



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Διαφοροποίηση γεωγραφικής προέλευσης δειγμάτων καλλιεργούμενης
ρίγανης (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*) με ενόργανη ανάλυση, ανάλυση
DNA και χημειομετρία**

Ελευθερία Τσουμάνη
Χημικός MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

2023

Ιωάννινα



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Διαφοροποίηση γεωγραφικής προέλευσης δειγμάτων καλλιεργούμενης
ρίγανης (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*) με ενόργανη ανάλυση, ανάλυση
DNA και χημειομετρία**

Ελευθερία Τσουμάνη

Χημικός MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

2023

Ιωάννινα

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών,
του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32,
άρθρο 202, παράγραφος 2»

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Συνέλευση: Γ.Σ. 899/19-12-2014, Γ.Σ 992/22-2-2019 (Αντικατάσταση μέλους τριμελούς)

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπουσα:

Α. Μπαδέκα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παν/μίου Ιωαννίνων, Τμήμα Χημείας

Μέλη:

Σ. Κοκκίνη, Ομότιμη Καθηγήτρια ΑΠΘ, Τμήμα Βιολογίας

Χ. Προεστός, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ, Τμήμα Χημείας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: Γ.Σ. 943/3-2-2017

Θέμα: «Διαφοροποίηση γεωγραφικής προέλευσης δειγμάτων καλλιεργούμενης ελληνικής ρίγανης με ενόργανη ανάλυση, ανάλυση DNA και χημειομετρία»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Συνέλευση: Γ.Σ. 1097/05-10-2023

Α. Μπαδέκα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παν/μίου Ιωαννίνων, Τμήμα Χημείας (Επιβλέπουσα)

2. Σ. Κοκκίνη, Ομότιμη Καθηγήτρια ΑΠΘ, Τμήμα Βιολογίας

3. Χ. Προεστός, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ, Τμήμα Χημείας

4. Γ. Πατακιούτας, Αναπληρωτής Καθηγητής Παν/μίου Ιωαννίνων, Τμήμα Γεωπονίας

5. Δ. Σκάλκος, Αναπληρωτής Καθηγητής Παν/μίου Ιωαννίνων, Τμήμα Χημείας

6. Κ. Σταλίκας, Καθηγητής Παν/μίου Ιωαννίνων, Τμήμα Χημείας

7. Ε. Μαλούπα, Τακτική Ερευνήτρια του Ελληνικού Γεωργικού Οργανισμού Δήμητρα

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «Άριστα-10» στις 01-11-2023

Ο Πρόεδρος του Τμήματος Χημείας
Ιωάννης Πλακατούρας, Καθηγητής

Η Γραμματέας του Τμήματος
Ξανθή Τουτουνζόγλου

Πρόλογος

Αυτή η διδακτορική διατριβή είναι το αποτέλεσμα πολλών ετών έρευνας, κουραστικής μελέτης, επίπονων απογοητεύσεων αλλά και αγάπης και αφοσίωσης. Στο σύνολό της, η διαδικασία του διδακτορικού προγράμματος ήταν μια δύσκολη, αλλά εξαιρετικά ικανοποιητική προσπάθεια. Κατά τη διάρκεια αυτής της πορείας, είχα την τύχη να λάβω την καθοδήγηση και την υποστήριξη πολλών ανθρώπων που διαδραμάτισαν σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό της ακαδημαϊκής και προσωπικής μου ανάπτυξης. Είναι μεγάλη μου τιμή να αναγνωρίσω την ανεκτίμητη συμβολή τους.

Καταρχάς, εκφράζω την ειλικρινή ευγνωμοσύνη μου προς την εκλεκτή μου επιβλέπουσα, Αναστασία Μπαδέκα. Η καθοδήγησή της όχι μόνο υπήρξε πολύτιμη στην εκτέλεση των αναλύσεών μου, αλλά και το άσβεστο ενδιαφέρον της για την επιστήμη της Χημείας Τροφίμων αποτέλεσε σημαντική πηγή έμπνευσης για μένα.

Ένα θερμό ευχαριστώ οφείλω και στα υπόλοιπα μέλη της επιτροπής μου, την κα. Κοκκίνη και τον κ. Προεστό, για τα ευφυή σχόλιά τους και τις ανεκτίμητες προτάσεις τους. Η εμπειρία τους και οι κρίσιμες παρατηρήσεις τους έχουν εμπλουτίσει αυτήν την εργασία και έχουν διευρύνει την κατανόησή μου για το θέμα. Εκφράζω την ειλικρινή εκτίμησή μου σε καθέναν από αυτούς για τον χρόνο, την προσήλωση, αλλά και την αυστηρή αξιολόγηση τους.

Ευγνωμοσύνη οφείλω επίσης στους συναδέλφους μου για τις ενθαρρυντικές συζητήσεις, την ακλόνητη υποστήριξη και την υπέροχη συνεργασία. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τη μεταδιδάκτορα Ιωάννα Κοσμά που, εκτός από καταξιωμένη επιστήμων, αποδείχτηκε μια εξαιρετικά καλή φίλη. Οι συζητήσεις μας έχουν αποτελέσει συνεχή πηγή έμπνευσης και με έχουν βοηθήσει να αντιμετωπίσω τις προκλήσεις που προκύπταν καθόλη τη διάρκεια της διαδρομής μου. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στη Δρ. Δήμητρα Δήμου, ακαδημαϊκή υπότροφο του τμήματος Γεωπονίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή της στις μοριακές αναλύσεις. Η υπομονή της, η διάθεση συνεργασίας και οι συμβουλές της υπήρξαν ανεκτίμητες για μένα.

Στην οικογένειά μου και στους φίλους μου, εκφράζω την ειλικρινή ευγνωμοσύνη μου για την ακλόνητη ενθάρρυνση και την ανεκτίμητη πίστη τους στις ικανότητές μου. Ζητώ συγγνώμη για

όλες τις μέρες που χάσαμε λόγω αυτής μου της προσπάθειας και υπόσχομαι με την ολοκλήρωσή της να τους το ανταποδώσω. Η αγάπη, η κατανόηση και η ακλόνητη υποστήριξή τους ήταν οι πυλώνες της δύναμής μου κατά τη διάρκεια αμφιβολιών. Το μεγαλύτερο ευχαριστώ οφείλω στον σύζυγό μου, Ανέστη. Η στήριξή του υπήρξε ανεκτίμητη και η αγάπη του μου έδωσε το απαραίτητο κουράγιο για να συνεχίσω. Χωρίς τη βοήθεια και την κατανόησή του η ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας δεν θα ήταν εφικτή.

Τέλος, πρέπει να αναγνωρίσω την πολύ σημαντική βοήθεια των παραγωγών ρίγανης από τους οποίους προμηθεύτηκα τα δείγματα για την έρευνά μου. Όχι μόνο μου παρείχαν τα δείγματα αφίλοκερδώς και με μεγάλη χαρά, αλλά υπήρξαν καθόλα πρόθυμοι να μοιραστούν τη γνώση τους και την εμπειρία τους για το αντικείμενο, βοηθώντας με να εμπλουτίσω κι άλλο το περιεχόμενο της διατριβής μου. Επίσης, είχα την τύχη να επισκεφτώ από κοντά όλους τους παραγωγούς από τους οποίους προμηθεύτηκα τα εν λόγω δείγματα χάρη στην υποστήριξη του υπέροχου εργοδότη μου, κ. Ιωάννη Λούη. Ο κ. Λούης, όντας και ο ίδιος χημικός, έχει κερδίσει επάξια για μένα πρώτα τον τίτλο του μέντορα και μετά αυτόν του εργοδότη.

Κλείνοντας, εκτείνω την ειλικρινή μου ευγνωμοσύνη σε όλους όσους με συνόδευσαν σε αυτήν την επιστημονική περιπέτεια και παρέλειψα να αναφέρω προσωπικά. Χωρίς την υποστήριξη και την πίστη σας σε μένα, αυτή η διατριβή δεν θα ήταν δυνατόν να ολοκληρωθεί. Είναι με ταπεινότητα και βαθύ αίσθημα ικανοποίησης που παρουσιάζω αυτό το έργο στην ακαδημαϊκή κοινότητα.

Τσουμάνη Ελευθερία

2023

«Τα λιβάδια και οι λόφοι της γης είναι φαρμακεία»

Παράκελσος (1493-1541)

Αφιερωμένο στον μπαμπά μου.

Περιεχόμενα

Περίληψη	i
Abstract.....	vi
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1. ΡΙΓΑΝΗ	3
1.1. Γενικά στοιχεία	3
1.2. Το γένος <i>Origanum</i>	4
1.3. Η ελληνική ρίγανη.....	13
1.4. Στοιχεία και τύποι καλλιέργειας της ρίγανης	15
2. ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ	18
2.1. Γενικά	18
2.2. Τεχνικές παραλαβής αιθέριων ελαίων	20
2.3. Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή και τη σύσταση του αιθέριου ελαίου	21
2.4. Χημική σύσταση αιθέριου ελαίου φυτών του είδους <i>O. vulgare</i>	23
2.5. Βιολογική δράση αιθέριου ελαίου φυτών του είδους <i>O. vulgare</i>	27
3. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΤΙΚΩΝ ΕΙΔΩΝ ΜΕ ΑΝΑΛΥΣΗ DNA	33
3.1. Μέθοδοι αξιολόγησης γενετικής παραλλακτικότητας	33
3.2. Μοριακοί δείκτες	35
3.3. Φυλογενετική ανάλυση	40
II. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	45
III. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	48
1. ΥΛΙΚΑ	48
A.1. Δείγματα φυτών από καλλιέργειες ρίγανης.....	48
A.2. Αντιδραστήρια	52
2. ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ	55
3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ.....	57
3.1. Χημικές Μέθοδοι Ανάλυσης.....	57
3.1.1. Παραλαβή αιθέριων ελαίων.....	57
3.1.2. Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των συστατικών των αιθέριων ελαίων ρίγανης	59
3.1.3. Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου	62
3.1.4. Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας	63
3.2. Στατιστική Ανάλυση	64
3.2.1. Ανάλυση διακύμανσης (ANOVA)	64
3.2.2. Πολυμεταβλητή Ανάλυση Διακύμανσης (MANOVA)	64
3.2.3. Γραμμική Διαχωριστική Ανάλυση (LDA)	68
3.3. Μοριακή ανάλυση γενοτύπων καλλιεργούμενης ρίγανης	71
3.3.1. Απομόνωση γενωμικού DNA	71
3.3.2. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης	74
3.3.3. Ενίσχυση αλληλουχιών DNA με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	78
3.3.4. Ανάκτηση τμημάτων DNA από πηκτή αгарόζης (gel extraction).....	85
3.3.5. Ανάλυση των δεδομένων - Κατασκευή φυλογενετικών δένδρων	87
IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	90
IV.1. ΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	90
IV.1.1. Περιεκτικότητα των καλλιεργούμενων φυτών <i>O. vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i> σε αιθέριο έλαιο	90

IV.1.2.	Ποιοτική και ποσοτική σύσταση αιθέριων ελαίων	97
IV.1.3.	Ολικό φαινολικό περιεχόμενο	122
IV.1.4.	Αντιοξειδωτική ικανότητα	127
IV.2.	ΠΟΛΥΜΕΤΑΒΛΗΤΗ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	133
IV.2.1.	Ομάδα Α.....	134
IV.2.2.	Ομάδα Β.....	144
IV.3.	ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ	153
IV.3.1.	Απομόνωση γενωμικού DNA από φυτικό υλικό γενοτύπων ρίγανης.....	153
IV.3.2.	Φυλογενετική ανάλυση των δειγμάτων καλλιεργούμενης ρίγανης <i>O. vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i> με βάση τις αλληλουχίες της περιοχής ITS του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA (nrDNA).....	154
IV.3.3.	Φυλογενετική ανάλυση των δειγμάτων καλλιεργούμενης ρίγανης <i>O. vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i> με τη χρήση μοριακών δεικτών RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA, Τυχαίως Πολλαπλασιαζόμενα Πολυμορφικά τμήματα DNA)	162
	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	172
	ΔΙΕΘΝΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	177
	ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	198
	ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ	202
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I: ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΕΣ ΑΠΟ ΔΕΙΓΜΑΤΑ <i>O. vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i>	203
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II: ΑΝΤΙΠΡΟΣΩΠΕΥΤΙΚΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΑ	209
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ITS ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΟΥ nrDNA	211

Περίληψη

Στην παρούσα έρευνα έγινε προσπάθεια χαρακτηρισμού και διαφοροποίησης φυτών καλλιεργούμενης ρίγανης σύμφωνα με τη γεωγραφική περιοχή προέλευσης, χρησιμοποιώντας ενόργανη ανάλυση, ανάλυση DNA και χημειομετρία. Για το σκοπό αυτό, ελήφθησαν συνολικά 142 δείγματα εμπορικά διαθέσιμων φυτών ρίγανης (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*) που συγκομίστηκαν κατά τα ημερολογιακά έτη 2017-2018 από βιολογικές καλλιέργειες. Τα δείγματα προήλθαν από πέντε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές της Ελλάδας (Ηπειρος, Μακεδονία, Κρήτη, Πελοπόννησος και Θεσσαλία) και συγκεκριμένα αφορούσαν: πέντε καλλιέργειες από το νομό Ιωαννίνων, δύο από το νομό Πρεβέζης, δύο από το νομό Κοζάνης, μια από το νομό Τρικάλων, δύο από το νομό Μαγνησίας, μια από το νομό Πιερίας, μια από το νομό Κιλκίς, δύο από το νομό Θεσσαλονίκης, μια από το νομό Αχαΐας, μια από το νομό Ηλείας, μια από το νομό Ρεθύμνου και μια από το νομό Ηρακλείου.

Τα φυτά ρίγανης υποβλήθηκαν αρχικά σε υδροαπόσταξη (hydrodistillation - HD) και στα προκύπτοντα αιθέρια έλαια έγινε προσδιορισμός της περιεκτικότητάς τους σε ολικό φαινολικό περιεχόμενο (Total Phenolic Content - TPC) με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, της αντιοξειδωτικής τους δράσης (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity - TEAC) με τη μέθοδο DPPH, της εκατοστιαίας τους σύστασης, καθώς και ποσοτικός προσδιορισμός των τεσσάρων βασικών συστατικών τους (καρβακρόλη, θυμόλη, γ-τερπινένιο και π-κυμένιο) και ημιποσοτικός προσδιορισμός όλων των υπολοίπων συστατικών με τη συνδυασμένη τεχνική της Αέριας Χρωματογραφίας-Φασματομετρίας Μάζας (GC-MS).

Τα επίπεδα απόδοσης σε αιθέριο έλαιο των φυτών ρίγανης κυμάνθηκαν στο σύνολό τους από ~ 4% μέχρι 7%, με τη μεγαλύτερη απόδοση να καταγράφεται στα δείγματα ρίγανης από την περιοχή της Ηλείας και τη μικρότερη στα δείγματα ρίγανης από την περιοχή της Θεσσαλονίκης. Η χρωματογραφική ανάλυση οδήγησε στην ταυτοποίηση 35 συνολικά ενώσεων στα αιθέρια έλαια των δειγμάτων, ενώ 15 από αυτές βρέθηκαν παρούσες σε όλα τα δείγματα. Τα συστατικά των αιθέριων ελαίων στο μεγαλύτερο τους μέρος αποτελούνταν από οξυγονωμένα μονοτερπένια (65,67 – 83,98%) και μονοτερπενικούς υδρογονάνθρακες (10,80 – 30,43%), ενώ σε χαμηλότερα ποσοστά ακολούθησαν οι σεσκιτερπενικοί υδρογονάνθρακες (2,44 – 3,97%) , τα οξυγονωμένα σεσκιτερπένια (0,40 – 1,92%) και οι λοιπές ενώσεις (0,10 – 1,29%).

Το κυρίαρχο συστατικό στα αιθέρια έλαια όλων των δειγμάτων βρέθηκε να είναι η καρβακρόλη, με εξαίρεση μόνο τα δείγματα αιθέριου ελαίου από την περιοχή της Ηλείας όπου βρέθηκε η θυμόλη. Τα ποσοστά της καρβακρόλης κυμάνθηκαν από 28,74% έως 68,8%, με το υψηλότερο ποσοστό να καταγράφεται στα δείγματα αιθέριου ελαίου από την περιοχή της Θεσσαλονίκης και το μικρότερο στα δείγματα από την περιοχή της Ηλείας. Το δεύτερο σε εκατοστιαία αναλογία συστατικό βρέθηκε να είναι η θυμόλη, με ποσοστά από 7,4% έως 35,2%, με το υψηλότερο ποσοστό αυτής να καταγράφεται στα δείγματα από την Ηλεία και το μικρότερο στα δείγματα αιθέριου ελαίου από το Ηράκλειο. Το σύνολο των ποσοστών των τεσσάρων βασικών συστατικών των αιθέριων ελαίων ρίγανης (καρβακρόλη, θυμόλη, γ -τερπινένιο και π -κυμένιο) κυμάνθηκε από 85,10% έως 89,54%, με την υψηλότερη τιμή να καταγράφεται στα δείγματα από την περιοχή του Ρεθύμνου και τη χαμηλότερη στα δείγματα από την περιοχή της Κοζάνης.

Επιπλέον, οι συνολικές συγκεντρώσεις των τεσσάρων βασικών ενώσεων των αιθέριων ελαίων των δειγμάτων καλλιεργούμενης ρίγανης, όπως υπολογίστηκαν κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό τους, κυμάνθηκαν από 6230 mg/L έως 16540 mg/L, με τη σειρά κατάταξης των δειγμάτων σε φθίνουσα σειρά να διαμορφώνεται ως εξής: Ηλεία > Ηράκλειο > Πρέβεζα > Κιλκίς > Ιωάννινα > Πιερία > Κοζάνη > Μαγνησία > Τρίκαλα > Θεσσαλονίκη > Ρέθυμνο > Αχαΐα (οι περιοχές αντιπροσωπεύουν τα δείγματα που προέρχονται από αυτές). Η ένωση με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση βρέθηκε να είναι η καρβακρόλη (10700 ± 1500 mg/L, Ηράκλειο), ενώ οι υψηλότερες τιμές των συγκεντρώσεων των υπολοίπων τριών ενώσεων καταγράφηκαν στα δείγματα αιθέριου ελαίου από την περιοχή της Ηλείας και ήταν 8170 ± 260 mg/L για τη θυμόλη, 860 ± 180 mg/L για το γ -τερπινένιο και 920 ± 53 mg/L για το π -κυμένιο.

Από τις ενώσεις που μελετήθηκαν με ημιποσοτικό προσδιορισμό, η ένωση με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση βρέθηκε να είναι το α -τερπινένιο (112 ± 14 mg/L, Ηλεία), ακολουθούμενη από το καρνοφυλλένιο (101 ± 10 mg/L, Πιερία) και το β -μυρκένιο (91 ± 14 mg/L, Ηλεία). Το συνολικό άθροισμα των συγκεντρώσεων των ενώσεων που προσδιορίστηκαν ημιποσοτικά κινήθηκε από 406,23 mg/L έως 721,02 mg/L, με τη σειρά κατάταξης των δειγμάτων σε φθίνουσα σειρά να διαμορφώνεται ως εξής: Κιλκίς > Αχαΐα > Ηλεία > Κοζάνη > Ιωάννινα > Μαγνησία > Τρίκαλα > Πρέβεζα > Πιερία > Ηράκλειο > Θεσσαλονίκη > Ρέθυμνο.

