** Συγκριτική ανάλυση της δευτεροταγούς δομής της περιοχής ITS2 των ειδών του γένους *Salvia* σύμφωνα με το λογισμικό RNA fold.

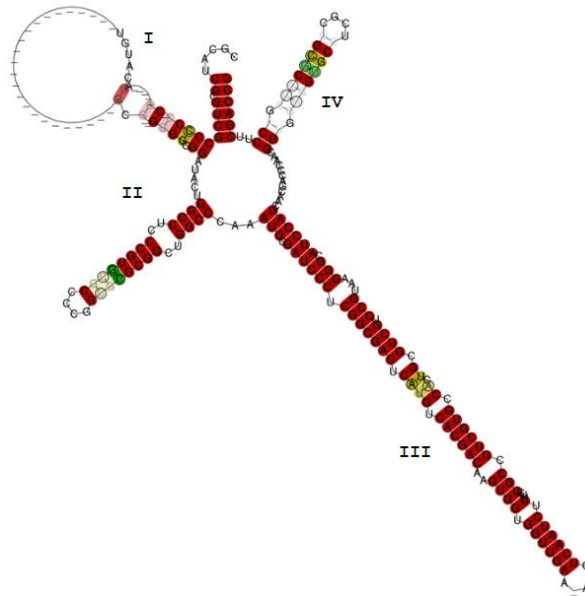
#### 4.1.4 Ανάλυση της συναινετικής δευτεροταγούς δομής της περιοχής ITS1 και ITS2

Το λογισμικό LocARNA-P επιτρέπει τον προσδιορισμό της συναινετικής δευτεροταγούς δομής της περιοχής ITS1 και ITS2 των 15 ειδών του γένους *Salvia*. Το αποτέλεσμα αυτής της προσέγγισης παρατίθενται στις εικόνες 4.12 και 4.13. Η συναινετική δευτεροταγής δομή της περιοχή ITS1 φέρει έξι έλικες, με τις έλικες III, IV και VI να εμφανίζουν μικρό ποσοστό σταθερών ζεύγων βάσεων. Η συναινετική δευτεροταγής δομή της περιοχής ITS2 φέρει τέσσερις έλικες, με τις έλικες I και IV να εμφανίζουν μικρό ποσοστό σταθερών ζεύγων βάσεων (G-C, A-U, G-U). Η καταμέτρηση του συνολικού αριθμού των σταθερών ζεύγων βάσεων στις έλικες της συναινετικής δευτεροταγούς δομής της περιοχής ITS1 (61 ζεύγη βάσεων) ή της ITS2 (61 ζεύγη βάσεων) έδειξε το ποσοστό των νουκλεοτιδίων που σχηματίζουν κανονικά ζεύγη βάσεων στις έλικες στην περιοχή ITS1 (π.χ. 122/230) το οποίο είναι μικρότερο από το ποσοστό της περιοχής ITS2 (122/224).



**Εικόνα 4.12:** Η προβλεπόμενη συναινετική δευτεροταγής δομή της περιοχής ITS1 στα 15 είδη του γένους *Salvia* σύμφωνα με το λογισμικό LocARNA-P. Τα σταθερά ζεύγη βάσεων (G-C, A-U, G-U) παρουσιάζονται με μπορντό και πράσινο χρώμα.





**Εικόνα 4.13:** Η προβλεπόμενη συναινετική δευτεροταγής δομή της περιοχής ITS2 στα 15 είδη του γένους *Salvia* σύμφωνα με το λογισμικό LocARNA-P. Τα σταθερά ζεύγη βάσεων (G-C, A-U, G-U) παρουσιάζονται με μπορντό και πράσινο χρώμα.

#### 4.1.5 Ανάλυση της δευτεροταγούς δομής της περιοχής 5.8S

Η ανάλυση της δευτεροταγούς δομής της περιοχής 5.8S σε όλους τους γενοτύπους, αποκάλυψε ότι οι σημειακές μεταλλάξεις που παρατηρήθηκαν (Πίνακας 4.5) δεν επηρέασαν τις δευτεροταγείς δομές της 5.8S RNA, υποδηλώνοντας ότι η διατήρηση της δευτεροταγούς δομής μπορεί να παίζει σημαντικό βιολογικό ρόλο στη λειτουργία του 5.8S RNA (Εικόνα 4.15). Τα τρία μοτίβα στο 5.8S, που είναι συντηρημένα στα M1 (5'-CGATGAAGAACGTAGC-3'), M2 (5'-GAATTGCAGAATCC-3') και M3 (5'-TTTGAACGCA-3'), βρέθηκαν σε όλους τους γενοτύπους (Εικόνα 4.14).

A

TGTCATAACGACTCTCGGCAAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAAGAAAGCGTAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGC  
 ACGAATTCGTGAACCATCGAGTCTTTGAAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCCTGCCTGGCGTCA

B

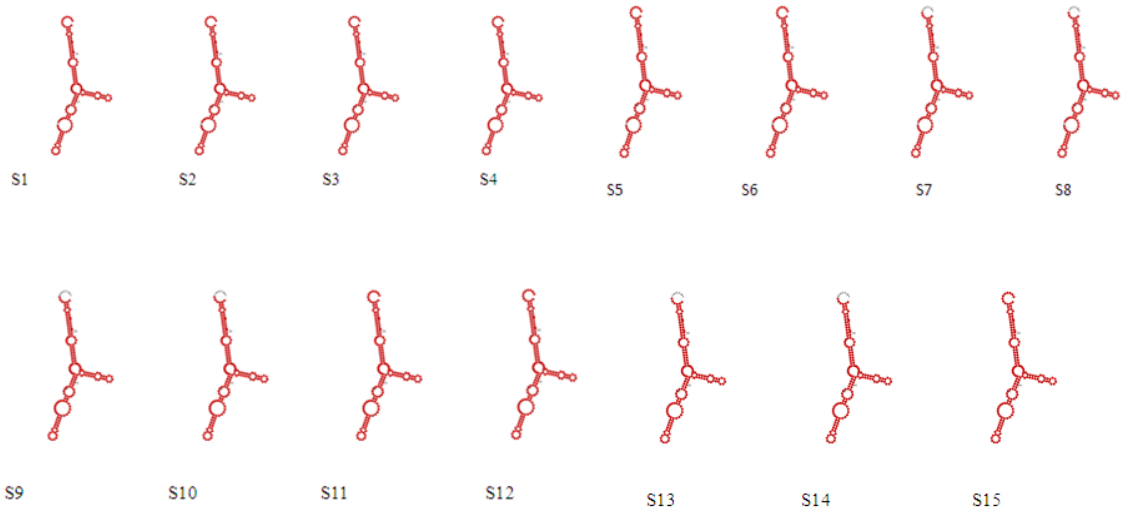
M1		M2		M3	
<i>Sclarea</i>	CGATGAAGAACOTAGC	<i>sclarea</i>	GAATTCAGAAATCC	<i>sclarea</i>	TTTGAACGCA
<i>cadmica</i>	CGATGAAGAACOTAGC	<i>cadmica</i>	GAATTCAGAAATCC	<i>cadmica</i>	TTTGAACGCA
<i>digitaloides</i>	CGATGAAGAACOTAGC	<i>digitaloides</i>	GAATTCAGAAATCC	<i>digitaloides</i>	TTTGAACGCA
<i>bucharica</i>	CGATGAAGAACOTAGC	<i>bucharica</i>	GAATTCAGAAATCC	<i>bucharica</i>	TTTGAACGCA
<i>dominica</i>	CGATGAAGAACOTAGC	<i>dominica</i>	GAATTCAGAAATCC	<i>dominica</i>	TTTGAACGCA
<i>transsylvanica</i>	CGATGAAGAACOTAGC	<i>transsylvanica</i>	GAATTCAGAAATCC	<i>transsylvanica</i>	TTTGAACGCA
<i>calycina</i>	CGATGAAGAACOTAGC	<i>calycina</i>	GAATTCAGAAATCC	<i>calycina</i>	TTTGAACGCA
<i>sclarea v. turk</i>	CGATGAAGAACOTAGC	<i>sclarea v. turk</i>	GAATTCAGAAATCC	<i>sclarea v. turk</i>	TTTGAACGCA
<i>hians</i>	CGATGAAGAACOTAGC	<i>hians</i>	GAATTCAGAAATCC	<i>hians</i>	TTTGAACGCA
<i>pratensis</i>	CGATGAAGAACOTAGC	<i>pratensis</i>	GAATTCAGAAATCC	<i>pratensis</i>	TTTGAACGCA
<i>glutinosa</i>	CGATGAAGAACOTAGC	<i>glutinosa</i>	GAATTCAGAAATCC	<i>glutinosa</i>	TTTGAACGCA
<i>verbenaca</i>	CGATGAAGAACOTAGC	<i>verbenaca</i>	GAATTCAGAAATCC	<i>verbenaca</i>	TTTGAACGCA
<i>virgata</i>	CGATGAAGAACOTAGC	<i>virgata</i>	GAATTCAGAAATCC	<i>virgata</i>	TTTGAACGCA
<i>lavandulaefolia</i>	CGATGAAGAACOTAGC	<i>lavandulaefolia</i>	GAATTCAGAAATCC	<i>lavandulaefolia</i>	TTTGAACGCA
<i>namaensis</i>	CGATGAAGAACOTAGC	<i>namaensis</i>	GAATTCAGAAATCC	<i>namaensis</i>	TTTGAACGCA
	*****		*****		*****

**Εικόνα 4.14:** A) Νουκλεοτιδική αλληλουχία της περιοχής 5.8S και συντηρημένα motifs στο *S. sclarea*. Με κίτρινο χρώμα φαίνεται το M1, με κόκκινο το M2 και πράσινο το M3. B) Ευθυγράμμιση των τριών συντηρημένων μοτίβων στην περιοχή 5.8S.

**Πίνακας 4.5:** Σημειακές μεταλλάξεις στην περιοχή 5.8S στις θέσεις 6 και 59.

No	<i>Salvia sp.</i>	6 <sup>n</sup>	59 <sup>n</sup>
S1	<i>S.sclarea</i>	T	A
S2	<i>S.cadmica</i>	T	G
S3	<i>S.digitaloides</i>	T	G
S4	<i>S.bucharica</i>	T	G
S5	<i>S.dominica</i>	T	A
S6	<i>S.transsylvanica</i>	T	G
S7	<i>S.calycina</i>	A	G
S8	<i>S.turkestanica</i>	T	A
S9	<i>S.hians</i>	A	G
S10	<i>S.pratensis</i>	T	G
S11	<i>S.glutinosa</i>	T	G
S12	<i>S.verbenaca</i>	T	G
S13	<i>S.virgata</i>	T	G
S14	<i>S.namaensis</i>	A	G
S15	<i>S.lavandulaefolia</i>	A	G

Οι αλληλουχίες της 5.8S περιοχής αναλύθηκαν και μοντελοποιήθηκαν με βάση το λογισμικό ExraRNA. Σύμφωνα με την μοντελοποίηση, η δευτεροταγής δομή σε όλα τα δείγματα της μελέτης μας ήταν ίδια όπως φαίνεται και στην εικόνα 4.15.



**Εικόνα 4.15:** Δευτεροταγείς δομές της 5.8S περιοχής σύμφωνα με το λογισμικό ExraRNA.

## 4.2 Χαρακτηριστικά της περιοχής psbA-trnH

Η περιοχή psbA-trnH είναι ένας σημαντικός δείκτης μέτρησης της φυλογενετικής σχέσης μεταξύ διαφόρων φυτικών ειδών και συχνά θεωρείται κατάλληλο για DNA barcoding. Η περιοχή psbA-trnH περιλαμβάνει τμήμα της κωδικής περιοχής γονιδίου psbA, την psbA μη-κωδική περιοχή (untranslated region), την περιοχή λήξης της μεταγραφής του γονιδίου psbA η οποία φέρει εκτεταμένες παλίνδρομες αλληλουχίες, μια διαγονιδιακή περιοχή (non-transcribed spacer) και ένα τμήμα του γονιδίου trnH. (Εικόνα 4.16).



