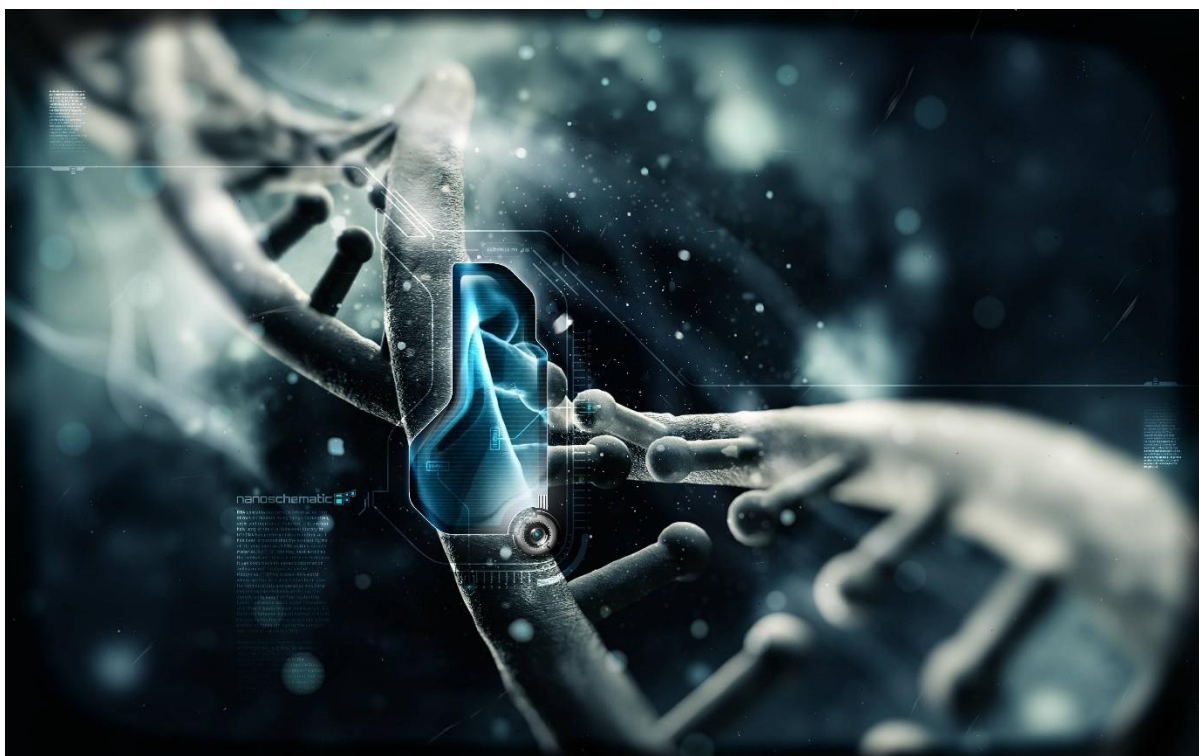




Ανάλυση της ενδομεταγραφόμενης περιοχής του πυρηνικού
ριβοσωμικού (nrDNA) σε είδη του γένους *Cynodon*
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Πέρος Χαράλαμπος
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΑΘΗΝΑ 2018

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 του πυρηνικού
ριβοσωμικού (nrDNA) σε είδη του γένους *Cynodon**

ΠΕΡΟΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2018

Επιβλέπων Καθηγητής: Παναγιώτης Κατινάκης

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 του πυρηνικού
ριβοσωμικού (nrDNA) σε είδη του γένους *Cynodon*

ΠΕΡΟΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2018

Επιβλέπων Καθηγητής: Παναγιώτης
Κατινάκης
**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ
ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

Θέμα: Ανάλυση της ενδομεταγραφόμενης περιοχής του πυρηνικού ριβοσωμικού (nrDNA) σε είδη του γένους *Cynodon*

ΠΕΡΟΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ

Η ανάθεση της Μεταπτυχιακής Διπλωματικής εργασίας με θέμα: “**Ανάλυση της ενδομεταγραφόμενης περιοχής του πυρηνικού ριβοσωμικού (nrDNA) σε είδη του γένους *Cynodon***” έγινε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης Ειδικής Σύθεσης του τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής στις 3/06/2016, κατά την οποία ορίστηκε η τριμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Παναγιώτης Κατινάκης, Καθηγητής (Επιβλέπων) Δημήτριος

Μπουράνης, Καθηγητής (Μέλος)

Γεώργιος Αϊβαλάκης, 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 έδειξε στον πρόσωπο μου, δίνοντας μου την ευκαιρία να αποτελέσω μέλος του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας. Η συνεχής καθοδήγησή του και οι πολύτιμες συμβουλές του συνέβαλαν καταλυτικά στην υλοποίηση της εργασίας. Η ουσιαστική, διαρκής, εποικοδομητική και ευχάριστη συνεργασία μας, καθώς και το κριτικό πνεύμα του κατάφεραν να αλλάξουν το δικό μου τρόπο σκέψης.

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

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Διδάκτορα κ. Αιμιλία – Ελένη Νικολοπούλου για τις συμβουλές της στην πραγματοποίηση αυτής της Διπλωματικής Εργασίας, όπως και τους φίλους και υποψήφιους διδακτορικού Τάσο Σπαντίδος, και Δήμητρα Δούκα όπως επίσης για την πολύτιμη βοήθεια τους καθώς και το επιστημονικό προσωπικό Δρ. Α. Βενιεράκη και την Δρ. Μαρία Δήμου του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία και την βοήθεια τους.

Τέλος ευχαριστώ τα άτομα που είναι κοντά μου και κυρίως την οικογένειά μου που με στηρίζαν και με στηρίζουν ψυχικά και που είναι κοντά μου σε όποια απόφαση και αν πάρω στη ζωή μου. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω του φίλους που ήταν μαζί μου σε όλοι αυτήν την
προσπάθεια.

Στους Γονείς μου και τον Αδερφό μου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
SUMMARY	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Γενικά για τα ριβοσώματα	9
1.2 Το Πυρηνικό Ριβοσωμικό DNA	9
1.3 Μεταγραφή του 45S rDNA και επεξεργασία του πρόδρομου Rna.....	11
1.4 Δευτεροταγής δομή του ITS 1 και του ITS 2	12
1.5 Εναρμονισμένη Εξέλιξη.....	13
1.6 Η αντισταθμιστική αλλαγή των βάσεων στις έλικες των ITS1 και ITS2.....	16
1.7 Η περιοχή ITS1 και ITS2 ως φυλογενετικός μοριακός δείκτης.....	17
1.8 Η περιοχή ITS1 και ITS2 ως γραμμωτός κώδικας DNA.....	17
1.9 Γενικά για το <i>Cynodon dactylon</i>	19
1.10 Μορφολογία <i>Cynodon dactylon</i>	20
1.11 Υβρίδια.....	21
Tifway.....	22
Tifgreen.....	23
Tifdwarf.....	23
2 Σκοπός.....	25
3 Υλικά και Μέθοδοι.....	26
3.1 Φυτικό Υλικό.....	26
3.2 Σύγκριση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών – φυλογενετική ανάλυση.....	30
4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	31

4.1 Γενικά χαρακτηριστικά της περιοχής ITS.....	31
4.2 Ευθυγράμμιση των αλληλουχιών των περιοχών ITS1 και ITS2.....	31
4.3 Ανάλυση της δευτεροταγούς δομής των αλληλουχιών της περιοχής ITS1 και ITS2 στο <i>C.dactylon</i>	34
4.4 Συναινετική δευτεροταγής δομής της περιοχής ITS1 και ITS2 σε 7 είδη του γένους <i>Cynodon</i>	38
4.5 Φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των ειδών του γένους <i>Cynodon</i>	43
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	46
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ.....	48
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	52

Περίληψη

Το γένος *Cynodon* (Οικογένεια *Poaceae*) περιέχει 9 είδη και 10 ποικιλίες με το *Cynodon dactylon* να αποτελεί το είδος με το μεγαλύτερο βαθμό εξάπλωσης. Στην παρούσα μελέτη οι ακολουθίες της ενδομεταγραφόμενης περιοχής (ITS) ανακτήθηκαν από πιστοποιημένα είδη (*Cynodon aethiopicus*, *Cynodon dactylon*, *Cynodon incompletus*, *Cynodon nlemfuensis*, *Cynodon radiatus*, και *Cynodon transvaalensis*) του γένους *Cynodon* και προσδιορίστηκαν οι αλληλουχίες των περιοχών ITS1 και ITS2. Οι αλληλουχίες των περιοχών ITS1 και ITS2 είναι ένα από τα πιο αξιόπιστα εργαλεία για την μοριακή φυλογενετική ανάλυση των φυτών. Στη συνέχεια κατασκευάστηκε η προβλεπόμενη δευτεροταγής δομή των περιοχών ITS1 και ITS2 και εξετάστηκε εάν η προβλεπόμενη συναινετική δευτεροταγής δομή παρέχει πληροφορίες στη διαφοροποίηση φυτών του ίδιου είδους και μεταξύ διαφορετικών ειδών. Επίσης, με βάση την πρωτοταγή δομή των περιοχών ITS1 και ITS2, πραγματοποιήθηκε φυλογενετική ανάλυση φυτών του γένους *Cynodon*.

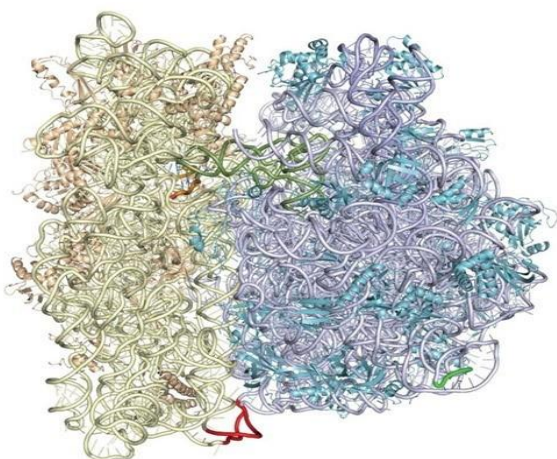
Summary

The genus *Cynodon* (family *Poaceae*) contains 9 species and 10 varieties, with *C. dactylon*(L.) Pers. (common bermudagrass) being the most widespread. In the present study, the ITS sequences from several species (*Cynodon aethiopicus* , *Cynodon dactylon*, *Cynodon incompletus*, *Cynodon nlemfuensis* , , *Cynodon radiatus*, *Cynodon transvaalensis*) of the genus *Cynodon* were retrieved from the Genbank and the ITS1 and ITS2 regions were extracted. The ITS1 and ITS2 regions are considered as the most reliable tools for molecular phylogenetic analysis of plant species. The secondary structure ITS1 and ITS2 regions were predicted and used to explore their utility in addressing interspecies and intraspecies discriminations. Furthermore, we used the primary sequences of ITS1 and ITS2 to explore their contribution in the phylogenetic analysis of the genus *Cynodon*.

Εισαγωγή

1.1 Γενικά για τα ριβοσώματα

Τα ριβοσώματα είναι μικροσκοπικά σωματίδια, τα οποία είναι τα κέντρα που μετατρέπουν την γενετική πληροφορία η κωδικοποιείται στο mRNA σε πρωτεΐνες. Τα σωματίδια αυτά έχουν πολύ μικρό μέγεθος και η διάμετρος του είναι ~ 20 nm τα οποία είναι ορατά μόνο με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Τα ριβοσώματα αποτελούνται από πρωτεΐνες και RNAs, το ποσοστό των ριβοσωμικών RNAs (rRNAs), καταλαμβάνει το ~65% και το υπόλοιπο αποτελείται από πρωτεΐνες. Όλα τα κυτταρικά ριβοσώματα φέρουν από δυο υπομονάδες διαφορετικού μεγέθους, την μεγάλη (LSU) και την μικρή (SSU), όπου αυτές συνδέονται μεταξύ τους. Το ριβόσωμα στους ευκαρυώτες είναι γνωστό ως 80S και οι υπομονάδες του ως 60S και 40S, μεγάλη και μικρή αντίστοιχα. Τα χαρακτηριστικά που έχει κάθε μια υπομονάδα περιλαμβάνει rRNAs και ριβοσωμικές πρωτεΐνες (Poczai and Hygönen, 2010).

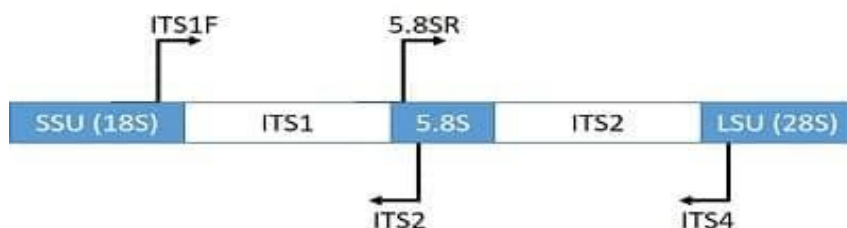


Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση κρυσταλλικής δομής 80S ριβοσώματος και των 60S και 40S υπομονάδων.

1.2 Το Πυρηνικό Ριβοσωμικό DNA

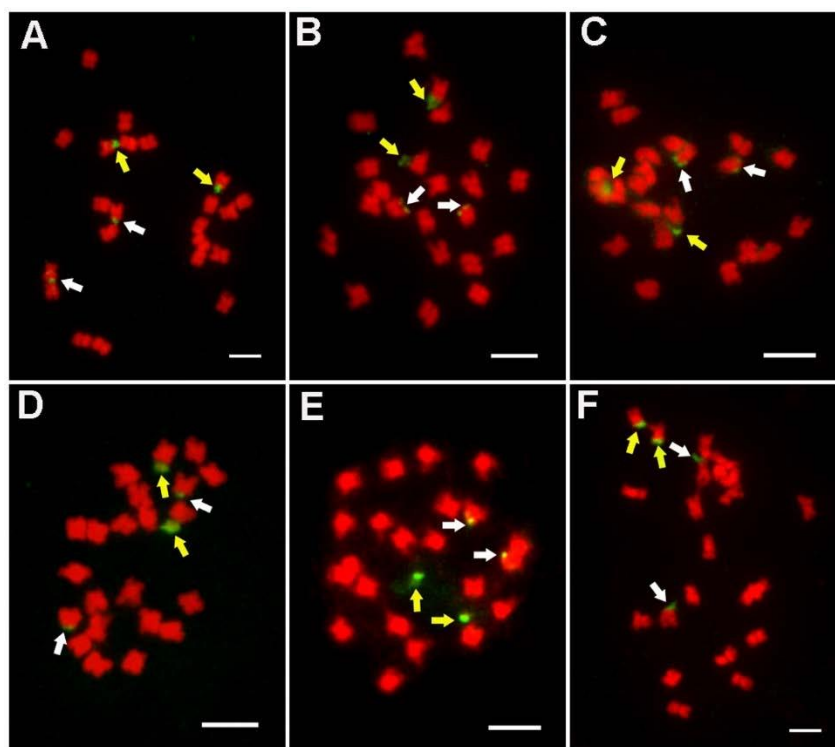
Τα αντίγραφα του ριβοσωμικού DNA (rDNA) είναι κάποιες χιλιάδες αυτά φιλοξενούνται στο πυρηνικό γονιδίωμα των ευκαρυωτικών οργανισμών. Τα αντίγραφα του rDNA αποτελείται από το 18S, 5.8 S και 25-28S rRNAs γονίδια και τα αναφέρονται συχνά ως rDNA οπερόνιο ή 45S rDNA. Οι αλληλουχίες των νουκλεοτιδίων που βρίσκονται μεταξύ του 18S rRNA και του 5.8S γονιδίου αναφέρονται ως ενδομεταγραφόμενη περιοχή 1 (ITS 1, Internal

Transcribed Spacer) του πυρινικού ριβοσωμικού DNA ενώ οι αλληλουχίες του DNA που βρίσκονται μεταξύ των 5.8S και 25 – 28S rRNA γονιδίων αναφέρονται ως ενδομεταγραφόμενη περιοχή 2 του πυρινικού ριβοσωμικού DNA (ITS2, Internal Transcribed Spacer 2). Τα αντίγραφα του rDNA οργανώνονται σε διάταξη *κεφαλή- ουρά* με διαδοχικές επαναλήψεις 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 1.2).



Εικόνα 1.2: Σχηματική Παρουσίαση της θέσης 45S.

Ο πυρηνίσκος έχει μία δυναμική δομή του πυρήνα χωρίς μεμβράνη, και συγκροτείται γύρω από δέσμες διαδοχικά επαναλαμβανόμενων ριβοσωμικών γονιδίων, (rDNA ονιδίων), τα οποία μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση I. Αυτές οι περιοχές ονομάζονται οργανωτές πυρηνίσκου, (**N**ucleolar **O**rganiser **R**egions, NOR), και είναι η βάση της δομικής οργάνωσης του πυρηνίσκου, προκειμένου να στρατολογηθούν όλα τα απαραίτητα συστατικά επεξεργασίας και συγκρότησης που χρειάζονται για την βιοσύνθεση των ριβοσωμικών (Dundr *et al.*, 2001; Mélése and Xue, 1995; Olson *et al.*, 2000; Scheer *et al.*, 1999). Η ενεργοποίηση των NORS είναι όταν αρχίζει η μεταγραφή των rDNA γονιδίων. Όταν τα NORS είναι ενεργά στην διάρκεια της μεσόφασης (interphase), παραμένουν σχετικά αποσυμπυκνωμένα σε μετάφραση σχηματίζοντας μία δομή η οποία καλείται ως δευτερογενής σύσφιξη (Lam *et al.*, 2005; Shaw και Doonan, 2005).

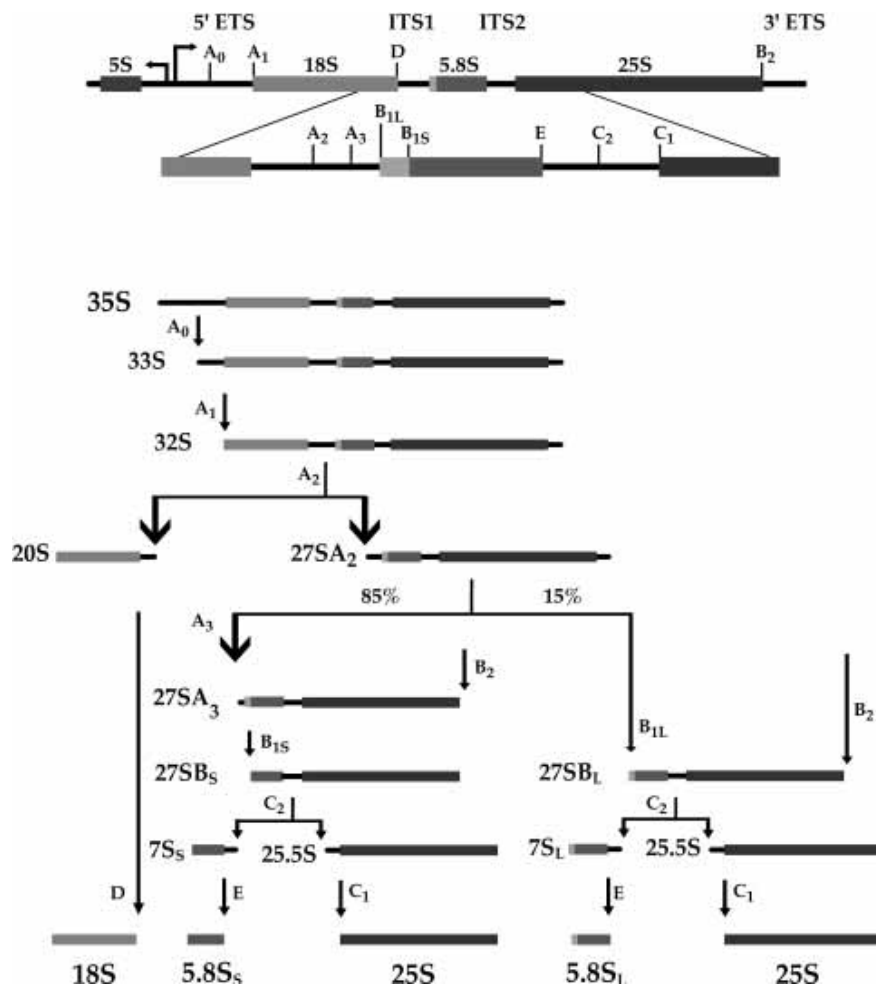


Εικόνα 1.3: Μεταφασικά χρωμοσώματα *Jatropha curcas* με προσδιορισμό θέσης 45S rDNA. Με κόκκινο φαίνονται τα χρωμοσώματα που έχουν χρωματιστεί με DAPI, ενώ με κίτρινο - πράσινη κηλίδα φαίνονται στα χρωμοσώματα 45S rDNA θέση.