Οι τιμές TPC των αιθέριων ελαίων όλων των δειγμάτων ρίγανης κυμάνθηκαν από $74,5 \pm 3,6$ mg GAE/g EO έως $89,0 \pm 4,8$ mg GAE/g EO, με την υψηλότερη τιμή να καταγράφεται στα δείγματα της Αχαΐας και τη μικρότερη στα δείγματα από την περιοχή του Ηρακλείου. Αντίστοιχα, οι τιμές TEAC κυμάνθηκαν μεταξύ $306,8 \pm 5,0$ μ mol TE/g EO και $461,3 \pm 7,3$ μ mol TE/g EO, με τα δείγματα από την περιοχή της Αχαΐας να καταγράφουν τη μικρότερη τιμή, ενώ τα δείγματα από την περιοχή του Ρεθύμνου την υψηλότερη.

Τα δεδομένα που αποκτήθηκαν από τις χημικές αναλύσεις συνδυάστηκαν με τις χημειομετρικές μεθόδους ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA), πολυμεταβλητής ανάλυσης διακύμανσης (MANOVA) και γραμμικής διακριτικής ανάλυσης (LDA) για τη διερεύνηση της δυνατότητας ταξινόμησης των δειγμάτων ρίγανης ως προς τη γεωγραφική προέλευση. Για τη διευκόλυνση της ταξινόμησης, τα δείγματα χωρίστηκαν σε δυο ομάδες (Ομάδα Α – Ηλεία, Ηράκλειο, Τρίκαλα, Θεσσαλονίκη, Κιλκίς και Πρέβεζα και Ομάδα Β – Αχαΐα, Ρέθυμνο, Μαγνησία, Πιερία, Κοζάνη και Ιωάννινα). Παρόλο που ενσωματώθηκαν αρχικά όλοι οι παράμετροι των χημικών αναλύσεων στην στατιστική ανάλυση, επιλέχθηκαν τελικά να χρησιμοποιηθούν μόνο εκείνες των οποίων ο συνδυασμός έδωσε ποσοστά διαχωρισμού άνω του 50%. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν ως εξαρτημένες μεταβλητές οι επί τοις εκατό αναλογίες των συστατικών των αιθέριων ελαίων και οι τιμές TPC και TEAC. Τέλος, ως ύστατη μέθοδος ταξινόμησης χρησιμοποιήθηκε η σταδιακή εφαρμογή LDA (Stepwise LDA, SLDA) μέσω μιας διαδικασίας κλιμακωτής επιλογής μεταβλητών για τη διάκριση και τον εντοπισμό αυτών που διαθέτουν την υψηλότερη διακριτική δύναμη (markers) προκειμένου να βελτιστοποιηθεί περαιτέρω ο διαχωρισμός των δειγμάτων.

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων και των δύο ομάδων έδειξε ότι το μεγαλύτερο μέρος του συνόλου των παρατηρήσεων κατατάχθηκε σωστά με τη μέθοδο της ενδοεπικύρωσης. Συγκεκριμένα, οι επί τοις εκατό αναλογίες των συστατικών των αιθέριων ελαίων σε συνδυασμό με τις τιμές TPC και TEAC της Ομάδας Α έδωσαν ποσοστό διαχωρισμού 93,3%, ενώ της Ομάδας Β έδωσαν 82,7% αντίστοιχα. Τέλος, από τις συνολικές 33 παραμέτρους της Ομάδας Α που εξετάστηκαν, η ανάλυση SLDA κατέδειξε 16 μεταβλητές ως markers, ενώ από τις 32 της Ομάδας Β που εξετάστηκαν, η ανάλυση SLDA κατέδειξε 14 μεταβλητές ως markers. Η χρήση των συνδυασμών των μεταβλητών αυτών στην στατιστική

ανάλυση βρέθηκε ότι βελτίωσε τα ποσοστά διαχωρισμού και στις δυο περιπτώσεις: για την Ομάδα Α, από ποσοστό 93,3% ανέβηκε στο 100% και για την Ομάδα Β από 82,7% ανέβηκε στο 87,8%.

Κατά την ανάλυση DNA, επιλέχθηκαν 20 αντιπροσωπευτικά δείγματα ρίγανης (ένα από κάθε καλλιέργεια) από τα οποία και απομονώθηκε γενωμικό DNA (nrDNA). Στη συνέχεια εφαρμόστηκε αρχικά η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase chain reaction -PCR) για την ενίσχυση της ενδομεταγραφόμενης (Internal Transcribed Spacer -ITS) περιοχής του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA χρησιμοποιώντας ως μήτρα το απομονωμένο γενωμικό DNA από τα υπό μελέτη δείγματα ρίγανης και τους καθολικούς εκκινητές ITS1 και ITS4. Τα προϊόντα των αντιδράσεων PCR, αφού καθαρίστηκαν, στάλθηκαν προς προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας σε κατάλληλο εργαστήριο. Οι παραγόμενες αλληλουχίες συγκρίθηκαν με αλληλουχίες της βάσης δεδομένων και στη συνέχεια ευθυγραμμίστηκαν με τη βοήθεια κατάλληλου προγράμματος. Μετά την ευθυγράμμιση των αλληλουχιών, κατασκευάστηκαν τα φυλογενετικά δέντρα με δύο μεθόδους, τις NJ (Neighbor-Joining) και UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean), ενώ η αξιοπιστία και η σταθερότητα των σχέσεων του δενδρογράμματος εκτιμήθηκε μέσω 1000 επαναλήψεων (bootstraps). Η φυλογενετική ανάλυση οδήγησε σε πλήρη διαχωρισμό των δειγμάτων και με τις δύο μεθόδους, ακόμα και σε αυτά που προήλθαν από την ίδια περιοχή.

Για τον περαιτέρω προσδιορισμό της γενετικής ποικιλότητας μεταξύ των δειγμάτων ρίγανης δοκιμάστηκαν 15 μοριακοί δείκτες RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA- Τυχαία Ενισχυμένα Πολυμορφικά Τμήματα DNA) για την ανίχνευση του πολυμορφισμού του DNA. Από τους 15 εκκινητές που δοκιμάστηκαν, ευκρινή αριθμό ζωνών έδωσαν οι 13. Ο συνολικός αριθμός των ενισχυμένων ζωνών DNA που έδωσαν οι τυχαίοι εκκινητές ήταν 107, από τις οποίες πολυμορφικές ήταν οι 66. Το συνολικό ποσοστό πολυμορφισμού, επομένως, ανήλθε στο 62%. Αφού υπολογίστηκαν οι συντελεστές ομοιότητας του Jaccard για όλα τα δείγματα, κατασκευάστηκε μια μήτρα ομοιότητας με βάση την οποία υπολογίστηκαν οι γενετικές αποστάσεις. Οι αποστάσεις αυτές αναλύθηκαν και πάλι με τη χρήση κατάλληλου προγράμματος και τις μεθόδους UPGMA και NJ. Όπως και παραπάνω, προέκυψαν δύο φυλογενετικά δενδρογράμματα, στα οποία, σε συμφωνία με τη

φυλογενετική ανάλυση με βάση τις αλληλουχίες της περιοχής ITS, παρατηρήθηκε πλήρης διαχωρισμός των δειγμάτων και με τις δύο μεθόδους.

Abstract

This present study attempted to characterize and differentiate samples of cultivated oregano according to the geographical area of origin using instrumental analysis, DNA analysis and chemometrics. For this purpose, a total of 142 samples of commercially available Greek oregano plants (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*), harvested from organic farms during the calendar years 2017-2018, were obtained. The samples came from five different geographical regions of Greece (Epirus, Macedonia, Crete, Peloponnese and Thessaly) and specifically included: 5 oregano cultivars from the prefecture of Ioannina, 2 from the prefecture of Preveza, 2 from the prefecture of Kozani, 1 from the prefecture of Trikala, 2 from the prefecture of Magnesia, one from the prefecture of Pieria, one from the prefecture of Kilikis, 2 from the prefecture of Thessaloniki, one from the prefecture of Achaia, one from the prefecture of Ileia, one from the prefecture of Rethymno and one from the prefecture of Heraklion.

The oregano samples were initially subjected to hydrodistillation (HD) and the resulting essential oils were determined for their total phenolic content (TPC) with the Folin-Ciocalteu method, their antioxidant activity (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) - TEAC) with the DPPH method, and their chemical composition. In addition, a quantitative determination of the four main compounds of the essential oils of the oregano samples (carvacrol, thymol, γ -terpinene, and *p*-cymene) was performed, as well as a semi-quantitative determination of all the remaining volatile components with the use of the combined technique of Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS).

The essential oil yield levels of the oregano samples ranged from ~4% to 7%, with the highest yield recorded in the oregano samples from the region of Ileia and the lowest in the oregano samples from the region of Thessaloniki. The chromatographic analysis led to the identification of a total of 35 compounds, while 15 of them were found to be present in all samples. The components of the essential oils mostly consisted of oxygenated monoterpenes (65.67 – 83.98%) and monoterpene hydrocarbons (10.80 – 30.43%), while lower percentages were followed by sesquiterpene hydrocarbons (2.44 – 3.97%), oxygenated sesquiterpenes (0.40 - 1.92%) and other compounds (0.10 - 1.29%).

The most abundant essential oil component in all samples was found to be carvacrol, except only in the essential oil samples from the region of Ileia where it was thymol. The rates of carvacrol in the oregano essential oil samples ranged from 28.74% to 68.8%, with the highest rate recorded in the oregano samples from Thessaloniki and the lowest in the oregano samples from Ileia. The second most abundant component of the essential oil samples was found to be thymol, with rates ranging from 7.4% to 35.2%. The highest thymol rate was recorded in the samples from Ileia and the lowest in the essential oil samples from Heraklion. The total rates of the four main components of oregano essential oils (carvacrol, thymol, γ -terpinene, and *p*-cymene) ranged from 85.1% to 89.54%, with the highest value recorded in the samples from the Rethymno area and the lowest in the samples from the area of Kozani.

In addition, the total concentrations of the four main compounds of the cultivated oregano samples, as calculated during the quantitative determination, ranged from 6230 mg/L to 16540 mg/L, with the descending ranking order being as follows: Ileia > Heraklion > Preveza > Kilgis > Ioannina > Pieria > Kozani > Magnesia > Trikala > Thessaloniki > Rethymno > Achaea (the regions represent the samples that originate from them). The compound with the highest concentration was found to be carvacrol (10700 ± 1500 mg/L, Heraklion), while the highest values of the concentrations of the remaining three compounds were recorded in the essential oil sample from the area of Ileia: 8170 ± 260 mg/L for thymol, 860 ± 180 mg/L for γ -terpinene and 920 ± 53 mg/L for *p*-cymene.

Of the compounds studied by semiquantitative determination, the compound with the highest concentration was found to be α -terpinene (112 ± 14 mg/L, Ileia), followed by caryophyllene (101 ± 10 mg /L, Pieria) and β -myrcene (91 ± 14 mg/L, Ilia). The total sum of the concentrations of the semi-quantitatively determined compounds ranged from 406.23 mg/L to 721.02 mg/L, with the ranking order of the samples, in descending order, being as follows: Kilgis > Achaea > Ileia > Kozani > Ioannina > Magnesia > Trikala > Preveza > Pieria > Heraklion > Thes/ki > Rethymno.

The TPC values of the essential oils of all oregano samples ranged from 74.5 ± 3.6 mg GAE/g EO to 89.0 ± 4.8 mg GAE/g EO, with the highest value recorded in the Achaea samples and the lowest in the samples from the area of Heraklion. Accordingly, the TEAC values ranged between 306.8 ± 5.0 μ mol TE/g EO and 461.3

$\pm 7.3 \mu\text{mol TE/g EO}$, with the samples from the region of Achaea yielding the lowest value, while the samples from the area of Rethymno the highest.

The data obtained from the chemical analyses were then combined with the chemometric methods of analysis of variance (ANOVA), multivariate analysis of variance (MANOVA), and linear discriminant analysis (LDA) to investigate the possibility of classifying the oregano samples in terms of geographical origin. To facilitate this classification, the samples were divided into two groups (Group A – Ileia, Heraklion, Trikala, Thessaloniki, Kilkis, and Preveza and Group B – Achaea, Rethymno, Magnesia, Pieria, Kozani, and Ioannina). Although initially all parameters of the chemical analyses were incorporated into the statistical analysis, only those whose combination produced classification rates greater than 50% were ultimately chosen to be used. Specifically, the percentage ratios of the essential oil components and the TPC and TEAC values were the ones that were selected as dependent variables. Furthermore, Stepwise LDA (SLDA) was used as the final classification method, executing a stepwise selection process of variables, to distinguish and identify the ones with the highest discriminative power (markers) and, subsequently, optimize further the discrimination of the samples.

The statistical treatment of the results of both groups showed that, while using the cross-validation method, most of the observations were correctly classified. Specifically, the combination of the percentage ratios of the essential oil components and the TPC and TEAC values of Group A produced a classification rate of 93.3%, while those of Group B yielded 82.7% respectively. Finally, from the total 33 parameters of Group A that were examined, the SLDA analysis showed 16 variables as markers, while from the 32 of Group B that were examined, the SLDA analysis showed 14 variables as markers. The use of the combinations of these variables in the statistical analysis was found to improve the classification rates in both cases: for Group A, from 93.3% to 100% and for Group B from 82.7% to 87, 8%.

Twenty representative oregano samples were selected for the DNA analysis (one from each oregano cultivation), and their genomic DNA (nrDNA) was subsequently isolated. Initially, the PCR method was applied in order to amplify the ITS (Internal Transcribed Spacer) region of the nuclear ribosomal DNA, with the use of the isolated genomic DNA from the studied oregano samples as a template, and the universal

primers ITS1 and ITS4. The PCR products were purified and sent to an appropriate laboratory for the determination of their nucleotide sequence. The generated sequences were compared with those in the database and then aligned using an appropriate program. Following the alignment of sequences, the phylogenetic trees were constructed by using two methods, Neighbor-Joining and UPGMA, while the reliability and stability of the dendrogram relationships were assessed through 1000 bootstrap samples. The phylogenetic analysis led to the complete separation of the samples in both methods, even when originating from the same region.

To further determine the genetic diversity among the oregano samples, 15 RAPD molecular markers were utilized for detecting DNA polymorphism. Of the 15 primers tested, 13 gave a clear number of bands. The total number of amplified DNA bands given by the random primers was 107, of which 66 were polymorphic. The total polymorphism rate therefore amounted to 62%. After Jaccard similarity coefficients were calculated for all samples, a similarity matrix was constructed from which genetic distances were calculated. These distances were analyzed using a suitable program and again with the use of both UPGMA and NJ methods. As above, the phylogenetic analysis led to the complete separation of the samples using both methods.

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο κόσμος των φυτών περιλαμβάνει περίπου 350.000 διαφορετικά είδη, με τα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά (ΑΦΦ) να ανήκουν σε μια σχετικά μικρή, αλλά εξαιρετικά σημαντική κατηγορία. Οι παραμεσότητες χώρες, συμπεριλαμβανομένης και της Ελλάδας, είναι εξαιρετικά πλούσιες σε αυτοφυή αρωματικά φυτά, πολλά από τα οποία καλλιεργούνται συστηματικά. Ειδικότερα, η Ελλάδα, λόγω της μεγάλης ποικιλομορφίας στη μορφολογία του εδάφους και τις ιδιαίτερες κλιματικές συνθήκες της, συγκαταλέγεται μεταξύ των ευρωπαϊκών χωρών με τη μεγαλύτερη ποικιλομορφία σε φυτικά είδη και τη μεγαλύτερη αφθονία σε ενδημικά είδη με αρωματικές και φαρμακευτικές ιδιότητες (Dimopoulos et al., 2013; Goliaris et al., 2003).

Η οικογένεια των Χειλανθών (Lamiaceae) περιλαμβάνει ένα από τα υψηλότερα ποσοστά ΑΦΦ δεδομένου ότι (i) τα περισσότερα μέλη της παράγουν πτητικά έλαια, (ii) συμμετέχουν σε όλους τους τύπους βλάστησης των κλιματικά διαφορετικών περιοχών μιας χώρας, και (iii) πολλά από αυτά είναι ενδημικά (Kokkini et al., 1988). Τα μέλη της οικογένειας Lamiaceae εξαπλώνονται σε σχεδόν όλες τις εύκρατες κυρίως περιοχές της γης, ενώ εμφανίζονται σε μεγαλύτερους πληθυσμούς σε περιοχές της Μεσογείου (Kokkini et al., 2003). Κατά βάση τα περισσότερα είδη είναι προσαρμοσμένα σε ξηροθερμικές συνθήκες και είναι ανθεκτικά σε μειωμένη εδαφική ατμοσφαιρική υγρασία. Το μεσογειακό κλίμα που προσφέρει αυτού του είδους τις συνθήκες ευνοεί, επομένως, την ανάπτυξη των ΑΦΦ τα οποία παράγουν υψηλής ποιότητας αιθέρια έλαια (Margaris, 1981).

Το φυτό *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, γνωστό εμπορικά με τον όρο ελληνική ρίγανη, κατέχει μια ιδιαίτερη θέση ανάμεσα στα φυτά της οικογένειας των Χειλανθών και καλλιεργείται ευρέως στον ελλαδικό χώρο (Στεφάνου κ.α., 2013). Τα ιδιαίτερα ποιοτικά χαρακτηριστικά και η αξία αυτού του φυτού ρίγανης έχουν επισημανθεί συστηματικά από τη διεθνή βιβλιογραφία (Kokkini et al., 2004; Kosakowska et al., 2021; Proestos et al., 2006; Węglarz et al., 2020).

Παρόλο που είναι ένα φυτό που παρουσιάζει ιδιαίτερη ποικιλομορφία, το *O. vulgare* subsp. *hirtum* διαθέτει κάποιες χαρακτηριστικές ιδιότητες που το ξεχωρίζουν από τα

υπόλοιπα είδη ρίγανης και διευκολύνουν την αναγνώρισή του. Η καταγραφή αυτών των χαρακτηριστικών ιδιοτήτων έχει ιδιαίτερη σημασία σήμερα καθώς υπάρχει αύξηση της οικονομικής αξίας της ελληνικής ρίγανης ως καλλιεργούμενου φυτού η οποία έχει οδηγήσει και σε αυξημένες περιπτώσεις νοθείας και ψευδούς επισήμανσης (Bejar, 2019; Black et al., 2016; Drabova et al., 2019; Μαλούπα κ.α., 2013). Μάλιστα, πρόσφατη πανευρωπαϊκή έρευνα αναφορικά με την αξιολόγηση της αυθεντικότητας 1.885 δειγμάτων εμπορευόμενων βοτάνων και μπαχαρικών, κατέδειξε ότι τα δείγματα ρίγανης (*Origanum vulgare*) παρουσίαζαν το υψηλότερο ποσοστό υποψίας νοθείας (48%) σε σύγκριση με τα δείγματα των λοιπών βοτάνων που εξετάστηκαν (Maquet et al., 2021). Με βάση τα παραπάνω, ειδικά πιστοποιητικά όπως η ΓΕΠ (Γεωγραφική Ένδειξη Προέλευσης) ή η ΠΟΠ (Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης) μπορούν να αποτελέσουν χρήσιμα εργαλεία για την αναγνώριση και προστασία της γνησιότητας της ελληνικής ρίγανης. Επιπλέον, η ενίσχυση των ελέγχων ποιότητας και της επιθεώρησης της αλυσίδας εφοδιασμού μπορεί να βοηθήσει στην ανίχνευση περιπτώσεων νοθείας ή παραπλανητικής επισήμανσης.