Εικόνα 4.16: Σχηματική αναπαράσταση της psbA-trnH περιοχής.

### 4.2.1 Ανάλυση της πρωτοταγούς δομής των αλληλουχιών psbA-trnH

Η ενίσχυση της περιοχής psbA-trnH έγινε σε 11 δείγματα (είδη) του γένους *Salvia* με την χρήση της τεχνικής PCR. Το μέγεθος του προϊόντος της αντίδρασης PCR κυμαίνεται από 426 (*S. digitaloides*) bp έως 455 bp (*S. calycina*). Οι ευθυγραμμίσεις των αλληλουχιών έγιναν μεταξύ των δειγμάτων της μελέτης μας και με μια διαθέσιμη αλληλουχία *S. verbenaca* HQ902841 που βρέθηκε και ανασύρθηκε από την δημόσια βάση δεδομένων GenBank χρησιμοποιώντας τη μηχανή αναζήτησης BLAST (Basic Local Alignment Tool) του NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>). Η ευθυγράμμιση των αλληλουχιών κατέδειξε την παρουσία ένθετων/ελλείψεων (indel) 4bp (*S. glutinosa*), 8pb (*S. verbenaca* HQ902841), 20bp (*S. calycina*, *S. namaensis*) καθώς και μια τελευταία 6bp (*S. calycina*, *S. namaensis* και *S. virgata*) (Εικόνα 4.17 και 4.19). Επίσης

παρατηρήθηκε σημαντική παραλλακτικότητα στις αλληλουχίες στην περιοχή λήξης της μεταγραφής του γονιδίου *psbA* (Εικόνα 4.18) όπως και στην διαγονιδιακή περιοχή (Εικόνα 4.19).

```

S.calycina      GTTATGCGTAAGCGTAATGCTCAAACTCCCTCTAGACCTAGCTGCTATCGAAGCTCCA ACAAATGGCTAAGACTTGTTTTGTAGTGTAGGAGTTTTGAAAAAGAAATAGATAAATA
S.namaensis    GTTATGCGTAAGCGTAATGCTCAAACTCCCTCTAGACCTAGCTGCTATCGAAGCTCCA ACAAATGGCTAAGACTTGTTTTGTAGTGTAGGAGTTTTGAAAAAGAAATAGATAAATA
S.virgata       GTTATGCGTAAGCGTAATGCTCAAACTCCCTCTAGACCTAGCTGCTATCGAAGCTCCA ACAAATGGCTAAGACTTGTTTTGTAGTGTAGGAGTTTTGAAAAAGAAATAGATAAATA
S.sclarea_v.turk GTTATGCGTAAGCGTAATGCTCAAACTCCCTCTAGACCTAGCTGCTATCGAAGCTCCA ACAAATGGCTAAGACTTGTTTTGTAGTGTAGGAGTTTTGAAAAAGAAATAGATAAATA
S.dominica      GTTATGCGTAAGCGTAATGCTCAAACTCCCTCTAGACCTAGCTGCTATCGAAGCTCCA ACAAATGGCTAAGACTTGTTTTGTAGTGTAGGAGTTTTGAAAAAGAAATAGATAAATA
S.sclarea       GTTATGCGTAAGCGTAATGCTCAAACTCCCTCTAGACCTAGCTGCTATCGAAGCTCCA ACAAATGGCTAAGACTTGTTTTGTAGTGTAGGAGTTTTGAAAAAGAAATAGATAAATA
S.cadmica       GTTATGCGTAAGCGTAATGCTCAAACTCCCTCTAGACCTAGCTGCTATCGAAGCTCCA ACAAATGGCTAAGACTTGTTTTGTAGTGTAGGAGTTTTGAAAAAGAAATAGATAAATA
S.transsylvanica GTTATGCGTAAGCGTAATGCTCAAACTCCCTCTAGACCTAGCTGCTATCGAAGCTCCA ACAAATGGCTAAGACTTGTTTTGTAGTGTAGGAGTTTTGAAAAAGAAATAGATAAATA
S.bucharica     GTTATGCGTAAGCGTAATGCTCAAACTCCCTCTAGACCTAGCTGCTATCGAAGCTCCA ACAAATGGCTAAGACTTGTTTTGTAGTGTAGGAGTTTTGAAAAAGAAATAGATAAATA
S.digitaloides  GTTATGCGTAAGCGTAATGCTCAAACTCCCTCTAGACCTAGCTGCTATCGAAGCTCCA ACAAATGGCTAAGACTTGTTTTGTAGTGTAGGAGTTTTGAAAAAGAAATAGATAAATA
S.glutinosa     GTTATGCGTAAGCGTAATGCTCAAACTCCCTCTAGACCTAGCTGCTATCGAAGCTCCA ACAAATGGCTAAGACTTGTTTTGTAGTGTAGGAGTTTTGAAAAAGAAATAGATAAATA
*****

S.calycina      TAAGGAGCAATAAACCCCTTCTGTCTATCAAAAAGAGGGTTATTGCTCCCTTATTTTC TTTTCAATTAGGAATCCCTTTCTTATTTCTAGTAGTATTGGACTTACCTAAAAATTATT
S.namaensis    TAAGGAGCAATAAACCCCTTCTGTCTATCAAAAAGAGGGTTATTGCTCCCTTATTTTC TTTTCAATTAGGAATCCCTTTCTTATTTCTAGTAGTATTGGACTTACCTAAAAATTATT
S.virgata       TAAGGAGCAATAAACCCCTTCTGTCTATCAAAAAGAGGGTTATTGCTCCCTTATTTTC TTTTCAATTAGGAATCCCTTTCTTATTTCTAGTAGTATTGGACTTACCTAAAAATTATT
S.sclarea_v.turk TAAGGAGCAATAAACCCCTTCTGTCTATCAAAAAGAGGGTTATTGCTCCCTTATTTTC TTTTCAATTAGGAATCCCTTTCTTATTTCTAGTAGTATTGGACTTACCTAAAAATTATT
S.dominica      TAAGGAGCAATAAACCCCTTCTGTCTATCAAAAAGAGGGTTATTGCTCCCTTATTTTC TTTTCAATTAGGAATCCCTTTCTTATTTCTAGTAGTATTGGACTTACCTAAAAATTATT
S.sclarea       TAAGGAGCAATAAACCCCTTCTGTCTATCAAAAAGAGGGTTATTGCTCCCTTATTTTC TTTTCAATTAGGAATCCCTTTCTTATTTCTAGTAGTATTGGACTTACCTAAAAATTATT
S.cadmica       TAAGGAGCAATAAACCCCTTCTGTCTATCAAAAAGAGGGTTATTGCTCCCTTATTTTC TTTTCAATTAGGAATCCCTTTCTTATTTCTAGTAGTATTGGACTTACCTAAAAATTATT
S.transsylvanica TAAGGAGCAATAAACCCCTTCTGTCTATCAAAAAGAGGGTTATTGCTCCCTTATTTTC TTTTCAATTAGGAATCCCTTTCTTATTTCTAGTAGTATTGGACTTACCTAAAAATTATT
S.bucharica     TAAGGAGCAATAAACCCCTTCTGTCTATCAAAAAGAGGGTTATTGCTCCCTTATTTTC TTTTCAATTAGGAATCCCTTTCTTATTTCTAGTAGTATTGGACTTACCTAAAAATTATT
S.digitaloides  TAAGGAGCAATAAACCCCTTCTGTCTATCAAAAAGAGGGTTATTGCTCCCTTATTTTC TTTTCAATTAGGAATCCCTTTCTTATTTCTAGTAGTATTGGACTTACCTAAAAATTATT
S.glutinosa     TAAGGAGCAATAAACCCCTTCTGTCTATCAAAAAGAGGGTTATTGCTCCCTTATTTTC TTTTCAATTAGGAATCCCTTTCTTATTTCTAGTAGTATTGGACTTACCTAAAAATTATT
*****

S.calycina      CTTTCCATTAGA----GAATAAAGAAAAGAGATAAAAAAA-TGATTCAAATCCATCTTT TGTTTTACAATTTCTAAAAAAA-TTTTAAATGAAAAGTGAATTCATAAATAAAAAAGTA
S.namaensis    CTTTCCATTAGA----GAATAAAGAAAAGAGATAAAAAAA-TGATTCAAATCCATCTTT TGTTTTACAATTTCTAAAAAAA-TTTTAAATGAAAAGTGAATTCATAAATAAAAAAGTA
S.virgata       CTTTCCATTAGA----GAATAAAGAAAAGAGATCAAAAAA-TGATTCAAATCCATCTTT TGTTTTACAATTTCTAAAAAAA-TTTTAAATGAAAAGT-----A
S.sclarea_v.turk CTTTCCATTAGA----GAATAAAGAAAAGAGATCAAAAAA-TGATTCAAATCCATCTTT TGTTTTACAATTTCTAAAAAAA-TTTTAAATGAAAAGT-----A
S.dominica      CTTTCCATTAGA----GAATAAAGAAAAGAGATCAAAAAA-TGATTCAAATCCATCTTT TGTTTTACAATTTCTAAAAAAA-TTTTAAATGAAAAGT-----A
S.sclarea       CTTTCCATTAGA----GAATAAAGAAAAGAGATCAAAAAA-TGATTCAAATCCATCTTT TGTTTTACAATTTCTAAAAAAA-TTTTAAATGAAAAGT-----A
S.cadmica       CTTTCCATTAGA----GAATAAAGAAAAGAGATCAAAAAA-TGATTCAAATCCATCTTT TGTTTTACAATTTCTAAAAAAA-TTTTAAATGAAAAGT-----A
S.transsylvanica CTTTCCATTAGA----GAATAAAGAAAAGAGATCAAAAAA-TGATTCAAATCCATCTTT TGTTTTACAATTTCTAAAAAAA-TTTTAAATGAAAAGT-----A
S.bucharica     CTTTCCATTAGA----GAATAAAGAAAAGAGATCAAAAAA-TGATTCAAATCCATCTTT TGTTTTACAATTTCTAAAAAAA-TTTTAAATGAAAAGT-----A
S.digitaloides  CTTTCCATTAGA----GAATAAAGAAAAGAGATCAAAAAA-TGATTCAAATCCATCTTT TGTTTTACAATTTCTAAAAAAA-TTTTAAATGAAAAGT-----A
S.glutinosa     CTTTCCATTAGA----GAATAAAGAAAAGAGATCAAAAAA-TGATTCAAATCCATCTTT TGTTTTACAATTTCTAAAAAAA-TTTTAAATGAAAAGT-----A
*****

S.calycina      AATAAATAGAAAATTTTACTAGAAATTTTCTAGTTATAGTAGAGGGGGCGGATGTAGCCA AGTGGATCAAGGCAGTGGATTGTGAATCCACCATGCG
S.namaensis    AATAAATAGAAAATTTTACTAGAAATTTTCTAGTTATAGTAGAGGGGGCGGATGTAGCCA AGTGGATCAAGGCAGTGGATTGTGAATCCACCATGCG
S.virgata       AATAAATAGAAAATTTTACTAGAAATTTTGAATTTTATAGTAGAGGGGGCGGATGTAGCCA AGTGGATTAAGGCAGTGGATTGTGAATCCACCATGCG
S.sclarea_v.turk AATAAATAGAAAATTTTACTAGAAATTTTCTAGTTATAGTAGAGGGGGCGGATGTAGCCA AGTGGATCAAGGCAGTGGATTGTGAATCCACCATGCG
S.dominica      AATAAATAGAAAATTTTACTAGAAATTTTCTAGTTATAGTAGAGGGGGCGGATGTAGCCA AGTGGATCAAGGCAGTGGATTGTGAATCCACCATGCG
S.sclarea       AATAAATAGAAAATTTTACTAGAAATTTTCTAGTTATAGTAGAGGGGGCGGATGTAGCCA AGTGGATCAAGGCAGTGGATTGTGAATCCACCATGCG
S.cadmica       AATAAATAGAAAATTTTACTAGAAATTTTCTAGTTATAGTAGAGGGGGCGGATGTAGCCA AGTGGATCAAGGCAGTGGATTGTGAATCCACCATGCG
S.transsylvanica AATAAATAGAAAATTTTACTAGAAATTTTCTAGTTATAGTAGAGGGGGCGGATGTAGCCA AGTGGATCAAGGCAGTGGATTGTGAATCCACCATGCG
S.bucharica     AATAAATAGAAAATTTTACTAGAAATTTTCTAGTTATAGTAGAGGGGGCGGATGTAGCCA AGTGGATCAAGGCAGTGGATTGTGAATCCACCATGCG
S.digitaloides  AATAAATAGAAAATTTTACTAGAAATTTTCTAGTTATAGTAGAGGGGGCGGATGTAGCCA AGTGGATCAAGGCAGTGGATTGTGAATCCACCATGCG
S.glutinosa     AATAAATAGAAAATTTTACTAGAAATTTTCTAGTTATAGTAGAGGGGGCGGATGTAGCCA AGTGGATCAAGGCAGTGGATTGTGAATCCACCATGCG
*****