1.3 Μεταγραφή του 45S rDNA και επεξεργασία του πρόδρομου rRNA

Η RNA πολυμεράση I (Pol I) εστιάζεται αποκλειστικά στη μεταγραφή του rDNA. Στην περιοχή IGS υπάρχει ο υποκινητής όπου από εκεί ξεκινάει η μεταγραφή. Στα φυτά και πιο συγκεκριμένα στο *A.thaliana* 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. Ένα μεγάλο πρόδρομο προκύπτει από τη μεταγραφή το pre-rRNA το 45S, το οποίο έχει μήκος περίπου 8-12kb αλληλουχίες για τα δομικά rRNAs (5.8S, 18S και 25-28S rRNAs), το ITS1 και ITS 2, καθώς και τις εξωτερικές μεταγραφόμενες περιοχές (5'- ETS και 3'- ETS). Κατά την διάρκεια της μεταγραφής, τα πρόδρομα μετάγραφα, συνδέονται με ριβοσωμικές πρωτεΐνες (Ribosomal Proteins, RPs) και με μια ομάδα μικρών ριβονουκλεοπρωτεϊνών (snoRNPs) και έτσι σχηματίζονται μεγάλα ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια τα οποία μπορεί να γίνουν ορατά με μεθόδους ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Οι αλληλουχίες των νουκλεοτιδίων των ITS 1, ITS 2 και ETS απομακρύνονται μέσω της δράσης ενδοριβονουκλεασών οι οποίες αναγνωρίζουν συγκεκριμένες θέσεις εκτομής και 5' ή και 3' εξωριβονουκλεασών και τελικά προκύπτουν τα ώριμα ριβοσωμικά RNA. Η επεξεργασία

του pre – rRNA στα φυτά φαίνεται να έχουν δυο εναλλακτικά μονοπάτια (Εικόνα 1.4). Η επεξεργασία του pre – rRNA από τα δυο εναλλακτικά μονοπάτια μπορεί να χρησιμεύσουν για να διασφαλιστεί η βιογένεση των λειτουργικών ριβοσωμάτων ενώ θα μπορούσαν να ρυθμίζονται διαφορετικά σε κατάσταση στρες ή σε διαφορετικούς ιστούς (Henras et al., 2015; Lafontaine, 2015).

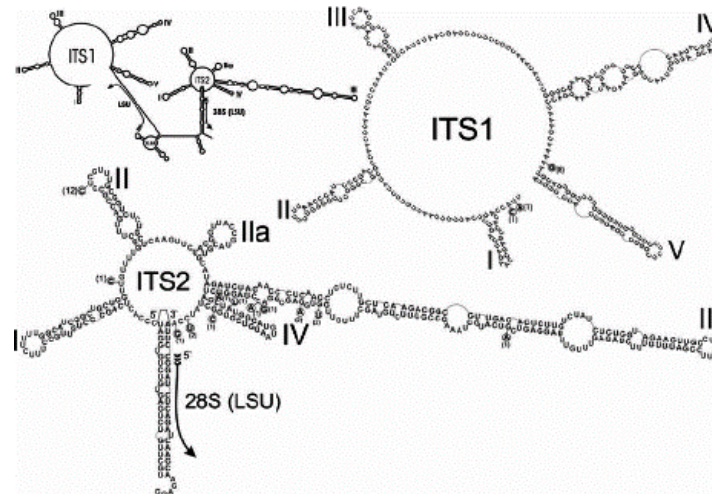


Εικόνα 1.4 Η *A. thaliana* διαθέτει δυο εναλλακτικά μονοπάτια επεξεργασίας του pre-rRNA.

1.4 Δευτεροταγής δομή του ITS 1 και του ITS 2

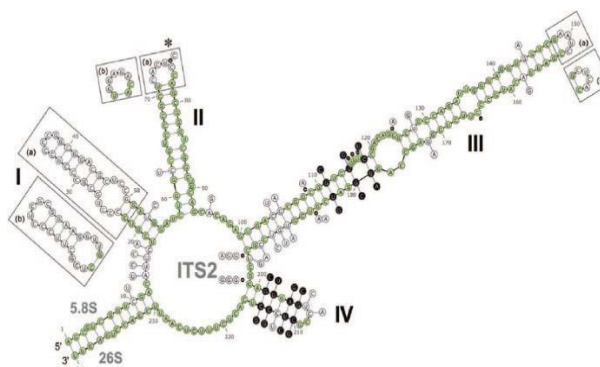
Μελέτες μας έδειξαν ότι στα σπονδυλωτά, στα φυτά και στους μύκητες η προβλεπόμενη δευτεροταγής δομή του ITS 2 μεταγραφόμενης περιοχής είναι συντηρημένη σε αντίθεση με αυτή της ITS 1 μεταγραφόμενης περιοχής (Hershkovitz and Zimmer 1997, Jobes and Thien 1997, Joseph et al., 1999)(Εικόνα 1.5). Η πρόβλεψη της δευτεροταγής δομής μίας αλληλουχίας RNA γίνεται με προγράμματα, συνήθως αυτά τα προγράμματα βασίζονται σε αλγορίθμους που

έχουν την δυνατότητα να υπολογίσουν την ελάχιστη ελεύθερη ενέργεια (ΔG) της δομής έτσι ώστε να μπορούμε να επιτύχουμε την μέγιστη σταθερότητα (Zuker, 2003). Στην προβλεπόμενη δευτεροταγής δομή ITS 2 φέρει τέσσερις έλικες (Εικόνα 1.6).



Εικόνα 1.5: Μια γενική δευτεροταγής δομή ITS 1 και ITS 2.

Οι έλικες που ακολουθούνται από μια συντηρημένη μονόκλωνη περιοχή είναι I και II η συγκεκριμένη περιοχή είναι πλούσια σε πουρίνες, η έλικα III μερικές φορές είναι διακλαδισμένη και έχει σχετικά μεγάλο μήκος, τέλος η έλικα IV είναι μικρή και επί το πλείστον μεταβλητή. Η «φουσαλίδα» (bulge) του ITS 2 στην έλικα II είναι το κύριο γνώρισμα που διευκολύνει την αναγνώριση των δομικών χαρακτηριστικών, αυτή είναι μια πυριμιδίνη – πυριμιδίνης που βρίσκεται κοντά στη βάση της και ενώνει την έλικα III, κοντά στο 5' άκρο της (Coleman, 2015)

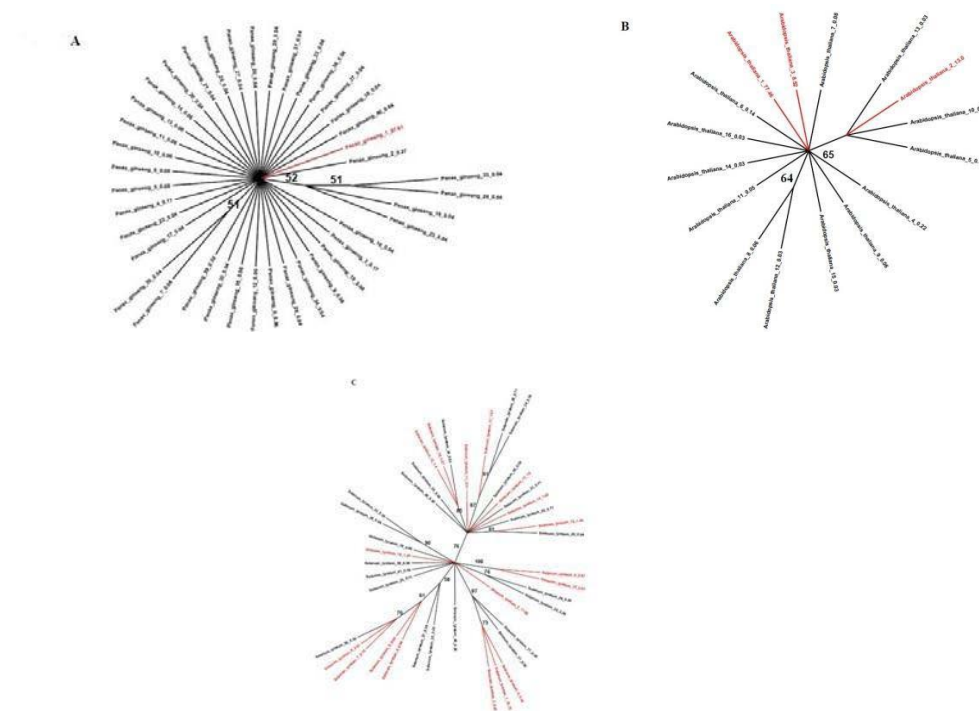


Εικόνα 1.6 : Σχηματική αναπαράσταση του μοντέλου της δευτεροταγής δομής της περιοχής ITS 2

1.5 Εναρμονισμένη Εξέλιξη

Το φαινόμενο κατά το οποίο τα δυο γονίδια εξελίσσονται μαζί καλείται εναρμονισμένη εξέλιξη (concerted evolution) ή λιγότερο συχνά συνεξέλιξη (coevolution). Τα ριβοσωμικά γονίδια από το ότι απαντώνται σε πολλά αντίγραφα, θεωρείται ότι συνήθως ακολουθούν εναρμονισμένη εξέλιξη (concerted evolution) και ουσιαστικά όλα τα αντίγραφα έχουν την ίδια αλληλουχία (Graur and Li, 1999; Zhang and Hewitt, 2003). Η χρήση των ριβοσωμικών γονιδίων σε εξελικτικές μελέτες είναι τόσο ευρεία και αυτό αποδίδεται στο γεγονός ότι διαθέτουν μια σειρά από γνωρίσματα, όπως η δευτεροταγής δομή τους, η διαφορετικοί ρυθμοί εξέλιξης των περιοχών τους και ο τυχαίος αριθμός επαναλήψεων τους, που εξυπηρετούν στην αντιμετώπιση διαφόρων ερωτημάτων εξελικτικής φύσης. Τα ριβοσωμικά γονίδια είναι διατεταγμένα σε διαδοχικές επαναλήψεις και χαρακτηρίζονται από χαμηλή ενδογονιδιωματική ποικιλομορφία ως συνέπεια της εναρμονισμένης εξέλιξης (Dover *et al.*, 1982; Baldwin *et al.*, 1995; Elder and Turner, 1995). Ο ανασυνδυασμός (unequal crossing over) και αντικατάσταση γονιδίων (gene conversion) είναι δυο από τους πολλούς μηχανισμούς που ευθύνονται για το φαινόμενο αυτό με τον πρώτο να υποστηρίζεται ότι είναι σημαντικός αφού καταλήγει σε διπλασιασμό ή έλλειψη πολλών επαναλήψεων, ενώ ο δεύτερος επηρεάζει πολύ λίγες επαναλήψεις (Hribova *et al.*, 2011). Η σταθερότητα του rRNA εντός ITS 1 και ITS 2 που βρίσκονται κάτω από την χαμηλή επιλεκτική πίεση, έκανε την ITS περιοχή έναν από τους πιο δημοφιλείς δείκτες σε φυλογενετικές μελέτες (Alvarez and Wendel, 2003; Francisco-Ortega *et al.*, 2001; Renner *et al.*, 2007; Pettengill and Neel, 2008). Για τον εντοπισμών προγόνων των υβριδικών ειδών αλλά και για την μελέτη των πολυπλοειδών ειδών χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση των ITS (Sun *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007). Ωστόσο, η εξέλιξη των rDNA σε υβρίδια και σε αλλοπολυπλοειδή ειδικότερα, μπορεί να είναι περίπλοκη ως προς τον τρόπο που αλληλοεπιδρούν τα μητρικά rDNA. Οι αποκλίνουσες μητρικές αλληλουχίες rDNA εξακολουθούν να παραμένουν συντηρημένες και εξελίσσονται ανεξάρτητα χωρίς καμία αλληλεπίδραση, ορισμένα είδη από αυτά είναι *Arabidopsis*, *Brassica* ή *Silene* (O'Kane *et al.*, 1996; Popp and Oxelman, 2001; Bennet and Smith, 1991). Σε άλλες περιπτώσεις, όπως σε αλλοπολυπλοειδή του *Nicotiana* ή *Dendrochilum*, τα μητρικά rDNA φαίνεται να ανασυνδυάζονται όπως κρίνεται από την παρουσία χμαιρικών ITS αλληλουχιών (Barkman and Simpson, 2002; Volkov *et al.*, 2007). Η κυρίαρχη αλληλουχία rDNA μπορεί να αντικαταστήσει μια από τις γονικές αλληλουχίας rDNA όταν ένας τύπος rDNA χαθεί ή απαλειφθεί ή μπορεί να είναι μία χμαιρική αλληλουχία που προκύπτει από ενδογονιδιωματικό ανασυνδυασμό (Hribova *et al.*, 2011). Σε περίπτωση που η εναρμονισμένη εξέλιξη δεν

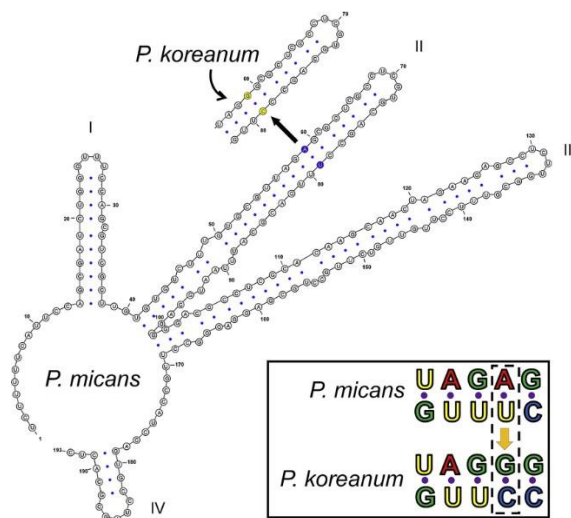
ολοκληρωθεί διαφορετικοί τύποι παραλόγων και ορθολόγων rDNA αλληλουχιών μπορεί να βρεθούν στο γονιδίωμα που συχνά περιλαμβάνουν σιωπηλές και μη λειτουργικές ITS ακολουθίες rDNA που αναφέρονται ως ψευδογονίδια. Σε λανθασμένα φυλογενετικά συμπεράσματα μπορεί να μας οδηγήσει η παρουσία των ψευδογονιδίων στα σύνολα των φυλογενετικών δεδομένων (Mayol and Rosselló, 2001). Σύμφωνα με τα φυλογενετικά δέντρα της ενδογονιδιωματικής ποικιλομορφίας όλων των ειδών που ερευνήθηκαν, ο ενδογονιδιωματικός πολυμορφισμός των ITS2 αλληλουχιών οφείλεται στους τρεις καθιερωμένους μηχανισμούς εξέλιξης (Nei and Rooney, 2005). Η εναρμονισμένη εξέλιξη είναι ο πρώτος μηχανισμός, σύμφωνα με την οποία οι παραλλαγές του ITS 2 εξελίχθηκαν ως μονάδες σε φυτικά γονιδιώματα από τους μηχανισμούς του ανασυνδυασμού (unequal crossing over) ή και της αντικατάστασης γονιδίων (gene conversion). Στο γονιδίωμα του *Panax Ginseng* σχεδόν όλα (<97%) τα ITS2 είναι πανομοιότυπα (one major variant) ως αποτελέσματα του μηχανισμού της εναρμονισμένης εξέλιξης (Εικόνα 1.7). η εξέλιξη γέννησης και θανάτου (birth-and-death evolution) είναι ο δεύτερος μηχανισμός στην οποία μερικές παραλλαγές (variants) του ITS2 παρήχθησαν από διπλασιασμό γονιδίου ενώ κάποιες από αυτές στη συνέχεια χάθηκαν από απαλοιφές (deletions), μετατοπίσεις (translocations) ή και κάποια αλλαγή στον αριθμό των χρωμοσωμάτων. Στην (Εικόνα 1.7) βλέπουμε τις παραλλαγές του ITS 2 στο γονιδίωμα του *Arabidopsis thaliana* σχηματίζουν δυο ομάδες και θεωρείται μια περίπτωση του εν λόγω μηχανισμού. Η αποκλίνουσα εξέλιξη (divergent evolution) είναι ο τρίτος μηχανισμός, σύμφωνα με τη οποία οι ITS 2 παραλλαγές μέσα σε ένα φυτικό γονιδίωμα εξελίχθηκαν ανεξάρτητα και με κάποια απόκλιση. Με αυτόν τον μηχανισμό μπορεί να εξηγηθεί καλύτερα το γονιδίωμα του *Solanum lyratum* γιατί έχει πολλαπλές ομάδες μεγάλων παραλλαγών (Εικόνα 1.7). Η εναρμονισμένη εξέλιξη από την μελέτη των Song και των συνεργατών του (2012) φαίνεται να είναι ο καλύτερος μηχανισμός που εξηγεί την ενδογονιδιωματική διακύμανση των αλληλουχιών ITS 2 για το 65,7% των ειδών, ενώ η εξέλιξη γέννησης και θανάτου και η αποκλίνουσα εξέλιξη είναι ο καλύτερος μηχανισμός για να εξηγήσει το 27% και το 7.3% των ειδών, αντίστοιχα. Ωστόσο, ο Wolf και οι συνεργάτες (2013) χρησιμοποίησαν τα δεδομένα 454 Pyrosequencing των Song και συνεργατών (2012) και επανεξέτασαν το κριτήριο σχετικά με αντισταθμιστικές αλλαγές βάσεων (CBCs) εν όψει της ενδογονιδιωματικής μεταβλητότητας. Η μελέτη διαπίστωσε ότι οι ενδογονιδιωματικές αλλαγές βάσεων στα ITS2 αντίγραφα δεν ήταν σημαντικές ώστε να επηρεάζουν τη δευτεροταγή δομή της περιοχής ITS2 και τη φυλογενετική σχέση μεταξύ των φυτών και ως εκ τούτου κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η ITS2 περιοχή θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο barcode για τα φυτά.



Εικόνα 1.7. Φυλογενετικά δένδρα των διαφόρων περιοχών ITS2 που απαντώνται στο γονιδίωμα του *Panax Ginseng* (A), *Arabidopsis thaliana* (B) και *Solanum lyratum* (C).