Η παρούσα διατριβή πραγματεύεται τον χαρακτηρισμό και την πιθανή διαφοροποίηση φυτών καλλιεργούμενης ρίγανης (*O. vulgare* subsp. *hirtum*) ως προς τη γεωγραφική περιοχή προέλευσης με βάση τα συστατικά των αιθέριων ελαίων, το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο, την αντιοξειδωτική ικανότητα καθώς και τις φυλογενετικές τους σχέσεις. Η καινοτομία της έρευνας αυτής έγκειται αρχικά στο γεγονός ότι μελετήθηκαν αποκλειστικά εμπορικά διαθέσιμα καλλιεργούμενα φυτά *O. vulgare* subsp. *hirtum* και όχι φυτά από πειραματικούς αγρούς. Επιπλέον, η συγκεκριμένη έρευνα αποτελεί μια πρώτη προσπάθεια σύνδεσης ορισμένων χαρακτηριστικών του καλλιεργούμενου φυτού *O. vulgare* subsp. *hirtum* με τις περιοχές καλλιέργειάς του, ιδιαίτερα ακόμα με περιοχές που βρίσκονται εντός του ελλαδικού χώρου. Η προσέγγιση αυτή έρχεται να καλύψει ένα κενό στη βιβλιογραφία, δεδομένου ότι οι περισσότερες μελέτες έχουν εστιάσει στην καταγραφή και τη σύγκριση των ιδιοτήτων, είτε καλλιεργούμενων είτε αυτοφυών, φυτών *O. vulgare* subsp. *hirtum* που προέρχονται από διαφορετικές περιοχές, χωρίς, ωστόσο, να έχουν γίνει προσπάθειες ταυτοποίησης των ιδιοτήτων που τα διαφοροποιούν με τη χρήση χημειομετρικών μεθόδων.

1. ΡΙΓΑΝΗ

1.1. Γενικά στοιχεία

Με τον όρο «ρίγανη» αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία τουλάχιστον 61 φυτικά είδη από 17 διαφορετικά γένη που ανήκουν σε έξι βοτανικές οικογένειες (Bernáth, 1996). Η χρήση του όρου «ρίγανη» φαίνεται, επομένως, να έχει περισσότερο εμπορική παρά βοτανική σημασία αφού πολλά από τα καλλιεργούμενα είδη που είναι γνωστά στη διεθνή αγορά ως «oregano» (όπως και «origan» ή «origanum»), δεν ανήκουν καν στο γένος *Origanum*. Το κοινό στοιχείο, ωστόσο, όλων των φυτών που έχουν βαπτιστεί ως «ρίγανη» είναι μια αρωματική φαινόλη, η καρβακρόλη.

Η καρβακρόλη είναι η χημική ένωση υπεύθυνη για τη χαρακτηριστική έντονη μυρωδιά και γεύση των αρτυματικών ειδών ρίγανης και συναντάται σε πολλά και διαφορετικά φυτικά είδη (Bejilali, 1996; Γαβαλάς, 2004). Μεταξύ των οικογενειών που περιλαμβάνουν φυτά γνωστά ως «ρίγανη», ιδιαίτερη θέση έχει η οικογένεια των Χειλανθών (Lamiaceae) καθώς περιέχει το γένος *Origanum*, το οποίο περιλαμβάνει δύο από τα πλέον γνωστά είδη ρίγανης διεθνώς - την ελληνική (*O. vulgare* subsp. *hirtum*) και την τουρκική (*Origanum onites*) (Bernáth, 1996).

Στον ελλαδικό χώρο χρησιμοποιούνται ως αρτύματα κυρίως τέσσερα είδη φυτών με την ονομασία «ρίγανη»: το *Coridothymus capitatus* (γνωστό διεθνώς ως ισπανική ρίγανη), το *Satureja thymbra*, το *Origanum onites* και το *Origanum vulgare*. Σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας αναφέρονται στα δύο πρώτα είδη επίσης σαν θρούμπι, αγριορίγανη ή και θυμάρι. Όλα αυτά τα είδη, πλην του *O. vulgare*, συναντώνται σε περιοχές με φρυγανικού τύπου βλάστηση και υψόμετρο 0-600 m, ενώ παρουσιάζουν σχετικά μικρή μορφολογική και χημική ποικιλότητα.



Το είδος *O. vulgare* έχει τη μεγαλύτερη εξάπλωση και είναι το πλέον ποικιλόμορφο είδος ρίγανης στην Ελλάδα (Kokkini and Vokou, 1989; Λαγούρη, 1998). Το είδος αυτό είναι γνωστό από τα αρχαία χρόνια τόσο για τις ευεργετικές του ιδιότητες, όσο και για το ξεχωριστό άρωμά του (Πολυσίου, 2002).

Οι φαρμακευτικές χρήσεις της ρίγανης χρονολογούνται από την αρχαιότητα, από την εποχή των αρχαίων Ελλήνων, όπου τα φύλλα της χρησιμοποιούνταν για τη θεραπεία δερματικών παθήσεων, για την ανακούφιση των πονεμένων μυών, ακόμη και ως αντισηπτικό. Η ρίγανη έχει επίσης χρησιμοποιηθεί σε παραδοσιακά φάρμακα για παθήσεις όπως το άσθμα, κράμπες, διάρροια και δυσπεψία (Baser, 2008; Iowa University Libraries, 2023; Singletary, 2010). Στην Ελλάδα, το έγχυμα ρίγανης χρησιμοποιείται ακόμα ως λαϊκή θεραπεία κατά του κρυολογήματος και των στομαχικών διαταραχών (Πιερρακέας, 1971).

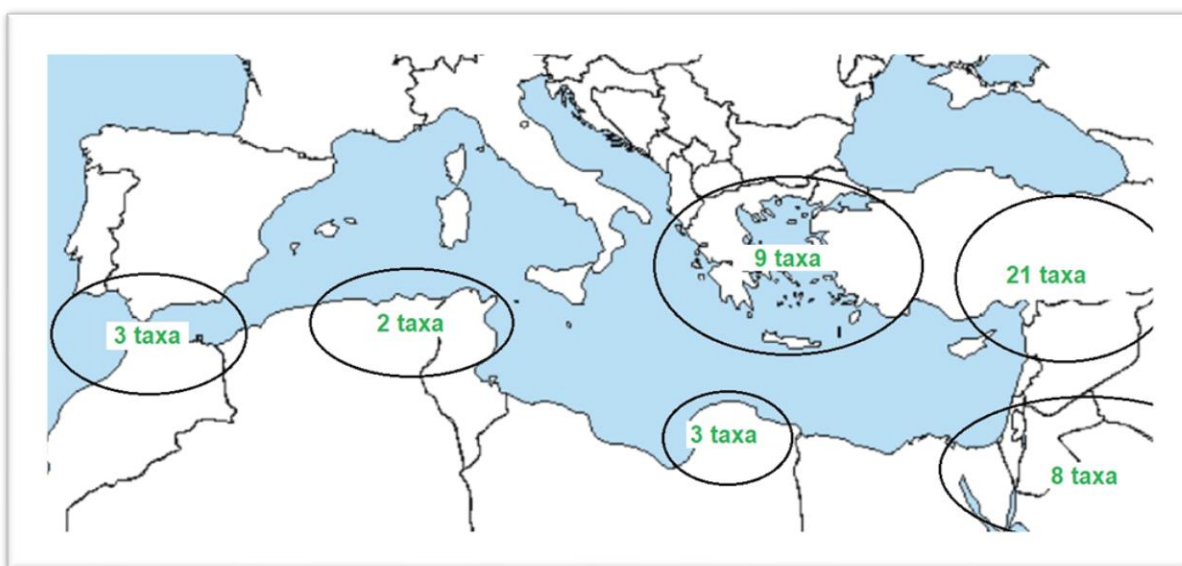
Σήμερα, η ρίγανη συνεχίζει να κατέχει σπουδαίο ρόλο στην καθημερινή μας ζωή, με το άρωμά της να είναι αναντικατάστατο σε πολλά φαγητά, ενώ τα φυτικά μέρη της και τα αιθέρια έλαιά της χρησιμοποιούνται ευρύτατα ως αρώματα από τη Βιομηχανία Τροφίμων παγκοσμίως.

1.2. Το γένος *Origanum*

Βοτανική ταξινόμηση-Μορφολογία

Τα είδη του γένους *Origanum* είναι ημιθαμνώδη ή πολυετή ποώδη φυτά με πολλούς βλαστούς, όρθιους ή ανυψούμενους, ημιέμμισχα ή έμμισχα φύλλα και άνθη σε έλικες ομαδοποιημένα σε πυκνούς ή χαλαρούς βότρες οι οποίοι διατάσσονται σε κορυμβοειδή ή σύνθετη βοτρυοειδή ταξιανθία (Kokkini, 1996). Στη φύση απαντώνται σε ξηρά, βραχώδη ασβεστολιθικά εδάφη, κυρίως στις ορεινές περιοχές της νότιας Ευρώπης, της νοτιοδυτικής Ασίας και των μεσογειακών χωρών. Η ριζική δομή των φυτών του γένους αυτού είναι τέτοια που δεσμεύει το έδαφος και το αποτρέπει να ξεπλένεται σε απότομες πλαγιές (Kintzios, 2002). Το γένος περιλαμβάνει φυτά ευρέως γνωστά σε όλο τον κόσμο με σπουδαία οικονομική σημασία, η οποία δεν περιορίζεται μόνο στη χρήση αυτών ως αρώματα (Kokkini, 1996).

Το γένος *Origanum* (φυλή *Mentheae*, οικογένεια *Lamiaceae*) χαρακτηρίζεται από μεγάλη μορφολογική και χημική ποικιλότητα, γεγονός που καθιστά τη βοτανική ταξινόμηση των ειδών του δύσκολη. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το γένος *Origanum* έχει διαχωριστεί σε δέκα τμήματα (sections) τα οποία αποτελούνται από 42 είδη ή 49 taxa (είδη, υποείδη, ποικιλίες), με 46 από αυτά να παρουσιάζουν συγκεκριμένη τοπική κατανομή στο χώρο της Μεσογείου (**Εικόνα 1**) (Carlström, 1984; Danin, 1990; Danin and Künne, 1996; Ietswaart, 1980; Kokkini, 1996).



Εικόνα 1. Κατανομή των *Origanum* taxa στο χώρο της Μεσογείου (Kokkini, 1996).

Ακολουθώντας την ταξινόμηση κατά Ietswaart, προκύπτουν τα εξής 10 sections (Ietswaart, 1980; Kokkini, 1996):

- I. *Section Amaracus* (Gleditsch) Benthām (περιλαμβάνει επτά είδη, όλα εντοπισμένα στο χώρο της ανατολικής Μεσογείου).
- II. *Section Anatolicon* Benthām (περιλαμβάνει οχτώ είδη, με περιορισμένη κατανομή σε Ελλάδα, Μ. Ασία, Λίβανο και Λιβύη).
- III. *Section Brevifilamentum* Ietswaart (περιλαμβάνει έξι είδη, στενοενδημικά κυρίως στο ανατολικό κομμάτι της Τουρκίας).
- IV. *Section Longitubus* Ietswaart (περιλαμβάνει ένα μόνο είδος, εντοπισμένο στην οροσειρά Νουρ στα σύνορα Τουρκίας-Συρίας).

- V. *Section Chilocalyx* (Briquet) Ietswaart (περιλαμβάνει τέσσερα είδη, στενοενδημικά της Νότιας Ανατολίας και της Κρήτης).
- VI. *Section Majorana* (Miller) Bentham (περιλαμβάνει τρία είδη που χαρακτηρίζονται από πράσινα βράκτια και μονόχειλους κάλυκες. Στην Ελλάδα απαντάται το είδος: *O. onites* L.).
- VII. *Section Campanulaticalyx* Ietswaart (περιλαμβάνει έξι είδη, ενδημικά της Ιορδανίας, του Ισραήλ και του βόρειου Σινά).
- VIII. *Section Elongatispica* Ietswaart (περιλαμβάνει τρία είδη, στενοενδημικά της Βόρειας Αφρικής).
- IX. *Section Origanum* (περιλαμβάνει μόνο ένα είδος, το *O. vulgare*, το οποίο είναι ευρέως διαδεδομένο σε περιοχές της Ευρασίας και της Βορείου Αφρικής. Έχουν αναγνωριστεί έξι υποείδη του είδους αυτού, η κατανομή των οποίων απεικονίζεται στην **Εικόνα 2**).
- X. *Section Prolaticorolla* Ietswaart (περιλαμβάνει τρία είδη, ενδημικά στις ανατολικές και δυτικές περιοχές της Μεσογείου).



Εικόνα 2. Απλοποιημένη παρουσίαση της κατανομής των έξι υποειδών *O. vulgare*. Πάνω από τη γραμμή απεικονίζονται τα υποείδη που είναι φτωγά σε αιθέρια έλαια, ενώ κάτω από τη γραμμή τα υποείδη που είναι πλούσια σε αυτά (Kokkini, 1996).

Πέραν των έξι υποειδών του είδους *O. vulgare* L. που αναφέρονται παραπάνω, έχουν καταγραφεί και 17 υβρίδια από διασταυρώσεις διαφορετικών μεταξύ τους ειδών, τέσσερα εκ των οποίων απαντώνται μόνο ως τεχνητά προϊόντα (Ietswaart, 1980; Kokkini, 1996). Ωστόσο, καθώς το γένος *Origanum* συνεχίζει να αποτελεί αντικείμενο μελέτης, αναμένεται να ανακαλυφθούν και περισσότερα υβρίδια (Skoula and Harborne, 2002). Ευρύτερα διαδεδομένο υβρίδιο του γένους είναι το *Origanum × intercedens* Rechinger (*O. onites* × *O. vulgare* subsp. *hirtum*), το οποίο και σχηματίζει εκτεταμένους πληθυσμούς στα νησιά του Αιγαίου (Kokkini et al., 1991; Kokkini and Vokou, 1993).

Το είδος *Origanum vulgare* L.

Γενικά στοιχεία

Το είδος *O. vulgare* L. παρουσιάζει τη μεγαλύτερη εξάπλωση παγκοσμίως από όλα τα γνωστά συγγενικά του είδη, ενώ και στον ελλαδικό χώρο αποτελεί το πιο κοινό και διαδεδομένο από όλα τα άλλα. Παρουσιάζει εξαιρετική ποικιλομορφία, γεγονός που κατά το παρελθόν προκάλεσε σύγχυση στους διάφορους ερευνητές και οδήγησε σε μεγάλο αριθμό διαφορετικών ονομάτων σε διάφορα είδη και υποείδη, λόγω του επικαλυπτόμενου χαρακτήρα των διακριτών τους γνωρισμάτων (Spada and Perrino, 1997).

Τα φυτά αυτού του είδους είναι πολυετή, ξυλώδη, με βλαστούς που φτάνουν μέχρι και το ένα μέτρο, με αδένες από δύσκολα έως εύκολα διακριτούς, πυκνούς βότρες, καθαρά διακρινόμενους από τους βλαστούς και τα κλαδιά, κάλυκες πέντε οδόντων και δίχειλη στεφάνη (Kokkini et al., 1991). Ακόμα και μέσα στο ίδιο το είδος, ωστόσο, παρουσιάζονται σημαντικές μορφολογικές και χημικές διαφορές, οι οποίες έχουν οδηγήσει στο διαχωρισμό του είδους στα εξής έξι υποείδη:

<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:453395-1>,
<https://www.ipni.org/?q=Origanum%20vulgare%20subsp.%20hirtum>

και

- *O. vulgare* subsp. *glandulosum* (Desf.) Ietsw.
- *O. vulgare* subsp. *gracile* (K.Koch) Ietsw.

- *O. vulgare* subsp. *hirtum* (Link) A.Terracc. [isonym *O. vulgare* subsp. *hirtum* (Link) Ietsw.]
- *O. vulgare* subsp. *virens* (Hoffmanns. & Link) Bonnier & Layens
- *O. vulgare* subsp. *viridulum* (Martin-Donos) Nyman
- *O. vulgare* subsp. *vulgare*

Υποείδη που συναντώνται στον ελληνικό χώρο

Η γεωγραφική διαφοροποίηση του *O. vulgare* L. στην Ελλάδα αποτελεί ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αξιοσημείωτης ενδοειδικής ποικιλότητας (Kokkini, 1996). Τρία είναι τα βασικά υποείδη που απαντώνται στον ελληνικό χώρο, το *O. vulgare* subsp. *hirtum* (Link) Ietswaart (**Εικόνα 3**), το *O. vulgare* subsp. *viridulum* (Martin-Donos) Nyman (**Εικόνα 4**) και το *O. vulgare* subsp. *vulgare* (**Εικόνα 5**). Ο διαχωρισμός των υποειδών γίνεται λαμβάνοντας υπόψιν συγκεκριμένα κυρίως μορφολογικά αλλά και χημικά γνωρίσματα αυτών, όπως (Kokkini et al., 1991; Kokkini and Vokou, 1989; Vokou et al., 1993):

- η πυκνότητα του τριχώματος
- η παρουσία διακριτών ή μη άμισχων αδένων σε φύλλα, βράκτια και κάλυκες
- η αναλογία μήκους βρακτίων προς κάλυκα
- το χρώμα των βρακτίων και της στεφάνης
- η περιεκτικότητα σε αιθέρια έλαια και η σύνθεση αυτών

➤ *O. vulgare* subsp. *hirtum*



Εικόνα 3. Αριστερά: Παγκόσμια κατανομή του υποείδους *O. vulgare* subsp. *hirtum* (<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:60473145-2>)

Δεξιά: Φωτογραφία ενός δείγματος *O. vulgare* subsp. *hirtum* κατά την άνθησή του (Τσουμάνη Ελευθερία).

Το *O. vulgare* subsp. *hirtum* είναι αυτοφυές στην Αλβανία, τη Βουλγαρία, την Κύπρο, την Ελλάδα, την Τουρκία και τη Γιουγκοσλαβία (<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:60473145-2>). Τα φυτά του υποείδους δύναται να αναπτυχθούν σε υψόμετρο 1-1500 m και ευδοκιμούν σε εδάφη με ασβεστόλιθο και σπάνια με σχιστόλιθο ή σερπεντίνη, καθώς και σε ξηρά ηλιόλουστα μέρη κοντά σε ακτές αλλά και ορεινά δάση (Kokkini and Vokou, 1989). Διαθέτουν χαρακτηριστικούς, μεγάλους και πολυάριθμους αδένες στα φύλλα τους, ενώ το μήκος των βρακτίων τους έναντι του κάλυκα είναι από ισόμηκες ως διπλάσιο. Η άνθηση των φυτών του υποείδους μπορεί να λάβει χώρα από Μάιο ως Σεπτέμβριο και τα φυτά διακρίνονται εύκολα από τα μικρά πράσινα βράκτια και τα άσπρα άνθη τους (Karousou et al., 1998; Kokkini et al., 1991). Από τα τρία υποείδη *O. vulgare* που ευδοκιμούν στην Ελλάδα, το υποείδος αυτό έχει τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο (1,1-8,2%) (Kokkini et al., 1991; Kokkini and Vokou, 1989).