```

Εικόνα 4.17: Ευθυγράμμιση αλληλουχιών της *psbA-trnH* περιοχής.

```

S.calycina      AATAGAAATAGATAAAATATAAAGGAGCAATAAACCCCTTCTGTCTATCAA AAGAGGGTTATTGCTCCCTTATTTCTTTTCAATT
S.namaensis    AATAGAAATAGATAAAATATAAAGGAGCAATAAACCCCTTCTGTCTATCAA AAGAGGGTTATTGCTCCCTTATTTCTTTTCAATT
S.digitaloides AATAGAAATAGATAAAATATAAAGGAGCAATAAACCCCTTCTGTCTATCAA AAGAGGGTTATTGCTCCCTTATTTCTTTTCAATT
S.verbenacaH902841 AATAGAAATAGATAAAATATAAAGGAGCAATAAACCCCTTCTGTCTATCAA AAGAGGGTTATTGCTCCCTTATTTCTTTTCAATT
S.sclarea       AATAGAAATAGATAAAATATAAAGGAGCAATAAACCCCTTCTGTCTATCAA AAGAGGGTTATTGCTCCCTTATTTCTTTTCAATT
S.bucharica     AATAGAAATAGATAAAATATAAAGGAGCAATAAACCCCTTCTGTCTATCAA AAGAGGGTTATTGCTCCCTTATTTCTTTTCAATT
S.virgata       AATAGAAATAGATAAAATATAAAGGAGCAATAAACCCCTTCTGTCTATCAA AAGAGGGTTATTGCTCCCTTATTTCTTTTCAATT
S.cadmica       AATAGAAATAGATAAAATATAAAGGAGCAATAAACCCCTTCTGTCTATCAA AAGAGGGTTATTGCTCCCTTATTTCTTTTCAATT
S.dominica      AATAGAAATAGATAAAATATAAAGGAGCAATAAACCCCTTCTGTCTATCAA AAGAGGGTTATTGCTCCCTTATTTCTTTTCAATT
S.transsylvanica AATAGAAATAGATAAAATATAAAGGAGCAATAAACCCCTTCTGTCTATCAA AAGAGGGTTATTGCTCCCTTATTTCTTTTCAATT
S.sclarea_v.turkestanica AATAGAAATAGATAAAATATAAAGGAGCAATAAACCCCTTCTGTCTATCAA AAGAGGGTTATTGCTCCCTTATTTCTTTTCAATT
S.glutinosa     AATAGAAATAGATAAAATATAAAGGAGCAATAAACCCCTTCTGTCTATCAA AAGAGGGTTATTGCTCCCTTATTTCTTTTCAATT
*****

```

Εικόνα 4.18: Ευθυγράμμιση αλληλουχιών της περιοχής λήξης της μεταγραφής του γονιδίου *psbA*

```

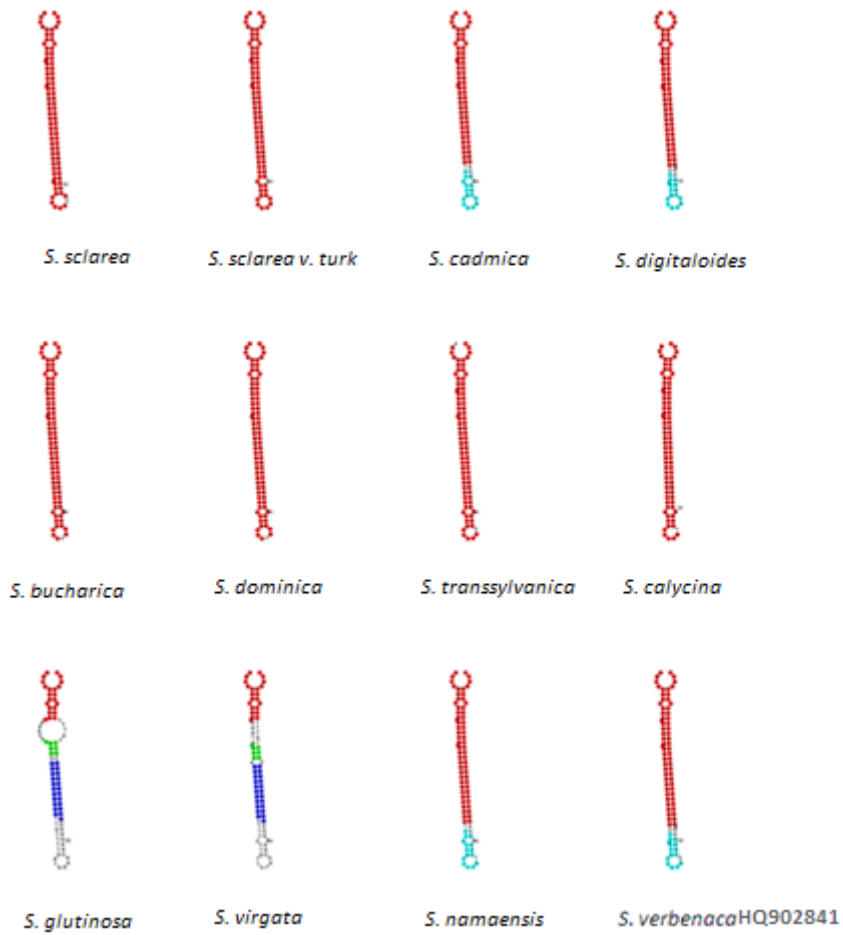
S.calycina      GACTGTGTTTTAGTGTGTAGGAGTTTTGAAAAATAGAATAGATAAATAAAGGAGCAATA AACCCCTTCTGTGTCATCAAAAAGAGGGTTATTGCTCCCTTATTTCTTTCAATTAGG
S.namaensis    GACTGTGTTTTAGTGTGTAGGAGTTTTGAAAAATAGAATAGATAAATAAAGGAGCAATA AACCCCTTCTGTGTCATCAAAAAGAGGGTTATTGCTCCCTTATTTCTTTCAATTAGG
S.virgata      GACTGTGTTTTAGTGTGTAGGAGTTTTGAAAAATAGAATAGATAAATAAAGGAGCAATA AACCCCTTCTGTGTCATCAAAAAGAGGGTTATTGCTCCCTTATTTCTTTCAATTAGG
S.cadmica      GACTGTGTTTTAGTGTGTAGGAGTTTTGAAAAATAGAATAGATAAATAAAGGAGCAATA AACCCCTTCTGTGTCATCAAAAAGAGGGTTATTGCTCCCTTATTTCTTTCAATTAGG
S.transylvanica GACTGTGTTTTAGTGTGTAGGAGTTTTGAAAAATAGAATAGATAAATAAAGGAGCAATA AACCCCTTCTGTGTCATCAAAAAGAGGGTTATTGCTCCCTTATTTCTTTCAATTAGG
S.bucharica    GACTGTGTTTTAGTGTGTAGGAGTTTTGAAAAATAGAATAGATAAATAAAGGAGCAATA AACCCCTTCTGTGTCATCAAAAAGAGGGTTATTGCTCCCTTATTTCTTTCAATTAGG
S.digitaloides GACTGTGTTTTAGTGTGTAGGAGTTTTGAAAAATAGAATAGATAAATAAAGGAGCAATA AACCCCTTCTGTGTCATCAAAAAGAGGGTTATTGCTCCCTTATTTCTTTCAATTAGG
S.verbenacahQ902841 GACTGTGTTTTAGTGTGTAGGAGTTTTGAAAAATAGAATAGATAAATAAAGGAGCAATA AACCCCTTCTGTGTCATCAAAAAGAGGGTTATTGCTCCCTTATTTCTTTCAATTAGG
S.sclarea      GACTGTGTTTTAGTGTGTAGGAGTTTTGAAAAATAGAATAGATAAATAAAGGAGCAATA AACCCCTTCTGTGTCATCAAAAAGAGGGTTATTGCTCCCTTATTTCTTTCAATTAGG
S.dominica     GACTGTGTTTTAGTGTGTAGGAGTTTTGAAAAATAGAATAGATAAATAAAGGAGCAATA AACCCCTTCTGTGTCATCAAAAAGAGGGTTATTGCTCCCTTATTTCTTTCAATTAGG
S.sclarea_v.turk GACTGTGTTTTAGTGTGTAGGAGTTTTGAAAAATAGAATAGATAAATAAAGGAGCAATA AACCCCTTCTGTGTCATCAAAAAGAGGGTTATTGCTCCCTTATTTCTTTCAATTAGG
S.glutinosa    GACTGTGTTTTAGTGTGTAGGAGTTTTGAAAAATAGAATAGATAAATAAAGGAGCAATA AACCCCTTCTGTGTCATCAAAAAGAGGGTTATTGCTCCCTTATTTCTTTCAATTAGG
*****
S.calycina      AATCCTTTCTTATTTCTAGTAGATTGGACTTACCTAAAAATTATCTTTCCATTAGA ----GAATAAAGAAAGAGATAAAAAA-TGATTCAAATCCATCTTT-----TGTT
S.namaensis    AATCCTTTCTTATTTCTAGTAGATTGGACTTACCTAAAAATTATCTTTCCATTAGA ----GAATAAAGAAAGAGATAAAAAA-TGATTCAAATCCATCTTT-----TGTT
S.virgata      AATCCTTTCTTATTTCTAGTAGATTGGACTTACCTAAAAATTATCTTTCCATTAGA ----GAATAAAGAAAGAGATAAAAAA-TGATTCAAATCCATCTTT-----TGTT
S.cadmica      AATCCTTTCTTATTTCTAGTAGATTGGACTTACCTAAAAATTATCTTTCCATTAGA ----GAATAAAGAAAGAGATAAAAAA-TGATTCAAATCCATCTTT-----TGTT
S.transylvanica AATCCTTTCTTATTTCTAGTAGATTGGACTTACCTAAAAATTATCTTTCCATTAGA ----GAATAAAGAAAGAGATAAAAAA-TGATTCAAATCCATCTTT-----TGTT
S.bucharica    AATCCTTTCTTATTTCTAGTAGATTGGACTTACCTAAAAATTATCTTTCCATTAGA ----GAATAAAGAAAGAGATAAAAAA-TGATTCAAATCCATCTTT-----TGTT
S.digitaloides AATCCTTTCTTATTTCTAGTAGATTGGACTTACCTAAAAATTATCTTTCCATTAGA ----GAATAAAGAAAGAGATAAAAAA-TGATTCAAATCCATCTTT-----TGTT
S.verbenacahQ902841 AATCCTTTCTTATTTCTAGTAGATTGGACTTACCTAAAAATTATCTTTCCATTAGA ----GAATAAAGAAAGAGATAAAAAA-TGATTCAAATCCATCTTT-----TGTT
S.sclarea      AATCCTTTCTTATTTCTAGTAGATTGGACTTACCTAAAAATTATCTTTCCATTAGA ----GAATAAAGAAAGAGATAAAAAA-TGATTCAAATCCATCTTT-----TGTT
S.dominica     AATCCTTTCTTATTTCTAGTAGATTGGACTTACCTAAAAATTATCTTTCCATTAGA ----GAATAAAGAAAGAGATAAAAAA-TGATTCAAATCCATCTTT-----TGTT
S.sclarea_v.turk AATCCTTTCTTATTTCTAGTAGATTGGACTTACCTAAAAATTATCTTTCCATTAGA ----GAATAAAGAAAGAGATAAAAAA-TGATTCAAATCCATCTTT-----TGTT
S.glutinosa    AATCCTTTCTTATTTCTAGTAGATTGGACTTACCTAAAAATTATCTTTCCATTAGA TAGAGAAATAAAGAAAGAGATAAAAAAATGATTGAATTCATCTTT-----TTT
*****
S.calycina      TTCAATTTCTAAAAAAA-TTTAAATTGAAAAAGTGAATTCATAAATAAAAAAGTAAATA AATAGAAAAATTTTACTAGAAATTTCTAGTTATAGTAGAGG-
S.namaensis    TTCAATTTCTAAAAAAA-TTTAAATTGAAAAAGTGAATTCATAAATAAAAAAGTAAATG AATAGAAAAATTTTACTAGAAATTTCTAGTTATAGTAGAGG-
S.virgata      TTCAATTTCTAAAAAAA-TTTAAATTGAAAAAGT-----AAATA AATATAAAACATTTTAAATAGAAATTT-----TATAGTAGAGG-
S.cadmica      TTCAATTTCTAAAAAAA-TTTAAATTGAAAAAGT-----AAATA AATATAAAACATTTTAAATAGAAATTT-----TATAGTAGAGG-
S.transylvanica TTCAATTTCTAAAAAAA-TTTAAATTGAAAAAGT-----AAATA AATATAAAACATTTTAAATAGAAATTT-----TATAGTAGAGG-
S.bucharica    TTCAATTTCTAAAAAAA-TTTAAATTGAAAAAGT-----AAATA AATATAAAACATTTTAAATAGAAATTT-----TATAGTAGAGG-
S.digitaloides TTCAATTTCTAAAAAAA-TTTAAATTGAAAAAGT-----AAATA AATATAAAACATTTTAAATAGAAATTT-----TATAGTAGAGG-
S.verbenacahQ902841 TTCAATTTCTAAAAAAA-TTTAAATTGAAAAAGT-----AAATA AATATAAAACATTTTAAATAGAAATTT-----TATAGTAGAGG-
S.sclarea      TTCAATTTCTAAAAAAA-TTTAAATTGAAAAAGT-----AAATA AATATAAAACATTTTAAATAGAAATTT-----TATAGTAGAGG-
S.dominica     TTCAATTTCTAAAAAAA-TTTAAATTGAAAAAGT-----AAATA AATATAAAACATTTTAAATAGAAATTT-----TATAGTAGAGG-
S.sclarea_v.turk TTCAATTTCTAAAAAAA-TTTAAATTGAAAAAGT-----AAATA AATATAAAACATTTTAAATAGAAATTT-----TATAGTAGAGG-
S.glutinosa    TTCAATTTCTAAAAAAA-TTTCAATTGAAAAAGT-----AAATA AATAGAAAAATGATAAATATCATT-----TATAGTAGAGG-
*****