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

Στις έλικες του RNA μπορεί να διατηρείται η δυνατότητα σχηματισμού ζευγών βάσεων μέσω δυο εξελικτικών μηχανισμών, της αντισταθμιστικής αλλαγής (CBC) ή της ημι-αντισταθμιστικής αλλαγής (hCBC) (Mai and Coleman, 2007). Ο μηχανισμός της αντισταθμιστικής αλλαγής περιλαμβάνει την αντικατάσταση και των δυο νουκλεοτιδίων, τα οποία μετέχουν στο σχηματισμό ενός ζεύγους βάσεων της έλικας. Το γεγονός αυτό επιτρέπει να μην διαταράσσεται ο αριθμός των κανονικών ζευγών βάσεων. Στο δεύτερο μηχανισμό (ημι-αντισταθμιστική αλλαγή), εάν πιθανά λόγω μετάλλαξης πραγματοποιηθεί υποκατάσταση του νουκλεοτιδίου που εδράζεται από την μια πλευρά της έλικας, δηλαδή το ζεύγος G-C μετατρέπεται σε G-U. Το νέο ζεύγος βάσεων είναι σχετικά σταθερό και δεν διαταράσσεται σημαντικά η δευτεροταγής δομή της έλικας. Η παρουσία CBC ή hCBC κατά την ανάλυση της συναινετικής δευτεροταγούς δομής των ITS1 και ITS2 έχει συχνά υποβοηθητικό χαρακτήρα για την διάκριση συγγενικών ειδών φυτών και μυκήτων (Koetschan et al., 2014).



Εικόνα 1.8: Συγκριτική ανάλυση της δευτεροταγής δομής της έλικας III του ITS 2 RNA μετάγραφου μεταξύ δύο ειδών

1.7 Η περιοχή ITS1 και ITS2 ως φυλογενετικός μοριακός δείκτης

Οι εξελικτικές μεταβολές στους διάφορους οργανισμούς πραγματοποιούνται με πολύ αργό ρυθμό, αυτές λαμβάνουν χώρα στα γονίδια 28S, 18S και 5.8S. Η σύγκριση των αλληλουχιών του γονιδίου 18S καθιστά δυνατή μια εκτίμηση εξελικτικών σχέσεων μεταξύ των οργανισμών. Στην περιοχή ITS 1 και ITS 2 ο αριθμός των εξελικτικών μεταβολών είναι περίπου 100 φορές πιο γρήγορος και ως εκ τούτου η σύγκριση αυτών των αλληλουχιών επιτρέπει την εξέταση των εξελικτικών σχέσεων εντός της οικογένειας του γένους και του είδους μια ομάδας οργανισμών (Goldman, 1983).

Το PCR είναι η τεχνολογία της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης, αυτή μας έχει επιτρέψει την ενίσχυση περιοχής ITS από ένα μεγάλο αριθμό οργανισμών. Βάση του PCR και σε συνδυασμό με το γεγονός της δυνατότητας της αλληλούχησης της περιοχής ITS αποκάλυψε ότι οι περιοχές ITS 1 και ITS 2 παρουσιάζουν εξαιρετική παραβατικότητα και αυτή η περιοχή έγινε ένας από τους καλύτερους δείκτες για να μπορούμε να διερευνούμε τις εξελικτικές σχέσεις για τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Alvarez and Wendel., 2003, Li *et al.*., 2011, Chen *et al.*, 2014).

1.8 Η περιοχή ITS1 και ITS2 ως γραμμωτός κώδικας DNA

Στον πλανήτη μας από εκτιμήσεις που έχουν γίνει υπάρχουν πάνω από 300.000 είδη φυτών, από αυτά έχουν ταυτοποιηθεί σχετικά λίγα με τις κλασσικές ταξινομικές προσεγγίσεις. Η ταυτοποίηση των φυτικών ειδών όσο και η προσπάθεια της διερεύνησης της βιοποικιλότητας

επικουρείται από μοριακές προσεγγίσεις όπως ο γραμμωτός κώδικας DNA (Barcoding DNA) (Gregory, 2005). Για την αναγνώριση των ειδών με βάση τις διαφορές τους σε μικρές περιοχές του DNA χρησιμοποιούμε την τεχνική του γραμμωτού κώδικα DNA (Hebert *et al.*, 2003).

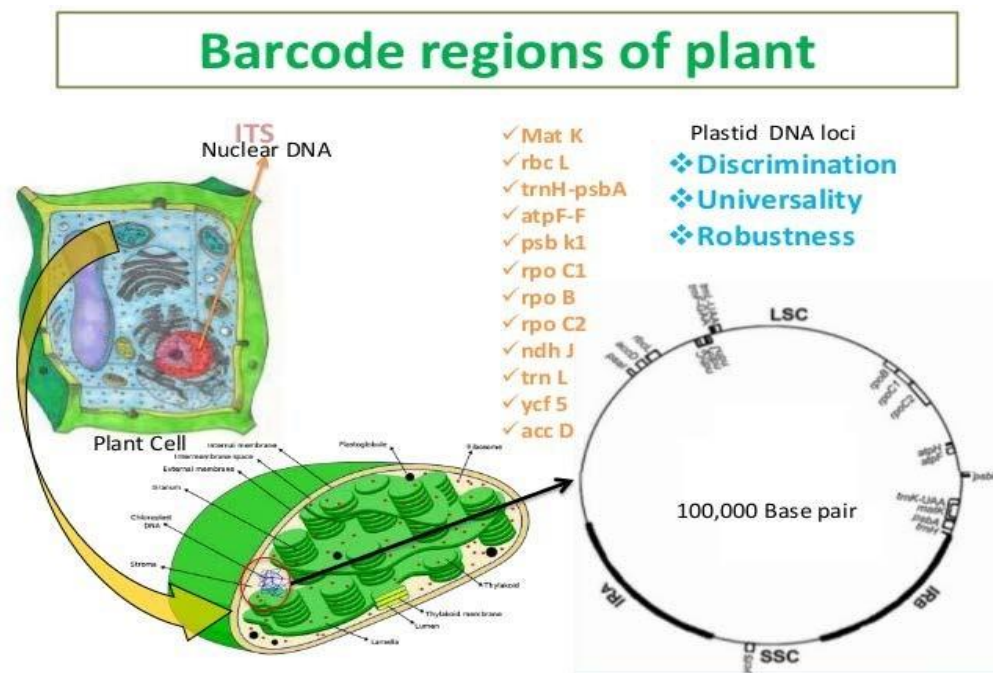
Αρχικά χρησιμοποιήθηκε η οξειδάση του κυτοχρώματος c 1 (CO1) από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα ως γραμμωτός κώδικας DNA για την ταυτοποίηση των ζώων (Tehen *et al.*, 2014). Στα φυτά τα μιτοχονδριακά γονίδια είναι αργά εξελισσόμενα, με πολύ χαμηλά ποσοστά υποκατάστασης και δεν είναι κατάλληλα για barcoding. Η αναζήτηση για τα φυτικά barcode μετατοπίζεται προς τα χλωροπλαστικά και πυρηνικά γονιδιώματα με υψηλά ποσοστά υποκατάστασης. Τα τρία βασικά κριτήρια μίας αλληλουχίας DNA που θεωρείται χρήσιμη είναι :

- 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). Εάν η αλληλουχία DNA από έναν άγνωστο οργανισμό ή ιστό αποτύχει να ταιριάζει με οποιαδήποτε από τις αλληλουχίες που αναφέρονται, τότε το δείγμα θα πρέπει να επισημανθεί ως πιθανό νέο είδος, που απαιτεί μια λεπτομερή μελέτη. Εκτός από την παροχή μιας ταχείας αναγνώρισης, μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε 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. Για να μπορέσουμε να έχουμε μια ακριβή ταυτοποίηση των ειδών απαιτείται η χρήση περισσότερων του ενός φυλογενετικού δείκτη αυτό

αναφέρει η πλειοψηφία των επιστημόνων. 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. 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.*, 2015).



Εικόνα 1.9: Περιοχές του DNA από το γονιδίωμα του πλασμιδίου και από το πυρηνικό γονιδίωμα

1.9 Γενικά για το *Cynodon dactylon* (Αγριάδα)

Η αγριάδα (*Cynodon dactylon*) είναι ποώδες πολυετές φυτό χαμηλής ανάπτυξης. Το υπόγειο μέρος του φυτού δημιουργεί διάφορα ριζώματα που η κορυφή τους βγαίνοντας από το έδαφος σχηματίζει νέους βλαστούς.(Ακουμιανάκης *et.al.*,2009). Είναι ένα φυτό το οποίο δημιουργεί πολλά προβλήματα στις καλλιεργείες καθώς έχει επιθετική φύση, και είναι ανταγωνιστικό προς τα άλλα φυτά. Εκτός από ζιζάνιο μπορούμε να το χρησιμοποιήσουμε και σαν χλοοτάπητα ή καλλωπιστικό φυτό για εδαφοκαλύψεις, ιδιαίτερα σε περιοχές με θερμά κλίματα λόγω της μεγάλης ανθεκτικότητας της στην ξηρασία.

Βασίλειο:	Φυτά (Plantae)
Συνομοταξία:	Αγγειόσπερμα (Magnoliophyta)
Ομοταξία:	Μονοκοτυλήδονα (Liliopsida)
Τάξη:	Κυπειρώδη (Cyperales)
Οικογένεια:	Ποοειδή (Poaceae)
Γένος:	Κυνόδους (Cynodon)
Είδος:	<i>C. dactylon</i>

1.10 Μορφολογία *Cynodon dactylon*

Η αγριάδα είναι φυτό που ανήκει στην κατηγορία C4. Είναι ένα φυτό χαμηλής ανάπτυξης, και το ύψος των βλαστών του φθάνουν σε ύψος έως 60 εκατοστά, αλλά σε μερικές περιπτώσεις μπορούν να φθάσουν και το 1 μέτρο (Watson and Dallwitz, 1992). Οι στόλωνες που σχηματίζει η αγριάδα είναι βλαστοί που έρπουν στην επιφάνεια του εδάφους, καθώς και τα ριζώματα τα οποία είναι υπόγειοι βλαστοί. Τα ριζώματα είναι σκληρά, λευκά, πεπλατυσμένα και καταλήγουν σε οξεία αιχμή. Το βάθος τους φθάνει έως 35 εκατοστά και βοηθούν την αγριάδα να επιβιώσει για μεγάλο διάστημα σε ξηρές συνθήκες. Οι στόλωνες όσο και στα ριζώματα υπάρχουν οφθαλμοί με μεγάλη ικανότητα ριζοβολίας. Η αγενώς αναπαραγωγή της αγριάδας γίνεται από τους στόλωνες και τα ριζώματα. Η εγγενής αναπαραγωγή γίνεται με σπόρους που παράγει, το φυτό. Οι σπόροι είναι μικροί, μεταφέρονται εύκολα με τον αέρα και το νερό και αυτό του δίνει την δυνατότητα να διαδίδετε εύκολα σε μεγάλες αποστάσεις. Τα φύλλα είναι μαλακά και οξύληκτα, αραιές τρίχες υπάρχουν στην επιφάνεια. Ο κολεός είναι κυλινδρικός, κοντός και φέρει τρίχες. Δεν υπάρχουν ωτίδια, ενώ το γλωσσίδιο έχει αντικατασταθεί από δακτύλιο λευκών τριχών. Τα άνθη της αγριάδας είναι ερμαφρόδιτα και φέρει σε 3-7 λεπτούς στάχεις, οι οποίοι σχηματίζονται στην κορυφή των βλαστών. Η αναπαραγωγική περίοδος της αγριάδας είναι από Ιούνιο έως Οκτώβριο. (Ελευθεροχωρινός, 1996). Τα μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά δεν είναι επαρκείς για να διαφοροποιήσει τους γονότυπους της αγριάδας επειδή οι διαφορές μεταξύ τους είναι συχνά λεπτές και υπόκεινται στην περιβαλλοντική τους επιρροή.



Εικόνα 1.10: Μορφολογία *Cynodon dactylon*

Cynodon transvaalensis



Εικόνα 1.11: *Cynodon transvaalensis*

Το *Cynodon trasvaalensis* είναι διπλοειδές είδος ($2n = 2x = 18$) και τα βρίσκουμε στο Transvaal στο Cape Province της Νοτίου Αφρικής τα οποία βρίσκονται σε υγρές τοποθεσίες (Harlan et al., 1970a, 1970b). Τα χαρακτηριστικά του *C. trasvaalensis* είναι φυτά μικρού μεγέθους έχουν κιτρινοπράσινο χρώμα, τα φύλλα του είναι στενά. Η ταξιανθία του είναι βότρυς και φέρει από δύο ως τέσσερις ταξιανθίες. Τα αρσενικά είναι σπειροειδώς διατεταγμένα. Προσαρμόζεται σε δροσερό κλίμα. Λόγο του ριζώματος του σχηματίζει πυκνό χλοοτάπητα και έχει πολύ πυκνού βλαστούς (Harlan et al., 1970b).

1.11 Υβρίδια *C. dactylon*

Υπάρχουν εννέα είδη της αγριάδας αλλά δυο από αυτά μόνο, *C. dactylon* και *C. transvaalensis* συμβάλουν ουσιαστικά στις γενετικές βιβλιοθήκες στην μοντέρνα εποχή των χλοοταπίτων. Το *C. transvaalensis* ή αλλιώς Αφρικανικό γρασίδι εκτιμάται ως χλοοτάπητας και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε εξειδικευμένο υβριδισμό με *C. dactylon* για την παραγωγή ποικιλιών χλοοτάπητα. Ωστόσο τα γρασίδια εκτός τύπου άρχισαν να εμφανίζονται σε καθιερωμένους τύπους την Tifgreen ή την Tifway και να εδραιώνονται μετά την εμπορική τους κυκλοφορία. Τα συγκεκριμένα είδη γρασιδιού είναι εκείνα με διαφορετική μορφολογία και απόδοση σε σύγκριση με το περιβάλλον αλλά και με της επιθυμητές ποικιλίες. Από αυτά τα είδη έχουν επιλεγεί ως εμπορικές ποικιλίες αρκετοί τύποι από την Tifgreen και η αρχή έγινε από την Tifdwarf. Αυτοί οι τύποι έχουν την δυνατότητα να μειώνουν την ομοιομορφία της επιφάνειας, η οποία επηρεάζει αρνητικά την ποιότητα της.

Tifway

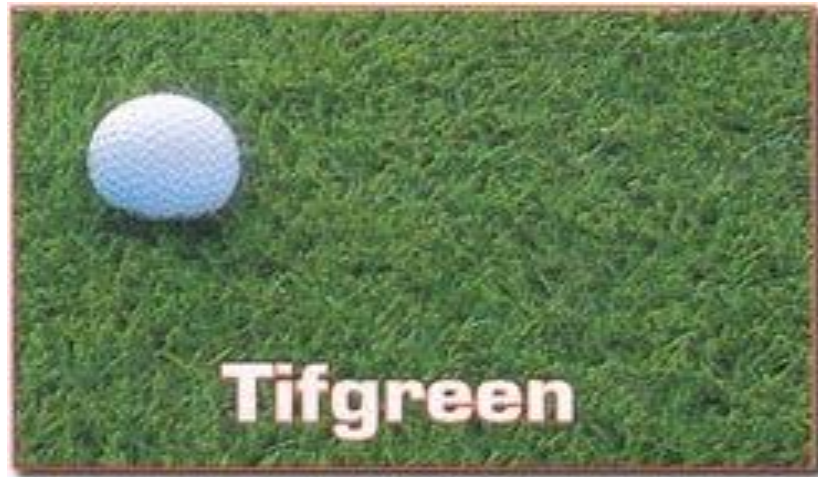


Εικόνα 1.12: Tifway

Η “Tifway” είναι το θεμέλιο της σειράς υβριδίων “Tif”, αυτή η σειρά αναπτύχθηκε στον ερευνητικό σταθμό USDA στο Tifton της Georgia. Ο θηλυκός γονέας του Tifway πρέπει να ήταν *C. transvaalensis* ($2n = 18$). Ο αριθμός των χρωμοσωμάτων ($2n = 27$) και τα άλλα χαρακτηριστικά του Tifway υποδηλώνουν ότι ο αρσενικός γονέας πρέπει να ήταν *C. dactylon* ($2n = 36$). Έχει εξαιρετικά μεγάλη αντοχή στο πάτημα και έχει λεπτή υφή, και σκούρο πράσινο χρώμα σαν ποικιλία. Λόγο ότι η Tifway είναι υβρίδιο και δεν έχει γύρη και σπόρους. Την Tifway χρησιμοποιούμε για τις γέφυρες του γκολφ και στα tees, όπως επίσης σε αθλητικά

γήπεδα. Η συγκεκριμένη ποικιλία εξαπλώνεται γρήγορα και είναι ανθεκτική στην *Herpetogramma phaeopteralis*. Έκτος από την Tifway υπάρχει και η επιλογή της Tifway II η οποία είναι βελτιωμένη σε σχέση με την πρώτη, έχει τα ίδια χαρακτηριστικά αλλά έχει μεγάλη αντίσταση στους νηματώδης στο ριζικό σύστημα (Brosnan and Deputy, 2008).

Tifgreen



Εικόνα 1.13: Tifgreen

Η Tifgreen (υβρίδιο *Cynodon dactylon* και *C. transvaalensis*) έχει ένα μεσαίο πράσινο χρώμα, με λεπτή υφή και υψηλή πυκνότητά βλάστησης και συνήθως χαμηλή ανάπτυξη. Η Tifgreen μπορεί να παράγει σπόρους σε κιτρινωπό ή πράσινο χρώμα αλλά αυτοί οι σπόροι δεν είναι βιώσιμοι. Αν και η Tifgreen χρησιμοποιείται σε γήπεδα του γκολφ και σε αθλητικά γήπεδα χρειάζεται πιο εντατική διαχείριση από την Tifway. Η Tifgreen είναι ευαίσθητη στους νηματώδης (Brosnan and Deputy, 2008).

Tifdwarf



Εικόνα 1.14 Tifdwarf

Η Tifdwart (*C. dactylon* x *C. transvaalensis*), είναι μια ποικιλία η οποία έχει μεταλλαχθεί από την Tifgreen. Η Tifdwarf είναι σχεδόν ίδια με την Tifgreen αλλά τα φύλλα και τα εσωτερικά του είναι πολύ μικρότερα από το Tifgreen. Το πράσινο χρώμα είναι επίσης πιο σκούρο από το Tifgreen. Η Tifdwarf παίρνει ένα κόκκινο-μοβ χρώμα αμέσως μετά το χειμώνα.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να αξιολογηθεί το κατά πόσο η ανάλυση της πρωτοταγούς και δευτεροταγούς δομής της περιοχής ITS 1 και ITS 2 παρέχει την δυνατότητα διάκρισης των ειδών του γένους *Cynodon*.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Αλληλουχίες της περιοχής ITS από φυτά του γένους *Cynodon*

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν αλληλουχίες της περιοχής ITS από διάφορα φυτικά είδη του γένους *Cynodon*. Οι αλληλουχίες αυτές ανακτήθηκαν από τη βάση δεδομένων NCBI, όπου επιλέχθηκαν φυτά Vouchers. Ως Vouchers ορίζονται τα φυτά που έχουν ταυτοποιηθεί σε επίπεδο γένους και είδους με τη χρήση ταξινομικών κλειδών και έχουν κατατεθεί σε διεθνή εν αποθετήρια φυτών. Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία απομονώνονται 300-500 mg φυτικού ιστού και πραγματοποιείται η εκχύλιση ολικού πυρηνικού DNA. Αυτό χρησιμοποιείται για την ενίσχυση της περιοχής ITS με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) και το προϊόν αλληλουχείται και κατατίθεται σε βάσεις δεδομένων. Παρακάτω δίδονται οι αλληλουχίες της περιοχής ITS για κάθε είδος φυτών του γένους *Cynodon* που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη και ο αριθμός πρόσβασης (Accession number) στη βάση δεδομένων NCBI (Εικόνα 1).