➤ *O. vulgare* subsp. *viridulum*



Εικόνα 4. Αριστερά: Παγκόσμια κατανομή του υποείδους *O. vulgare* subsp. *viridulum* (<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:77101344-1>)
Δεξιά: Φωτογραφία ενός δείγματος *O. vulgare* subsp. *viridulum* κατά την άνθησή του (https://portal.cybertaxonomy.org/flora-greece/cdm_dataportal/taxon/d30fb488-64e6-4aaa-ad71-177cca5a0aa3)

Η γηγενής περιοχή αυτού του υποείδους εκτείνεται από τη Ν. Ευρώπη έως τα Ιμαλάια. Πρόκειται για πολυετές φυτό το οποίο αναπτύσσεται σε ανοίγματα δασωδών εκτάσεων και υψόμετρο 400-1400 m, ενώ ευδοκimeί κυρίως σε εύκρατες συνθήκες και εδάφη με ασβεστόλιθο και σπάνια με σερπεντίνη (Kokkini and Vokou, 1989) (<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:77101344-1>). Τα φυτά *O. vulgare* subsp. *viridulum* διαθέτουν λίγους, μικρούς και δυσδιάκριτους αδένες στα φύλλα τους, ενώ το μήκος των βρακτίων τους έναντι του κάλυκα είναι σχεδόν διπλάσιο. Η άνθηση των φυτών μπορεί να λάβει χώρα από τον Ιούνιο ως και τον Οκτώβρη και διακρίνονται από τα μεγάλα πράσινα βράκτια και τα άσπρα άνθη τους (Kokkini, 1996; Kokkini et al., 1991). Η περιεκτικότητα των φυτών του υποείδους σε αιθέριο έλαιο κυμαίνεται από 0,3-0,8% (Kokkini et al., 1994; Kokkini and Vokou, 1989).

➤ *O. vulgare* subsp. *vulgare*

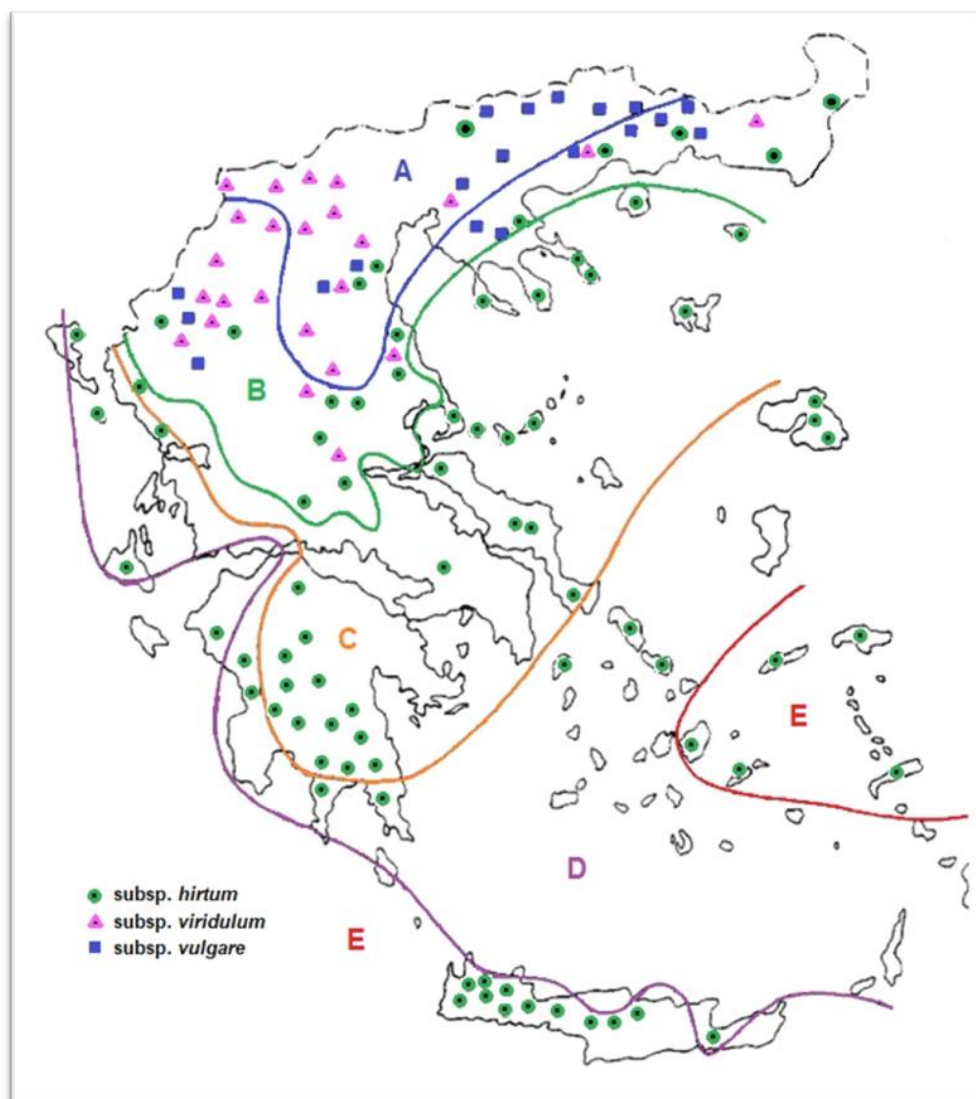


Εικόνα 5. Πάνω: Παγκόσμια κατανομή του υποείδους *O. vulgare* subsp. *vulgare* (οι γηγενείς πληθυσμοί του φυτού σημειώνονται με πράσινο και οι εισαχθέντες με μωβ). Δεξιά: Φωτογραφία ενός δείγματος *O. vulgare* subsp. *vulgare* κατά την άνθησή του. (<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:77171469-1> και <https://pallano.altervista.org/origanum-vulgare-subsp-vulgare.html>)

Το υποείδος *O. vulgare* subsp. *vulgare* είναι αυτοφυές στις περισσότερες περιοχές της Ευρώπης και της Ασίας, ενώ αποτελεί εισαχθέν είδος σε διάφορες παραθαλάσσιες κυρίως περιοχές της Αμερικής. Πρόκειται για πολυετές φυτό το οποίο αναπτύσσεται σε ανοίγματα φυλλοβόλων δασών και υψόμετρο 600-2000 m, ενώ ευδοκίμει κυρίως σε εύκρατες συνθήκες και εδάφη με ασβεστόλιθο και σχιστόλιθο (Kokkini and Vokou, 1989) (<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:77171469-1>). Τα φυτά *O. vulgare* subsp. *vulgare* διαθέτουν λίγους, μικρούς και δυσδιάκριτους αδένες στα φύλλα τους, ενώ το μήκος των βρακτίων τους έναντι του κάλυκα είναι σχεδόν διπλάσιο. Η άνθηση των φυτών μπορεί να λάβει χώρα από τον Ιούλιο ως και

τον Οκτώβρη και διακρίνονται από τα χαρακτηριστικά ιώδη βράκτια και τα ιώδη άνθη τους (Kokkini, 1996; Kokkini et al., 1991). Η περιεκτικότητα των φυτών του υποείδους σε αιθέριο έλαιο κυμαίνεται από 0,1-0,3% και το ποσοστό καρβακρόλης στο αιθέριο έλαιό τους δεν ξεπερνά το 0,1% (Kokkini et al., 1994; Kokkini and Vokou, 1989).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το εύρος εξάπλωσης των τριών υποειδών στη χώρα μας σχετίζεται άμεσα με τις επικρατούσες κλιματικές συνθήκες της κάθε περιοχής (Εικόνα 6) (Kokkini et al., 1994).



Εικόνα 6. Κατανομή των τριών υποειδών του *O. vulgare* L. στις πέντε κλιματικές ζώνες: A: Ηπειρωτική-Μεσογειακή, B: Μεταβατική, C: Κύρια Μεταβατική, D: Πραγματική Μεσογειακή και E: Πραγματική Μεσογειακή υψηλότερης σταθερότητας (Kokkini et al., 1994).

Η Ελλάδα είναι μια χώρα που χαρακτηρίζεται από σημαντικές κλιματολογικές και τοπογραφικές διαφορές. Αν και γενικά θεωρείται ότι βρίσκεται εξ ολοκλήρου εντός της μεσογειακής κλιματικής ζώνης, εντούτοις παρουσιάζει σημαντικές διακυμάνσεις σε αρκετές κλιματολογικές παραμέτρους, με κυριότερες από αυτές να είναι οι κατά τόπους θερμοκρασίες τους χειμερινούς μήνες και οι καλοκαιρινές βροχοπτώσεις (Κοτίνη-Ζαμπάκα, 1983). Δεν είναι τυχαία επομένως η διασπορά του είδους *O. vulgare* και των υποειδών του στις διάφορες κλιματικές ζώνες της Ελλάδας. Έτσι, το υποείδος *hirtum* απαντάται κυρίως στη νησιωτική χώρα, τη νότια ενδοχώρα και σε χαμηλές παράκτιες περιοχές της Βόρειας Ελλάδας, ενώ αρχικά το subsp. *viridulum* και έπειτα το subsp. *vulgare* φαίνεται σταδιακά να το αντικαθιστούν όσο κινούμαστε βορειότερα (Kokkini et al., 1994, 1991).

1.3. Η ελληνική ρίγανη

Από το σύνολο των ειδών που χρησιμοποιούνται παγκοσμίως ως αρτύματα ρίγανης, το φυτό *O. vulgare* subsp. *hirtum* είναι εκείνο που είναι ευρέως γνωστό με την εμπορική ονομασία «Greek oregano» («ελληνική ρίγανη»). Συλλέγεται σε όλα τα μέρη του ελλαδικού χώρου και αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος της ρίγανης που εξάγεται (Σκρουμπής, 1985).



Εικόνα 7. Μορφολογικά χαρακτηριστικά ενός φυτού ρίγανης *O. vulgare* subsp. *hirtum* (Τσουμάνη Ελευθερία).

Με βάση τη βιβλιογραφία, το *O. vulgare* subsp. *hirtum* φαίνεται να υπερτερεί ποιοτικά έναντι άλλων φυτών ρίγανης, γεγονός που οφείλεται κυρίως στην υψηλή περιεκτικότητά του σε αιθέρια έλαια και την εξαιρετική ποιότητα αυτών (Calprouzos, 1954; Fleisher and Fleisher, 1988; Fleisher and Sneer, 1982; Kokkini and Vokou, 1989; Lawrence, 1984).

Το φυτό *O. vulgare* subsp. *hirtum* (**Εικόνα 7**) είναι μια έντονα αρωματική, πολυετής πόα η οποία αυτοφύεται σε μεγάλη ποικιλία εδαφών και κλιμάτων, από παραθαλάσσιες έως ορεινές περιοχές, στη νησιώτικη και την ηπειρωτική Ελλάδα (Vokou et al., 1993). Πρόκειται για θαμνώδες φυτό που φτάνει σε ύψος από 30 έως και 80 εκατοστά. Στην αρχή της ανάπτυξής του οι βλαστοί του είναι έρποντες και τριχωτοί, ενώ τα φύλλα του έχουν χρώμα πρασινοσταχτί και είναι ωοειδή με τριχώματα και αντίθετης διάταξης. Τα τριχώματα, τα οποία μπορεί να είναι αδενικά ή μη, είναι άφθονα και αναδίδουν τη χαρακτηριστική μυρωδιά της ρίγανης (**Εικόνα 8**).



Εικόνα 8. Τριχώματα στην επιφάνεια των φύλλων ρίγανης *O. vulgare* subsp. *hirtum* (Τσουμάνη Ελευθερία).

Τα αδενικά τριχώματα της άνω επιφάνειας των φύλλων είναι αυτά που είναι αποκλειστικά αρμόδια για τη βιοσύνθεση των αιθέριων ελαίων του φυτού. Καθώς οι έρποντες βλαστοί ακουμπούν στο έδαφος βγάζουν επιγενείς ρίζες και αργά την άνοιξη, αφού ριζώσουν, εκπύσσονται από αυτούς νέα πλαγιόκλαδα, έως και ορθόκλαδα, ανθοφόρα στελέχη. Τα άνθη των στελεχών είναι μικρά με δίχειλη, συμπέταλη, λευκή στεφάνη και σωληνοειδή κάλυκα με πέντε οδόντες. Οι ανθοφόροι και κατόπιν καρποφόροι βλαστοί ξηραίνονται, αλλά στις αρχές του φθινοπώρου τα φυτά εκπύσσουν νέους έρποντες βλαστούς. Τα σπέρματα είναι ιδιαίτερα μικρού μεγέθους, 10.000 από αυτούς ζυγίζουν μόλις ένα γραμμάριο και είναι χρώματος καφέ (Δόρδας, 2012).

1.4. Στοιχεία και τύποι καλλιέργειας της ρίγανης

Το φυτό *O. vulgare* subsp. *hirtum* είναι ιδιαίτερα ανθεκτικό καθώς μπορεί και αναπτύσσεται σε διάφορα υψόμετρα, τόσο σε παραθαλάσσιες, όσο και ημιορεινές ή ορεινές περιοχές, καθώς και σε επικλινή, άγονα και μέτριας γονιμότητας εδάφη. Η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξής του είναι 18-22°C, με όριο ανάπτυξης 4-33°C, ενώ τα φυτά πλέον του ενός έτους αντέχουν σε εύρος θερμοκρασιών από -25 έως +42°C. Επιπλέον, το φυτό αυτό δημιουργεί πολυάριθμες παραφυάδες με πολλές ρίζες, με συνέπεια να προστατεύει τα εδάφη όπου φύτεται από τη διάβρωση και να συγκρατεί το επιφανειακό τμήμα της γης (Γκόλιαρης, 1992; Τζουραμάνη κ.α., 2008).

Λαμβάνοντας υπόψιν όλα τα παραπάνω, μαζί με το γεγονός ότι η καλλιέργεια της ρίγανης μπορεί να είναι εκμεταλλεύσιμη για αρκετά χρόνια, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για μια καλλιέργεια χωρίς ιδιαίτερες απαιτήσεις, εν συγκρίσει με τις μεγάλες καλλιέργειες, ιδανική για αναξιοποίητες και άγονες εκτάσεις (Γκόλιαρης, 1992; Σταματόπουλος, 2006; Τσιγαρίδα κ.α., 2002).



Εικόνα 9. Βιολογική, ξηρική καλλιέργεια ρίγανης στο Λούρο Πρεβέζης (2017)
(Πηγή: Δάσκαλος Δ.- παραγωγός).

Η καλλιέργεια της ρίγανης μπορεί να είναι ξηρική ή ποτιστική, συμβατική ή βιολογική (**Εικόνα 9**). Η επιλογή του τύπου της καλλιέργειας επηρεάζει άμεσα την απόδοση του φυτού σε μάζα, καθώς και την τελική του ποιότητα. Επομένως, όταν το φυτό της ρίγανης καλλιεργείται κάτω από ξηρικές συνθήκες δίνει πολύ καλής ποιότητας προϊόν, αλλά η παραγωγή είναι μικρής απόδοσης. Αντίθετα, όταν η καλλιέργεια της ρίγανης είναι ποτιστική, η ποσότητα του προϊόντος αυξάνει, αλλά η ποιότητά του υποβαθμίζεται. Κατά συνέπεια, για να διατηρηθεί η καλή ποιότητα του φυτού της ρίγανης θα πρέπει να αποφεύγεται η καλλιέργειά του σε πλήρως αρδευόμενους αγρούς, αν και είναι θεμιτό να πραγματοποιούνται 1-2 ποτίσματα κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού ώστε να διατηρηθεί το φυτό της ρίγανης σε ένα καλό επίπεδο χωρίς να επηρεάζεται η ποιότητά του (Σκρουμπής, 1985, 1978). Η βιολογική γεωργία είναι ένα σύστημα παραγωγής το οποίο αποκλείει τη χρήση χημικών λιπασμάτων, φυτοφαρμάκων και παρασιτοκτόνων στη φυτική παραγωγή, γεγονός που επηρεάζει αναπόφευκτα την απόδοση σε προϊόν. Αντίθετα, η συμβατική καλλιέργεια ρίγανης, λόγω του εντατικού της ρυθμού, δίνει παραγωγή μεγαλύτερης

απόδοσης συγκριτικά με τη βιολογική. Ωστόσο, η ποιότητα της βιολογικής ρίγανης είναι σαφώς υψηλότερη από αυτή της συμβατικής καθώς υπερτερεί σημαντικά σε αντιοξειδωτικές ουσίες και στερείται επιβλαβών χημικών (Hallmann and Sabała, 2020).

2. ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ

2.1. Γενικά

Σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Χημικών Προϊόντων (ECHA- European Chemicals Agency), ως αιθέριο έλαιο ορίζεται το πτητικό μέρος ενός φυσικού προϊόντος, το οποίο μπορεί να ληφθεί είτε με απόσταξη, είτε με απόσταξη με υδρατμούς ή, στην περίπτωση των εσπεριδοειδών, με έκθλιψη. Ο χαρακτηρισμός ενός ελαίου ως «αιθέριο» έγκειται στο γεγονός ότι φέρει τη διακριτική μυρωδιά, ή το άρωμα του φυτού (<https://echa.europa.eu/el/support/substance-identification/sector-specific-support-for-substance-identification/essential-oils>). Να σημειωθεί, ωστόσο, ότι η χημική σύσταση των αιθέριων ελαίων που παραλαμβάνονται μετά από απόσταξη ενδέχεται να διαφέρει αρκετά από αυτή του ελαιώδους περιεχομένου των φυτικών κυττάρων, όπως και το άρωμα των αιθέριων ελαίων από το άρωμα των φυτών που αναπτύσσονται στο φυσικό τους περιβάλλον (Baser and Buchbauer, 2010).

Τα αιθέρια έλαια, μαζί με τα αλκαλοειδή και τα φαινολικά συστατικά, είναι σημαντικά συστατικά του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών και προέρχονται από ποικίλα τμήματα αυτών. Η χημική τους ανάλυση έχει δείξει ότι δεν πρόκειται για καθαρές χημικά ουσίες αλλά για μίγματα διαφόρων ενώσεων με διαφορετικές χημικές και φυσικές ιδιότητες (Guenther, 1947). Η σύνθεσή τους αποτελείται κατά βάση από μόνο- και σεσκιτερπενικούς υδρογονάνθρακες (κυρίως τερπένια) καθώς και οξυγονωμένα (υδροξυλ- και καρβονυλ-) παράγωγά αυτών μαζί με αλειφατικές αλδεϋδες, αλκοόλες και εστέρες. Τα τερπένια, η πιο συχνά απαντώμενη ομάδα ενώσεων στα αιθέρια έλαια, μπορούν να θεωρηθούν ως η πιο δομικά ποικιλόμορφη κατηγορία φυτικών φυσικών προϊόντων, τα οποία προέρχονται ουσιαστικά από την επαναλαμβανόμενη μίξη διακλαδισμένων μονάδων ισοπρενίου ($\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}=\text{CH}_2$) (Baser and Buchbauer, 2010).