```

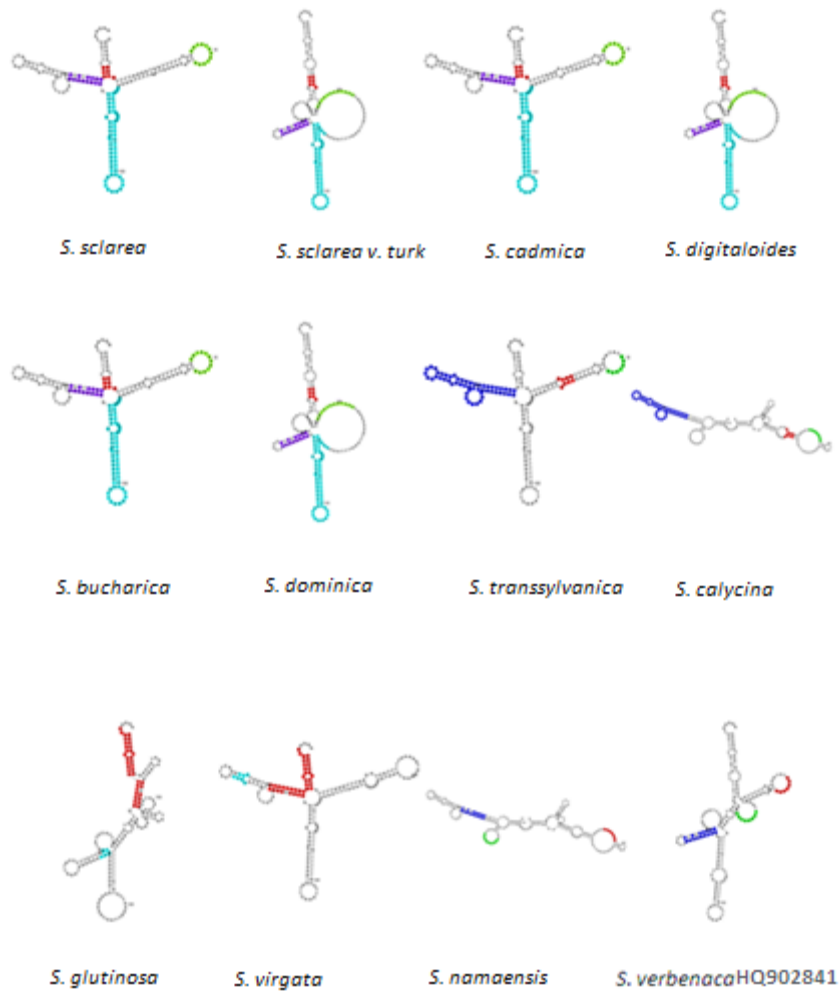
Εικόνα 4.19: Ευθυγράμμιση αλληλουχιών της διαγονιδιακής περιοχής.

### 4.2.2 Ανάλυση της δευτεροταγούς δομής των αλληλουχιών psbA-trnH

Η δευτεροταγή δομή των αλληλουχιών της περιοχής λήξης της μεταγραφής του γονιδίου psbA καθώς και της διαγονιδιακής περιοχής αναλύθηκε μέσω του λογισμικού ExpaRNA. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι σημειακές μεταλλάξεις στην περιοχή λήξης της μεταγραφής του γονιδίου psbA δεν επηρέασαν σε μεγάλο βαθμό την δευτεροταγή δομή (Εικόνα 4.20). Αντίθετα, η ανάλυση της δευτεροταγούς δομής της διαγονιδιακής περιοχής φανέρωσε τέσσερις ομάδες δομών (Εικόνα 4.21), στις οποίες διακρίνονται εμφανώς κάποιες αλλαγές στην δευτεροταγή δομή τους.



**Εικόνα 4.20:** Σχηματική αναπαράσταση της δευτεροταγούς δομής της περιοχής λήξης της μεταγραφής του γονιδίου *psbA* με το λογισμικό ExpaRNA.



**Εικόνα 4.21:** Ανάλυση της δευτεροταγούς δομής των αλληλουχιών της *psbA-trnH* διαγονιδιακής περιοχής των ειδών του γένους *Salvia* με το λογισμικό ExpaRNA.



## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι ακολουθίες της ενδομεταγραφόμενης περιοχής του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA έχουν αναγνωρισθεί ως χρήσιμο DNA barcode για την ανακάλυψη και τον προσδιορισμό φυτικών ειδών (Vijaykumar *et al.*, 2010). Η περιοχή αυτή αποτελείται από τρία τμήματα: ITS1, 5.8S και ITS2 με την 5.8S περιοχή να αποτελεί μία από τις πιο συντηρημένες περιοχές μεταξύ των φυτικών ειδών και ως εκ τούτου δεν προσδίδει καμία αξία για το DNA barcoding. Αντίθετα, οι περιοχές ITS1 και ITS2 έχουν δοκιμαστεί και έχουν ευρέως αξιοποιηθεί ως βέλτιστες για DNA barcode στα φυτά (Song *et al.*, 2012). Ωστόσο, μελέτες έχουν δείξει ότι η περιοχή ITS2, σε σύγκριση με ολόκληρη την περιοχή ITS, αποτελεί καλύτερο DNA barcode δείκτη για τη φυλογενετική ανάλυση των φυτών (Han *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2012).

Η ανάλυση της ITS1 και της ITS2 περιοχής για τα 15 είδη *Salvia* έδειξε ότι το μέσο μέγεθος των ITS1 και των ITS2 είναι σχετικά μικρό, το μήκος των αλληλουχιών κυμαίνεται από 229 έως 231 bp και από 219 έως 246 bp αντίστοιχα, με την ITS2 να έχει σχετικά μεγαλύτερο μήκος σε σχέση με την ITS1. Ο μέσος όρος του περιεχομένου σε G+C δείχνει ότι στην ITS1 το ποσοστό G+C% ήταν κάπως υψηλότερο από ό,τι στην ITS2. Επιπλέον, η ITS1 έχει την υψηλότερη μέση γενετική απόκλιση μεταξύ των ειδών σε σύγκριση με την ITS2. Τα στοιχεία αυτά είναι σε συμφωνία με αυτά που προέκυψαν από την ανάλυση των ITS1 και ITS2 περιοχών σε 22 είδη *Salvia* που ενδημούν στην Κίνα (Wang *et al.*, 2013).

Πρόσφατες μοριακές φυλογενετικές μελέτες με βάση τις ITS και τις psbA-trnH αλληλουχίες έχουν δείξει ότι το γένος *Salvia* είναι πολυφυλετικό και διαχωρίζεται σε τρεις μεγάλες φυλογενετικές ομάδες ενώ πέντε άλλα γένη φαίνεται να παρεμβάλλονται μέσα στο φυλογενετικό δένδρο των ειδών της *Salvia* (Walker *et al.*, 2004; Walker and Sytsma, 2007). Ο κλάδος I σύμφωνα με τους Walker και Sytsma (2007) περιλαμβάνει τα συγγενή γένη *Rosmarinus* και *Perovskia*, καθώς και είδη της *Salvia* της Ευρώπης, της Κεντρικής Αφρικής, της Νότιας Αφρικής και της Δυτικής Ασίας, ενώ ο κλάδος II περιλαμβάνει είδη από τον Νέο Κόσμο καθώς και ο κλάδος III περιλαμβάνει είδη *Salvia* της Δυτικής Ασίας, της Κεντρικής Ασίας, της Ανατολικής Ασίας, της Μεσογείου και της Αφρικής.

Οι μελέτες μας έδειξαν ότι οι φυλογενετικές σχέσεις που βασίζονται στις ITS1 και ITS2 ακολουθίες απέδωσαν παρόμοια φυλογενετικά δέντρα τα οποία επιτρέπουν την διάκριση των ειδών του γένους της *Salvia*. Ωστόσο, συγκρίσεις των φυλογενετικών δένδρων που πρόεκυψαν από τις ITS1 και ITS2 αλληλουχίες, έδειξαν ότι υπήρχαν ορισμένες σημαντικές διαφορές εντός των κλάδων σε σχέση με την τοποθέτηση κάποιων συγκεκριμένων ειδών. Η παρατήρηση αυτή σε συνδυασμό με την εμφάνιση μεγαλύτερου ποσοστού μεταλλάξεων που εντοπίζονται στην περιοχή ITS1 μεταξύ των διαφόρων ειδών *Salvia* σε σύγκριση με την περιοχή ITS2 καταδεικνύει ότι η περιοχή ITS1 μπορεί να αποτελεί καλύτερο μοριακό δείκτη για την διάκριση των ειδών του γένους *Salvia*.