C. dactylon

Vouchers

KP057014 *C.cynodon* voucher HCCN-PJ008548-PB-315 South Korea

GGTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGTGACCTGATGAAAACAAACCGTGAACTGTACCTATGCTGCCGGTTGATGGGCTTGACCT
ATCTCTCGGTCTAGGCCACCGACCTTCTTCAGAAGGGCGGGGTGCCAAAAGAACCCACGCGCCGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATGTTGCCTTGCTTG
GGGCTCGGCCGGCTTGCCGGATGCACCCCTTGACGCGATGCTATGAAAAATCACATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTTGATCGATGAAGAA
CTAGCAAAATGCGATACCTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCCTTGCGCCGAGGGCAGCTG
TGCTGGGCGTCAAGCCAAAAGACACTCCACCGCAATCCCGGTCTGGACGTGGTGTGGCCCTCATTCATAGTGTATGGTGGGCCAAAGAGGAGGC
TGCCGGCGGTGCCGGTACAGCAGATGGTGGATGGCACAAGTTATTCTCGGTGTTGTGATCCTGACAACCTCCCGGTATGTTATGCCCTTTTGACCCAT
GGTTTGAGCGTATGTAGCTCGGACCGGACCCCA

>KP057015 *C.cynodon* voucher HCCN-PJ008548-PB-338 South Korea

GGTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGTGACCTGATGAAAACAAACCGTGAACTGTACCTATGCTGCCGGTTGATGGGCTTGACCT
ATCTCTCGGTCTAGGCCACCGACCTTCTTCAGAAGGGCGGGGTGCCAAAAGAACCCACGCGCCGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATGTTGCCTTGCTTG
GGGCTCGGCCGGCTTGCCGGATGCACCCCTTGACGCGATGCTATGAAAAATCACATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTTGATCGATGAAGAA
CTAGCAAAATGCGATACCTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCCTTGCGCCGAGGGCAGCTG
TGCTGGGCGTCAAGCCAAAAGACACTCCACCGCAATCCCGGTCTGGACGTGGTGTGGCCCTCATTCATAGTGTATGGTGGGCCAAAGAGGAGGC
TGCCGGCGGTGCCGGTACAGCAGATGGTGGATGGCACAAGTTATTCTCGGTGTTGTGATCCTGACAACCTCCCGGTATGTTATGCCCTTTTGACCCAT
GGTTTGAGCGTATGTAGCTCGGACCGGACCCCA

>KP057016 voucher HCCN-PJ008548-PB-91 South Korea

GGTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGTGACCTGACCAAAACAAACCGTGAACTGTACCTATGCTGCCGGTTGATGGGCTTGACCT
ATCTCTCGGTCTAGGCCACCGACCTTCTTCAGAAGGGCGGGGTGCCAAAAGAACCCACGCGCCGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATGTTGCCTTGCTTG
GGGCTCGGCCGGCTTGCCGGATGTACCCCTTGACGCGATGCTATGAAAAATCACATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTTGATCGATGAAGAA
CTAGCAAAATGCGATACCTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCCTTGCGCCGAGGGCAGCTG
TGCTGGGCGTCAAGCCAAAAGACACTCCACCGCAATCCCGGTCTGGACGTGGTGTGGCCCTCATTCATAGTGTATGGTGGGCCAAAGAGGAGGC
GCCGGCGGTGCCGGTACAGCAGATGGTGGATGGCACAAGTTATTCTCGGTGTTGTGATCCTGACGTCATGTTATGCGCCCTTTTGACCCATGGTTG
GAGCGTACGTAGCTCGGACCGGACCCCA

>KP057017 voucher HCCN-PJ008548-PB-179 South Korea

GGTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGTGACCTGACCAAAACAAACCGTGAACTGTACCTATGCTGCCGGTTGATGGGCTTGACCT
ATCTCTCGGTCTAGGCCACCGACCTTCTTCAGAAGGGCGGGGTGCCAAAAGAACCCACGCGCCGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATGTTGCCTTGCTTG

GGGCTCGGCCGGCTTGCCGGATGTACCCCTTGACGCGATGCTATGAAAAATCACATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTTGATCGATGAAGAA
CGTAGCAAAATGCGATACCTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCTTGCGCCGAGGGCAGCTG
TGCTGGGCGTCA CGCCAAAAGACACTCCACCGCAATCCCGGTCTGGACGTGGTGTGGCCCTCATTCCATAGTGTATGGTGGGCCAAAGAGGCGGCT
GCCGGCGGTGCCGGTCACAGCAGATGGTGGATGGCACAAGTTATTCTCGGTGTTGTATCCTGACGTATGTTATGCGCCCTTTTGACCCATGGTTTG
GAGCGTACGTAGCTCGGACCGGACCCCA

>GQ470555 voucher AMWF27 Honolulu USA

TCGTGACCCTGATGAAAAACAAACCGTGAACCTGTACCTATGCTGCCGGTTGATGGGCTTGACCTATCTCTCGGTCTAGGCCACCGACCTTCTCAGAAG
GGCGGGGTGCCAAAAGAACCCACGGCGCGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATGTTGCCTTGCTTGGGGCTCGGCCGGCTTGCCGGATGCACCCCTTGC
AGCGATGCTATGAAAAATCACATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTTGATCGATGAAGAACGTAGCAAAATGCGATACCTGGTGTGAATTGCAG
AATCCCGTGAACCATCGAGTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCTTGTTGGCCGAGGGCAGCTCTGCCTGGGCGTCA CGCCAAAAGACACTCCACCG
CAATCCCGGTCTGGACGTGGTGTGGCCCTCATTCCATAGTGTATGGTGGGCCAAAGAGGAGGCTGCCGGCGGTGCCGGTCACAGCAGATGGTGGATG
GGCACAAGTTATTCTCGGTGTTGTATCCTGACAACCTCCCGGTATGTTATGCCCTTTTGACCCATGGTTTGAGCGTATGTAGCTCGGACCGGCA

>DQ655795 *Cynodon dactylon* voucher Spies5248 South Africa

TCGTGACCCTGACCAAAACAAACCGTGAACCTGTACCTATGCTGCCGGTTGATGGGCTTGACCTATCTCTCGGTCTAGGCCACCGACCTTCTCAGAAG
GGCGGGGTGCCAAAAGAACCCACGGCGCGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATGTTGCCTTGCTTGGGGCTCGGCCGGCTTGCCGGATGCACCCCTTGC
AGCGATGCTATGAAAAATCACATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTTGATCGATGAAGAACGTAGCAAAATGCGATACCTGGTGTGAATTGCAG
AATCCCGTGAACCATCGAGTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCTTGTTGGCCGAGGGCAGCTCTGCCTGGGCGTCA CGCCAAAAGACACTCCACCG
AATCCCGGTCTGGACGTGGTGTGGCCCTCATTCCATAGTGTATGGTGGGCCAAAGAGGCGGCTGCCGGCGGTGCCGGTCACAGCAGATGGTGGATG
GCACAAGTTATTCTCGGTGTTGTATCCTGACAAGTCCCGGTATGTTATGCCCTTTTGACCCATGGTTTGAGCGTACGTAGCTCGGACCG

Varieties

>KP873313 *Cynodon dactylon* var. *pilosus* voucher Saarela 1606, Peterson, Soreng & Judziewicz (CAN)

ACCTGCGGAAGGATCATTGTCGTGACCCTGATGAAAAACAAACCGTGAACCTGTACCTATGCTGCCGGTTGATGGGCTTGACCTATCTCTCGGTCTAGGC
CACCGACCTTCTCAGAAGGGCGGGGTGCCAAAAGAACCCACGGCGCGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATGTTGCCTTGCTTGGGGCTCGGCCGGCT
TGCCGGATGCACCCCTTGACGCGATGCTATGAAAAATCACATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTTGATCGATGAAGAACGTAGCAAAATGCGA
TACCTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCTTGTTGGCCGAGGGCAGCTCTGCCTGGGCGTCA CG
CCAAAAGACACTTCCACCGCAATCCCGGTCTGGACGTGGTGTGGCCCTCATTCCATAGTGTATGGTGGGCCAAAGAGGAGGCTGCCGGCGGTGCCGG
TCACAGCAGATGGTGGATGGCACAAGTTATTCTCGGTGTTGTATCCTGACAACCTCCCGGTATGTTATGCCCTTTTGACCCATGGTTTGAGCGTATG
TAGCTCGGACCGGACCCAGGTGAGTCGGGACTACCCGCTGAATTAAGCATATCAATAAGCGG

>KP873312 *Cynodon dactylon* var. *pilosus* voucher Peterson 24626 & Romaschenko (USA)

ACCTGCGGAAGGATCATTGTCGTGACCCTGATGAAAAACAAACCGTGAACCTGTACCTATGCTGCCGGTTGATGGGCTTGACCTATCTCTCGGTCTAGGC
CACCGACCTTCTCAGAAGGGCGGGGTGCCAAAAGAACCCACGGCGCGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATGTTGCCTTGCTTGGGGCTCGGCCGGCT
TGCCGGATGCACCCCTTGACGCGATGCTATGAAAAATCACATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTTGATCGATGAAGAACGTAGCAAAATGCGA
TACCTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCTTGTTGGCCGAGGGCAGCTCTGCCTGGGCGTCA CG
CCAAAAGACACTTCCACCGCAATCCCGGTCTGGACGTGGTGTGGCCCTCATTCCATAGTGTATGGTGGGCCAAAGAGGAGGCTGCCGGCGGTGCCGG
TCACAGCAGATGGTGGATGGCACAAGTTATTCTCGGTGTTGTATCCTGACAACCTCCCGGTATGTTATGCCCTTTTGACCCATGGTTTGAGCGTATG
TAGCTCGGACCGGACCCAGGTGAGTCGGGACTACCCGCTGAATTAAGCATATCAATAAGCGG

Cultivars

>AF058812 *C. dactylon* cultivar Windsor Green Australia

TCGTGACCCTGACCAAAACAAACCGTGAACCTGTACCTATGCTGCCGGATGATGGGCTTGACCTATCTCTCGGTGTAGGCCACCGACCTTCTCAGAAG
GGCGGGGTGCCAAAAGAACCCAGGGCGCGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATGTTGCCTTGCTTGGGGCTCGGCCGGCTTGCCGGATGCACCCCTTGC
AGCGATGCTATGAAAAATCACATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTTGATCGATGAAGAACGTAGCAAAATGCGATACCTGGTGTGAATTGCAG
AATCCCGTGAACCATCGAGTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCTTGTTGGCCGAGGGCAGCTCTGCCTGGGCGTCA CGCCAAAAGACACTCCACCG
AATCCCGGTCTGGACGTGGTGTGGCCCTCATTCCATAGTGTATGGTGGGCCAAAGAGGCGGCTGCCGGCGGTGCCGGTCACAGCAGATGGTGGATG
GCACAAGTTATTCTCGGTGTTGTATCCTGACAACCTCCCGGTATGTTATGCCCTTTTGACCCATGGTTTGAGCGTATG

>AF058818 *C. dactylon* cultivar Wintergreen Australia

TCGTGACCCTGACCAAAACAAACCGTGAACCTGTACCTATGCTGCCGGATGATGGGCTTGACCTATCTCTCGGTGTAGGCCACCGACCTTCTCAGAAG
GGCGGGGTGCCAAAAGAACCCAGGGCGCGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATGTTGCCTTGCTTGGGGCTCGGCCGGCTTGCCGGATGCACCCCTTGC
AGCGATGCTATGAAAAATCACATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTTGATCGATGAAGAACGTAGCAAAATGCGATACCTGGTGTGAATTGCAG
AATCCCGTGAACCATCGAGTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCTTGTTGGCCGAGGGCAGCTCTGCCTGGGCGTCA CGCCAAAAGACACTCCACCG
AATCCCGGTCTGGACGTGGTGTGGCCCTCATTCCATAGTGTATGGTGGGCCAAAGAGGCGGCTGCCGGCGGTGCCGGTCACAGCAGATGGTGGATG
GCACAAGTTATTCTCGGTGTTGTATCCTGACAACCTCCCGGTATGTTATGCCCTTTTGACCCATGGTTTGAGCGTATG

>AF058822 *C. dactylon* cultivar Couch 5 Australia

TCGTGACCTGACGAAAAACAAACCGTGAACCTGTACCTATGCTGCCGGTTGATGGGCTTGACCTATCTGTCGGTGTAGGCCACCGACCTTCTCAGAA
GGGCGGTGTGCCAAAAGAACCCAGGGCGCGGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATGTTGCCCTTGCTGGGGCTCGGCCGGCTTGCCGGATGACCCCTTG
CAGCGATGCTATG**GAAAAATCACATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTTGATCGATGAAGAACGTAGCAAAATGCGATACCTGGTGTGAATTGCA**
GAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTGAACGCAAGTTGCGCCGAGGCCCTGTGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCCAAAAGACACTCCACCG
CAATCCCGGTCTGGACGTGGTGTGGCCCTCATTCCATAGTGTATGGTGGGCCAAAGAGGCGGCTGCCGGCGGTGCCGGTACAGCAGATGGTGGAT
GGCACAAGTTATTCTCGGTGTTGTGATCCTGACAACTCCGGTCATGTTATGCCCTTTTGACCCATGGTTTGAGCGTACGTAGCTCGGACCG

>KP873303 *C.aethiopicus* voucher Peterson 24318, Soreng, Romaschenko &Mbago (US)

ACCTGCGGAAGGATCATTGTCGTGACCTGACCAAAACAAACCGTGAACATGTACCTATGCTGCCGGTTGATGGGCTTGACCTATCTCTCGGTCTAGGC
CACCGACCTTCTCAGAAAGTGCGGGGTGCCAAAAGAACCCACGGCGCGGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATGTTGCCCTTGCTGGGGCTCGGCCGGCTT
GCCGGATGCAACCCGTGCAGCGATGGTATG**GAAAAATCACATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTTGATCGATGAAGAACGTAGCAAAATGCGA**
TACCTGGTGTGAATTGCAAGTCCCGTGAACCATCGAGTTTTGAACGCAAGTTGCGCCGAGGCCCTGTGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACG
CCAAAAGACACTCCACCGCAATCCCGGTCTGGACGTGGTGTGGCCCTCATTCCATAGTGTGTGGTGGGCTAAAGAGGCGGCTGCCGGCGGTGCCGG
TCACAGCAGTTGGTGGATGGCAGATGTTATTCTCGGTGTTGTATCCTGAAACTCCCGTCATGTTTGACCCATGGTTTGAGCGTATGTTGCTCGGA
CAG**CGACCCAGGTACGTGCGGACTACCCGCTGAATTTAAGCATATCAATAAGCGG**

>KP873302 *C.aethiopicus* voucher Peterson 24268, Soreng, Romaschenko &Mbago (US)

ACCTGCGGAAGGATCATTGTCGTGACCTGACCAAAACAAACCGTGAACATGTACCTATGCTGCCGGTTGATGGGCTTGACCTATCTCTCGGTCTAGGC
CACCGACCTTCTCAGAAAGTGCGGGGTGCCAAAAGAACCCACGGCGCGGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATGTTGCCCTTGCTGGGGCTCGGCCGGCTT
GCCGGATGCAACCCGTGCAGCGATGGTATG**GAAAAATCACATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTTGATCGATGAAGAACGTAGCAAAATGCGA**
TACCTGGTGTGAATTGCAAGTCCCGTGAACCATCGAGTTTTGAACGCAAGTTGCGCCGAGGCCCTGTGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACG
CCAAAAGACACTCCACCGCAATCCCGGTCTGGACGTGGTGTGGCCCTCATTCCATAGTGTGTGGTGGGCTAAAGAGGCGGCTGCCGGCGGTGCCGG
TCACAGCAGTTGGTGGATGGCAGATGTTATTCTCGGTGTTGTATCCTGAAACTCCCGTCATGTTTGACCCATGGTTTGAGCGTATGTTGCTCGGA
CAG**CGACCCAGGTACGTGCGGACTACCCGCTGAATTTAAGCATATCAATAAGCGG**

>GU359246 *Cynodon incompletus* voucher US:Smook 2408 & Gussell

TGACCTGCGGAAGGATCATTGTCGTGACCTAACC AAAACAAACCGTGAACATGTACCTATGCTGCCGGTTGATGGGCTTGACCTATCTCTCGGTCTAG
GCCACCGACCTTCTCAGAAAGTGCGGGGTGCCAAAAGAACCCACGGCGCGGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATGTTGCCCTTGCTGGGGCTCGGCCGG
CTTGCCGGATGCAACCCGTGCAGCGATGGTATG**GAAAAATCACATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTTGATCGATGAAGAACGTAGCAAAATG**
CGATACCTGGTGTGAATTGCAAGTCCCGTGAACCATCGAGTTTTGAACGCAAGTTGCGCCGAGGCCCTGTGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTC
ACGCCAAAAGACACTCCACCGCAATCCCGGTCTGGACGTGGTGTGGCCCTCATTCCATAGTGTATGGTGGGCTAAAGAGGCGGCTGCCGGCGGGTGC
CGTACAGCAGTTGGTGGATGGCAGATGTTATTCTCGGTGTTGTATCCTGAAACTCCCGTCATGTTATGCCCTTTGAGGAGCCATGTTTGAGAGC
GTATGCAGTTCCGACAGCGACCCAGGTACGTGCGGACTACCCGCTGAATTTAAGCATATCAATAAGCGG

>GU359245 *Cynodon incompletus* voucher US:Smook 10152

TGACCTGCGGAAGGATCATTGTCGTGACCTAACC AAAACAAACCGTGAACATGTACCTATGCTGCCGGTTGATGGGCTTGACCTATCTCTCGGTCTAG
GCCACCGACCTTCTCAGAAAGTGCGGGGTGCCAAAAGAACCCACGGCGCGGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATGTTGCCCTTGCTGGGGCTCGGCCGG
CTTGCCGGATGCAACCCGTGCAGCGATGGTATG**GAAAAATCACATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTTGATCGATGAAGAACGTAGCAAAATG**
CGATACCTGGTGTGAATTGCAAGTCCCGTGAACCATCGAGTTTTGAACGCAAGTTGCGCCGAGGCCCTGTGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTC
ACGCCAAAAGACACTCCACCGCAATCCCGGTCTGGACGTGGTGTGGCCCTCATTCCATAGTGTATGGTGGGCTAAAGAGGCGGCTGCCGGCGGGTGC
CGTACAGCAGTTGGTGGATGGCAGATGTTATTCTCGGTGTTGTATCCTGAAACTCCCGTCATGTTATGCCCTTTGAGGAGCCATGTTTGAGAGC
GTATGCAGTTCCGACAGCGACCCAGGTACGTGCGGACTACCCGCTGAATTTAAGCATATCAATAAGCGG

>KP873322 *Cynodon nlemfuensis* voucher Laegaard 19876 (US)

ACCTGCGGAAGGATCATTGTCGTGACCTGACCAAAACAAACCGTGAACATGTACCTATGCTGCCGGTTGATGGGCTTGACCTATCTCTCGGTCTAGGC
CACCGACCTTCTCAGAAAGGCGGGTGCCAAAAGAACCCACGGCGCGGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATGTTGCCCTTGCTGGGGCTCGGCCGGCT
TGCCGGATGCAACCCCTGCAGCGATGCTATG**GAAAAATCACATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTTGATCGATGAAGAACGTAGCAAAATGCGA**
TACCTGGTGTGAATTGCAAGTCCCGTGAACCATCGAGTTTTGAACGCAAGTTGCGCCGAGGCCCTGTGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACG
CCAAAAGACACTCCACCGCAATCCCGGTCTGGACGTGGTGTGGCCCTCATTCCATAGTGTATGGTGGGCCAAAGAGGCGGCTGCCGGCGGTGCCGGT
CACAGCAGATGGTGGATGGCACAAGTTATTCTCGGTGTTGTATCCTGACAACTCCCGTCATGTTATGCCCTTTTGACCCATGGTTTGAGCGTATGT
AGCTCGGACCG**CGACCCAGGTACGTGCGGACTACCCGCTGAATTTAAGCATATCAATAAGCGG**