Ο Διεθνής Οργανισμός Τυποποίησης (International Organization for Standardization, ISO) έχει αναπτύξει κατάλληλα πρότυπα για τα αιθέρια έλαια τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για σκοπούς χαρακτηρισμού και ταυτοποίησης πολλών φυσικών προϊόντων (<https://www.iso.org/committee/48956/x/catalogue/>). Η χημική σύσταση των αιθέριων ελαίων και οι φυσικές τους σταθερές (ειδικό βάρος, δείκτης

διαθλάσεως, κ.α.) αποτελούν βασικά εργαλεία για την ταυτοποίησή τους και τον προσδιορισμό της ποιότητά τους. Σήμερα, με τη χρήση σύγχρονων μεθόδων όπως η Αέρια Χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC) σε συνδυασμό με τη Φασματομετρία Μαζών (Mass Spectrometry) μπορεί να πραγματοποιηθεί ο προσδιορισμός των συστατικών των αιθέριων ελαίων ταχύτατα, με ακρίβεια και με πολύ μικρή ποσότητα αιθέριου ελαίου (D'Antuono et al., 2000).

Τα αιθέρια έλαια των ΑΦΦ έχουν χρησιμοποιηθεί από την αρχαιότητα τόσο ως θεραπευτικά μέσα, όσο και ως καλλυντικά (**Εικόνα 10**). Στις μέρες μας, η χρήση τους βασίζεται σε επιστημονικά δεδομένα που προέκυψαν μετά από συστηματική έρευνα και βρίσκουν εφαρμογή σε βιομηχανίες φαρμάκων, αρωμάτων, καλλυντικών, αλλά και τροφίμων και ποτών (Guenther, 1947).



Εικόνα 10. Απεικόνιση αρωματικών προσφορών σε αιγυπτιακό πάπυρο (13ος αι. π.Χ.).

Το άρωμα του κάθε αιθέριου ελαίου φαίνεται να είναι η συνισταμένη όλων των επιμέρους αρωματικών ενώσεων και της υφιστάμενης αναλογίας τους στο συνολικό έλαιο και αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα για το κάθε φυτό (Βογιατζή-Καμβούκου, 2004; Δόρδας, 2009).

Η χημική ταυτότητα των αυτοφυών ή καλλιεργούμενων ΑΦΦ προσδιορίζεται από (i) την ποσότητα του αιθέριου ελαίου που παράγουν και (ii) από την ποιοτική και ποσοτική σύσταση των αιθέριων ελαίων (δηλαδή το είδος των ενώσεων που συνιστούν το αιθέριο έλαιο και την εκατοστιαία συμμετοχή τους). Γενικά, τα αρωματικά φυτά εμφανίζουν μεγάλη ποικιλία τόσο στην περιεκτικότητά τους σε

αιθέρια έλαια, όσο και στην ποιοτική και ποσοτική σύσταση τους (Kokkini et al., 1991; Kokkini and Vokou, 1989).

2.2. Τεχνικές παραλαβής αιθέριων ελαίων

Στο πέρασμα των χρόνων ενώ οι μέθοδοι, οι τρόποι και οι τεχνικές παραλαβής των αιθέριων ελαίων έχουν βελτιωθεί και εξελιχθεί, στη βασική τους θεωρία δεν φαίνεται να έχουν αλλάξει και πολύ. Η συχνότερη και πιο απλή μέθοδος παραλαβής των αιθέριων ελαίων είναι η απόσταξη, ενώ χρησιμοποιούνται και άλλες τεχνικές όπως η εκχύλιση και η μηχανική παραλαβή, αλλά και η εκχύλιση με υπέρηχους, μικροκύματα ή υπερκρίσιμα υγρά. Σε βιομηχανική κλίμακα οι βασικές τεχνικές που ακολουθούνται είναι η απόσταξη και η εκχύλιση (Κατσιώτης, 1997).

Η μέθοδος παραλαβής των αιθέριων ελαίων με απόσταξη διακρίνεται σε τρία βασικά είδη, τα οποία θεωρητικά δε διαφέρουν μεταξύ τους, αλλά πρακτικά παρουσιάζουν διαφορές που επιδρούν ποικιλοτρόπως στα τελικά προϊόντα:

- Απόσταξη με νερό ή Υδραπόσταξη (water distillation)
- Απόσταξη με νερό και υδρατμούς ή Υδροατμοαπόσταξη (water and steam distillation)
- Απόσταξη με υδρατμούς (steam distillation)



Εικόνα 11. Εργαστηριακή συσκευή απόσταξης αιθέριων ελαίων τύπου Clevenger (Εργαστήριο Χημείας Τροφίμων, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 2020).

Η τεχνική που προτιμάται στο εργαστήριο, όσον αφορά τον έλεγχο της συνολικής περιεκτικότητας σε αιθέριο έλαιο μικρών ποσοτήτων αρωματικών φυτών, είναι αυτή της υδραπόσταξης η οποία πραγματοποιείται κυρίως με τη χρήση της συσκευής Cleverger (**Εικόνα 11**). Στη βιομηχανία, ωστόσο, η τεχνική αυτή αποφεύγεται και προτιμώνται η εκχύλιση και οι υπόλοιπες εναλλακτικές τεχνικές απόσταξης καθώς η υδραπόσταξη είναι αρκετά χρονοβόρα διαδικασία και ενέχει τον κίνδυνο της υδρόλυσης των διαφόρων συστατικών του αιθέριου ελαίου και την επακόλουθη υποβάθμιση της ποιότητάς του (Σαρλής, 1994; Τσιγαρίδα κ.α., 2002).

Είναι σημαντικό τα αιθέρια έλαια μετά την παραλαβή τους, είτε με απόσταξη είτε με εκχύλιση, να διατηρούνται σε ερμητικά κλειστά δοχεία, σε δροσερό χώρο και μακριά από το φως. Το οξυγόνο της ατμόσφαιρας, με τη συνέργεια του φωτός, ενδέχεται να οξειδώσει τα συστατικά των αιθέριων ελαίων, ιδίως τα τερπενικά, προς σχηματισμό υπεροξειδίων και ρητινοειδών προϊόντων. Έτσι, κατά τη συνεχόμενη έκθεση στο φως και τον αέρα, τα αιθέρια έλαια αποκτούν σταδιακά λιγότερο ευχάριστο άρωμα και πιο σκούρο χρώμα, ενώ στο τέλος χάνουν τη ρευστότητά τους και κατ' επέκταση την εμπορευσιμότητά τους (Κατσιώτης, 1997).

2.3. Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή και τη σύσταση του αιθέριου ελαίου

Η παρουσία, η απόδοση και η σύνθεση των αιθέριων ελαίων στα φυτά μπορούν να επηρεαστούν από διάφορους παράγοντες, από το σχηματισμό τους σε αυτά μέχρι και την τελική τους απομόνωση. Η γνώση των παραγόντων που καθορίζουν τη χημική μεταβλητότητα και την απόδοση σε αιθέριο έλαιο είναι πολύ σημαντική, ιδιαίτερα όταν πρόκειται για εμπορικές καλλιέργειες ή στις περιπτώσεις που τα αιθέρια έλαια των φυτών χρησιμοποιούνται ως εργαλεία χημειοταξινόμησης (Figueiredo et al., 2008).

Οι πιο σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή και τη σύσταση των αιθέριων ελαίων, τόσο στα αυτοφυή, όσο και στα καλλιεργούμενα ΑΦΦ θεωρούνται οι εξής:

- > Το στάδιο ανάπτυξης του φυτού

- > Το μέρος του φυτού που αποστάζεται/εκχυλίζεται
- > Η ποικιλία
- > Η εποχή συλλογής
- > Το έδαφος
- > Οι κλιματολογικές συνθήκες
- > Η γεωγραφική θέση
- > Οι γενετικοί παράγοντες
- > Οι μετασλλεκτικοί χειρισμοί
- > Η μέθοδος παραλαβής αιθέριου ελαίου

(Baser and Buchbauer, 2010; Figueiredo et al., 2008; Guenther, 1947)

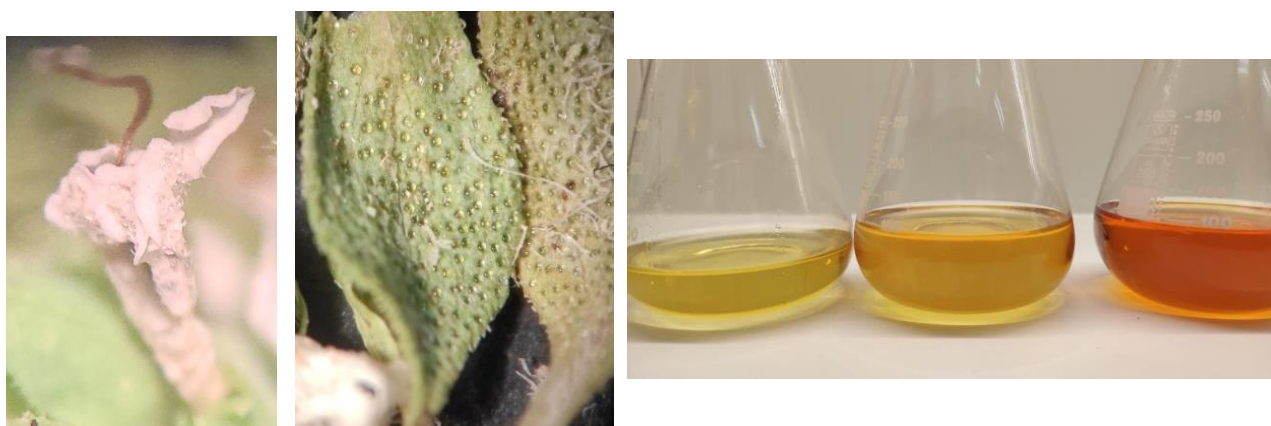
Συγκεκριμένα για τα φυτά *O. vulgare* έχει βρεθεί ότι το κλίμα, η εποχή της συλλογής αλλά και το έδαφος είναι δυνατόν να επηρεάσουν τη σύσταση της ρίγανης σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι η ποικιλία της, όπως επίσης επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό και η μέθοδος παραλαβής των αιθέριων ελαίων (Alekseeva et al., 2020; Kokkini et al., 1994). Όταν πρόκειται για καλλιέργεια φυτών ρίγανης, σημαντικό ρόλο παίζει και ο τύπος αυτής στην απόδοση του φυτού σε αιθέριο έλαιο (βλ. **Κεφ. 1.4**).

Επιπλέον, τα εναέρια μέρη των φυτών *O. vulgare* φέρουν κάποιας μορφής τριχών οι οποίες μπορεί να είναι αδενώδεις ή μη αδενώδεις. Οι αδενώδεις τρίχες εντοπίζονται κυρίως στα φύλλα αλλά απαντώνται σε όλα τα εναέρια μέρη όπως στον κάλυκα, στη στεφάνη και στους στήμονες (**Εικόνα 12**) και είναι αποκλειστικά υπεύθυνες για την παραγωγή αιθέριου ελαίου. Ο αριθμός αυτών των τριχών, επομένως, στα φύλλα των φυτών *O. vulgare* σχετίζεται άμεσα με την παραγωγή του αιθέριου ελαίου από αυτά (Werker et al., 1985). Η διαπίστωση αυτή εξηγεί ικανοποιητικά τη διαφορά στην απόδοση σε αιθέριο έλαιο των τριών υποειδών *O. vulgare* που ευδοκιμούν στον ελλαδικό χώρο. Το φυτό *O. vulgare* subsp. *hirtum*, σε αντίθεση με τα subsp. *vulgare* και subsp. *viridulum*, διαθέτει μεγάλους και πολυάριθμους αδένες στα φύλλα του (βλ. **Κεφ. 1.2**) με αποτέλεσμα να αποδίδει και συγκριτικά μεγαλύτερες ποσότητες σε αιθέριο έλαιο (Bosabalidis and Kokkini, 1997; Kokkini et al., 1994; Kokkini and Vokou, 1989).

2.4. Χημική σύσταση αιθέριου ελαίου φυτών του είδους *O. vulgare*

Το αιθέριο έλαιο των φυτών του είδους *O. vulgare* είναι υγρό με απαλό κίτρινο ως πορτοκαλοκόκκινο χρώμα (**Εικόνα 12**). Διαθέτει πολύ έντονο άρωμα, το οποίο χαρακτηρίζει το φυτό, καθώς και δριμεία γεύση. Η περιεκτικότητα των αυτοφυών φυτών *O. vulgare* subsp. *hirtum* σε αιθέριο έλαιο κυμαίνεται μεταξύ ~2-10 ml/ 100g ξηρού φυτικού υλικού (2-10%), με την υψηλότερη τιμή μέχρι σήμερα να έχει καταγραφεί σε φυτά ρίγανης από το νησί της Ικαρίας (10%). Ωστόσο, σε βιομηχανική κλίμακα ο μέσος όρος κυμαίνεται σε χαμηλότερα επίπεδα, συνήθως από ~2 έως 4 ml/ 100g ξ.φ. (2-4%), χωρίς να αποκλείονται μικρότερες ή μεγαλύτερες αποδόσεις (Economou et al., 2011; Kirimer et al., 1995; Kokkini and Vokou, 1989).

Η χημική ανάλυση του αιθέριου ελαίου του *O. vulgare* subsp. *hirtum* έδειξε ότι περιέχει περισσότερες από 30 χημικές ενώσεις. Τα τέσσερα βασικά συστατικά του είναι η καρβακρόλη και/ή η θυμόλη, οι οποίες ανήκουν στις φαινολικές ενώσεις και αποτελούν μαζί περίπου το 80% του αιθέριου ελαίου, συνοδευόμενες από τα π-κυμένιο και γ-τερπινένιο που ανήκουν στους υδρογονάνθρακες (Adam et al., 1998; Goliaris et al., 2003; Russo et al., 1998). Σε μικρότερο ποσοστό ακολουθούν διάφορες ενώσεις της ίδιας κατηγορίας, όπως το α-πινένιο, το β-πινένιο, το θουαγένιο, το α-τερπινένιο, το β-καρυοφυλλένιο, το β-βισαβολένιο, το φελλανδρένιο και το σαβινένιο. Επιπλέον, απαντούν διάφορες αλκοόλες, όπως η κινεόλη, η λιναλοόλη, η βορνεόλη και η τερπινεόλη (Daferera et al., 2000; Kokkini et al., 2004; Russo et al., 1998; Vokou et al., 1993).

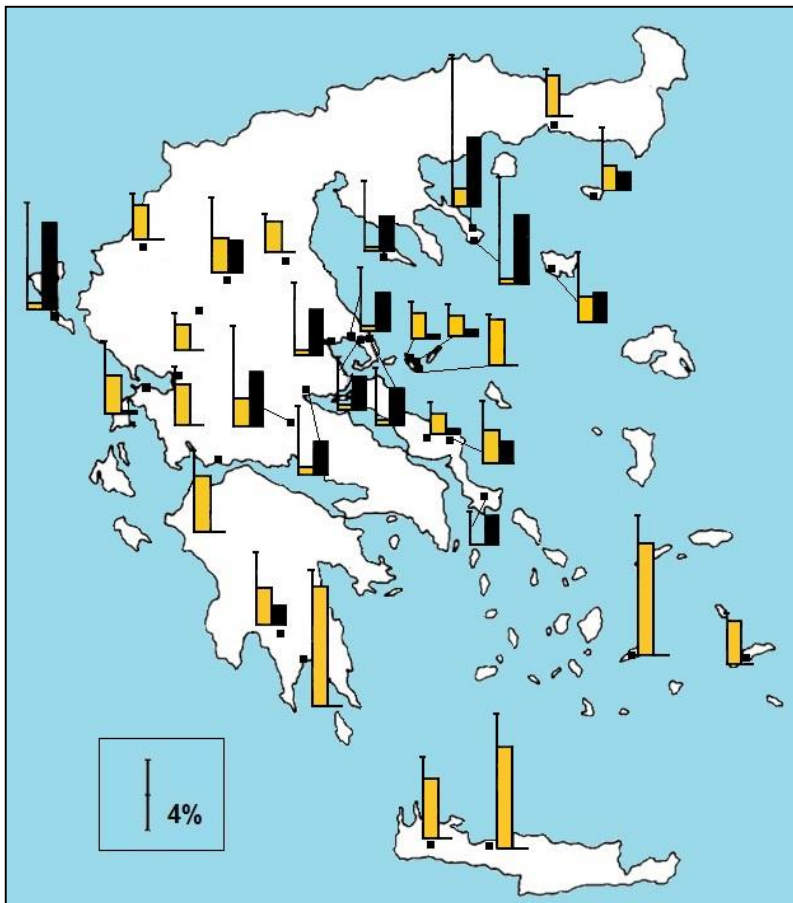


Εικόνα 12. Άνθος (αριστερά) και φύλλα ρίγανης (κέντρο) όπου διακρίνεται το «αποθηκευμένο» αιθέριο έλαιο στους αδένες (glandular peltate hairs) (φωτογραφίες από στερεοσκοπικό μικροσκόπιο), διαφορετικοί χρωματικοί τόνοι αιθέριου ελαίου ρίγανης (δεξιά) (Τσουμάνη Ελευθερία).

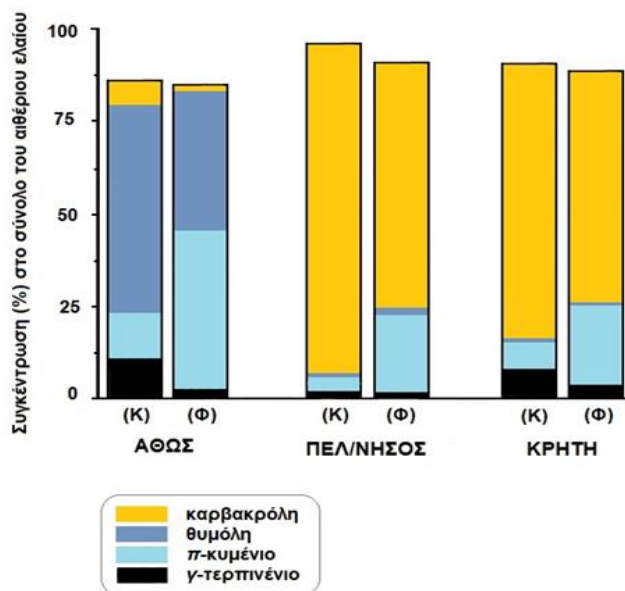
Η σύσταση του αιθέριου ελαίου της ρίγανης *O. vulgare* subsp. *hirtum* ενδέχεται να ποικίλλει σημαντικά, με την καρβακρόλη και τη θυμόλη να συμμετέχουν η καθεμία από ίχνη ως πάνω από 90%, προσδίδοντας ανάλογες διαφορές και στο άρωμα των φυτών. Έχει βρεθεί ότι μικρές διαφορές στο γενότυπο ατόμων του ίδιου υποείδους επηρεάζουν σημαντικά τη χημική σύσταση των δευτερογενών μεταβολιτών. Αυτές οι ενδοειδικές διαφορές οι οποίες είναι ανεξάρτητες από τις τοπικές συνθήκες καλλιέργειας ή οντογενετικής ανάπτυξης, έχουν ως αποτέλεσμα την ύπαρξη διαφορετικών χημειότυπων μέσα στο ίδιο υποείδος (Harborne and Turner, 1984). Στη διεθνή βιβλιογραφία έχουν καταγραφεί για το φυτό *O. vulgare* subsp. *hirtum* τρεις χημειότυποι, ανάλογα με την επικρατούσα φαινόλη στο αιθέριο έλαιό του. Στον χημειότυπο καρβακρόλης ανήκουν τα αιθέρια έλαια που χαρακτηρίζονται από υψηλή συγκέντρωση καρβακρόλης, στον χημειότυπο θυμόλης εκείνα που χαρακτηρίζονται από υψηλή συγκέντρωση θυμόλης, ενώ, τέλος, στον χημειότυπο θυμόλης-καρβακρόλης τα αιθέρια έλαια που περιέχουν θυμόλη-καρβακρόλη σε αναλογία 1:2 (Fleisher and Sneer, 1982).