Ανάλυση των περιοχών ITS1 και ITS2 σε είδη του γένους *Salvia* που ενδημούν στην Κίνα έδειξε ότι η ITS1 περιοχή αποτελεί έναν έμπιστο δείκτη προσδιορισμού της αυθεντικότητας των ειδών του γένους *Salvia* και επιτρέπει τη διάκρισή τους με μεγαλύτερη ακρίβεια (Wang *et al.*, 2014). Γενικά, έχει δειχθεί ότι η περιοχή ITS1 είναι κατά μέσο όρο περισσότερο μεταβλητή από την ITS2 στα περισσότερα είδη μυκήτων και φυτών (Poczai and Hyvonen, 2010; Mello *et al.*, 2008) και πιθανόν να αποτελεί καλύτερο μοριακό δείκτη για την διάκριση των ειδών. Εκτεταμένη μετα-ανάλυση χιλιάδων ITS1 και ITS2 περιοχών που ανασύρθηκαν από τη βάση δεδομένων έδειξε ότι η ITS1 περιοχή, συγκριτικά με την ITS2, αποτελεί καλύτερο DNA barcode δείκτη για σχεδόν όλα τα είδη των ευκαρυωτικών οργανισμών (Wang *et al.*, 2015).

Οι προβλέψεις δευτεροταγών δομών παίζουν σημαντικό ρόλο για την ταυτοποίηση ειδών, επειδή επιτρέπει την ανίχνευση των σφαλμάτων κατά την αλληλούχηση. Έτσι, εσφαλμένες ακολουθίες που θα μπορούσαν να επηρεάσουν αρνητικά την ταξινόμηση των ειδών, μπορούν να αφαιρεθούν από το σύνολο των δεδομένων. Συνεπώς, δεδομένου του αριθμού των ακολουθιών που είναι σωστές ή εσφαλμένες στη διεθνή βάση δεδομένων (GenBank, ENA, και DDB), θα πρέπει να επικυρωθούν πριν χρησιμοποιηθούν σε επόμενες αναλύσεις (Rampersad, 2014). Για πρόβλεψη και αποφυγή πιθανών λαθών από εντοπισμό ψευδογονιδίων ή και από απουσίες συντηρημένων motifs, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί η δευτεροταγής δομή των ITS αλληλουχιών (Freire *et al.*, 2012).

Στην έρευνά μας, η ανάλυση των ITS αλληλουχιών και των περιοχών psbA-trnH αποκάλυψε ότι η ITS περιοχή ενισχύεται επιτυχώς σε όλα τα είδη *Salvia*, ενώ η περιοχή psbA-trnH παρουσίασε προβλήματα κατά τη διάρκεια της ενίσχυσης μέσω της αντίδρασης PCR (εμφανίστηκαν πολλαπλές ζώνες κατά την ηλεκτροφόρηση) και η επιτυχία της αλληλούχησης τους κυμάνθηκε από 85 έως 100%. Οι ακολουθίες psbA-trnH που αναλύθηκαν παρουσίασαν ενθέσεις (insertions) και ελλείψεις (deletions) καθώς και παλίνδρομες ακολουθίες, έτσι η φυλογενετική ανάλυση με βάση τις psbA-trnH αλληλουχίες μπορεί να είναι λιγότερο επιτυχής σε αυτή την περίπτωση. Ωστόσο, μπορεί να αξιοποιηθεί επικουρικά σε συνδυασμό με την περιοχή ITS1 ή ITS2 για την διάκριση των ειδών του γένους *Salvia* και γενικότερα των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

**Barkman T. J., and Simpson B. B.** (2002). Hybrid origin and parentage of *Dendrochilum acuiiferum* (*Orchidaceae*) inferred in a phylogenetic context using nuclear and plastid DNA sequence data. *Systematic Botany*, 27, 209-220.

**Barnes J., Anderson L. A., and Phillipson J. D.** (2003). *Herbal medicines: a guide for healthcare professionals*, Pharmaceutical Press.

**Bennett R. I., and Smith A. G.** (1991). Use of a genomic clone for ribosomal RNA from *Brassica oleracea* in RFLP analysis of *Brassica* species. *Plant molecular biology*, 16, 685-688.

**Berg J., Tymoczko J. and Stryer L.** (2002). *Biochemistry*, 5th edition, W.H. Freeman and Company, New York.

**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*. Academic Press, London, UK, 523-532.

**Bothmer, R.** (1970). STUDIES IN AEGEAN FLORA. 15. CHROMOSOME NUMBERS IN LABIATAE. *Botaniska Notiser*, 123, 52.

**Clebsch, Betsy; Barner, Carol D.** (2003). *The New Book of Salvias*. Timber Press. p. 112. ISBN 978-0-88192-560-9.

**Coleman A. W.** (2015). Nuclear rRNA transcript processing versus internal transcribed spacer secondary structure. *Trends in Genetics*, 31, 157-163.

**Comella P., Pontvianne F., Lahmy S., et al.** (2008). Characterization of a ribonuclease III-like protein required for cleavage of the pre-rRNA in the 3' ETS in *Arabidopsis*. *Nucleic acids research*, 36, 1163-1175.

**Dal Piaz F., Vassallo A., Lepore L., et al.** (2009). Sesterterpenes as Tubulin Tyrosine Ligase Inhibitors. First Insight of Structure– Activity Relationships and Discovery of New Lead. *Journal of medicinal chemistry*, 52, 3814-3828. MID 19459643.

**Davis P.H.** (1982). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, 7. Edinburgh University Press, Edinburgh 400–461.

**DiTomaso, J. M., and Healy, E. A.** (2007). *Weeds of California and other western states*. UCANR Publications, 837.

**Dundr M. and Misteli T.** (2001). Functional architecture in the cell nucleus. *Biochemical Journal*, 356, 297-310.

**Elgavish T., Cannone J. J., Lee J. C., et al.** (2001). AA. AG@ helix. ends: A: A and A: G base-pairs at the ends of 16 S and 23 S rRNA helices. *Journal of molecular biology*, 310, 735-753.

**Ferri G, Alù M, Corradini B, Beduschi G.** (2009). Forensic botany: species identification of botanical trace evidence using a multigene barcoding approach. *International Journal of Legal Medicine*, 123, 395-401.

**Freire M. C. M., da Silva M. R., Zhang X., et al.** (2012). Nucleotide polymorphism in the 5.8 S nrDNA gene and internal transcribed spacers in *Phakopsora pachyrhizi* viewed from structural models. *Fungal Genetics and Biology*, 49, 95-100.

**Goertzen L. R., Cannone J. J., Gutell, R. R., et al.** (2003). ITS secondary structure derived from comparative analysis: implications for sequence alignment and phylogeny of the *Asteraceae*. *Molecular phylogenetics and evolution*, 29, 216-234.

**Gregory T. R.** (2005). DNA barcoding does not compete with taxonomy. *Nature*, 434, 1067-1067.

**Han J. P., Song J. Y., Liu C., et al.** (2010). Identification of *Cistanche* species (*Orobanchaceae*) based on sequences of the plastid psbA-trnH intergenic region. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 45, 126-130.

**Han J., Zhu Y., Chen X., et al.** (2013). The short ITS2 sequence serves as an efficient taxonomic sequence tag in comparison with the full-length ITS. *BioMed research international*, 2013.

**He J., Wong K. L., Shaw P. C., et al.** (2010). Identification of the medicinal plants in *Aconitum L.* by DNA barcoding technique. *Planta medica*, 76, 1622-1628.

**Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, et al.** (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270, 313-321.

**Henras A. K., Plisson-Chastang C., O'Donohue M. F., et al.** (2015). An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 6, 225-242.

**Hollingsworth M. L., Forrest, L. L., Richardson J., et al.** (2009). Selecting barcoding loci for plants: evaluation of seven candidate loci with species-level sampling in three divergent groups of land plants. *Molecular Ecology Resources*, 9, 439-457.

**Holmes, D. S., and Quigley, M.** (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical biochemistry*, 114, 193-197.

**Hřibová E., Čížková J., Christelová P., et al.** (2011). The ITS1-5.8 S-ITS2 sequence region in the *Musaceae*: structure, diversity and use in molecular phylogeny. *PLoS One*, 6, e17863.

**Jordan B. R., Jourdan R., and Jacq B.** (1976). Late steps in the maturation of *Drosophila* 26 S ribosomal RNA: Generation of 5.8 S and 2 S RNAs by cleavages occurring in the cytoplasm. *Journal of molecular biology*, 101, 85-105.

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

**Karousou R., Vokou D., and Kokkini, S.** (1998). Distribution and essential oils of *Salvia pomifera* subsp. *pomifera* (Labiatae) on the island of Crete (S Greece). *Biochemical systematics and ecology*, 26, 889-897.

**Kintzios, S. E.** (2000). *Sage: the genus Salvia*. Amsterdam, Harwood 296p. ISBN, 468295466.

**Kufel J., Dichtl et al.** (1999). Yeast Rnt1p is required for cleavage of the pre-ribosomal RNA in the 3'ETS but not the 5'ETS. *Rna*, 5, 909-917.

**Lafontaine D. L.** (2015). Noncoding RNAs in eukaryotic ribosome biogenesis and function. *nature structural & molecular biology*, 22, 11-19.

**Lam Y. W., Trinkle-Mulcahy L., and Lamond A. I.** (2005). The nucleolus. *Journal of Cell Science*, 118, 1335-1337.

**Lathe W. C. and Eickbush T. H.** (1997). A single lineage of r2 retrotransposable elements is an active, evolutionarily stable component of the *Drosophila* rDNA locus. *Molecular biology and evolution*, 14, 1232-1241.

**Lathe W. C., Burke W. D., Eickbush D. G. et al.** (1995). Evolutionary stability of the R1 retrotransposable element in the genus *Drosophila*. *Molecular biology and evolution*, 12, 1094-1105.

**Li Y. H., Ruan J. L., Chen S. L., et al.** (2010). Authentication of *Taxillus chinensis* using DNA barcoding technique. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4, 2706-9.

**Liu Q., Ge S., Tang H., et al.** (2006). Phylogenetic relationships in *Elymus* (*Poaceae*: *Triticeae*) based on the nuclear ribosomal internal transcribed spacer and chloroplast trnL-F sequences. *New Phytologist*, 170, 411-420.

**Liu Y., Zhang L., Liu Z., et al.** (2012). Species identification of *Rhododendron* (*Ericaceae*) using the chloroplast deoxyribonucleic acid PsbA-trnH genetic marker. *Pharmacognosy magazine*, 8, 29.

**Liu Z., Chen S. L., Song J. Y., et al.** (2012). Application of deoxyribonucleic acid barcoding in *Lauraceae* plants. *Pharmacognosy magazine*, 8, 4.

**Liu, J. S., & Schardl, C. L.** (1994). A conserved sequence in internal transcribed spacer 1 of plant nuclear rRNA genes. *Plant molecular biology*, 26, 775-778.

**Ma X. Y., Xie C. X., Liu C., et al.** (2010). Species identification of medicinal *pteridophytes* by a DNA barcode marker, the chloroplast psbA-trnH intergenic region. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 33, 1919-1924.

**Mélèse T., and Xue Z.** (1995). The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome. *Current opinion in cell biology*, 7, 319-324.

**Mello A, Napoli C, Morin CME et al.** (2011). ITS-1 versus ITS-2 pyrosequencing: a comparison of fungal populations in truffle grounds. *Mycologia*, 103, 1184–1193.

**Mullis K.B., Faloona F.A., Scharf S., et al.** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51, 263-273.



**Nei M., and Rooney A. P.** (2005). Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annual review of genetics*, 39, 121.