>KP873326 *C.nlemfuensis* voucher Peterson 24207, Soreng, Romaschenko & Mbago (US)

ACCTGCGGAAGGATCATTGTCGTGACCTGACCAAAACAAACCGTGAACATGTACCTATGCTGCCGGTTGATGGGCTTGACCTATCTCTCGGTCTAGGC
CAGCGACCTTCTCAGAAAGGCGGGTGCCAAAAGAACCCACGGCGCGGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATGTTGCCCTTGCTGGGGCTCGGCCGGCT
TGCCGGATGCAACCCCTGCAGCGATGCTATG**GAAAAATGACATGACTCTCGGCAACGGATATCTGGCTCTTGATCGATGAAGAACGTAGCAAAATGCGA**
TACCTGGTGTGAATTGCAAGTCCCGTGAACCATCGAGTTTTGAACGCAAGTTGCGCCGAGGCCCTGTGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACG
CCAAAAGACACTCCACCGCAATCCCGGTCTGGACGTGGTGTGGCCCTCATTCCATAGTGTATGGTGGGCCAAAGAGGCGGCTGCCGGCGGTGCCGGT
CACAGCAGATGGTGGATGGCACAAGTTATTCTCGGTGTTGTATCCTGGCAACTCCCGTCATGTTATGCCCTTTTGACCCATGGTTTGAGCGTCTGT
AGCTCGGACCG**CGACCCAGGTACGTGCGGACTACCCGCTGAATTTAAGCATATCAATAAGCGG**

>KP873324 *C.nlemfuensis* voucher Peterson 24058, Soreng, Romaschenko & Abeid (US)

ACCTGCGGAAGGATCATTGTCGTGACCTGACCAAAACAAACCGTGAACATGTACCTATGCTGCCGGTTGATGGGCTTGACCTATCTCTCGGTCTAGGC
CAGCGACCTTCTCAGAAAGGCGGGTGCCAAAAGAACCCACGGCGCGGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATGTTGCCCTTGCTGGGGCTCGGCCGGCT
TGCCGGATGCAACCCCTGCAGCGATGCTATG**GAAAAATGACATGACTCTCGGCAACGGATATCTGGCTCTTGATCGATGAAGAACGTAGCAAAATGCGA**

TACCTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCGAGGCCCTTGTTGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA CG
CCAAAAGACACTCCACCGCAATCCCGGTCTGGACGTGGTGTGGCCCCCTATTCCATAGTGTATGGTGGGCCAAAGAGGCGGCTGCCGGCGGTGCCGGT
CACAGCAGATGGTGGATGGCACAAGTTATTCTCGGTGTTGTATCTGGCAACTCCCGGTGATGTTATGCCCTTTTGACCCATGGTTTGAGCGTCTGT
AGCTCGGACCGCGACCCAGGTCACTCGGGACTACCCGCTGAATTTAAGCATATCAATAAGCGG

>KP873327 *C. radiatus* voucher Laegaard 21611 (US)

ACCTGCGGAAGGATCATTGTCGTGACCTGACCAAAACAAACCGTGAACATGTACCTATGCTGCCGTTGATGGGCTTGACCTATCTCTCGGTCTAGGC
CACCGACCGACCTTCTCAGAAGGGCGGGGTGCCAAAAGAACCACGGCGCCGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATGTTGCGTTGCTTGGGGCTCTGTCC
GGCTTGCCGGATGCACCCCGTGCAGCGATGCTATGGAATACATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTTGATCGATGAAGAACGTAGCAAAAT
GCGATACCTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCGAGGCCCTGTTGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGT
CA CGCCAAAAGACACTCCACCGCAATCCCGGTCCGGACGTGGTGTGGCCCCCTATTCCATAGTGTGTGGTGGGCCAAGAGGCGGCTGCCGGCGGTG
CCGGTACAGCAGATGGTGGATGGCACAAGTTATTCTCGGTGTTGTATCTGACAGCTCCCGGTGATGTTATGCCCTTTTGACCCATATGGTTTGAG
CGTATGTAGCTCGGACCGCGACCCAGGTCACTCGGGACTACCCGCTGAATTTAAGCATATCAATAAGCGG

>KP873328 *C. transvaalensis* voucher Laegaard 20560 (US)

ACCTGCGGAAGGATCATTGTCGTGAGCCTGACCAAAACAAACCGTGAACATGTACCTATGCTGCCGTTGATGGGCTTGACCTATCTCTCGGTCTAGGC
CACCGACCTTCTCAGAAGGGCGGTGTGCCAAAAGAACCACGGCGCCGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATGTTGCTTGGCTTGGGGCTCGGCCGCTT
GCCGGATGCACCCCATGCAGCGATGCTATGGAATACATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTTGATCGATGAAGAACGTAGCAAAATGCGAT
ACCTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCGAGGCCCTTGTTGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA CGC
CAAAAGACACTCCACCGCAATCCCGGTCTGGACGTGGTGTGGCCCCCTATTCCATAGTGTATGGTGGGCCAAGAGGCGGCTGCCGGCGGTGCCGGT
ACAGCATATGGTGGATGGCACAAGTTATTCTCGGTGTTGTATCTGACAACTCCCGGTGATGTTATGCCCTTTTGACCCATGGTTTGAGCGTATGTAG
CTCGGACCGCGACCCAGGTCACTCGGGACTACCCGCTGAATTTAAGCATATCAATAAGCGG

>GU359250.1 *Cynodon transvaalensis* voucher US:Smook 6710

TGACCTGCGGAAGGATCATTGTCGTGAGCCTGACCAAAACAAACCGTGAACATGTACCTATGCTGCCGTTGATGGGCTTGACCTATCTCTCGGTCTAG
GCCACCGACCTTCTCAGAAGGGCGGTGTGCCAAAAGAACCACGGCGCCGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATGTTGCTTGGCTTGGGGCTCGGCCG
CTTGCCGGATGCACCCCATGCAGCGATGCTATGGAATACATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTTGATCGATGAAGAACGTAGCAAAATG
GATACCTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCGAGGCCCTTGTTGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA
CGCCAAAAGACACTCCACCGCAATCCCGGTCTGGACGTGGTGTGGCCCCCTATTCCATAGTGTATGGTGGGCCAAGAGGCGGCTGCCGGCGGTGCCG
GTACAGCATATGGTGGATGGCACAAGTTATTCTCGGTGTTGTATCTGACAACTCCCGGTGATGTTATGCCCTTTTGACCCATGGTTTGAGCGTATGT
AGCTCGGACCGCGACCCAGGTCACTCGGGACTACCCGCTGAATTTAAGCATATCAATAAGCGG

>KP873235.1 *Stapfochloa ciliata* voucher Peterson 24632 & Romaschenko (US)

ACCTGCGGAAGGATCATTGTCGTGACCTGACCAAAACAAACCGTGAACATGTACCTATGCTGCCGTTGATGGGGCTTGACCTATCTCTCGGTCCAG
GCCACCGACCTTCTCAGAAGGACGGGGTGCCAAAAGAACCACGGCGCCGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATATTGCTTGGCTTGGGGCCACGGCCG
GCTTGCCGTTGACACCCGTGCAGCGATGCTATGAGAATCAAATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTTGATCGATGAAGAACGTAGCAAAATG
CGATACCTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCTGAGGCCCTTGCGGCTGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGT
ACGCCAAAAGACACTCCACCGCAATGCGGTCTGGACGTGGTGTGGCCCCCTATCCCGTCTGATGGTGGGCCAAGAGATGCGGCTGCTGGCGGTGCC
GGTACAGCAGATGGTGGATGGCACAAGTTATTCTCGGTGTTGTATCTGACAACTCCCGGTGATGTTATGCCCTTTTGACCCATGGTTTGAGCGTATG
TAGCTCGGACCGCGACCCAGGTCACTCGGGACTACCCGCTGAATTTAAGCATATCAATAAGCGG

Εικόνα 1. Οι αλληλουχίες της περιοχής ITS για κάθε είδος φυτών του γένους *Cynodon* που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη και ο αριθμός πρόσβασης (Accession number) στη βάση δεδομένων NCBI.

3.2 Σύγκριση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών – φυλογενετική ανάλυση

Η ευθυγράμμιση των αλληλουχιών (alignment) έγινε με χρήση του αλγόριθμου ClustalW μέσω του προγράμματος Mega 6.0.(Thompson *et al.*, 1994). Οι συντηρημένες αλληλουχίες της περιοχής ITS 2 εντοπίστηκαν μέσω του προγράμματος motif μέσα από την βάση δεδομένων ITS2database (<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/>). Η δευτεροταγής δομή της περιοχής ITS 1 και ITS 2 προσδιορίστηκε είτε με τη βοήθεια του λογισμικού predict που προσφέρεται από την βάση δεδομένων της περιοχής ITS 2 (<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/>) ITS2database, είτε του προγράμματος Freiburg RNA tools (<http://rna.informatik.uni-freiburg.de/>). Η φυλογενετική σχέση μέσω των γενετικών αποστάσεων μεταξύ των δειγμάτων με τη μέθοδο Maximum Composite Likelihood (Tamura *et al.*, 2004) και του μέσου φυλογενετικού δένδρου που πραγματοποιήθηκε μέσω του προγράμματος MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013)

4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Γενικά χαρακτηριστικά της περιοχής ITS

Με βάση τις διάφορες αλληλουχίες της περιοχής ITS του *C. dactylon* που έχουν κατατεθεί στην δημόσια βάση δεδομένων NCBI επιλέγησαν 13 από το είδος *C.dactylon*, 2 από το *Cynodon aethiopicus*, 2 από το *Cynodon incompletus*, 3 από το *Cynodon nlemfuensis*, 1 από το *Cynodon radiatus*, και 2 από το *Cynodon transvaalensis*. Οι αλληλουχίες της περιοχής ITS εδράζονται μεταξύ των συντηρημένων 18S rDNA και 28S rDNA και αποτελούνται από τις αλληλουχίες της περιοχής ITS1, το συντηρημένο 5.8S γονίδιο και τις αλληλουχίες της περιοχής ITS2 (Εικόνα 1). Οι ακριβείς αλληλουχίες της περιοχής ITS2 ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού 'annotate' της βάσης δεδομένων ITS2 (ITS2 database) ενώ ο προσδιορισμός της περιοχής ITS1 πραγματοποιήθηκε με βάση τις γνωστές συντηρημένες αλληλουχίες του 5.8S και 28S rDNA γονιδίων. Το μέγεθος της περιοχής ITS κυμαίνεται από 580 έως 589 bp με το μήκος της περιοχής ITS1 να κυμαίνεται από 212 έως 216 bp και της περιοχής ITS2 από 208 έως 215 bp.

KP057014 *C.cynodon* voucher HCCN-PJ008548-PB-315 South Korea

GGTTTCGGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGTGACCCGTGATGAAAACAAACCGTGAACCTGTACCTATGCTGCCGGTTGATGGGCTTGACCT
ATCTCTCGGTCTAGGCCACCGACCTTCTTCAGAAGGGCGGGGTGCCAAAAGAACCCACGGCGCGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATGTTGCCCTTGCTTG
GGGCCTCGGCCGGCTTGCCGGATGCACCCCTTGACGCGATGCTATGGAATAATCAGATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTTGATCGATGAAGAA
CGTAGCAAAATGCGATACCTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTGAACGCAAGTTGCGCCGAGGCCTTGCGCCGAGGGCACGTC
TGCTTGGGCGTCAAGCCAAAAGACATTCACCGCAATCCCGGTCTGGACGTGGTGTGGCCCTCATTCATAGTGTATGGTGGGCCAAAGAGGAGGC
TGCCGGCGGTGCCGGTACAGCAGATGGTGGATGGCACAAGTTATTCTCGGTGTTGTATCCTGACAACCTCCCGGTGATGTTATGCCCTTTTGACCCAT
GGTTTGGAGCGTATGATGCTCGGACCGCGACCCCA

Εικόνα 1. Αλληλουχίες νουκλεοτιδίων της περιοχής ITS *Cynodon dactylon* (KP057014). Η αλληλουχία νουκλεοτιδίων της περιοχής ITS περιλαμβάνει το 3' άκρο του 18S rDNA γονιδίου (κόκκινο), την περιοχή ITS1 (μαύρο), 5S rDNA γονίδιο (μπλε), την περιοχή ITS2 (μαύρο) και 5' άκρο του 28S rDNA γονιδίου (κόκκινο).

4.2 Ευθυγράμμιση των αλληλουχιών των περιοχών ITS1 και ITS2

Η ευθυγράμμιση των 13 ITS1 και ITS2 αλληλουχιών του *C. dactylon* έδειξε την παρουσία πολυμορφικών θέσεων στη νουκλεοτιδική τους αλληλουχία η οποία οφείλεται είτε σε υποκαταστάσεις βάσεων είτε ελλείψεις (Εικόνα 2). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι οι αλληλουχίες της περιοχής ITS1 και της ITS2 παρουσιάζουν παραλλακτικότητα μεταξύ φυτών του ίδιου είδους.

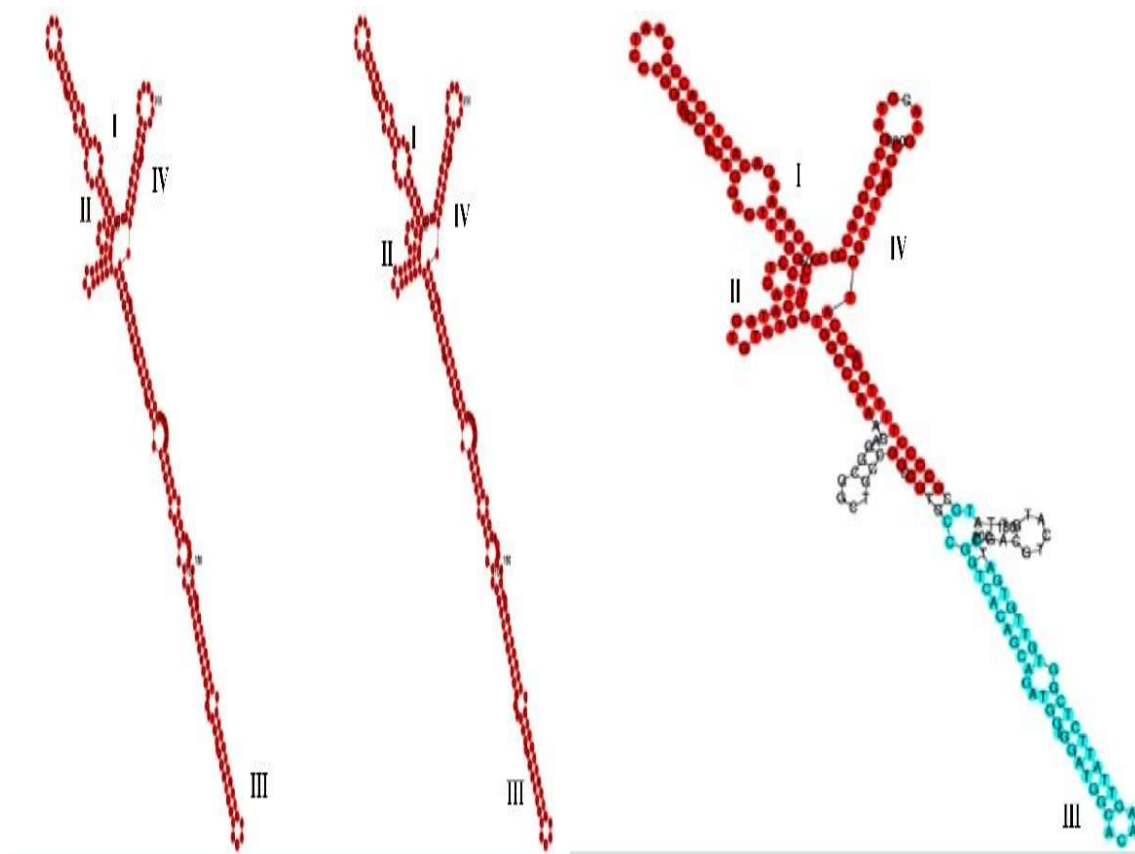
[illegible][illegible]

32

4.3 Ανάλυση της δευτεροταγούς δομής των αλληλουχιών της περιοχής ITS1 και ITS2 στο *C.dactylon*

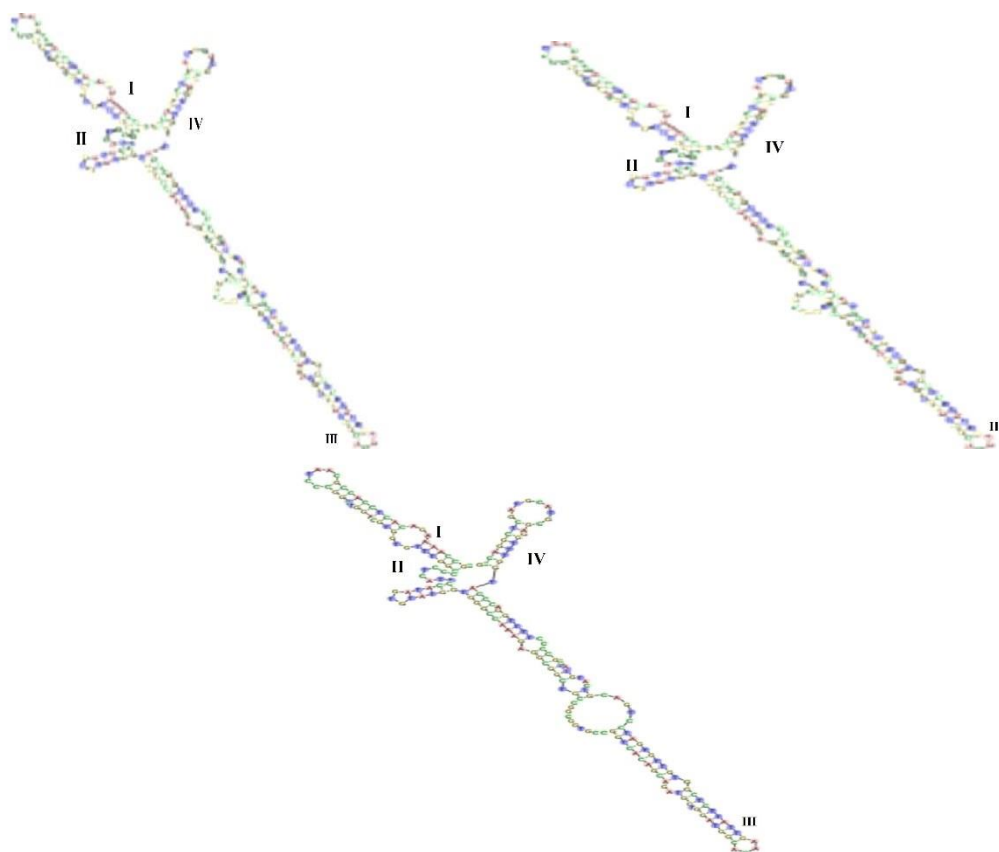
Η πρώτη εκτίμηση της προβλεπόμενης δευτεροταγούς δομής των ITS2 ριβοτύπων που ανήκουν στο *C.dactylon* (KP057014 *C.dactylon*, KP057015 *C.dactylon* και KP057016C) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού ExprARNA. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλοι οι ITS2 ριβοτύποι αναδιπλώνονται σε τέσσερις έλικες, I, II, III και IV (Εικόνα 3).