Γενικά, οι ποσότητες καρβακρόλης και θυμόλης φαίνεται να παρουσιάζουν αρνητική συσχέτιση (**Εικόνα 13**) και το ίδιο ισχύει ανάμεσα στο άθροισμά τους και το άθροισμα των δύο υδρογονανθράκων γ-τερπινένιο και π-κυμένιο (Vokou et al., 1993). Σύμφωνα με τους Poulou & Croteau (1978), το γ-τερπινένιο και το π-κυμένιο αποτελούν τους βιοσυνθετικούς πρόδρομους (μέσω ενζυματικής υδροξυλίωσης) των δύο ισομερών φαινολών στο αιθέριο έλαιο του *Thymus vulgaris* (Poulou and Croteau, 1978), γεγονός που φαίνεται να ισχύει και στο αιθέριο έλαιο του *O. vulgare* subsp. *hirtum* (Vokou et al., 1993). Ένα διαφορετικό βιοσυνθετικό μονοπάτι πρότειναν σε πρόσφατη μελέτη τους οι Krause et al. (2021), το οποίο, ωστόσο, υποστηρίζει εκ νέου την κοινή βιοσυνθετική πορεία των τεσσάρων αυτών ενώσεων (Krause et al., 2021).

Ένα ενδιαφέρον σημείο είναι ότι παρ' όλες τις διαφορές που παρατηρούνται στη σύσταση των αιθέριων ελαίων ρίγανης λόγω εποχικότητας και γεωγραφικής θέσης, το άθροισμα των τεσσάρων κύριων συστατικών (γ-τερπινένιο + π-κυμένιο + θυμόλη + καρβακρόλη) φαίνεται να παραμένει πάντα σταθερό και να κυμαίνεται από ~85,0-97% (**Εικόνα 14**) (Kokkini et al., 1997).

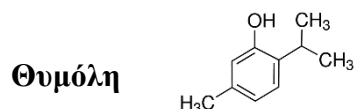


Εικόνα 13. Περιεκτικότητα και σύσταση των αιθέριων ελαίων του *O. vulgare* subsp. *hirtum* σε καρβακρόλη (πορτοκαλί μπάρες) και θυμόλη (μαύρες μπάρες) στον ελλαδικό χώρο (Vokou et al., 1993).

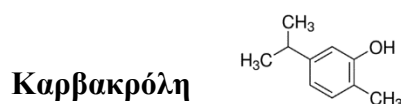


Εικόνα 14. Συγκέντρωση (%) των τεσσάρων βασικών συστατικών από δείγματα αιθέριων ελαίων *O. vulgare* subsp. *hirtum* συλλεγμένα από τρεις γεωγραφικές περιοχές της Ελλάδας κατά το καλοκαίρι (Κ) και το φθινόπωρο (Φ) (Kokkini et al., 1997).

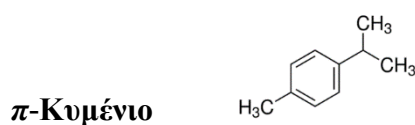
Παρατίθενται κάποιες πληροφορίες σχετικά με τα τέσσερα βασικά συστατικά του αιθέριου ελαίου ρίγανης:



Η θυμόλη, ή ισοπροπυλ-μ-κρεσόλη $[2-[(\text{CH}_3)_2\text{CH}]\text{C}_6\text{H}_3-5-(\text{CH}_3)\text{OH}]$ είναι μια φυσική μονοτερπενική φαινόλη που αποτελεί το ισομερές της καρβακρόλης. Είναι ένωση με χαρακτηριστική οσμή και καυστική γεύση, αδιάλυτη πρακτικά στο νερό αλλά πολύ ευδιάλυτη σε αλκοόλη, χλωροφόρμιο και αιθέρα. Η θυμόλη βρίσκεται στο αιθέριο έλαιο αρκετών ΑΦΦ, με κύριο αντιπρόσωπο το θυμάρι, ενώ εξάγεται ως λευκή κρυσταλλική ουσία με ισχυρές αντισηπτικές ιδιότητες (Budavari, 1989).

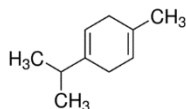


Η καρβακρόλη, ή ισοπροπυλ-ο-κρεσόλη $[(\text{CH}_3)_2\text{CHC}_6\text{H}_3(\text{CH}_3)\text{OH}]$ είναι μια άχρωμη, ελαιώδης ουσία που ανήκει και αυτή στα φαινολικά μονοτερπένια. Διαθέτει χαρακτηριστική μυρωδιά, έντονη γεύση και ενώ είναι πρακτικά αδιάλυτη στο νερό, διαλύεται εύκολα σε αλκοόλη και διαιθυλαιθέρα (Budavari, 1989). Απαντάται σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε όλα τα αιθέρια έλαια των φυτών ρίγανης, ενώ στο αιθέριο έλαιο του θυμαριού η ποσοστιαία περιεκτικότητα της καρβακρόλης κυμαίνεται συνήθως από 5-75% (v/v) (Kokkini and Vokou, 1989; Vernet et al., 1986).



Το π-κυμένιο, ή 1-μεθυλ-4-(1-μεθυλαιθυλ)- βενζόλιο $[\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}(\text{CH}_3)_2]$, είναι ένα υποκατεστημένο τολουόλιο το οποίο ανήκει στους μονοτερπενικούς υδρογονάνθρακες. Έχει χαρακτηριστική οσμή και γεύση κίτρου, ενώ είναι ένωση πρακτικά αδιάλυτη στο νερό και ευδιάλυτη σε αλκοόλη, αιθέρα, χλωροφόρμιο και οξικό οξύ (Budavari, 1989).

γ-Τερπινένιο



Το γ-τερπινένιο, ή 1-μεθυλ-4-(1-μεθυλαιθυλ)-1,4- κυκλοεξαδιένιο, είναι μια ελαιώδης ουσία που αποτελεί ισομερές των α- και β- τερπινενίων (διαφέρουν ως προς τη θέση του διπλού δεσμού) και ανήκει στους υδρογονάνθρακες. Έχει χαρακτηριστική ευχάριστη οσμή και γεύση λεμονιού. Είναι πρακτικά αδιάλυτη στο νερό και ευδιάλυτη σε αλκοόλη και αιθέρα. Το γ-τερπινένιο είναι φυσικής προελεύσεως και έχει απομονωθεί σε αιθέρια έλαια διαφόρων φυτικών ειδών (Eggersdorfer, 2000).

2.5. Βιολογική δράση αιθέριου ελαίου φυτών του είδους *O. vulgare*

Τα αιθέρια έλαια, όπως και τα εκχυλίσματα των φυτών του είδους *O. vulgare* είναι γνωστά για ένα μεγάλο εύρος δράσεων, μερικές εκ των οποίων περιγράφονται παρακάτω:

> Αντιβακτηριακή δράση

Έχει βρεθεί τόσο σε *in vitro* όσο και *in vivo* μελέτες ότι τα συστατικά του αιθέριου ελαίου της ρίγανης παρουσιάζουν μεγάλη αντιβακτηριακή δράση (Friedman et al., 2006; Gravanis et al., 2005; Mathlouthi et al., 2012; Moore-Neibel et al., 2013; Preuss et al., 2005; Sivropoulou et al., 1996). Συγκεκριμένα για τα τέσσερα βασικά συστατικά του αιθέριου ελαίου έχει διαπιστωθεί ότι:

Η καρβακρόλη αναστέλλει τη δράση των *Escherichia coli* και *Listeria monocytogenes* (Gill and Holley, 2006; Pérez-Conesa et al., 2011, 2006), καθώς και των *Salmonella typhimurium* και *Staphylococcus aureus* (Knowles et al., 2005; Netopilova et al., 2018; Rivas et al., 2010; Rúa et al., 2019). Επίσης έχει βρεθεί ότι είναι αποτελεσματική έναντι των *Salmonella enterica* (Ravishankar et al., 2010), *Vibrio cholerae* (Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2010), *Staphylococcus epidermidis* (Nostro et al., 2009), *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (Wong et al., 2008), *Campylobacter jejuni* (Ravishankar et al., 2008), *Enterobacter sakazakii* (Lee and Jin, 2008), *Pseudomonas aeruginosa* (Cox and Markham, 2007), *Latilactobacillus sakei* (Gill and Holley, 2006), *Brochothrix thermosphacta* (Di

Pasqua et al., 2006), καθώς και ένα πλήθος άλλων θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων που δεν αναφέρονται εδώ.

Η θυμόλη παρουσιάζει έντονη ανασταλτική δράση έναντι των μικροοργανισμών *Selenomonas ruminantium* και *Streptococcus bovis* (Evans and Martin, 2000). Επίσης δρα ανασταλτικά στην ανάπτυξη των *Botrytis cinerea*, *Fusarium* spp. και *Clavibacter michiganensis* (Daferera et al., 2003), των *L. monocytogenes* και *Bacillus subtilis* (Ettayebi et al., 2000), του *S. aureus* (Rúa et al., 2019), των *Porphyromonas gingivalis*, *Selenomonas artemidis*, *Streptococcus sobrinus* (Shapiro and Guggenheim, 1995) καθώς και πολλών άλλων.

Τέλος, η αντιβακτηριακή δράση των υπολοίπων συστατικών της ρίγανης, όπως το γ-τερπινένιο και το π-κυμένιο είναι δεδομένη, ωστόσο, μένει να μελετηθεί περαιτέρω το αποτέλεσμα της συνεργιστικής δράσης των συστατικών της (Bouhdid et al., 2008; Lu et al., 2018; Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2010; Sivropoulou et al., 1996). Η αντιβακτηριακή δράση τους θεωρείται ότι οφείλεται στην ικανότητα των φαινολικών ουσιών να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη μέσω της διάχυσης και να διεισδύουν στο εσωτερικό του βακτηριακού κυττάρου, όπου επιδρούν αρνητικά στους βιοχημικούς μηχανισμούς του μεταβολισμού του (Judis, 1963; Juven et al., 1972; Ultee et al., 1999).

> Αντιοξειδωτική - Αντικαρκινική δράση

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν σχετικά λίγες πληροφορίες για τους μηχανισμούς που προκαλούν αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο, τα φαινολικά συστατικά των αιθέριων ελαίων είναι αυτά που αναφέρονται συχνότερα ως υπεύθυνα για αυτή τη δράση. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των δευτερογενών μεταβολιτών δεν είναι μόνο σημαντική για την υγεία των φυτών, αλλά επίσης επιφέρει οφέλη στην ανθρώπινη υγεία όταν καταναλώνονται τα αρωματικά φυτά που τους περιέχουν (Tungmunthum et al., 2018).

Τα φαινολικά συστατικά των αιθέριων ελαίων των φυτών του είδους *O. vulgare* έχει βρεθεί ότι προσφέρουν τριπλή αποτελεσματική δράση: προστατεύουν τα λιπαρά τρόφιμα από τις βλαβερές συνέπειες της οξείδωσης, παρέχουν οφέλη για την υγεία ως αντιοξειδωτικά κατά την απορρόφησή τους στον εντερικό σωλήνα και δρουν

προστατευτικά για άλλες αντιοξειδωτικές ουσίες στα τρόφιμα, όπως οι ανθοκυανίνες. Η κατανάλωσή τους, συνεπώς, συμβάλλει στην αντιμετώπιση της φθοράς των κυττάρων, ενώ επιβραδύνει τη διαδικασία της γήρανσης. Ταυτόχρονα, οι αντιοξειδωτικές ουσίες δεσμεύουν τις βλαβερές ελεύθερες ρίζες, προλαμβάνοντας έτσι την εμφάνιση διαφόρων μορφών καρκίνου (Arcila-Lozano et al., 2004; Asensio et al., 2011; Baser, 2008; Olmedo et al., 2015; Rodriguez-Garcia et al., 2016; Terenina et al., 2011; Vekiari et al., 1993).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι φαινολικές ενώσεις που συναντάμε συνήθως στα φυτά *O. vulgare* subsp. *hirtum* και στις οποίες οφείλουν κάποιες από τις ευεργετικές τους ιδιότητες, είναι οι εξής (Gutiérrez-Grijalva et al., 2018; Özer et al., 2020):

- * Θυμόλη και καρβακρόλη: Πρόκειται για δύο από τα κύρια αρωματικά συστατικά του αιθέριου ελαίου της ελληνικής ρίγανης με σημαντική αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση.
- * Ροσμαρινικό οξύ: είναι μια σημαντική φαινολική ένωση που συναντάται σε πολλά φυτά, συμπεριλαμβανομένων των φυτών ρίγανης. Έχει ισχυρή δράση αντιοξειδωτικής προστασίας και μπορεί να συμβάλλει στην εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών.
- * Φλαβονοειδή: Τα πιο σημαντικά και γνωστά φλαβονοειδή που περιέχει η ελληνική ρίγανη είναι η ρουτίνη, η πεντουλετίνη και η κερκετίνη. Τα φλαβονοειδή αποτελούν ισχυρούς αντιοξειδωτικούς παράγοντες και συμβάλλουν στην προστασία των κυττάρων από οξειδωτική βλάβη.
- * Καφεϊκό οξύ: Πρόκειται για ένα φαινολικό οξύ με αντιοξειδωτικές ιδιότητες που έχει βρεθεί ότι συμβάλλει στην προστασία του δέρματος από τη βλάβη που προκαλεί η ηλιακή ακτινοβολία.

Επιπλέον, κάποια από τα φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα στα οποία αποδίδεται η αντιοξειδωτική δράση του αιθέριου ελαίου *O. vulgare* περιλαμβάνουν επίσης τα παράγωγα του λιθοσπερμικού οξέος και τις φλαβόνες απιγενίνη και λουτεολίνη (Cavero et al., 2006; Kikuzaki and Nakatani, 1989; Koukoulitsa et al., 2006).

Τα πολυφαινολικά συστατικά έχει βρεθεί ότι έχουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τα φαινολικά, έτσι το ροσμαρινικό οξύ φαίνεται να έχει πολύ μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση συγκριτικά με την καρβακρόλη και τη θυμόλη. Στην ίδια μελέτη επιβεβαιώνεται η αντιοξειδωτική δράση των μονοφαινολών, τόσο σε λιποσωμικά όσο και σε βιολογικά συστήματα, με την αντιοξειδωτική δράση της θυμόλης να είναι σημαντικά μεγαλύτερη συγκριτικά με τις άλλες μονοφαινόλες που εξετάστηκαν (Moure et al., 2001; Pearson et al., 1997).

Αρκετές μελέτες προτείνουν τη χρήση του αιθέριου ελαίου των φυτών *O. vulgare* ως φυσικό αντιοξειδωτικό παράγοντα στη Βιομηχανία Τροφίμων. Συγκεκριμένα, έχουν γίνει μελέτες σχετικά με την αντιοξειδωτική δράση των αιθέριων ελαίων και των εκχυλισμάτων φυτών ρίγανης (*O. vulgare*) σε τρόφιμα όπως κρεατικά, επιτραπέζια έλαια, ψάρια και τυροκομικά (Asensio et al., 2012; Beltrán et al., 2018; Fernandes et al., 2018, 2017; Sarikurkcü et al., 2015).

> Αντιμυκητιακή δράση

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η αντιμυκητιακή δράση των αιθέριων ελαίων σχετίζεται άμεσα με το είδος του φυτού από όπου προέρχονται και την περιεκτικότητά του σε αυτά. Εντονότερη αντιμυκητιακή δράση παρουσιάζουν οι φαινόλες, με τις αλκοόλες, τις κετόνες, τους αιθέρες και τους υδρογονάνθρακες να ακολουθούν (Biondi et al., 1993; Bullerman et al., 1977; Ebani and Mancianti, 2020; Γαβριήλ, 2013).

Τα φαινολικά συστατικά των αιθέριων ελαίων των φυτών *O. vulgare*, όπως και παρόμοιων φυτών με χημειότυπο καρβακρόλης/θυμόλης, είναι αυτά που κυρίως ευθύνονται για την ανασταλτική δράση έναντι στην ανάπτυξη μυκήτων όπως οι *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Fusarium* spp. και *Penicillium digitatum* (Biondi et al., 1993; Daferera et al., 2000; Manohar et al., 2001). Επιπλέον, τα μονοτερπένια του αιθέριου ελαίου της ρίγανης βρέθηκε ότι προκαλούν τη μείωση της αναπνευστικής δραστηριότητας του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, με συνέπεια να αναστέλλουν και τη σποροποίησή του λόγω εξάντλησης της κυτταρικής ενέργειας (Conner et al., 1984). Οι Adam et al. (1998) μελέτησαν τη δράση τεσσάρων αιθέριων ελαίων έναντι στους παθογόνους μύκητες *Malassezia furfur*, *Trichophyton rubrum*, και *Trichosporon beigeli*. Από τα

αιθέρια έλαια που εξετάστηκαν, το αιθέριο έλαιο *O. vulgare* subsp. *hirtum* παρουσίασε την υψηλότερη μυκητοκτόνο δράση (Adam et al., 1998).

> Άλλες δράσεις

Το αιθέριο έλαιο φυτών του είδους *O. vulgare*, πέραν του ότι είναι αποτελεσματικό έναντι μιας ευρείας γκάμας παθογόνων, έχει βρεθεί ότι επιδεικνύει και ισχυρές αντισηπτικές ιδιότητες. Δεν είναι καθόλου τυχαίο εξάλλου ότι τα τελευταία χρόνια η ρίγανη χρησιμοποιείται ευρέως ως πρόσθετο στις ζωοτροφές, καθώς έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλει στην υγιή χλωρίδα του εντέρου προστατεύοντας τα ζώα από διάφορες εντερικές λοιμώξεις (Betancourt et al., 2014; Cross et al., 2007; Scocco et al., 2017).