**O'Kane Jr S. L., Schaal B. A. and Al-Shehbaz I. A.** (1996). The origins of *Arabidopsis suecica* (*Brassicaceae*) as indicated by nuclear rDNA sequences. *Systematic Botany*, 559-566.

**Olson M. O., Dundr M., and Szebeni A.** (2000). The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. *Trends in cell biology*, 10, 189-196.

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

**Popp M. and Oxelman B.** (2001). Inferring the history of the polyploid *Silene aegaea* (*Caryophyllaceae*) using plastid and homoeologous nuclear DNA sequences. *Molecular phylogenetics and evolution*, 20, 474-481.

**Prakash, V.** (1990). *Leafy spices*. CRC Press, 898.

**Rampersad SN.** (2014). ITS1, 5.8S and ITS2 secondary structure modeling for intra-specific differentiation among species of the *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* species complex. *Springer Plus* 3, 684.

**Scheer U., and Hock R.** (1999). Structure and function of the nucleolus. *Current opinion in cell biology*, 11, 385-390.

**Shaw P., and Doonan J.** (2005). The nucleolus: Playing by different rules? *Cell cycle*, 4, 102-105.

**Singh H. K., Parveen I., Raghuvanshi S., et al.** (2012). The loci recommended as universal barcodes for plants on the basis of floristic studies may not work with congeneric species as exemplified by DNA barcoding of *Dendrobium* species. BMC research notes, 5, 42.

**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.

**Song J., Yao H., Li Y., et al.** (2009). Authentication of the family *Polygonaceae* in Chinese pharmacopoeia by DNA barcoding technique. Journal of Ethnopharmacology, 124, 434-439.

**Sun K., Chen X. L., Ma R. J., et al.** (2002). Molecular phylogenetics of *Hippophae* L. (*Elaeagnaceae*) based on the internal transcribed spacer (ITS) sequences of nrDNA. Plant Systematics and Evolution, 235, 121-134.

**Sun Z., Gao T., Yao H., et al.** (2011). Identification of *Lonicera japonica* and its related species using the DNA barcoding method. Planta medica, 77, 301.

**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.

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

**Techen N., Parveen I., Pan Z., et al.** (2014). DNA barcoding of medicinal plant material for identification. Current opinion in biotechnology, 25, 103-110.

**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.

**Vijaykumar A., Saini A. and Jawali N.** (2010). Phylogenetic analysis of subgenus *Vigna* species using nuclear ribosomal RNA ITS: evidence of hybridization among *Vigna unguiculata* subspecies. *Journal of Heredity*, 101, 177-188.

**Volkov, R. A., Komarova N. Y., and Hemleben V.** (2007). Ribosomal DNA in plant hybrids: inheritance, rearrangement, expression. *Systematics and Biodiversity*, 5, 261-276.

**Walker J.B. and Sytsma K.J.** (2007). Staminal evolution in the genus *Salvia* (*Lamiaceae*): molecular phylogenetic evidence for multiple origins of the staminal lever. *Annals of Botany*, 100,375–391.

**Walker J.B., Sytsma K.J., Treutlein J., et al.** (2004). *Salvia* (*Lamiaceae*) is not monophyletic: implications for the systematics, radiation, and ecological specializations of *Salvia* and tribe *Mentheae*. *American Journal of Botany*, 91, 1115-1125.

**Wang M., Zhao H., Wang L., et al.** (2013). Potential use of DNA barcoding for the identification of *Salvia* based on cpDNA and nrDNA sequences. *Gene* 528, 206-215.

**Wang M., Zhou Z. H., O'Connor, J. K., et al.** (2014). A new diverse enantiornithine family (*Bohaiornithidae* fam. nov.) from the Lower Cretaceous of China with information from two new species. *Vertebrata Palasiatica*, 52, 31-76.

**Wang Q. D., Zhang T. and Wang J. B.** (2007). Phylogenetic relationships and hybrid origin of *Potamogeton* species (*Potamogetonaceae*) distributed in China: insights from the nuclear ribosomal internal transcribed spacer sequence (ITS). *Plant Systematics and Evolution*, 267, 65-78.

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

**Wolf M., Koetschan C., and Müller T.** (2014). ITS2, 18S, 16S or any other RNA—simply aligning sequences and their individual secondary structures simultaneously by an automatic approach. *Gene*, 546, 145-149.

**Yang Y., Zhai Y., Liu T., et al.** (2011). Detection of *Valeriana jatamansi* as an Adulterant of Medicinal Paris by Length Variation of Chloroplast. *Planta Medica*, 77, 87-91.

**Yao H., Song J. Y., Ma X. Y., et al.** (2009). Identification of *Dendrobium* species by a candidate DNA barcode sequence: the chloroplast psbA-trnH intergenic region. *Planta medica*, 75, 667-669.

**Zhang D. X., and Hewitt G. M.** (2003). Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular ecology*, 12, 563-584.

**Zheng W., and Wang S. Y.** (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49, 5165-5170.

**Zuo Y., Chen Z., Kondo K., et al.** (2011). DNA barcoding of *Panax* species. *Planta medica*, 77, 182.

**Κανταρτζής N.A.** (2007). Αρωματικά & Φαρμακευτικά Φυτά. 2<sup>ος</sup> τόμος Οδηγός Ανθοκομίας, Ελεύθερος Τύπος, σελ.96.

**Καρούσου Ρ.** (1995). ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ *LABIATAE* ΣΤΗΝ ΚΡΗΤΗ 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.

**Μαρσέλλος Μ., και Μαρσέλλος Σ.** (1981). Οδηγός των Φαρμακευτικών Φυτών. Εκδότης: Μόσχος Γκιούρδας, Αθήνα. 432 σελ.

## ΙΣΤΟΤΟΠΟΙ

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/>

<http://plantnet.rbgsyd.nsw.gov.au/>

<http://rna.informatik.uni-freiburg.de/>

<http://rna.tbi.univie.ac.at/>

<http://rna.tbi.univie.ac.at/>

[http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora\\_id=5&taxon\\_id=242425208](http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=5&taxon_id=242425208)

<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α΄

### 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 ddH<sub>2</sub>O 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 100°C 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 ddH<sub>2</sub>O, μέχρι τελικό όγκο 1lt.
8. Βρωμιούχο αιθίδιο: Το βρωμιούχο αιθίδιο παρασκευάζεται ως πυκνό διάλυμα 0,5 mg/ml σε dH<sub>2</sub>O 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 ddH<sub>2</sub>O 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 dH<sub>2</sub>O 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 ddH<sub>2</sub>O 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

### ITS1

>*S.sclarea*

GTCGAAACCTGCAAAGCAGACCGCGAACACGTGTTTAAACACCGACCGACGGCGCACGGCTCGGGGGCGACCC  
CGCTCCGTGCCGCCGTGACCCCGCCCGCGCGTTCCCTCGGGTCGCGCGGGCGCGGGCTAACGAACCCC**GGCGC**  
**GGAATGCGCCAAGGAA**AACTAAACGAAGCGTCCGCCCCCGCGCCCGTTTCGCGGAGTGCGCGGGGGCGTTCG  
GACGTCTATCAAA

>*S. sclarea v. turk*

GTCGAAACCTGCAAAGCAGACCGCGAACACGTGTTTAAACACCGACCGACGGCGCACGGCTCGGGGGCGACCC  
CGCTCCGTGCCGCCGTGACCCCGCCCGCGCGTTCCCTCGGGTCGCGCGGGCGCGGGCTAACGAACCCC**GGCGC**  
**GGAATGCGCCAAGGAA**AACTAAACGAAGCGTCCGCCCCCGCGCCCGTTTCGCGGAGTGCGCGGGGGCGTTCG  
GACGTCTATCAAA

>*S.cadmica*

GTCGAAACCTGCAAAGCAGACCGCGAACACGTGTTTAAACACCGACCGACCGAACGGCGCGGGGGCGACCC  
CCGCCGTGCCGCCGTACCCCGCCCGTGCATCCCTCGGGTCGCGCGGGCGCGGGCTAACGAACCCC**GGCGCG**  
**GAATGCGCCAAGGAA**AACTAAACGAAGCGTCTCCCGCCGAGCCCGTTTCGCGGAGTGCGCGGGGGTGTTCG  
GACGTCTATCAAA

>*S.digitaloides*

GTCGAAACCTGCAAAGCAGACCGCGAACCCGTGTTTAAACACCGACCGACGGCTCACGGCGCGGGGGCGACCC  
CGTCGTGCCGCCGTACCCCGCCCGCGCGTTCCCTCGGGTCGCGCGGGCGCGGGCTAACGAACCCC**GGCGCG**  
**AATGCGCCAAGGAA**AACTAAACGAAGCGTCTCCCGCGTCCCGTTTCGCGGAGCGCGCGGGGGTGC CGA  
CGTCTATCAAA

>*S.bucharica*

GTCGAAACCTGCAAAGCAGACCGCGAACACGTGTTTAAACACCGACCGACGGCGCACGGCGCGGGGGCGACCC  
CCGCCGTGCCGCCGTACCCCGCCCGTGCATCCCTCGGGTCGCGCGGGCGCGGGCTAACGAACCCC**GGCGCG**  
**GAATGCGCCAAGGAA**AACTAAACGAAGCGTCTCCCGCCCGCGCCCGTTTCGCGGAGTGCGCGGGGGTGTTCG  
GACGTCTATCAAA

>*S.dominica*

GTCGAAACCTGCAAAGCAGACCGCGAACACGTGTTTAAACACCGACCGACGGCGCACGGCTCGGGGGCGACCC  
CGCTCCGTGCCGCCGTGACCCCGCCCGCGGTTCCCTCGGGTCGCGCGGGCGCGGGCTAACGAACCCC**GGCGC**  
**GGAATGCGCCAAGGAA**AACTAAACGAAGCGTCTCCCGCCCGCGCCCGTTTCGCGGAGTGCGCGGGGGTGTTC  
GGGCGTCTATCAAA

>*S.transsylvanica*

GTCGAAACCTGCAAAGCAGACCGCGAACACGTGTTTAAACACCGACCGACGGCGCACGGCGCGGGGGCGACCC  
CCGCCGTGCCGCCGTACCCCGCCCGTGCATCCCTCGGGTCGCGCGGGCGCGGGCTAACGAACCCC**GGCGCG**  
**GAATGCGCCAAGGAA**AACTAAACGAAGCGTCTCCCGCCCGCGCCCGTTTCGCGGAGTGCGCGGGGGTGTTCG  
GACGTCTATCAAA

>*S.calycina*

GTCGAAACCTGCAAAGCAGACGCGAACCCGTGACTAACACCGACCGACGGTGCACGGCGTGGGGGGCGACCC  
CCGTCTGTTCCCGTACCCCGCCCGCGTGTCCATCGGGTACGTCGTGTGGGCTAACGAACCCC**GGCGCG**  
**GAATGCGCCAAGGAA**AACTAAACGAAGCATCTCCCGCCCGCGCCCGTTTCGCGGAGTGTGCGGGGGCGTTCG  
ATGTCTATCAAA



>*S. hians*

GTCGAAACCTGCAAAGCAGACTGCGAACACGTGTTTAAACACCAACCGACGGCGCATGGCGTGGGGGCAACCCC  
CGTCGTGTTGCCGTACCCCCGCTGTGTGTTCCCTCGGGTCACGCAGTGCGGGTAACGAACCCC **GGCGCGGA**  
**AATGCGCCAAGGAA**AACTAAACGAAGCATCTCCCCCGCTTCCCGTTCGCGGGGCGTGCGGGGGTGTCGGATG  
TCTATCAA