Η διαμόρφωση των ελίκων I, II και IV παρέμειναν συντηρημένες σε όλους τους εξεταζόμενους ITS2 ριβοτύπους, ενώ η διαμόρφωση της έλικας III στο KP057016 *C.dactylon* του παρουσιάζει μια απόκλιση (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Δευτεροταγής δομή των ITS2 ριβοτύπων KP057014 *C.dactylon*, KP057015 *C.dactylon* και KP057016 *C.dactylon* μέσω του λογισμικού ExprARNA

Ανάλυση της δευτεροταγούς δομής των ITS2 ριβοτύπων KP057014 *C.dactylon*, KP057015 *C.dactylon* και KP057016C όπως αυτές προβλέπονται από τη ITS2 databank έδειξε παρόμοιες διαταραχές στη διαμόρφωση της έλικας III στο KP057016 *C.dactylon* (Εικόνα 4).

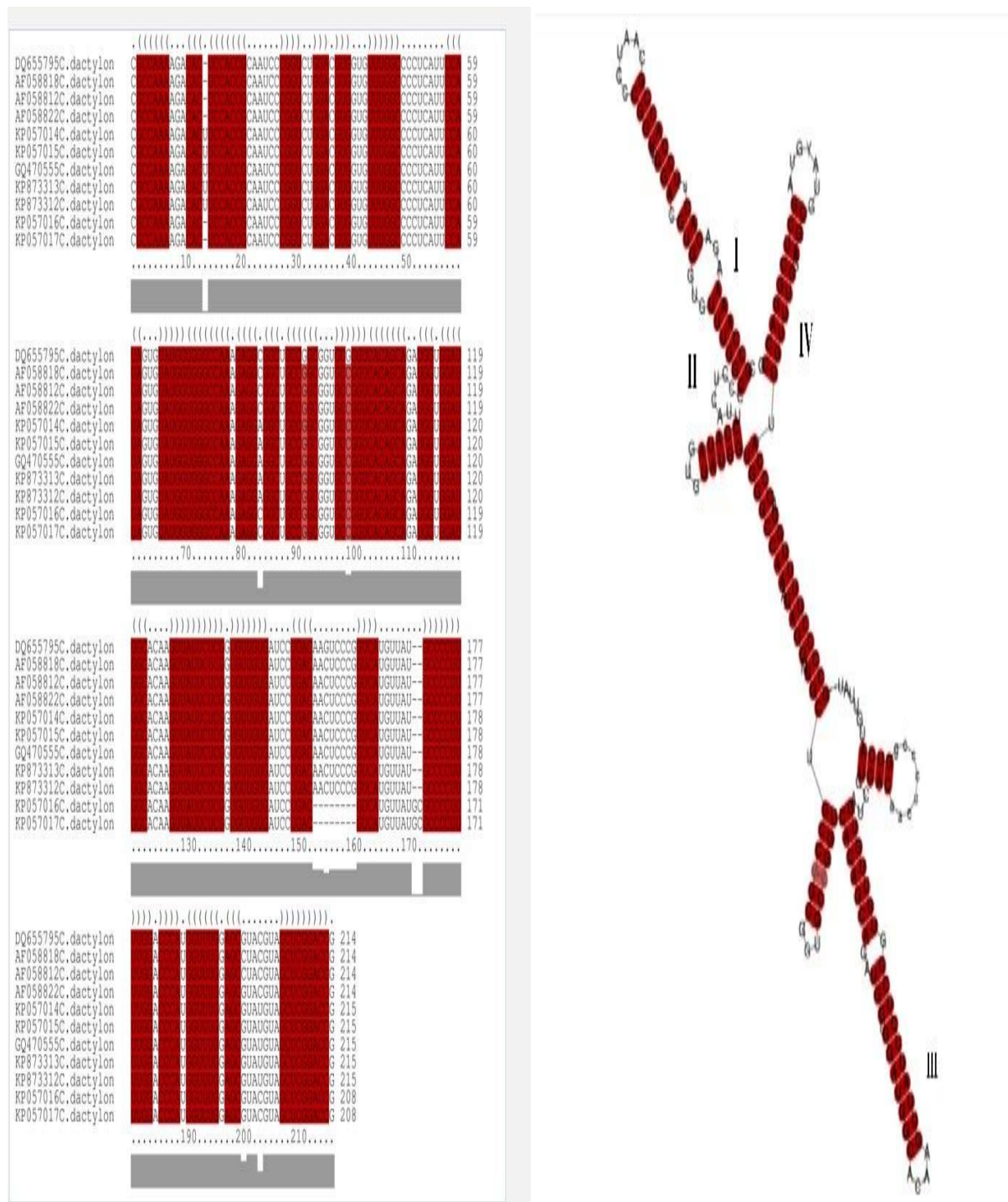


Εικόνα 4. Δευτεροταγής δομή της αλληλουχίας των ITS2 ριβοτύπων KP057014 *C.dactylon*, KP057015 *C.dactylon* και KP057016 *C.dactylon* όπως αυτές προβλέπονται από τη ITS2 databank

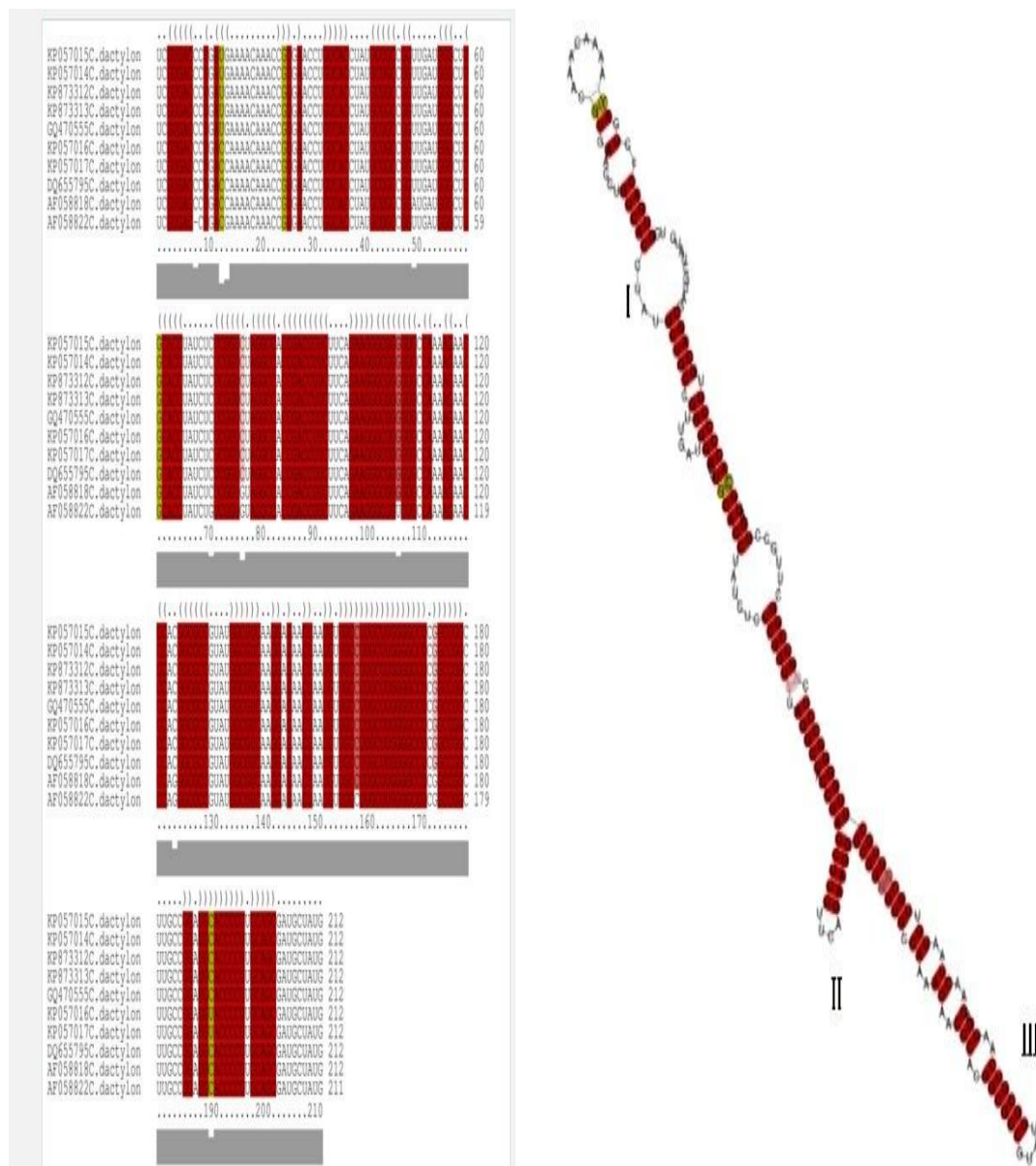
Η προβλεπόμενη συναινετική δευτεροταγής δομή των 13 ITS2 ριβοτύπων του *C.dactylon* καθώς και η ευθυγράμμιση των αλληλουχιών με βάση τις ομοιότητες στην πρωτοταγή και δευτεροταγή δομή απεικονίζεται στην εικόνα 5. Ανάλυση της συναινετικής δευτεροταγούς δομής οι έδειξε ότι η πλειονότητα των νουκλεοτιδίων εμπλέκονται στη δημιουργία κανονικών ζευγών βάσεων (π.χ. A-U ή G-C), τα οποία μετέχουν στο σχηματισμό μια ανοικτής δομής με τέσσερις έλικες (I, II, III και IV) (Εικόνα 3). Οι έλικες I, II και IV είναι συντηρημένες σε ότι αφορά τη διαμόρφωση τους, ενώ η διαμόρφωση της έλικας III φαίνεται να διαταράσσεται όσο αυξάνεται ο αριθμός των υπό μελέτη δειγμάτων (Εικόνα 5). Τούτο φαίνεται να οφείλεται στη συσσώρευση μεταλλάξεων (ελλείψεις) στις αλληλουχίες που εμπλέκονται στο σχηματισμό της έλικας III (Εικόνα 5).

Ανάλυση της συναινετικής δευτεροταγούς δομής των 13 ITS1 ριβοτύπων του *C.dactylon* καθώς και η ευθυγράμμιση των αλληλουχιών με βάση τις ομοιότητες στην πρωτοταγή και δευτεροταγή δομή απεικονίζεται στην εικόνα 6. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η πλειονότητα των νουκλεοτιδίων εμπλέκονται στη δημιουργία κανονικών ζευγών βάσεων τα οποία μετέχουν στο σχηματισμό μιας ανοικτής δομής με τρεις έλικες (Εικόνα 6). Στη έλικα I παρατηρείται ο

σηματισμός μη κανονικών αλλά σταθερών ζευγών βάσεων (π.χ. G-U) και ζευγών βάσεων τα οποία προήλθαν από αντισταθμιστικές αλλαγές.



Εικόνα 5. Ευθυγράμμιση της ITS2 ριβοτύπων στα 13 διαφορετικά *C. dactylon* με βάση τις ομοιότητες στην πρωτοταγή και δευτεροταγή δομή με τη χρήση του λογισμικού LocARNA.



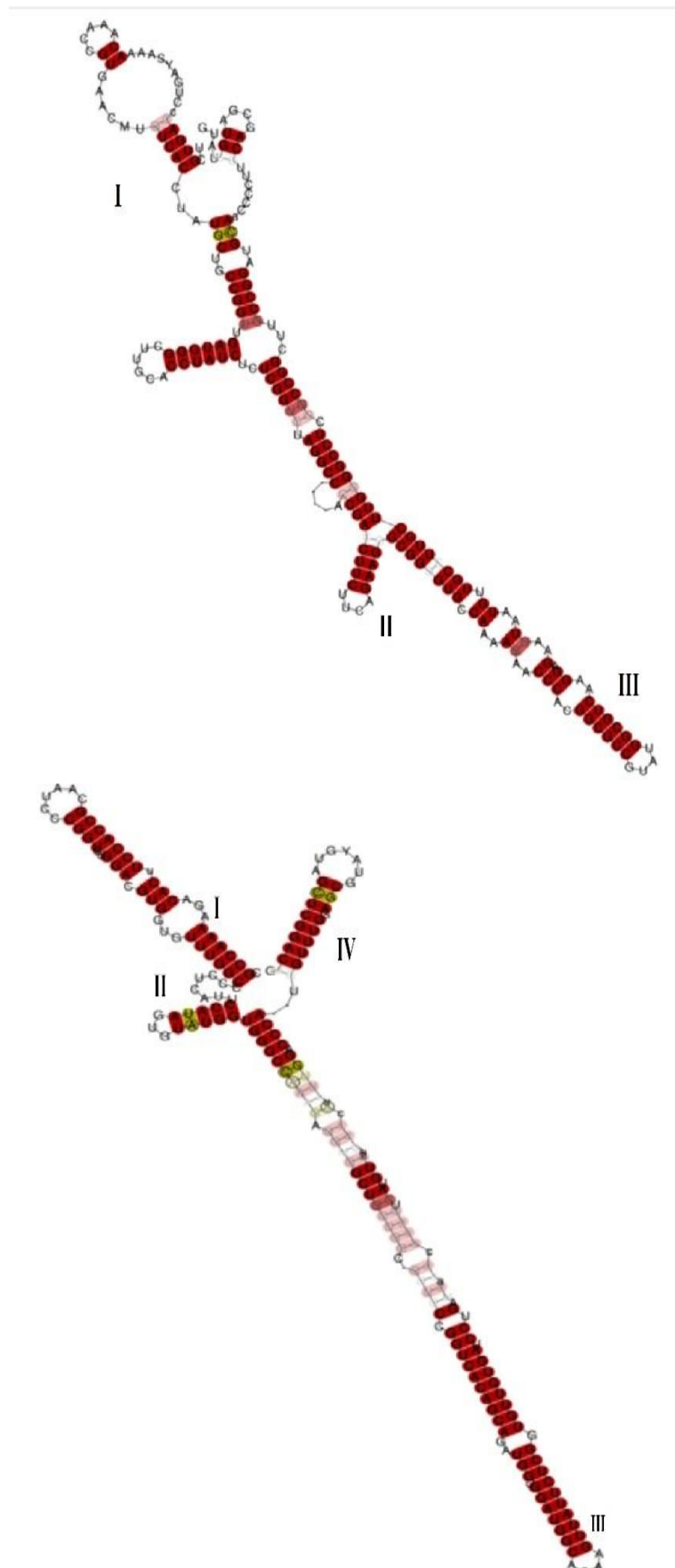
Εικόνα 6. Ευθυγράμμιση της ITS1 ριβοτύπων στα 13 διαφορετικά *C. dactylon* με βάση τις ομοιότητες στην πρωτοταγή και δευτεροταγή δομή με τη χρήση του λογισμικού LocARNA.

4.4 Συναινετική δευτεροταγής δομής της περιοχής ITS1 και ITS2 σε 7 είδη του γένους *Cynodon*

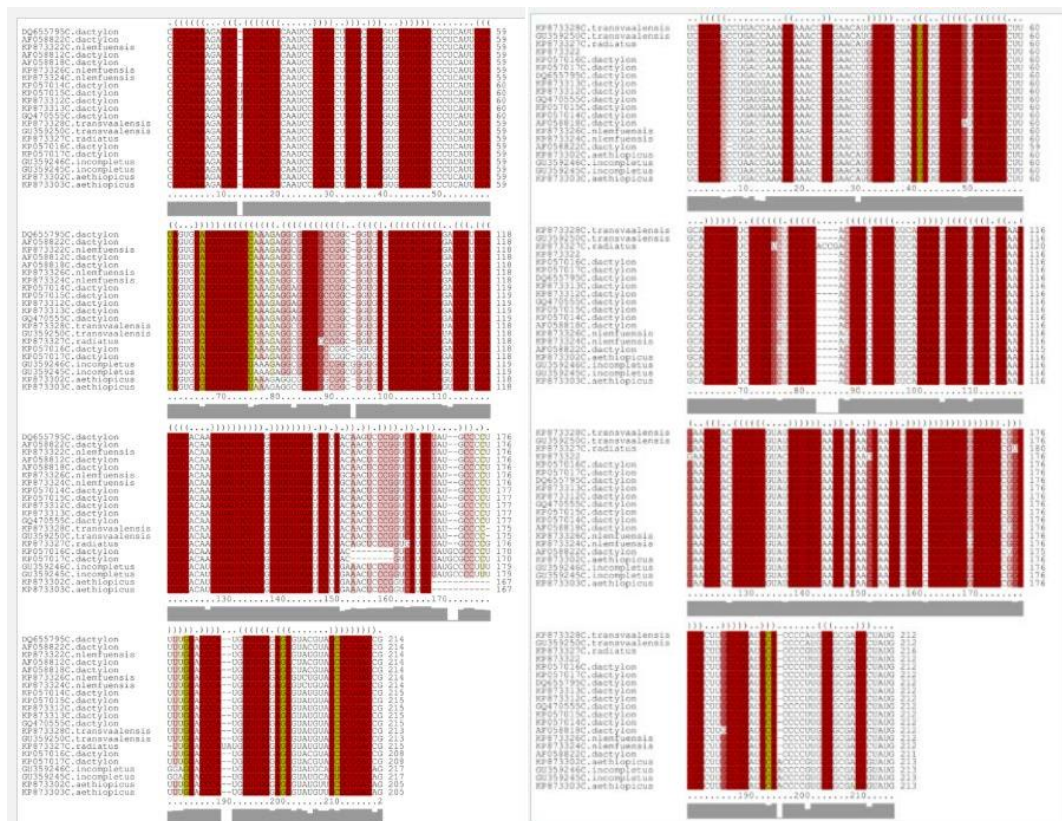
Με βάση τη συναινετική δευτεροταγή δομή της περιοχής ITS1 και της ITS2 του *C.dactylon* πραγματοποιήθηκε η ευθυγράμμιση των RNA αλληλουχιών ITS1 και ITS2 των 7 ειδών του γένους *Cynodon* με βάση τις ομοιότητες στην πρωτοταγή και δευτεροταγή δομή και η κατασκευή της προβλεπόμενης συναινετικής δευτεροταγούς δομής της περιοχής ITS1 και ITS2 των 7 ειδών του γένους *Cynodon*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα περισσότερα

νουκλεοτίδια του ITS2 και του ITS1 εμπλέκονται στο σχηματισμό κανονικών ή μη-κανονικών ζευγών βάσεων που ανήκουν σε έλικες (Εικόνα 7 και Εικόνα 8). Επίσης κατέδειξε την παρουσία ζευγών βάσεων που παρουσιάζουν αντισταθμιστικές αλλαγές (Εικόνα 7 και Εικόνα 8).

Ανάλυση της προβλεπόμενης συναινετικής δευτεροταγούς δομής της περιοχής ITS1 μεταξύ των 7 ειδών του γένους *Cynodon* έδειξε ότι τόσο η διαμόρφωση όσο τα σχηματιζόμενα ζεύγη βάσεων των ελίκων II και III παρέμειναν συντηρημένα, ενώ στην έλικα I παρατηρήθηκαν σημαντικές αποκλίσεις τόσο στη διαμόρφωση της έλικας όσο και στο ποσοστό των νουκλεοτιδίων που εμπλέκονται στο σχηματισμό κανονικών ζευγών βάσεων (Εικόνα 7 και Εικόνα 8). Παρόμοια ανάλυση της προβλεπόμενης συναινετικής δευτεροταγούς δομής της περιοχής ITS2 έδειξε ότι τόσο η διαμόρφωση όσο τα σχηματιζόμενα ζεύγη βάσεων των ελίκων I, II και IV παρέμειναν συντηρημένα, ενώ στην έλικα III παρατηρήθηκαν σημαντικές αποκλίσεις τόσο στη διαμόρφωση της έλικας όσο και στο ποσοστό των νουκλεοτιδίων που εμπλέκονται στο σχηματισμό κανονικών ζευγών βάσεων (Εικόνα 7). Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν τη συσσώρευση μεταλλάξεων στο τμήμα των αλληλουχιών της περιοχής ITS1 ή της ITS2 που εμπλέκεται στο σχηματισμό της έλικας I ή της III, αντίστοιχα.