Τέλος, τα τελευταία χρόνια, σε μια προσπάθεια εύρεσης πιο φυσικών εναλλακτικών, ερευνάται η εντομοκτόνος και ζιζανιοκτόνος δράση των αιθέριων ελαίων φυτών του είδους *O. vulgare* και έχουν ήδη ξεκινήσει να κυκλοφορούν κάποια προϊόντα στην αγορά (Baricevic and Bartol, 2000). Σύμφωνα με διάφορες μελέτες, τόσο η καρβακρόλη, όσο και τα υπόλοιπα τερπενικά συστατικά του αιθέριου ελαίου ρίγανης έχουν αναγνωριστεί ως ανασταλτικά της βλάστησης και της ανάπτυξης (Elakovich, 1988; Fischer, 1986; Muller et al., 1964; Muller, 1986), ενώ έχουν και νηματωδοκτόνο δράση, είτε δρώντας τοξικά στα νεαρά άτομα, είτε παρεμποδίζοντας την εκκόλαψη των αυγών (Asplund, 1968; Ibrahim et al., 2006; Karpouhtsis et al., 1998; Oka et al., 2000; Pardavella et al., 2020).

Η Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας των Τροφίμων (European Food Safety Authority - EFSA), εξέδωσε το Δεκέμβριο του 2019 μια αναφορά σχετικά με τη χρήση του αιθέριου ελαίου *O. vulgare* subsp. *hirtum* (Link) Letsw. ως πρόσθετη ύλη σε τρόφιμα και ζωοτροφές. Η αναφορά αυτή κατέληξε στο συμπέρασμα ότι, υπό τους προτεινόμενους όρους χρήσης, το εν λόγω αιθέριο έλαιο δεν έχει δυσμενείς επιδράσεις στην υγεία των ζώων, στην υγεία των καταναλωτών ή στο περιβάλλον. Ωστόσο, γίνεται σύσταση να λαμβάνονται κατάλληλα μέτρα προστασίας για την πρόληψη δυσμενών επιδράσεων στην υγεία του ανθρώπου, ιδίως όσον αφορά τους χρήστες της πρόσθετης ύλης, καθώς το αιθέριο έλαιο θεωρείται ερεθιστικό για το δέρμα και τους οφθαλμούς και είναι δυνητικό ευαισθητοποιητικό του δέρματος και του αναπνευστικού συστήματος (Bampidis et al., 2019). Βασιζόμενη σε αυτή την αναφορά, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή προχώρησε τον Ιούλιο του 2022 στη χορήγηση

άδειας για τη χρήση του αιθέριου ελαίου *O. vulgare* subsp. *hirtum* (Link) Ietsw. ως πρόσθετης ύλης ζωοτροφών για ορισμένα ζωικά είδη υπό συγκεκριμένους όρους και όρια συγκέντρωσης (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2022).

Σε πρόσφατη μελέτη, η Αμερικανική Ένωση Κατασκευαστών Γεύσεων και Εκχυλισμάτων (FEMA) επαναξιολόγησε την ασφάλεια ορισμένων φυσικών αρωματικών προϊόντων ως προς τη χρήση τους ως πρόσθετα τροφίμων, συμπεριλαμβανομένου του αιθέριου ελαίου του είδους *O. vulgare*. Κατά τη διαδικασία αυτής της αξιολόγησης, τόσο το αιθέριο έλαιο του είδους *O. vulgare*, όσο και οι ενώσεις καρβακρόλη και θυμόλη που αποτελούν τα βασικά συστατικά του, διατήρησαν τον τίτλο τους ως γενικά αναγνωρισμένα ως ασφαλή (Generally Recognized As Safe - GRAS) (Cohen et al., 2021).

3. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΤΙΚΩΝ ΕΙΔΩΝ ΜΕ ΑΝΑΛΥΣΗ DNA

Οι μέθοδοι μοριακής ταυτοποίησης προσφέρουν μια πιο ακριβής και αξιόπιστη προσέγγιση σε σύγκριση με την παραδοσιακή μορφολογική ή βιοχημική ταυτοποίηση, ιδιαίτερα όταν εξετάζονται στενά συγγενικά είδη ή υποείδη (Τσαυτάρης κ.α., 2012). Με τον τρόπο αυτό, οι μέθοδοι που περιγράφονται παρακάτω μπορούν να βοηθήσουν στην περίπτωση των αυτοφυών φυτών στη σωστή ταξινόμηση και σε μελέτες βιοποικιλότητας των φυτών, ενώ στην περίπτωση των καλλιεργούμενων φυτών, στη διασφάλιση της αυθεντικότητας και της ιχνηλασιμότητας προϊόντων υψηλής εμπορικής αξίας όπως η ρίγανη.

3.1. Μέθοδοι αξιολόγησης γενετικής παραλλακτικότητας

Μέχρι πρόσφατα, η αναγνώριση και ταυτοποίηση του γενετικού υλικού στηριζόταν αποκλειστικά στα μορφολογικά, φυσιολογικά και αγρονομικά χαρακτηριστικά των φυτών, τα οποία όμως επηρεάζονται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες και από το στάδιο ανάπτυξης του φυτού. Με την πάροδο των χρόνων, την πρόοδο της γενετικής και την εφαρμογή της βιοτεχνολογίας, οι παραδοσιακές μέθοδοι άρχισαν να συμπληρώνονται σταδιακά, ή να αντικαθίστανται, με άλλες πιο σύγχρονες μεθόδους οι οποίες στηρίζονται σε αντικειμενικότερη μεθοδολογία (Depicker et al., 1994; Smith and Smith, 1992). Τα τελευταία χρόνια, η έρευνα φαίνεται να έχει επικεντρωθεί στην ανάπτυξη μοριακών δεικτών που βασίζονται σε πολυμορφισμούς του DNA ή των πρωτεϊνών. Η σημασία των δεικτών αυτών είναι μεγάλη, καθότι έχουν δυνατότητα αξιοποίησης σε ένα ευρύ πεδίο εφαρμογών, από την ταξινόμηση, τη φυλογένεια, την οικολογία, μέχρι και τη γενετική και τη βελτίωση των φυτών (Rao et al., 2010).

Κατά τον χαρακτηρισμό των καλλιεργειών λαμβάνει χώρα ουσιαστικά η αναγνώριση και ταυτοποίηση του γενετικού υλικού και καθίσταται δυνατή η διάκριση των ποικιλιών με βάση κάποια συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Επιπλέον, ο χαρακτηρισμός χρησιμοποιείται και για την ταυτοποίηση των εμπορικών ποικιλιών που παράγονται με γενετική βελτίωση και αποτελεί την προϋπόθεση για την εγγραφή

τους στον Εθνικό ή Κοινοτικό Κατάλογο Ποικιλιών ή για την προστασία των Δικαιωμάτων του Βελτιωτή (Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο, 2019).

Με τη χρήση των μοριακών τεχνικών μπορεί να εκτιμηθεί εάν και κατά πόσο η διαφορετικότητα των μορφολογικών χαρακτηριστικών των διαφόρων ποικιλιών οφείλεται στο περιβάλλον ή αν τελικά αντιπροσωπεύουν όντως διαφορετικές ποικιλίες. Παράλληλα, με τη χρήση αυτών των τεχνικών επιτυγχάνεται και ο προσδιορισμός του βαθμού συγγένειας των εξεταζόμενων γενοτύπων, τόσο σε κοντινές, όσο και σε απομακρυσμένες περιοχές (Τσαυτάρης κ.α., 2012). Στο πλαίσιο αυτό, η ταξινόμηση και ο καθορισμός των φυλογενετικών σχέσεων στα φυτά γίνεται με τη χρήση διαφόρων ειδών δεικτών, όπως οι μορφολογικοί δείκτες, οι βιοχημικοί δείκτες και οι μοριακοί δείκτες.

Παρακάτω παρουσιάζονται κάποια στοιχεία για τους μορφολογικούς και βιοχημικούς δείκτες, ενώ οι μοριακοί δείκτες και οι εφαρμογές τους αναπτύσσονται αναλυτικότερα στις επόμενες παραγράφους.

> Μορφολογικοί δείκτες

Οι μορφολογικοί δείκτες είναι οι πρώτοι δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των φυτικών οργανισμών (Staub et al., 1996). Η ανάλυση με τους δείκτες αυτούς βασίζεται στη μελέτη των εξωτερικών μορφολογικών χαρακτηριστικών του φυτού τα οποία είναι μετρήσιμα και ορατά, όπως για παράδειγμα η δομή των σπόρων, το χρώμα των ανθέων, το σχήμα και ο χρωματισμός του καρπού και των φύλλων, η ύπαρξη τριχών κ.α. Τα μορφολογικά γνωρίσματα που έχουν παραλλακτικότητα χαρτογραφούνται σε ένα πληθυσμό, καθορίζεται η σύνδεσή τους με κάποιο επιθυμητό ή ανεπιθύμητο γνώρισμα και πραγματοποιείται η έμμεση επιλογή χρησιμοποιώντας το μορφολογικό δείκτη (Patterson and Weatherup, 1984; Stuber et al., 1999; Σαρίκα-Χατζηνικολάου, 1998; Τσαυτάρης κ.α., 2012).

> Βιοχημικοί δείκτες

Οι βιοχημικοί δείκτες είναι κληρονομήσιμοι και πολυμορφικοί, ιδίως σε ενδοειδικό και διεϊδικό επίπεδο και αποτελούνται από δευτερογενείς μεταβολίτες και πρωτεΐνες. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι οργανικές ενώσεις, προϊόντα δευτερογενούς

μεταβολισμού ανώτερων φυτών, ενώ οι πρωτεϊνικοί δείκτες αποτελούνται κυρίως από ορολογικές αναλύσεις, πρωτεΐνες αποθήκευσης και ισοένζυμα. Από τους βιοχημικούς δείκτες πιο συχνά χρησιμοποιούνται τα ισοένζυμα (Τσαυτάρης κ.α., 2012).

Η χρήση των ισοενζύμων ως δείκτες παραλλακτικότητας υπερτερεί των άλλων χάρη στην απλότητά της. Η ανάλυσή των ισοενζύμων είναι γρήγορη και εύχρηστη, καθώς δεν απαιτεί την απομόνωση DNA ή τη διαθεσιμότητα γνωστών αλληλουχιών, εκκινητών και ιχνηλατών, αν και ενδέχεται μερικά είδη να απαιτήσουν βελτιστοποίηση των τεχνικών για ορισμένα ένζυμα. Το κυριότερο μειονέκτημα, ωστόσο, των ισοενζύμων είναι ο σχετικά μικρός αριθμός τους και το χαμηλό επίπεδο πολυμορφισμού τους. Επίσης, εξαρτώνται από το αναπτυξιακό στάδιο του φυτού και υπόκεινται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που ενδέχεται να επηρεάζονται και από το περιβάλλον (Φανουράκης, 2010).

3.2. Μοριακοί δείκτες

3.2.1 Γενικά στοιχεία

Οι μοριακοί δείκτες είναι περιοχές του γονιδιώματος, χωρίς άμεση επίδραση στον φαινότυπο, που παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ των προς μελέτη ατόμων, η ανάδειξη των οποίων χρησιμοποιείται για τη μελέτη της κληρονομικότητας και της ποικιλομορφίας μεταξύ των ατόμων πληθυσμών. Μοριακός δείκτης μπορεί να είναι ένα ολόκληρο γονίδιο ή μια μικρή αλληλουχία όπως ένας μικροδορυφόρος (μικρή γραμμική επανάληψη ενός ολιγονουκλεοτιδίου) ή κάτι τόσο μικρό όσο ένα μόνο νουκλεοτίδιο που διαφέρει ανάμεσα σε δυο αλληλόμορφα γονίδια σε μια αντίστοιχη περιοχή της γενετικής ανάλυσης (Τσαυτάρης κ.α., 2012). Το κύριο πλεονέκτημα των μοριακών δεικτών σε σχέση με τους μορφολογικούς και βιοχημικούς δείκτες είναι ότι ανιχνεύουν διαφορές στις αλληλουχίες του DNA και όχι στα προϊόντα που αυτές εκφράζουν. Επομένως, δεν επηρεάζονται από τις συνθήκες του περιβάλλοντος και δεν εξαρτώνται από το στάδιο ανάπτυξης του φυτού. Επιπλέον, εμφανίζουν υψηλό επίπεδο πολυμορφισμού και μπορούν να καλύψουν ολόκληρο το γονιδίωμα σε προβλεπόμενες γενετικές αποστάσεις (Φανουράκης, 2010; Χατζόπουλος, 2018).

Η βάση της ανάπτυξης μοριακών δεικτών είναι οι διαφορές στην αλληλουχία του DNA μεταξύ αλληλόμορφων γονιδίων και ο μεγάλος αριθμός κατηγοριών τους που οφείλεται στις διάφορες τεχνικές με τις οποίες είναι δυνατή η ανίχνευση αυτών των διαφορών, ενώ συνεχώς νέες τεχνικές επιτρέπουν την ανάπτυξη νέων δεικτών κάθε χρόνο.

Οι κύριες τεχνικές ανίχνευσης μοριακών πολυμορφισμών μπορεί να διαχωριστούν σε αυτές που βασίζονται στον υβριδισμό των νουκλεϊκών οξέων και σε αυτές που βασίζονται στον πολλαπλασιασμό μιας αλληλουχίας με τη χρήση της τεχνικής PCR (Polymerase Chain Reaction, Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης). Νεότερες τεχνικές εξελίξεις επέτρεψαν την ανάπτυξη συστημάτων μοριακών δεικτών που στηρίζονται στην αλληλούχηση συγκεκριμένων περιοχών, ενώ δείκτες που στηρίζονται στην τεχνολογία των μικρο-συστοιχιών ανιχνεύουν πολυμορφισμούς σε επίπεδο γονιδιώματος χωρίς να απαιτείται προηγούμενη γνώση συγκεκριμένων αλληλουχιών (Τσαυτάρης κ.α., 2012).

Οι πρώτοι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι δείκτες RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, Πολυμορφισμός Μεγέθους Περιοριστικών Τμημάτων DNA) που βασίζονται σε δύο τεχνικές που χρησιμοποιούνται ευρύτατα στη μοριακή βιολογία: την πέψη του DNA με περιοριστικά ένζυμα και τον υβριδισμό (Botstein et al., 1980). Μετά την εισαγωγή της τεχνικής PCR ως πολύτιμο εργαλείο στην έρευνα, αναπτύχθηκαν νέοι μέθοδοι μοριακών δεικτών που βασίζονται στον *in vitro* πολλαπλασιασμό τμημάτων DNA. Η πρώτη εφαρμογή που αξιοποίησε την PCR για την ανίχνευση της γενετικής παραλλακτικότητας σε επίπεδο DNA ήταν η ανίχνευση δεικτών RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, Τυχαίως Πολλαπλασιαζόμενα Πολυμορφικά τμήματα DNA) (Williams et al., 1990). Στη συνέχεια εμφανίσθηκαν οι μοριακοί δείκτες δεύτερης γενιάς που περιλαμβάνουν τους SSRs (Simple Sequence Repeats - Microsatellites, Απλές Επαναλαμβανόμενες Αλληλουχίες - Μικροδορυφόροι), AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism, Πολυμορφισμός Μήκους Ενισχυμένων Τμημάτων) και μια ποικιλία διαφοροποιήσεων αυτών (Hearne et al., 1992). Τέλος, ακολούθησαν οι μοριακοί δείκτες τρίτης γενιάς όπως είναι οι SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms, Μονονουκλεοτιδικός Πολυμορφισμός).

Οι περισσότερες μελέτες που αφορούν τη γενετική ποικιλότητα του γένους *Origanum* επικεντρώνονταν κυρίως στα μορφολογικά χαρακτηριστικά και τη σύνθεση του αιθέριου ελαίου του. Ωστόσο, τις τελευταίες δεκαετίες, ολοένα και περισσότερες μελέτες χρησιμοποιούν μοριακούς δείκτες για ανίχνευση του πολυμορφισμού του DNA μεταξύ και εντός πληθυσμών και για τον προσδιορισμό των φυλογενετικών σχέσεων (Jedrzejczyk, 2018). Οι μοριακοί δείκτες, βασισμένοι στη διακύμανση της αλληλουχίας του DNA, παίζουν σημαντικό ρόλο στην ταυτοποίηση και πιστοποίηση της γνησιότητας των ΑΦΦ καθώς και στην εκτίμηση της γενετικής τους ποικιλότητας (Nybom et al., 2014).

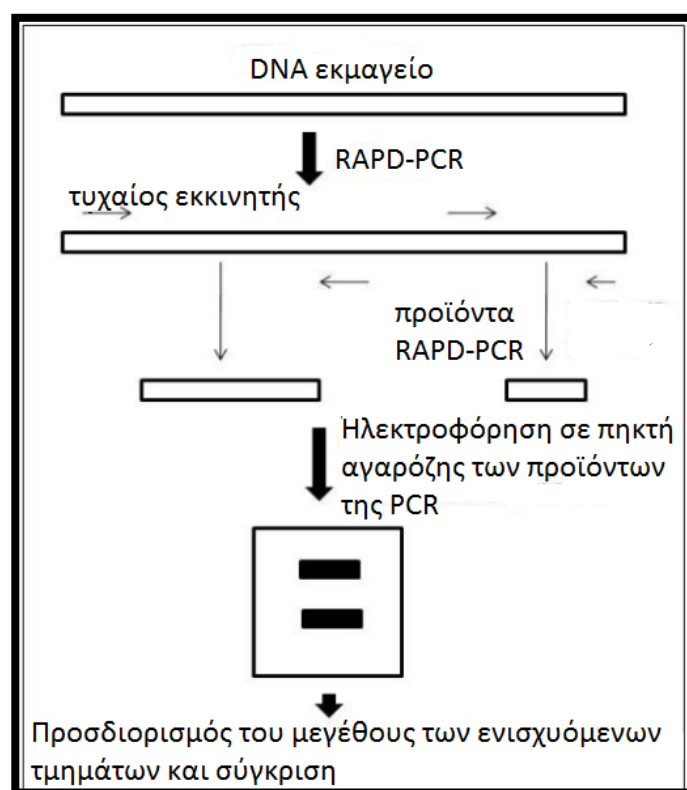
Στη συγκεκριμένη έρευνα έγινε χρήση των RAPD μοριακών δεικτών, οι οποίοι αναλύονται παρακάτω.

3.2.2 Τυχαίως Πολλαπλασιαζόμενα Πολυμορφικά τμήματα DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPDs)

Το σύστημα δεικτών RAPDs βασίζεται στη χρήση ενός μόνο μικρού εκκινητή (συνήθως μήκους 10 νουκλεοτιδίων) με τυχαία αλληλουχία, για την ενίσχυση με PCR τυχαίων περιοχών του γονιδιώματος των ατόμων ενός πληθυσμού. Για να πολλαπλασιαστεί ένα τμήμα με έναν εκκινητή θα πρέπει ο εκκινητής αυτός να βρει μια συμπληρωματική αλληλουχία και στα δυο άκρα του τμήματος αυτού, αλλά με αντίθετες κατευθύνσεις (δηλαδή στο ένα άκρο στη μια αλυσίδα του DNA και στο άλλο άκρο στην άλλη). Όταν η περιοχή ανάμεσα στα σημεία υβριδισμού-πρόσδεσης του εκκινητή είναι από 200 έως 3000 βάσεις παράγονται μόρια πολλαπλασιασμένου DNA που εμφανίζονται ως διακριτές ζώνες στην ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης (**Εικόνα 16**) (Τσαυτάρης κ.α., 2012).