>*S. pratensis*

GTCGAAACCTGCAAAGCAGACCGCGAACACGTGTTTAAACACCGACCGACGGCGCACGGCGCGGGGGCGACCC  
CCGCCGTGCCCGGTACCCCCGCCCGTGCATCCCTCGGGTCGCGCGGGCGGGGTAACGAACCCC **GGCGCG**  
**GAATGCGCCAAGGAA**AACTAAACGAGGCGTCTCCCCCGCGCCCGTTTCGCGGAGTGCAGGGGGGTGTCG  
GACGTCTATCAA

>*S. glutinosa*

GTCGAAACCTGCAAAGCAGACCGCGAACCCGTGTTTAAACACCGACCGACGGCTCACGGCGCGGGGGCGACCCC  
CGTCGTGCCGCCGTACCCCCGCCCGCGGTTCCCTCGGGTCGCGCGGGCGGGGTAACGAACCCC **GGCGCG**  
**AATGCGCCAAGGAA**AACTAAACGAAGCGTCTCCCCCGTGTCCCGTTCGCGGAGCGCGGGGGGTGCCGA  
CGTCTATCAA

>*S. verbenaca*

ATCGAAACCTGCAAAGCAGACCGCGAACCCGTGTTTAAACACCGACCGACGGCTCACGGCGCGGGGACGACCCC  
CGTCGTGCCGCCGTACCCCCGCCCGCGGTTCCCTCGGGTCGCGCGGGCGGGGTAACGAACCCC **GGCGCG**  
**AATGCGCCAAGGAA**AACTAAACGAAGCGTCTCCCCCGTGTCCCGTTCGCGGAGCGCGGGGGGTGCCGA  
CGTCTATCAA

>*S. virgata*

GTCGAAACCTGCAAAGCAGACCGCGAACACGTGTTTAAACACCGACCGACGGCGAACGGCGCGGGGGCGACCC  
CCGCCGTGCCCGGTACCCCCGCCCGTGCATCCCTCGGGTCGCGCGGGCGGGGTAACGAACCCC **GGCGCG**  
**GAATGCGCCAAGGAA**AACTAAACGAAGCGTCTCCCCCGCGCCCGTTTCGCGGAGTGCAGGGGGGTGTCGG  
ACGTCTATCAA

>*S. namaensis*

GTCGAAACCTGCAAAGCAGACCGCGAACACGTGACTAACACCGACCGACGGTGCATGGCGTGGGGGCGACCC  
CCGTCTGTTCCCGTACCCCCGCCCGGTGCTCCATCGGGTCACGTGTCGGGTAACGAACCCC **GGCGCG**  
**GAATGCGCCAAGGAA**AACTAAACGAAGCATCTCCCCCGCGCCCGTTTCGCGGAGTGTGCGGGGGCGTCGG  
ATGTCTATCAA

>*S. lavandulaefolia*

GTCGAAACCTGCAAAGCAGACCGCGAACACGTGTTTAAACACCAACCGACGGCGCATGGCGTGGGGGTGACCCC  
CGTCGTGTTGCCGTACCCCCGCTGCGTGTCCCTCGGGTCAGTAGTGCGGGTAACGAACCCC **GGCGCGGA**  
**ATGCGCCAAGGAA**AACTAAACGAAGTATCTCCCCCGCTCCCGTTCGCGGAGTGTGCGGGGGGTGTCGGATG  
TCTATCAA

## 5.8S

>*S.sclarea*

TGTCATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGC AAAATGCGATACTTGG  
TGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGC  
ACGTCTGCCTGGGCGTCA

>*S.cadmica*

TGTCATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGC GAAATGCGATACTTGG  
TGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGC  
ACGTCTGCCTGGGCGTCA

>*S.digitaloides*

TGTCATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGC GAAATGCGATACTTGG  
TGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGC  
ACGTCTGCCTGGGCGTCA

>*S.bucharica*

TGTCATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGC GAAATGCGATACTTGG  
TGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGC  
ACGTCTGCCTGGGCGTCA

>*S.domicina*

TGTCATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGC AAAATGCGATACTTGG  
TGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGC  
ACGTCTGCCTGGGCGTCA

>*S.transsylvanica*

TGTCATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGC GAAATGCGATACTTGG  
TGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGC  
ACGTCTGCCTGGGCGTCA

>*S.calycina*

TGTCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGC GAAATGCGATACTTGG  
GTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGC  
CACGTCTGCCTGGGCGTCA

>*S.sclareav.turk*

TGTCATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGC AAAATGCGATACTTGG  
TGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGC  
ACGTCTGCCTGGGCGTCA

>*S.hians*

TGTCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGC GAAATGCGATACTTGG  
GTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGC  
CACGTCTGCCTGGGCGTCA

>*S.pratensis*

TGTCATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGC GAAATGCGATACTTGG  
TGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGC  
ACGTCTGCCTGGGCGTCA

>*S.glutinosa*

TGTCATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGC GAAATGCGATACTTGG  
TGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGC  
ACGTCTGCCTGGGCGTCA

>*S.verbenaca*

TGTCATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGG  
TGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGC  
ACGTCTGCCTGGGCGTCA

>*S.virgata*

TGTCATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAAATGCGATACTTGG  
TGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGC  
ACGTCTGCCTGGGCGTCA

>*S.namaensis*

TGTCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGG  
GTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCA

>*S.lavandulaefolia*

TGTCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGG  
GTGTGAATTGCAGAATCCCGCGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGG  
CACGTCTGCCTGGGCGTCA

## ITS2

>*S.sclarea*

CGCATCGCGTCGCCCCCACCACATGCGGGGGCGGATACTGGCTCCCGTGCGCCCGGCGCGCGGCTGGCC  
CAAATGCGATCCCTCGGCGACTCGTGTACGACAAGTGGTGGTTGAAATCTCAATCTTTGCGCCGTCGTGCCG  
CTGCGTCTCCGCGAGGGCATCCATCAACGACCCAACGGCCGGTGCCTCGCGGCGCCCCGACCTTCGACCG

>*S.sclarea v.turk*

CGCATCGCGTCGCCCCCACCACATGCGGGGGCGGATACTGGCTCCCGTGCGCCCGGCGCGCGGCTGGCC  
CAAATGCGATCCCTCGGCGACTCGTGTACGACAAGTGGTGGTTGAAATCTCAATCTTTGCGCCGTCGTGCCG  
CTGCGTCTCCGCGAGGGCATCCATCAACGACCCAACGGCCGGTGCCTCGCGGCGCCCCGACCTTCGACCG

>*S.cadmica*

CGCATCGCGTCGCCCCCACCATGTGCGGGGGCGGATACTGGCTCCCGTGCGCCCGGCGCGCGGCTGGCC  
CAAATGCGATCCCTCGGCGACTCATGTACGACAAGTGGTGGTTGAAATCTCAATCTTTGCGCCGTCGTGCC  
ACTGCGTCTCCGTACGGGCATCCATCAACGACCCAACGGTGGGGGTGCCTCGCGGCGCCCCGACCTTCGACCG  
G

>*S.digitaloides*

CGCATCGCGTCGCCCCCACCATGTGCGGGGGCGGATAATTGGCTCCCGTGCGCCCGGCGCGCGGCTGGCC  
CAAATGCGATCCCTCGGCGACTCATGTACGACAAGTGGTGGTTGAAATCTCAATCTTTGCGCCGTCGTGCCA  
CTGCGTCTCCGTAAGGGCATCCATCAACGACCCAACGGTGGGGGTGCCTCACGGTGCCCCGACCTTCGACCG

>*S.bucharica*

CGCATCGCGTCGCCCCCACCATGTGCGGGGGCGGATACTGGCTCCCGTGCGCCCGGTCGCGGGCTGGCC  
CAAATGCGATCCCTCGGCGACTCATGTACGACAAGTGGTGGTTGAAATCTCAATCTTTGCGCCGTCGTGCC  
ACTGCGTCTCCGTACGGGCATCCATCAACGACCCAACGGTGGGGGTGCCTCGCGGCTCCCCGACCTTCGACCG  
G

>*S.dominica*

CGCATCGCGTCGCCCCCACCATGTGCGGGGGCGGATACTGGCTCCCGTGCGCCCGGCGCGCGGCTGGCCC  
AAATGCGATCCCTCGGCGACTCATGTACGACAAGTGGTGGTTGAAATCTCAATCTTTGCGCCGTCGTGCCAC  
TGCGTCTCCGTAAGGGCATCCATCAACGACCCAACGGCCGGTGCCTCGCGGCGCCCCGACCTTCGACCG

>*S.transsylvanica*

CGCATCGCGTCGCCCCCACCATGTGCGGGGGGCGGATACTGGCCTCCCGTCGCCCCGGCGCGGGGTGG  
CCAAATGCGATCCCTCGGCGACTCATGTCACGACAAGTGGTGGTTGAAATCTCAATCTTTGCGCCGTCGTGC  
CACTGCGTCGTCCGTACGGGCATCCATCAACGACCCAACGGTGGGGGTGCCTCGCAGCGCCCCGACCTTCGAC  
CG

>*S.calycina*

CGCATCGCGTCGCTCCCCCCTCCGTGCGCACAGCGCCCGCTGTTGGGGGGGGGGGGCGGATATTGGCC  
TCCCGTCTCCTCGGCGTGGGCTGGCCAAATGCGATCCCTCGGCGACTCATGTCACGACAAGTGGTGGTTGA  
AAACTCAATCTCGCGCGCCGTCGTGCCACTGCGTCGTCCGTTGGGCATCCATCAACAACCCAACGGTGCCGT  
GCCTCACAGCACCCACCTCCGACCG

>*S.hians*

CGCATCGCGTCGCCCCCATCCATGCGCACAGCACTGGTTGAGGGGCGGATATTGGCCTCCCGTGTGCTCGGC  
GTGCGGCTGGCCAAATGCGATCCCTCGGCGACTCATGTCACGACAAGTGGTGGTTGATAACTCAATCTTTGC  
GCCGTCGTGCCACTGCGTCGTCCGTATGGGCATCCATCAACGACCCAACGGTGAAGGTGCCTCACGGCGCCCC  
ACCTTCGACCG

>*S.pratensis*

CGCATCGCGTCGCCCCCACCATGTGCGGGGGGCGGATACTGGCCTCCCGTCGCCCCGGCGCGGGGTGG  
CCAAATGCGATCCCTCGGCGACTCATGTCACGACAAGTGGTGGTTGAAATCTCAATCTTTGCGCCGTCGTGC  
CACTGCGTCGTCCGTACGGGCATCCATCAACGACCCAACGGTGGGGGTGCCTCGCAGCGCCCCGACCTTCGAC  
CG

>*S.glutinosa*

CGCATCGCGTCGCCCCCACCATGTGCGGGGGGCGGATATTGGCCTCCCGTCGCCCCGGCGTGGGCTGGCC  
AAATGCGATCCCTCGGCGACTCATGTCACGACAAGTGGTGGTTGAAATCTCAATCTTTGCGCCGTCGTGCCA  
TGCGTCGTCCGTAAGGGCATCCATCAACGACCCAACGGTGGGGGTGCCTCACGGTGCCCCGACCTTCGACCG

>*S.verbenaca*

CGCATCGCGTCGCCCCCACCATGTGCGGGGGGCGGATATTGGCCTCCCGTCGCCCCGGCGCGGGGTGGCC  
CAAATGCGATCCCTCGGCGACTCATGTCACGACAAGTGGTGGTTGAAATCTCAATCTTTGCGCCGTCGTGCCA  
CTGCGTCGTCCGTAAGGGCATCCATCAACGACCCAACGGTGGGGGTGCCTCACGGTGCCCCGACCTTCGACCG

>*S.virgata*

CGCATCGCGTCGCCCCCACCATGTGCGGGGGGCGGATACTGGCCTCCCGTCGCCCCGGCGCGGGGTGGC  
CAAATGCGATCCCTCGGCGACTCATGTCACGACAAGTGGTGGTTGAAATCTCAATCTTTGCGCCGTCGTGCC  
ACTGCGTCGTCCGTACGGGCATCCATCAACGACCCAACGGTGGGGGTGCCTCGCGGGCGCCCCGACCTTCGACC  
G