Εικόνα 7. Προβλεπόμενη συναινετική δευτεροταγής δομή των ITS1 και ITS2 αλληλουχιών 7 ειδών του γένους *Cynodon*.

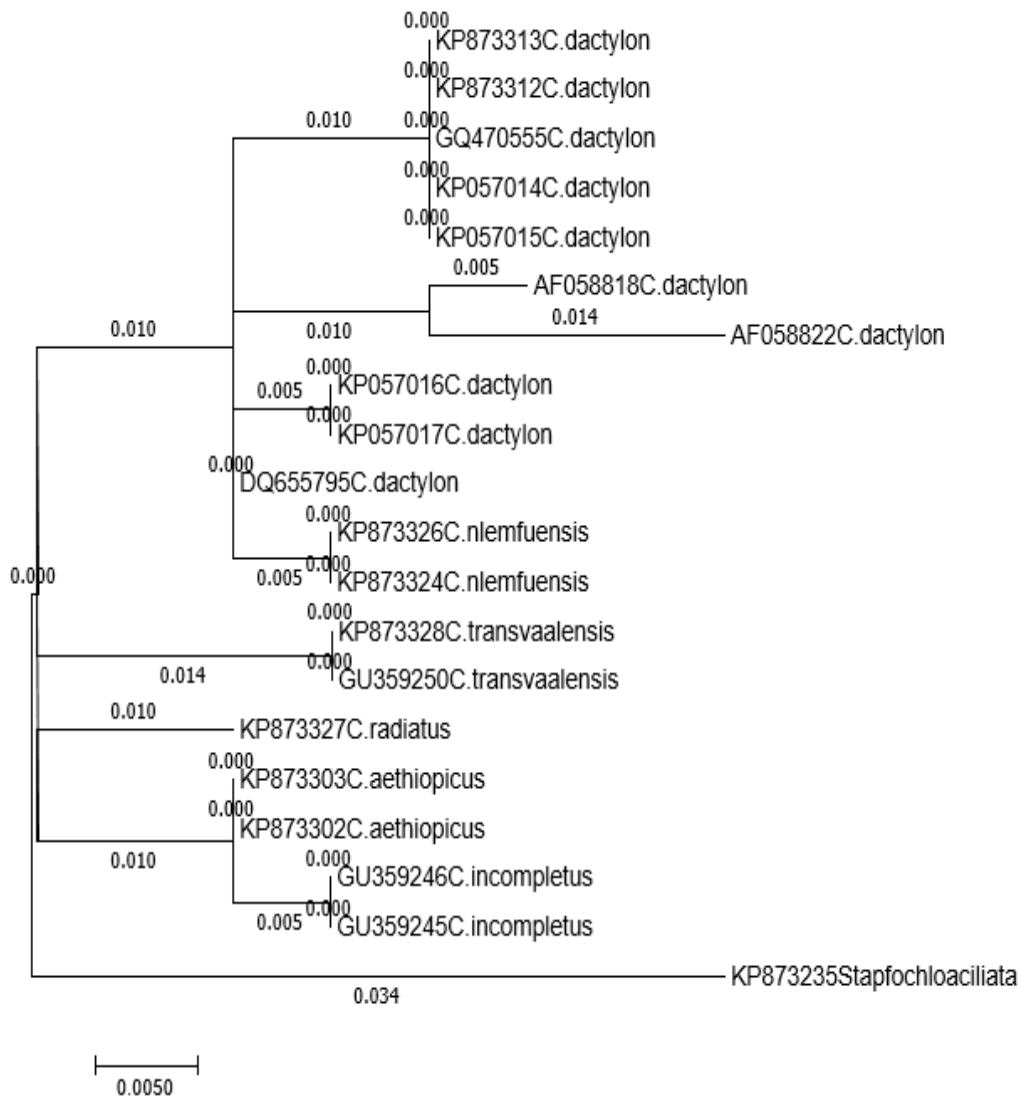


Εικόνα 7. Ευθυγράμμιση των RNA αλληλουχιών ITS1 και ITS2 των 7 ειδών του γένους με βάση τις ομοιότητες στην πρωτοταγή και δευτεροταγή δομή με τη χρήση του λογισμικού LocARNA. Οι τελείες αντιστοιχούν σε μονόκλωνες αλληλουχίες βάσεων και οι παρενθέσεις σε νουκλεοτίδια που εμπλέκονται στο σχηματισμό έλικας. Οι βάσεις που δεν παρουσιάζουν παραλλακτικότητα κατά την ευθυγράμμιση και ανήκουν σε έλικες έχουν μορφοτό χρώμα. Οι βάσεις που ανήκουν σε έλικες αλλά σχηματίζουν μη κανονικά ζεύγη βάσεων υποδηλώνονται από το ροζ ή ανοικτό κίτρινο χρώμα, ενώ οι βάσεις που ανήκουν σε έλικες αλλά παρουσιάζουν αντισταθμιστική παραλλακτικότητα έχουν χρώμα ανοικτό ή σκούρο πράσινο.

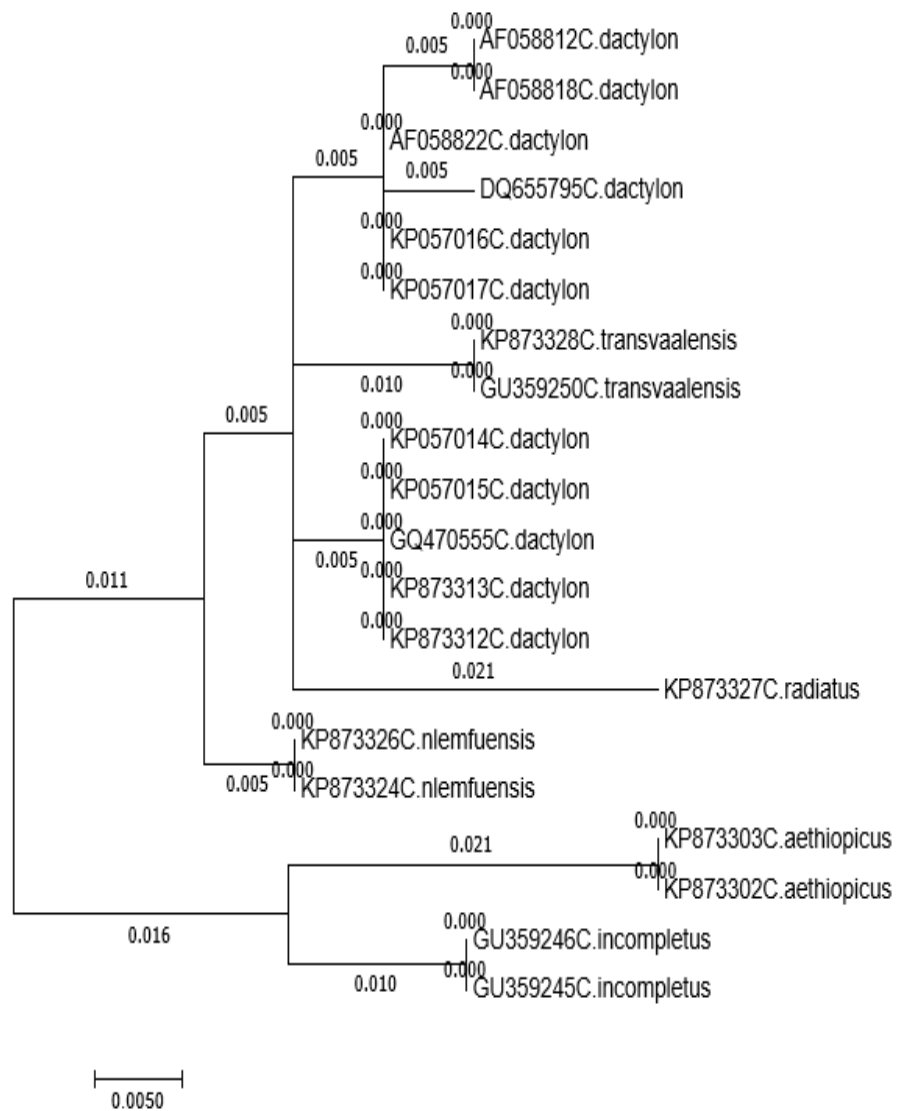
4.5 Φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των ειδών του γένους *Cynodon*

Οι αλληλουχίες της περιοχής ITS2 θεωρούνται ως οι περισσότερο αξιόπιστοι δείκτες για την διερεύνηση των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ φυτών του ίδιου γένους (*Cynodon*). Ως εκ τούτου εξετάστηκε εάν οι αλληλουχίες της περιοχής ITS1 ή της περιοχής ITS2 αποτελούν αξιόπιστους δείκτες για την φυλογενετική ανάλυση των ειδών του γένους *Cynodon*. Για αυτό τον σκοπό κατασκευάστηκε φυλογενετικό δένδρο με βάση την ανάλυση neighbor-joining των

αλληλουχιών της περιοχής ITS1 και της ITS2 από πιστοποιημένα είδη του γένους *Cynodon*. Τα αποτελέσματα έδειξαν τα φυτά του είδους *C. dactylon* ομαδοποιούνται διαφορετικά στα δυο δενδρογράμματα. Στο δενδρογράμμα με βάση το ITS1 όλα τα είδη *C. dactylon* ομαδοποιούνται σε ένα κλάδο μαζί με το είδος *C.nlemfuensis* από το οποίο όμως παρουσιάζουν σαφή γενετική απόσταση (Εικόνα 9). Στο δενδρογράμμα με βάση το ITS2 τα είδη *C. dactylon* ομαδοποιούνται σε ένα κλάδο μαζί με το είδος *C.transvalensis* από το οποίο όμως παρουσιάζουν σχετικά μικρή γενετική απόσταση (Εικόνα 10).



Εικόνα 9: Δενδρογράμμα με βάση το ITS1 όλα τα είδη *C. dactylon* ομαδοποιούνται σε ένα κλάδο μαζί με το είδος *C.nlemfuensis*



Εικόνα 10: Δενδρόγραμμα με βάση το ITS2 τα είδη *C. dactylon* ομαδοποιούνται σε ένα κλάδο μαζί με το είδος *C. transvaalensis*

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το γένος *Cynodon* (Οικογένεια *Poaceae*) περιέχει 9 είδη και 10 ποικιλίες με το *Cynodon dactylon* (κοινή Αγριάδα) να αποτελεί το είδος με το μεγαλύτερο βαθμό εξάπλωσης (Shi H *et al.*, 2012).

Η περιοχή ITS είναι ένα μικρό τμήμα του 45s rDNA. Το γονιδίωμα των φυτών φέρει εκατοντάδες αντίγραφα του 45s rDNA. Δέσμες διαδοχικά επαναλαμβανόμενων αντιγράφων του 45s rDNA διασπείρονται σε διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματος. Ανάλυση της περιοχής ITS σε δεκάδες φυτά έχει δείξει ότι τα αντίγραφα της περιοχής παρουσιάζουν μικρή παραλλακτικότητα είτε μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους (intra-species) είτε στο ίδιο το άτομο (intra-individual) (Song *et al.*, 2012). Ωστόσο, η παραλλακτικότητα της ITS είναι μεγαλύτερη μεταξύ φυτών διαφορετικού είδους σε σύγκριση με φυτά από ίδιο είδος (Εικόνα 2). Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι οι ITS1 και ITS2 παρουσιάζουν πολυμορφισμούς εντός του ίδιου είδους του φυτού *C. dactylon*.

Η ανάλυση της συναινετικής δευτεροταγούς δομής της περιοχής ITS1 και της ITS2 έδειξε ο κύριος όγκος των πολυμορφικών θέσεων στις αλληλουχίες του ITS1 και ITS2 που οφείλονται σε μεταλλάξεις είτε λόγω εξέλιξης των ειδών του γένους *Cynodon* είτε εντός του ίδιου είδους συσσωρεύονται σε συγκεκριμένες έλικες. Οι μεταλλάξεις που εδράζονται στις άλλες έλικες δεν φαίνεται να επηρεάζουν σημαντικά τη δευτεροταγή δομή διότι ανήκουν αφορούν κυρίως αντισταθμιστικές αλλαγές ή επιτρέπουν το σχηματισμό μη-κανονικών αλλά σταθερών ζεύγων βάσεων. Η σωστή επεξεργασία του 45s rDNA μεταγραφήματος προϋποθέτει την παρουσία σωστών δευτεροταγών δομών τόσο ITS1 όσο και στο ITS2 μεταγράφημα. Πιθανώς, κάποιες έλικες να πιο σημαντικές από άλλες για την σωστή επεξεργασία του 45s rDNA μεταγραφήματος.

Οι αλληλουχίες των περιοχών ITS1 και ITS2 χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην φυλογενετική ανάλυση των φυτών (Εικόνα 9 & 10). Γενικά έχει δειχθεί ότι η περιοχή ITS1 είναι κατά μέσο όρο περισσότερο μεταβλητή από την ITS 2 στα περισσότερα είδη των φυτών και μυκήτων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες τόσο της περιοχής ITS1 όσο και της ITS2 αποτελούν ικανοποιητικούς μοριακούς δείκτες για τη φυλογενετική ανάλυση των ειδών του γένους *Cynodon*, γεγονός το οποίο συνάδει με τα συμπεράσματα άλλων ερευνητικών ομάδων (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).

Η παραλλακτικότητα της περιοχής ITS1 ή της ITS2 που παρατηρείται τόσο εντός του ιδίου είδους όσο και μεταξύ διαφορετικών ειδών φυτών του ιδίου γένους προσφέρει τη δυνατότητα ανάλυσης ποικιλιών και υβριδίων του *Cynodon* μέσω αλληλουχισής επομένης γενιάς (Next generation sequencing, NGS) των περιοχών ITS1 και ITS2. Αυτή η προσέγγιση έχει επιτρέψει την διάκριση ποικιλιών και οικοτύπων στα φυτά (***Cynodon***). Επιπλέον η διακριτική ικανότητα της NGS έχει επιτρέψει τον εντοπισμό και ποσοτικοποίηση προσμίξεων σε μίγματα αποξηραμένων φαρμακευτικών φυτών (Ivanova *et al.*, 2016). Ως εκ τούτου θα ήταν ενδιαφέρον να εξεταστεί εάν μέσω της προσέγγισης αυτής μπορούν να διαφοροποιηθούν τα διαφορετικά υβρίδια (*C.dactylon*X *C.transvalensis*).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alvarez I. and Wendel JF. (2003).** Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol Phylogenetic Evolution*. 29, 417–434.
- Baldwin, B. G., Sanderson, M. J., Porter, J. M., et al., (1995).** The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 82, 247-277.
- Barkman, T. J. & 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.
- Bennett, R. I. & 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.
- Coleman AW.(2015).** Nuclear rRNA transcript processing versus internal transcribed spacer secondary structure. *Trends Genetics*. 31(3),157-63.
- Dover, G. A., Strachan, T., Coen, E. S., & Brown, S. D. (1982).** Molecular drive. *Science*. 218, 1069-1069.
- Dundr, M., & Misteli, T. (2001).** Functional architecture in the cell nucleus. *Biochemical Journal*. 356(2), 297-310.
- Elder Jr, J. F., & Turner, B. J. (1995).** Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *The Quarterly Review of Biology*. 70(3), 297-320.
- 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(5), 395-401.
- Francisco-Ortega, J., Barber, J. C., Santos-Guerra, A., et al., (2001).** Origin and evolution of the endemic genera of *Gonosperminae* (*Asteraceae: Anthemideae*) from 75 the Canary

Islands: evidence from nucleotide sequences of the internal transcribed spacers of the nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany*. 88, 161-169.

Graur D. & Li W.H. (1999). Fundamentals of molecular evolution, Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc.

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

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, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L. (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. *RNA*. 6, 225-242.

Hershkovitz, M. A., & Zimmer, E. A. (1996). Conservation patterns in angiosperm rDNA ITS2 sequences. *Nucleic Acids Research*. 24, 2857-2867.

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(3), e17863.

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.

Ivanova NV, Kuzmina ML, Braukmann TWA, Borisenko AV, Zakharov EV. (2016). Authentication of herbal supplements using next-generation sequencing. PLoS One; 11: e0156426

Jobes, D. V., & Thien, L. B. (1997). A conserved motif in the 5.8 S ribosomal RNA (rRNA) gene is a useful diagnostic marker for plant internal transcribed spacer (ITS) sequences. Plant Molecular Biology Reporter. 15, 326-334.

Joseph, N., Krauskopf, E., Vera, M. I., Michot, B. (1999). Ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) exhibits a common core of secondary structure in vertebrates and yeast. Nucleic Acids Research. 2, 4533-4540.

Kress, W. J., & Erickson, D. L. (2007). A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcl* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. PLoS one, 2(6), e508.

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.

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 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, 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.

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.

Mayol, M. & Rosselló, J. A. (2001). Why nuclear ribosomal DNA spacers (ITS) tell different stories in *Quercus*, Molecular phylogenetics and evolution. 19, 167-176.

Mélèse T., & Xue Z. (1995). The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome. Current Opinion in Cell Biology. 7, 319-324.

Nei, M. & 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. 21, 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.

Pettengill, J. B., & Neel, M. C. (2008). Phylogenetic patterns and conservation among North American members of the genus *Agalinis* (Orobanchaceae). BMC evolutionary biology. 8(1), 264.

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

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

Scheer U., & Hock R. (1999). Structure and function of the nucleolus. Current Opinion in Cell Biology. 11, 385-390.

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

Shaw, J., Lickey, E. B., Schilling, E. E., et al., (2007). Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany*. 94, 275-288.

Shi H, Wang Y, Cheng Z, Ye T, Chan Z. (2012.) Analysis of natural variation in bermudagrass (*Cynodon dactylon*) reveals physiological responses underlying drought tolerance *PLoS One* 7 e53422

.

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., 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.

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.

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*. 23, 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.

Van De Wiel, C. C. M., Van Der Schoot, J., Van Valkenburg, J. L. C. H. (2009). DNA barcoding discriminates the noxious invasive plant species, floating pennywort (*Hydrocotyle ranunculoides* Lf), from non- invasive relatives, *Molecular Ecology Resources*. 9, 1086-1091.

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

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.

Whitlock, B. A., Hale, A. M. and Groff, P. A. (2010). Intraspecific inversions pose a challenge for the trnH-psbA plant DNA barcode,.*PloS one*. 5, e11533.

Wolf, M., Chen, S., Song, J., et al., (2013). Compensatory base changes in ITS2 secondary structures correlate with the biological species concept despite intragenomic variability in ITS2 sequences—a proof of concept. *PloS one*. 8, e66726.

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

Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic acids research*. 31, 3406-3415.