>*S.namaensis*

CGCATCGCGTCGCCCCCACCATGTGCGCACAGCGCCCGCTGTTGGGGGGGCGGATATTGGCCTCCCGTCTC  
CTCGGCGTGGGCTGGCCAAATGCGATCCCTCGGCGACTCATGTCACGACAAGTGGTGGTTGAACAACCTCAA  
TCTCGCGCCGTCGTGCCACTGCGTCGTCCGTTGGGCATCCATCAACGACCCAACGGTGCCGGTGCCTCGCA  
GACCCACCTTCGACCG

>*S.lavandulaefolia*

CGCATCGCGTCGCCCCCACCATGTGCGCACAGCGCCGGTTGCGGGGGGCGGATATTGGCCTCCCGTACGCCTCG  
GCATGGGCTGGCCAAATGCGATCCCTCGGCGACTCATGTCACGACAAGTGGTGGTTGAACCTCAATCTTT  
GCGCCGTCGTGCCACTGCGTCGTCCGCTGGGCATCCATCAACGACCCAACGGTGCTGGTGCCTCACGGCGCT  
ACACCTTCGACCG

psbA-trnH

>*S.sclarea*

**GTTATGCATGAACGTAATGCTCATAA**CTTCCCTCTAGACCTAGCTGCTATCGAAGCTCCAACAAATGGCTAAG  
ACTTGTTTTAGTGTGTAGGAGTTTTTGAA**AATAGAATAGATAAAATATAAGGAGCAATAAACCCCTTCTTGTCT**  
**ACCAAAGAGGGTTATTGCTCCTTTATTTCTTTCAATT**AGGAATCCTTTCTATATTTCTAGTAGTATTGGAC  
TTACCTAAAATTATCTTTCCATTAGAGAATAAAGAAAGAAGATCAAAAAATGATTCAAATCCATTTTTGTTTT  
ACAATTTCTAAAAAATTTAATTGAAAAAGTAAATAAATAAACATTTTTAATAGAATTTTATAGTAGAGGGG  
**CGGATGTAGCCAAGTGGATCAAGGCAGTGGATTGTGAATCCACCATGCG**

>*S. sclarea v. turk*

**GTTATGCATGAACGTAATGCTCATAA**CTTCCCTCTAGATCTAGCTGCTATCGAAGCTCCAACAAATGGCTAAGA  
CTTGTTTTAGTGTGTAGGAGTTTTTGAA**AATAGAATAGATAAAATATAAGGAGCAATAAACCCCTTCTTGTCTA**  
**CCAAAAGAGGGTTATTGCTCCTTTATTTCTTTCAATT**AGGAATCCTTTCTATATTTCTAGTAGTATTGGACT  
TACCTAAAATTATCTTTCCATTAGAGAATAAAGAAAGAAGATCAAAAAATGATTCAAATCCATTTTTGTTTTA  
CAATTTCTAAAAAATTTAATTGAAAAAGTAAATAAATAAACATTTTTAATAGAATTTTATAGTAGAGGGG  
**GGATGTAGCCAAGTGGATCAAGGCAGTGGATTGTGAATCCACCATGCG**

>*S.cadmica*

**GTTATGCATGAACGTAATGCTCATAA**CTTCCCTCTAGACCTAGCTGCTATCGAAGCTCCAACAAATGGCTAAGA  
CTTGTTTTAGTGTGTAGGAGTTTTTGAA**AATAGAATAGATAAAATATAAGGAGCAATAAACCCCTTCTTGTCTA**  
**CCAAAAGAGGGTTATTGCTCCTTTATTTCTTTCAATT**AGGAATCCTTTCTATATTTCTAGTAGTATTGGACT  
TACCTAAAATTATCTTTCCATTAGAGAATAAAGAAAGAAGATCAAAAAATGATTCAAATCCATTTTTGTTTTA  
CAATTTCTAAAAAATTTAATTGAAAAAGTAAATAAATAAACATTTTTAATAGAATTTTATAGTAGAGGGG  
**GGATGTAGCCAAGTGGATCAAGGCAGTGGATTGTGAATCCACCATGCG**

>*S.digitaloides*

**GTTATGCATGAACGTAATGCTCATAA**CTTCCCTCTAGACCTAGCTGCTATCGAAGCTCCAACAAATGGCTAAGA  
CTTGTTTTAGTGTGTAGGAGTTTTTGAA**AATAGAATAGATAAAATATAAGGAGCAATAAACCCCTTCTTGTCTA**  
**CCAAAAGAGGGTTATTGCTCCTTTATTTCTTTCAATT**AGGAATCCTTTCTATATTTCTAGTAGTATTGGACT  
TACCTAAAATTATCTTTCCATTAGAGAATAAAGAAAGAAGATCAAAAAATGATTCAAATCCATTTTTGTTTTA  
CAATTTCTAAAAAATTTAATTGAAAAAGTAAATAAATAAACATTTTTAATAGAATTTTATAGTAGAGGGG  
**CGGATGTAGCCAAGTGGATCAAGGCAGTGGATTGTGAATCCACCATGCG**

>*S.bucharica*

**GTTATGCATGAACGTAATGCTCATAA**CTTCCCTCTAGACCTAGCTGCTATCGAAGCTCCTACAAATGGCTAAGA  
CTTGTTTTAGTGTGTAGGAGTTTTTGAA**AATAGAATAGACAAATATAAGGAGCAATAAACCCCTTCTTGTCCA**  
**CCAAAAGAGGGTTATTGCTCCTTTATTTCTTTCAATT**AGGAATCCTTTCTATATTTCTAGTAGTATTGGACT  
TACCTAAAATTATCTTTCCATTAGAGAATAAAGAAAGAAGATCAAAAAATGATTCAAATCCATTTTTGTTTTA  
CAATTTCTAAAAAATTTAATTGAAAAAGTAAATAAATAAACATTTTTAATAGAATTTTATAGTAGAGGGG  
**GGATGTAGCCAAGTGGATCAAGGCAGTGGATTGTGAATCCACCATGCG**

>*S.dominica*

**GTTATGCATGAACGTAATGCTCATAA**CTTCCCTCTAGATCTAGCTGCTATCGAAGCTCCAACAAATGGCTAAGA  
CTTGTTTTAGTGTGTAGGAGTTTTGAAAAATAGAATAGATAAAATATAAGGAGCAATAAACCCCTTCTTGTCTA  
CCAAAAGAGGGTTATTGCTCCTTTATTTCTTTCAATTAGGAATCCTTTCTATATTTCTAGTAGTATTGGACT  
TACCTAAAATTATCTTTCCATTAGAGAATAAAGAAAGAAGATCAAAAAATGATTCAAATCCATTTTTGTTTTA  
CAATTTCTAAAAAATTTAATTGAAAAAGTAAATAAATAAACATTTTTAATAGAATTTTATAGTAGAGGGG  
**GGATGTAGCCAAGTGGATCAAGGCAGTGGATTGTGAATCCACCATGCG**

>*S.transylvanica*

GTTATGCATGAACGTAATGCTCATAA CTTCCCTCTAGACCTAGCTGCTATCGAAGCTCCAACAAATGGCTAAGA  
CTTGTTTTAGTGTGTAGGAGTTTTTGAA AATAGAATAGATAAATATAAGGAGCAATAAACCCTTTCTTGTTCTA  
C AAAAGAGGGTTTATTGCTCCTTTATTTCTTTCAATTAGGAATCCTTTCTATATTTCTAGTAGTATTGGACT  
TACCTAAAATTATCTTTCCATTAGAGAATAAAGAAAGAAGATCAAAAAATGATTCAAATCCATTTTTGTTTTA  
CAATTTCTAAAAAAATTTAATTGAAAAAGTAAATAAATAAACATTTTTAATAGAATTTTATAGTAGAGGGGC  
GGATGTAGCCAAGTGGATCAAGGCAGTGGATTGTGAATCCACCATGCG

>*S.calycina*

GTTATGCATGAACGTAATGCTCATAA CTTCCCTCTAGACCTAGCTGCTATCGAAGCTCCAACAAATGGCTAAGA  
CTTGTTTTAGTGTGTAGGAGTTTTTGAA AATAGAATAGATAAATATAAGGAGCAATAAACCCTTTCTTGTTCTA  
T CAAAAGAGGGTTTATTGCTCCTTTATTTCTTTCAATTAGGAATCCTTTCTTATTTCTAGTAGTATTGGACT  
TACCTAAAATTATCTTTCCATTAGAGAATAAAGAAAGAAGATAAAAAAATGATTCAAATCCATCTTTGTTTTA  
CAATTTCTAAAAAAATTTAATTGAAAAAGTGAATTCATAAATAAAAAAGTAAATAAATAGAAAAATTTTACTA  
GAATTTCTAGTTATAGTAGAGGGGCGGATGTAGCCAAGTGGATCAAGGCAGTGGATTGTGAATCCACCATG  
CG

>*S.glutinosa*

GTTATGCATGAACGTAATGCTCATAA CTTCCCTCTAGACCTAGCTGCTATCGAAGCTCCAACAAATGGCTAAGA  
CTTGTTTTAGTGTGTAGGAGTTTTTGAA AATAGAATAGATAAACATAAGGAGCAATAAACCCTTTCTTTGATAGA  
A CAAGAGGGGGTTTATTGCTCCTTTATTTCTTTCAATTAGGGATCCTTTCTATATTTCTAGTAGTATTGGACT  
TACCTATAATTATCTTTCCATTAGATAGAGAATAAAGAAAGAAGATAAAAAAATGATTGAAATCTATCTTTT  
TTTTCAATTTCTAAAAAAATTTCAATTGAAAAAGTAAATAAATAGAAAAATGATAAATATCATTTTATAGTAGA  
GGGGCGGATGTAGCCAAGTGGATCAAGGCAGTGGATTGTGAATCCACCATGCG

>*S.virgata*

GTTATGCATGAACGTAATGCTCATAA CTTCCCTCTAGACCTAGCTGCTATCGAAGCTCCAACAAATGGCTAAGA  
CTTGTTTTAGTGTGTAGGAGTTTTTGAA AATAGAATAGATAAATATAAGAAGCAATAAACCCTTTCTTGTTCTA  
C AAAAGAGGGTTTATTGCTCCTTTATTTCTTTCAATTAGGAATCCTTTCTATATTTCTAGTAGTATTGGACT  
TACCTAAAATTATCTTTCCATTAGAGAATAAAGAAAGAAGATCAAAAAATGATTCAAATCCATTTTTGTTTTA  
CAATTTCTAAAAAAATTTAATTGAAAAAGTAAATAAATAAAAAATTTTACTAGAATTTGAATTTTATAGTAG  
AGGGGCGGATGTAGCCAAGTGGATTAAGGCAGTGGATTGTGAATCCACCATGCG

>*S.namaensis*

GTTATGCATGAACGTAATGCTCATAA CTTCCCTCTAGACCTAGCTGCTATCGAAGCTCCAACAAATGGCTAAGA  
CTTGTTTTAGTGTGTAGGAGTTTTTGAA AATAGAATAGATAAATATAAGGAGCAATAAACCCTTTCTTGTTCTA  
T CAAAAGAGGGTTTATTGCTCCTTTATTTCTTTCAATTAGGAATCCTTTCTTATTTCTAGTAGTATTGGACT  
TACCTAAAATTATCTTTCCATTAGAGAATAAAGAAAGAAGATAAAAAAATGATTCAAATCCATCTTTGTTTTA  
CAATTTCTAAAAAAATTTAATTGAAAAAGTGAATTCATAAATAAAAAAGTAAATGAATAGAAAAATTTTACTA  
GAATTTCTAGTTATAGTAGAGGGGCGGATGTAGCCAAGTGGATCAAGGCAGTGGATTGTGAATCCACCATG  
CG