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

ПАРАПТНМА

ITS 1

C. dactylon ITS1

>KP057014C.dactylon

TCGTGACCCTGATGAAAACAAACCGTGAACCTGTCACCTATGCTGCCGGTTGATGGGCTTGACCTATCTCTCGGTCTAGGCCACCGACCTTCTTCAGAAG
GGCGGGGTGCCAAAAGAACCCACGGCGCCGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATGTTGCCTTGCTTGGGGCCTCGGCCGGCTTGCCGGATGCACCCCTTGC
AGCGATGCTATG

>KP057015C.dactylon

TCGTGACCCTGATGAAAACAAACCGTGAACCTGTCACCTATGCTGCCGGTTGATGGGCTTGACCTATCTCTCGGTCTAGGCCACCGACCTTCTTCAGAAG
GGCGGGGTGCCAAAAGAACCCACGGCGCCGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATGTTGCCTTGCTTGGGGCCTCGGCCGGCTTGCCGGATGCACCCCTTGC
AGCGATGCTATG

>KP057016C.dactylon

TCGTGACCCTGACCAAAACAAACCGTGAACCTGTCACCTATGCTGCCGGTTGATGGGCTTGACCTATCTCTCGGTCTAGGCCACCGACCTTCTTCAGAAG
GGCGGGGTGCCAAAAGAACCCACGGCGCCGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATGTTGCCTTGCTTGGGGCCTCGGCCGGCTTGCCGGATGTACCCCTTGC
AGCGATGCTATG

>KP057017C.dactylon

TCGTGACCCTGACCAAAACAAACCGTGAACCTGTCACCTATGCTGCCGGTTGATGGGCTTGACCTATCTCTCGGTCTAGGCCACCGACCTTCTTCAGAAG
GGCGGGGTGCCAAAAGAACCCACGGCGCCGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATGTTGCCTTGCTTGGGGCCTCGGCCGGCTTGCCGGATGTACCCCTTGC
AGCGATGCTATG

>GQ470555C.dactylon

TCGTGACCCTGATGAAAACAAACCGTGAACCTGTCACCTATGCTGCCGGTTGATGGGCTTGACCTATCTCTCGGTCTAGGCCACCGACCTTCTTCAGAAG
GGCGGGGTGCCAAAAGAACCCACGGCGCCGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATGTTGCCTTGCTTGGGGCCTCGGCCGGCTTGCCGGATGCACCCCTTGC
AGCGATGCTATG

>DQ655795C.dactylon

TCGTGACCCTGACCAAAACAAACCGTGAACCTGTCACCTATGCTGCCGGTTGATGGGCTTGACCTATCTCTCGGTCTAGGCCACCGACCTTCTTCAGAAG
GGCGGGGTGCCAAAAGAACCCACGGCGCCGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATGTTGCCTTGCTTGGGGCCTCGGCCGGCTTGCCGGATGCACCCCTTGC
AGCGATGCTATG

>KP873313C.dactylon

TCGTGACCCTGATGAAAACAAACCGTGAACCTGTCACCTATGCTGCCGGTTGATGGGCTTGACCTATCTCTCGGTCTAGGCCACCGACCTTCTTCAGAAG
GGCGGGGTGCCAAAAGAACCCACGGCGCCGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATGTTGCCTTGCTTGGGGCCTCGGCCGGCTTGCCGGATGCACCCCTTGC
AGCGATGCTATG

>KP873312C.dactylon

TCGTGACCCTGATGAAAACAAACCGTGAACCTGTCACCTATGCTGCCGGTTGATGGGCTTGACCTATCTCTCGGTCTAGGCCACCGACCTTCTTCAGAAG
GGCGGGGTGCCAAAAGAACCCACGGCGCCGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATGTTGCCTTGCTTGGGGCCTCGGCCGGCTTGCCGGATGCACCCCTTGC
AGCGATGCTATG

>AF058818C.dactylon

TCGTGACCCTGACCAAAACAAACCGTGAACCTGTCACCTATGCTGCCGGATGATGGGCTTGACCTATCTCTCGGTGTAGGCCACCGACCTTCTTCAGAAG
GGCGGGGTGCCAAAAGAACCCAGGGCGCCGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATGTTGCCTTGCTTGGGGCCTCGGCCGGCTTGCCGGATGCACCCCTTGC
AGCGATGCTATG

>AF058822C.dactylon

TCGTGACCTGACCAAAACAAACCGTGAACCTGTCACCTATGCTGCCGGTTGATGGGCTTGACCTATCTGTCGGTGTAGGCCACCGACCTTCTTCAGAAG
GCGGTGTGCCAAAAGAACCCAGGGCGCCGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATGTTGCCTTGCTTGGGGCCTCGGCCGGCTTGCCGGATGCACCCCTTGA
GCGATGCTATG

>KP873303C.aethiopicus

TCGTGACCCTGACCAAAACAAACCGTGAACATGTCACCTATGCTGCCGGTTGATGGGCTTGACCTATCTCTCGGTCTAGGCCACCGACCTTCTTCAGAAG
TGCGGGGTGCCAAAAGAACCCACGGCGCCGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATGTTGCCTTGCTTGGGGCCTCGGCCGGCTTGCCGGATGCAACCCCTG
CAGCGATGGTATG

>KP873302C.aethiopicus

TCGTGACCCTGACCAAAACAAACCGTGAACATGTCACCTATGCTGCCGGTTGATGGGCTTGACCTATCTCTCGGTCTAGGCCACCGACCTTCTTCAGAAG
TGCGGGGTGCCAAAAGAACCCACGGCGCCGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATGTTGCCTTGCTTGGGGCCTCGGCCGGCTTGCCGGATGCAACCCCTG
CAGCGATGGTATG

>GU359246C.incompletus

TCGTGACCCTAACCAAAACAAACCGTGAACATGTACCTATGCTGCCGGTTGATGGGCTTGACCTATCTCTCGGTCTAGGCCACCGACCTTCTTCAGAAAGT
GCGGGGTGCCAAAAGAACCACGGCGCCGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATGTTGCCTTGCTTGGGGCCTCGGCCGGCTTGCCGGATGCAACCCCGTGC
AGCGATGGTATG

>GU359245C.incompletus

TCGTGACCCTAACCAAAACAAACCGTGAACATGTACCTATGCTGCCGGTTGATGGGCTTGACCTATCTCTCGGTCTAGGCCACCGACCTTCTTCAGAAAGT
GCGGGGTGCCAAAAGAACCACGGCGCCGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATGTTGCCTTGCTTGGGGCCTCGGCCGGCTTGCCGGATGCAACCCCGTGC
AGCGATGGTATG

>KP873322 C.nlembuensis

TCGTGACCCTGACCAAAACAAACCGTGAACCTGTACCTATGCTGCCGGTTGATGGGCTTGACCTATCTCTCGGTCTAGGCCACCGACCTTCTTCAGAAAG
GGCGGGGTGCCAAAAGAACCACGGCGCCGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATGTTGCCTTGCTTGGGGCCTCGGCCGGCTTGCCGGATGCACCCCTTGC
AGCGATGCTATG

>KP873326C.nlembuensis

TCGTGACCCTGACCAAAACAAACCGTGAACCTGTACCTATGCTGCCGGTTGATGGGCTTGACCTATCTCTCGGTCTAGGCCACCGACCTTCTTCAGAAAG
GGCGGGGTGCCAAAAGAACCACGGCGCCGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATGTTGCCTTGCTTGGGGCCTCGGCCGGCTTGCCGGATGCACCCCTTGC
AGCGATGCTATG

>KP873324C.nlembuensis

TCGTGACCCTGACCAAAACAAACCGTGAACCTGTACCTATGCTGCCGGTTGATGGGCTTGACCTATCTCTCGGTCTAGGCCACCGACCTTCTTCAGAAAG
GGCGGGGTGCCAAAAGAACCACGGCGCCGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATGTTGCCTTGCTTGGGGCCTCGGCCGGCTTGCCGGATGCACCCCTTGC
AGCGATGCTATG

>KP873327C.radiatus

TCGTGACCCTGACCAAAACAAACCGTGAACATGTACCTATGCTGCCGGTTGATGGGCTTGACCTATCTCTCGGTCTAGGCCACCGACCGACCTTCTTCA
GAAGGGCGGGGTGCCAAAAGAACCACGGCGCCGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATGTTGCCTTGCTTGGGGCCTCGGCCGGCTTGCCGGATGCACCC
GTGACGATGCTATG

>KP873328C.transvaalensis

TCGTGAGCCTGACCAAAACAAACCGTGAACATGTACCTATGCTGCCGGTTGATGGGCTTGACCTATCTCTCGGTCTAGGCCACCGACCTTCTTCAGAAAG
GGCGGTGTGCCAAAAGAACCACGGCGCCGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATGTTGCCTTGCTTGGGGCCTCGGCCGGCTTGCCGGATGCACCCATGC
AGCGATGCTATG

>GU359250C.transvaalensis

TCGTGAGCCTGACCAAAACAAACCGTGAACATGTACCTATGCTGCCGGTTGATGGGCTTGACCTATCTCTCGGTCTAGGCCACCGACCTTCTTCAGAAAG
GGCGGTGTGCCAAAAGAACCACGGCGCCGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATGTTGCCTTGCTTGGGGCCTCGGCCGGCTTGCCGGATGCACCCATGC
AGCGATGCTATG

>KP873235Staphylococcus

TCGTGACCCTGACCAAAACAAACCGTGAACATGTACCTATGCTGCCGGTTGATGGGCGTGACCTATCTCTCGGTCCAGGCCACCGACCTTCTTCAGAA
GGACGGGGTGCCAAAAGAACCACGGCGCCGTATGGCGTCAAGGAGAACTAATATTGCCTTGCTTGGGGCCACGGCCGGCTTGCCGGTTGCACCCGT
GCAGCGATGCTATG

ITS 2

C. dactylon ITS2

>KP057014C.dactylon

CGCCAAAAGACACTCCACCGCAATCCCGGTCTGGACGTGGTGTGGCCCTCATTCCATAGTGTATGGTGGGCCAAAGAGGAGGCTGCCGGCGGTGCC
GGTCACAGCAGATGGTGGATGGCACAAGTTATTCTCGGTGTTGTATCCTGACAACTCCCGGTCATGTTATGCCCTTTTGACCCATGGTTGGAGCGTA
TGTAGCTCGGACCG

>KP057015C.dactylon

CGCCAAAAGACACTCCACCGCAATCCCGGTCTGGACGTGGTGTGGCCCTCATTCCATAGTGTATGGTGGGCCAAAGAGGAGGCTGCCGGCGGTGCC
GGTCACAGCAGATGGTGGATGGCACAAGTTATTCTCGGTGTTGTATCCTGACAACTCCCGGTCATGTTATGCCCTTTTGACCCATGGTTGGAGCGTA
TGTAGCTCGGACCG

>KP057016C.dactylon

CGCCAAAAGACACTCCACCGCAATCCCGGTCTGGACGTGGTGTGGCCCTCATTCCATAGTGTATGGTGGGCCAAAGAGGCGGCTGCCGGCGGTGCC
GTACAGCAGATGGTGGATGGCACAAGTTATTCTCGGTGTTGTATCCTGACGTCATGTTATGCGCCCTTTTGACCCATGGTTGGAGCGTACGTAGCT
CGGACCG

>KP057017C.dactylon

CGCCAAAAGACACTCCACCGCAATCCCGGTCTGGACGTGGTGTGGCCCTCATTCCATAGTGTATGGTGGGCCAAAGAGGCGGCTGCCGGCGGTGCC
GTACAGCAGATGGTGGATGGCACAAGTTATTCTCGGTGTTGTATCCTGACGTCATGTTATGCGCCCTTTTGACCCATGGTTGGAGCGTACGTAGCT
CGGACCG

>GQ470555C.dactylon

CGCCAAAAGACACTCCACCGCAATCCCGGTCTGGACGTGGTGTGGCCCTCATTCCATAGTGTATGGTGGGCCAAAGAGGAGGCTGCCGGCGGTGCC
GGTCACAGCAGATGGTGGATGGCACAAGTTATTCTCGGTGTTGTATCCTGACAACTCCCGGTCATGTTATGCCCTTTTGACCCATGGTTGGAGCGTA
TGTAGCTCGGACCG

>DQ655795C.dactylon

CGCCAAAAGACACTCCACCGCAATCCCGGTCTGGACGTGGTGTGGCCCTCATTCCATAGTGTATGGTGGGCCAAAGAGGCGGCTGCCGGCGGTGCC
GGTCACAGCAGATGGTGGATGGCACAAGTTATTCTCGGTGTTGTATCCTGACAACTCCCGGTCATGTTATGCCCTTTTGACCCATGGTTGGAGCGTA
CTAGCTCGGACCG

>KP873313C.dactylon

CGCCAAAAGACACTCCACCGCAATCCCGGTCTGGACGTGGTGTGGCCCTCATTCCATAGTGTATGGTGGGCCAAAGAGGAGGCTGCCGGCGGTGCC
GGTCACAGCAGATGGTGGATGGCACAAGTTATTCTCGGTGTTGTATCCTGACAACTCCCGGTCATGTTATGCCCTTTTGACCCATGGTTGGAGCGTA
TGTAGCTCGGACCG

>KP873312C.dactylon

CGCCAAAAGACACTCCACCGCAATCCCGGTCTGGACGTGGTGTGGCCCTCATTCCATAGTGTATGGTGGGCCAAAGAGGAGGCTGCCGGCGGTGCC
GGTCACAGCAGATGGTGGATGGCACAAGTTATTCTCGGTGTTGTATCCTGACAACTCCCGGTCATGTTATGCCCTTTTGACCCATGGTTGGAGCGTA
TGTAGCTCGGACCG

>AF058812C.dactylon

CGCCAAAAGACACTCCACCGCAATCCCGGTCTGGACGTGGTGTGGCCCTCATTCCATAGTGTATGGTGGGCCAAAGAGGCGGCTGCCGGCGGTGCC
GTACAGCAGATGGTGGATGGCACAAGTTATTCTCGGTGTTGTATCCTGACAACTCCCGGTCATGTTATGCCCTTTTGACCCATGGTTGGAGCCTAC
GTAGCTCGGACCG

>AF058818C.dactylon

CGCCAAAAGACACTCCACCGCAATCCCGGTCTGGACGTGGTGTGGCCCTCATTCCATAGTGTATGGTGGGCCAAAGAGGCGGCTGCCGGCGGTGCC
GTACAGCAGATGGTGGATGGCACAAGTTATTCTCGGTGTTGTATCCTGACAACTCCCGGTCATGTTATGCCCTTTTGACCCATGGTTGGAGCCTAC
GTAGCTCGGACCG

>AF058822C.dactylon

CGCCAAAAGACACTCCACCGCAATCCCGGTCTGGACGTGGTGTGGCCCTCATTCCATAGTGTATGGTGGGCCAAAGAGGCGGCTGCCGGCGGTGCC
GTACAGCAGATGGTGGATGGCACAAGTTATTCTCGGTGTTGTATCCTGACAACTCCCGGTCATGTTATGCCCTTTTGACCCATGGTTGGAGCGTAC
GTAGCTCGGACCG

>KP873303C.aethiopicus

CGCCAAAAGACACTCCACCGCAATCCCGGTCTGGACGTGGTGTGGCCCTCATTCCATAGTGTGTGGTGGGCTAAAGAGGCGGCTGGCGGCGGTGCC
GGTCACAGCAGTTGGTGGATGGCAGATGTTATTCTCGGTGTTGTATCCTGAAACTCCCGGTCATGTTTGACCCATGGTTGGAGCGTATGTTGCTCG
GACAG

>KP873302C.aethiopicus

CGCCAAAAGACACTCCACCGCAATCCCGGTCTGGACGTGGTGTGGCCCTCATTCCATAGTGTGTGGTGGGCTAAAGAGGCGGCTGGCGGCGGTGCC
GGTCACAGCAGTTGGTGGATGGCAGATGTTATTCTCGGTGTTGTATCCTGAAACTCCCGGTCATGTTTGACCCATGGTTGGAGCGTATGTTGCTCG
GACAG

>GU359246C.incompletus

CGCCAAAAGACACTCCACCGCAATCCCGGTCTGGACGTGGTGTGTTGGCCCTCATTCCATAGTGTATGGTGGGCTAAAGAGGCGGCTGCCGGCGGGTGCC
GGTCACAGCAGTTGGTGGATGGCACATGTTATTCTCGGTGTTGTGATCCTGGAACTCCCGGTCATGTTATGCCCCTTTGGAGGACCCATGGTTTGGAGCG
TATGCAGTTCGGACAG

>GU359245C.incompletus

CGCCAAAAGACACTCCACCGCAATCCCGGTCTGGACGTGGTGTGTTGGCCCTCATTCCATAGTGTATGGTGGGCTAAAGAGGCGGCTGCCGGCGGGTGCC
GGTCACAGCAGTTGGTGGATGGCACATGTTATTCTCGGTGTTGTGATCCTGGAACTCCCGGTCATGTTATGCCCCTTTGGAGGACCCATGGTTTGGAGCG
TATGCAGTTCGGACAG

>KP873322C.nlemfuensis

CGCCAAAAGACACTCCACCGCAATCCCGGTCTGGACGTGGTGTGTTGGCCCTCATTCCATAGTGTATGGTGGGCCAAAGAGGCGGCTGCCGGCGGTGCCG
GTCACAGCAGATGGTGGATGGCACAAAGTTATTCTCGGTGTTGTGATCCTGACAACTCCCGGTCATGTTATGCCCCTTTGGACCCATGGTTTGGAGCGTAT
GTAGCTCGGACCG

>KP873326C.nlemfuensis

CGCCAAAAGACACTCCACCGCAATCCCGGTCTGGACGTGGTGTGTTGGCCCTCATTCCATAGTGTATGGTGGGCCAAAGAGGCGGCTGCCGGCGGTGCCG
GTCACAGCAGATGGTGGATGGCACAAAGTTATTCTCGGTGTTGTGATCCTGGCAACTCCCGGTCATGTTATGCCCCTTTGGACCCATGGTTTGGAGCGTCT
GTAGCTCGGACCG

>KP873324C.nlemfuensis

CGCCAAAAGACACTCCACCGCAATCCCGGTCTGGACGTGGTGTGTTGGCCCTCATTCCATAGTGTATGGTGGGCCAAAGAGGCGGCTGCCGGCGGTGCCG
GTCACAGCAGATGGTGGATGGCACAAAGTTATTCTCGGTGTTGTGATCCTGGCAACTCCCGGTCATGTTATGCCCCTTTGGACCCATGGTTTGGAGCGTCT
GTAGCTCGGACCG

>KP873327C.radiatus

CGCCAAAAGACACTCCACCGCAATCCCGGTCCGGACGTGGTGTGTTGGCCCTCATTCCATAGTGTGTGGTGGGCCAAAGAGGCGGCTGCCGGCGGTGCC
GGTCACAGCAGATGGTGGATGGCACAAAGTTATTCTCGGTGTTGTGATCCTGACAGCTCCCGGTGATGTTATGCCCCTTTGGACCCATATGGTTTGGAGCG
TATGTAGCTCGGACCG

>KP873328C.transvaalensis

CGCCAAAAGACACTCCACCGCAATCCCGGTCTGGACGTGGTGTGTTGGCCCTCATTCCATAGTGTATGGTGGGCCAAAGAGGCGGCTGCCGGCGGTGCCG
GTCACAGCATATGGTGGATGGCACAAAGTTATTCTCGGTGTTGTGATCCTGACAACTCCCGGTCATGTTATGCCCCTTTGGACCCATGGTTTGTAGCGTATGT
AGCTCGGACCG

>GU359250C.transvaalensis

CGCCAAAAGACACTCCACCGCAATCCCGGTCTGGACGTGGTGTGTTGGCCCTCATTCCATAGTGTATGGTGGGCCAAAGAGGCGGCTGCCGGCGGTGCCG
GTCACAGCATATGGTGGATGGCACAAAGTTATTCTCGGTGTTGTGATCCTGACAACTCCCGGTCATGTTATGCCCCTTTGGACCCATGGTTTGTAGCGTATGT
AGCTCGGACCG

>KP873235Staphylococcus

CGCCAAAAGACACTCCACCGCAATCCCGGTCTGGACGTGGTGTGTTGGCCCTCATCCGTCGTGATGGTGGGCCAAAGATGCGGCTGCTGGCGGTGCCG
GTCACAGCAGATGGTGGATGACACAAGTTATTCTCGGTGTTATGATCTGACAACCTCCCGTCATGTTATGCCCCTTTGGACCCATGGTTTGGAGCGTATGT
AGCTCGGACCG