Ο πολυμορφισμός μεταξύ των διαφορετικών ατόμων που εμφανίζεται σαν διαφορά στο πρότυπο ζωνών της ηλεκτροφόρησης μπορεί να οφείλεται σε σημειακές μεταλλάξεις που καταργούν ή δημιουργούν νέα θέση του υβριδισμού του εκκινητή, σε ενθέσεις ή διαγραφές που εισάγουν ή απαλείφουν αντίστοιχα θέσεις υβριδισμού, αλλά και σε ενθέσεις ή διαγραφές μεταξύ των θέσεων υβριδισμού που έχουν ως αποτέλεσμα τη μεταβολή του μεγέθους του πολλαπλασιαζόμενου τμήματος (όταν μια ένθεση απομακρύνει σημαντικά τις θέσεις υβριδισμού) ή τη δημιουργία νέου σε

περίπτωση που μια διαγραφή μειώσει την απόσταση των θέσεων υβριδισμού (Τσαυτάρης κ.α., 2012).



Εικόνα 16. Αρχές μοριακών δεικτών RAPD (Arif et al., 2010).

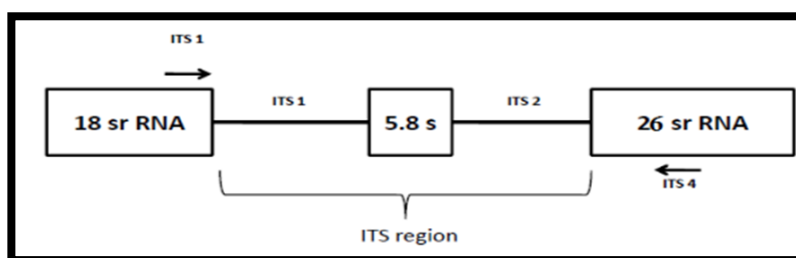
Τα κύρια πλεονεκτήματα των RAPD δεικτών είναι η ευκολία, η ταχύτητα και το χαμηλό κόστος, συν το γεγονός ότι η ποσότητα του DNA που απαιτείται είναι μικρή (συνήθως 5-50 ng ανά αντίδραση). Επιπρόσθετα, οι συγκεκριμένοι δείκτες έχουν μεγάλη γονιδιωματική αφθονία και κατανέμονται τυχαία σε όλο το γονιδίωμα. Ωστόσο, έχουν ως σημαντικό μειονέκτημα τη χαμηλή επαναληψιμότητα και για το λόγο αυτό η διαδικασία που ακολουθείται στο εργαστήριο θα πρέπει να είναι όσο γίνεται πιο ακριβής. Οι RAPDs είναι κυρίαρχοι δείκτες, που σημαίνει ότι ένα αλληλόμορφο που ενισχύεται εμφανίζεται σαν μια ζώνη τόσο σε ομόζυγη όσο και σε ετερόζυγη κατάσταση, ενώ το αλληλόμορφο που δεν ενισχύεται δεν μπορεί να ανιχνευθεί (Spooner et al., 2005; Τσαυτάρης κ.α., 2012).

Οι RAPD δείκτες χρησιμοποιούνται στη χαρτογράφηση του γονιδιώματος, στη βελτίωση φυτών και ζώων καθώς και στην ιχνηλάτηση (fingerprinting) του DNA, με εξειδικευμένη χρησιμότητα στη μελέτη της γενετικής πληθυσμών. Επίσης, παρέχουν

μια αποτελεσματική ανάλυση πολυμορφισμών, που επιτρέπουν τη γρήγορη αναγνώριση και απομόνωση τμημάτων DNA συγκεκριμένων χρωμοσωμάτων. Σειρές υβριδίων ή γενετικά αποθέματα που φέρουν ελλείμματα ή διπλασιασμούς μεγάλων χρωμοσωμικών τμημάτων μπορούν να συγκριθούν με κάποιο μάρτυρα και να αναγνωριστεί η περιοχή του γονιδιώματος που φέρει το έλλειμμα ή τον διπλασιασμό (Williams et al., 1990).

3.2.3 Η περιοχή ITS ως φυλογενετικός μοριακός δείκτης

Στις φυλογενετικές αναλύσεις των φυτικών οργανισμών χρησιμοποιούνται ευρέως οι γενετικοί τόποι που κωδικοποιούν τη σύνθεση του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA (nrDNA). Οι γενετικοί αυτοί τόποι επαναλαμβάνονται πολλές φορές στο γονιδίωμα των περισσότερων ανώτερων φυτών και οργανώνονται σε ξεχωριστές μονάδες. Καθεμία τέτοια μονάδα περιλαμβάνει τρία γονίδια, τα 18S, 5.8S και 25-28S rRNA, ενώ δύο εσωτερικά μεταγραφόμενα διαστήματα (ITS: Internal Transcribed Spacer), τα ITS-1 και ITS-2, διαχωρίζουν το 18S από το 5.8S rRNA γονίδιο και το 5.8S από το 28S rRNA γονίδιο, αντίστοιχα. Καθώς οι περιοχές ITS-1 και ITS-2 δεν κωδικοποιούν κανενός είδους λειτουργία και μπορούν να συσσωρεύσουν πλήθος μεταλλάξεων χωρίς κανένα ανιχνεύσιμο πρόβλημα για κάποια κυτταρική λειτουργία, το μήκος και η αλληλουχία των βάσεων των περιοχών αυτών ενδέχεται να ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό (Soltis and Soltis, 1998).



Εικόνα 17. Τα τρία γονίδια και τα ενδιάμεσα μεταγραφόμενα διαστήματα του nrDNA ενός τυπικού αγγειόσπερμου. Σημειώνονται οι θέσεις υβριδισμού των καθολικών εκκινητών που χρησιμεύουν για την ενίσχυση με PCR της ITS περιοχής (Sahare, 2013).

Η ITS περιοχή ήταν η πρώτη που προτάθηκε ως γραμμωτός κώδικας (barcode) για τα φυτά (Ferri et al., 2009; Li et al., 2011). Οι περιοχές ITS-1 και ITS-2 παρουσιάζουν

γρηγορότερο ρυθμό εξελικτικών μεταβολών σε σχέση με τις περιοχές που τις περιβάλλουν, γεγονός που τις καθιστά κατάλληλες για την ταξινόμηση και τη φυλογενετική ανάλυση συγγενών ειδών (Álvarez and Wendel, 2003; Li et al., 2011). Η περιοχή ITS-2 έχει δοκιμαστεί και χρησιμοποιηθεί ευρέως ως γραμμωτός κώδικας για φύκη, φυτά, μύκητες και ζώα (Ferri et al., 2009; Li et al., 2011).

Συγκεκριμένα, η ITS περιοχή του nrDNA χρησιμοποιείται ευρύτατα για την ταυτοποίηση συγγενικών φυτικών ειδών χάρη στις παρακάτω ιδιότητές της:

- > Παρουσία υψηλού πολυμορφισμού
- > Παρουσία συντηρημένων περιοχών που χρησιμεύουν στον σχεδιασμό καθολικών εκκινητών που οριοθετούν την ITS περιοχή και επιτρέπουν την ενίσχυσή της με PCR
- > Διαθέτει μικρό μέγεθος το οποίο διευκολύνει την εκχύλιση του DNA και την ενίσχυσή του.

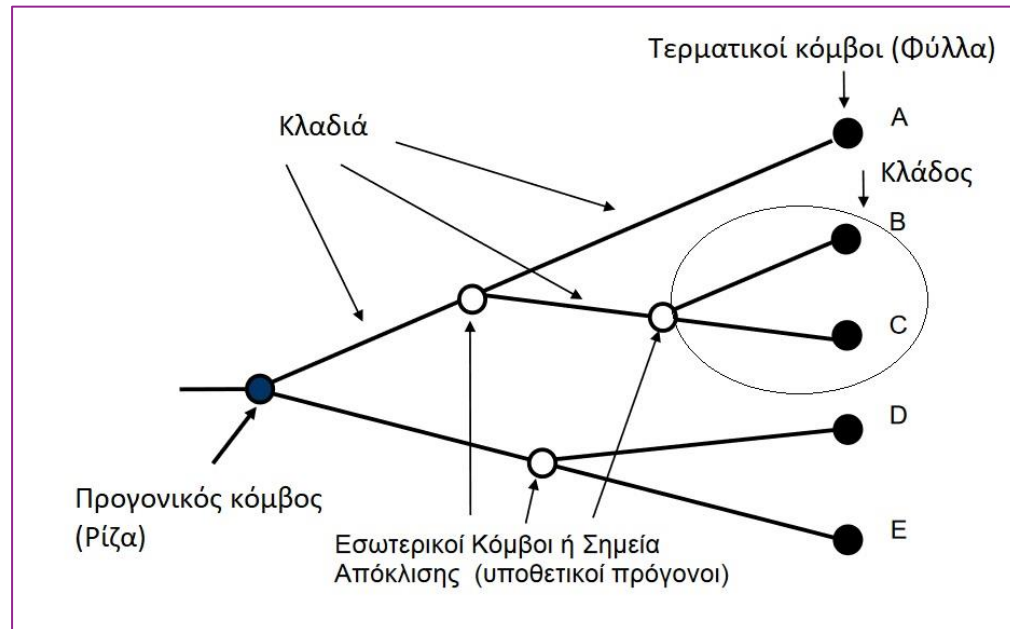
(Khan et al., 2019)

3.3. Φυλογενετική ανάλυση

Φυλογενετική ανάλυση είναι η διαδικασία ανάπτυξης υποθέσεων σχετικά με την εξελικτική συγγένεια των οργανισμών με βάση τα χαρακτηριστικά τους και στηρίζεται στη στοίχιση πολλαπλών αλληλουχιών (ακολουθιών). Ο βασικός τρόπος αναπαράστασης της εξελικτικής πορείας όπως προκύπτει από μια φυλογενετική ανάλυση είναι τα φυλογενετικά δέντρα (Νικολάου και Χουβαρδάς, 2015). Ένα φυλογενετικό δέντρο ενδέχεται να απεικονίζεται χωρίς προγονικό κόμβο-ρίζα (unrooted), οπότε και δεν παρέχει κάποια πληροφορία σχετικά με τον κοινό πρόγονο της υπό μελέτη ομάδας, ή με ρίζα (rooted) (**Εικόνα 18**), όπου και παρέχονται πληροφορίες για τον κοινό πρόγονο (ρίζα) της υπό μελέτη ομάδας (Θηραίου, 2012; Μπάγκος, 2015).

Ο τρόπος με τον οποίον οι βιολογικές μονάδες διατάσσονται σε ένα φυλογενετικό δέντρο ονομάζεται «τοπολογία». Η τοπολογία είναι ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά ενός φυλογενετικού δέντρου καθώς μας δίνει τη σειρά με την οποία έχουν αποκλίνει οι διάφορες βιολογικές μονάδες μεταξύ τους, ενώ παράλληλα

αποτελεί και την ποιοτική αποτύπωση των εξελικτικών τους σχέσεων (Νικολάου και Χουβαρδάς, 2015).



Εικόνα 18. Βασική δομή ενός φυλογενετικού δέντρου με προγονικό κόμβο (ρίζα) (Θηραίου, 2012).

Σε ένα φυλογενετικό δέντρο με προγονικό κόμβο, τα στοιχεία τοπολογίας του αποτελούν οι κλάδοι, οι κόμβοι, τα κλαδιά και η ρίζα (**Εικόνα 18**), ενώ σε ένα δέντρο χωρίς προγονικό κόμβο απουσιάζει η ρίζα.

Πιο αναλυτικά:

Ρίζα. Ο προγονικός κόμβος που αναπαριστά τον κοινό πρόγονο όλων των κόμβων στο δέντρο.

Κλαδί. Γραμμή που συνδέει τους κόμβους ενός φυλογενετικού δέντρου και αναπαριστά την προτεινόμενη διαδρομή της φυλογενετικής πορείας. Το μήκος αυτής της γραμμής, σύμφωνα με την κλίμακα απόστασης που χρησιμοποιείται, αντιπροσωπεύει τον αριθμό των διαφορών μεταξύ των αλληλουχιών (π.χ. ο αριθμός 0,1 σημαίνει 10 % διαφορές μεταξύ δύο αλληλουχιών).

Κλάδος. Κάθε ξεχωριστός κλάδος αποτελείται από μέλη που μοιράζονται έναν κοινό υποθετικό πρόγονο ο οποίος είναι ανεξάρτητος από τον κοινό πρόγονο όλων των άλλων ταξινομικών βαθμίδων του δέντρου.

Κόμβος. α) Εσωτερικός κόμβος: αναπαριστά τον υποθετικό κοινό πρόγονο. β) Τερματικός κόμβος (φύλλο): αναπαριστά τις ταξινομικές βαθμίδες όπως πληθυσμούς, είδη, γονίδια, πρωτεΐνες, κλπ., οι οποίες συγκρίνονται με τις υπόλοιπες ταξινομικές βαθμίδες (taxa) του δέντρου.

Στα φυλογενετικά δέντρα, ο βαθμός της εξελικτικής σχέσης μεταξύ των χρησιμοποιούμενων μονάδων εκφράζεται ως «συνάρτηση της θέσης κάθε μονάδας ενδιαφέροντος (π.χ. είδος, πληθυσμός, γονίδιο) ως προς την άλλη». Οι μονάδες που είναι περισσότερο συγγενικές μεταξύ τους τοποθετούνται πιο κοντά, ενώ οι μονάδες που είναι λιγότερο συγγενικές μεταξύ τους τοποθετούνται σε διαφορετικούς κλάδους του φυλογενετικού δέντρου. Όταν η ομοιότητα των δύο αλληλουχιών είναι αρκετή για να υποθέσουμε ότι οι αλληλουχίες έχουν έναν κοινό πρόγονο, προέρχονται δηλαδή από μια κοινή αλληλουχία αφού έχουν υποστεί έναν συγκεκριμένο αριθμό μεταβολών, τότε λέμε ότι οι δύο αλληλουχίες είναι ομόλογες. Η ομολογία αποτελεί μια ποιοτική ιδιότητα που αναφέρεται στην εξελικτική σχέση δύο αλληλουχιών χωρίς να ποσοτικοποιείται αριθμητικά. Δύο αλληλουχίες είτε είναι ομόλογες, είτε δεν είναι. Αντίθετα, η ομοιότητα είναι ένα αντικειμενικά μετρήσιμο μέγεθος και λαμβάνει αριθμητικές τιμές, λέμε δηλαδή ότι «οι αλληλουχίες A και B έχουν ομοιότητα 83%» (Νικολάου και Χουβαρδάς, 2015).

Αν και υπάρχουν πολλές τεχνικές για την κατασκευή φυλογενετικών δένδρων, οι δύο επικρατέστερες κατηγορίες είναι οι εξής: οι μέθοδοι αποστάσεων και οι μέθοδοι ελαχιστοποίησης κριτηρίων (Holder and Lewis, 2003). Οι πρώτες βασίζονται σε έναν πίνακα αποστάσεων μεταξύ των ταξινομικών μονάδων, ενώ οι δεύτερες αποτελούν μια κατηγορία πιο εκλεπτυσμένων μεθόδων που βασίζονται στην προσπάθεια εύρεσης μιας βέλτιστης λύσης σε ένα πρόβλημα ελαχιστοποίησης. Οι πιο γνωστές μέθοδοι αποστάσεων είναι η Μέθοδος Ομαδοποίησης Αστάθμητων Ζευγών με Αριθμητικούς μέσους όρους (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean, UPGMA) (Sneath and Sokal, 1973) και η Μέθοδος Ένωσης Γειτόνων (Neighbor Joining, NJ) (Saitou and Nei, 1987), ενώ οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μέθοδοι ελαχιστοποίησης κριτηρίων είναι η μέθοδος της Μέγιστης Φειδωλότητας (Maximum

Parsimony, MP) και η μέθοδος της Μέγιστης Πιθανοφάνειας (Maximum Likelihood, ML). Στην παρούσα διατριβή εφαρμόστηκαν οι μέθοδοι απόστασης UPGMA και NJ.

Οι μέθοδοι απόστασης υπολογίζουν τις γενετικές αποστάσεις για όλα τα ζεύγη των taxa. Οι γενετικές αυτές αποστάσεις αντανakλούν και την εξελικτική απόσταση, δηλαδή το μέσο αριθμό αλλαγών ανά θέση που θα έχουν συμβεί ανάμεσα σε ένα ζεύγος από τη στιγμή της διαφοροποίησής τους από τον κοινό πρόγονο. Βασική αρχή για την κατασκευή δέντρων αποτελεί η προϋπόθεση σταθερού ρυθμού εξέλιξης μεταξύ όλων των κλάδων του δέντρου, έτσι ώστε να υπάρχει μία σχεδόν γραμμική σχέση μεταξύ των υπολογιζόμενων γενετικών αποστάσεων και των χρόνων διαχωρισμού (Νικολάου και Χουβαρδάς, 2015). Η απόσταση ανάμεσα σε δύο taxa είναι ίση με το άθροισμα των μηκών των οριζόντιων κλάδων που τα ενώνουν.

Οι μέθοδοι αποστάσεων, όπως η UPGMA και η NJ, έχουν το πλεονέκτημα ότι είναι εξαιρετικά γρήγορες και συνεπώς είναι ιδιαίτερα χρήσιμες για τη δημιουργία μεγάλων δέντρων όπου αναλύονται ταυτόχρονα περισσότερες από 50 ή και 100 αλληλουχίες (Νικολάου και Χουβαρδάς, 2015). Η μέθοδος UPGMA χρησιμοποιείται κυρίως σε μελέτες μοριακών δεικτών, όπου η ομαδοποίηση ξεκινά από τα πιο κοντινά δείγματα και συνεχίζει στα υπόλοιπα, ενώ η μέθοδος NJ δίνει πιο αντιπροσωπευτικό δενδρόγραμμα ως προς την πραγματική ομαδοποίηση των δειγμάτων (Saitou and Nei, 1987).

II. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Αντικείμενο της παρούσας διατριβής αποτέλεσε ο χαρακτηρισμός και η προσπάθεια διαφοροποίησης φυτών καλλιεργούμενης βιολογικής ρίγανης *O. vulgare* subsp. *hirtum* με βάση τη γεωγραφική περιοχή προέλευσης χρησιμοποιώντας ενόργανη ανάλυση, χημειομετρία και ανάλυση DNA. Για την επίτευξη αυτού του σκοπού τέθηκαν οι ακόλουθοι στόχοι-ερωτήματα:

1. Προσδιορισμός της περιεκτικότητας των φυτών καλλιεργούμενης ρίγανης σε αιθέριο έλαιο, προσδιορισμός της ποιοτικής σύστασης των αιθέριων ελαίων, ποσοτικός προσδιορισμός των τεσσάρων βασικών ενώσεων των αιθέριων ελαίων των φυτών (καρβακρόλη, θυμόλη, γ-τερπινένιο, π-κυμένιο) και ημιποσοτικός προσδιορισμός των υπολοίπων ενώσεων με τη χρήση εσωτερικού προτύπου (4-μεθυλ-2-πεντανόλη). Διερεύνηση της διαφοροποίησης της σύστασης των αιθέριων ελαίων των φυτών σε σχέση με την περιοχή προέλευσης.

- Ποια η περιεκτικότητα των φυτών σε αιθέριο έλαιο;
- Ποια η ποιοτική σύσταση των αιθέριων ελαίων των φυτών;
- Ποια η συγκέντρωση των τεσσάρων βασικών ενώσεων στα δείγματα αιθέριων ελαίων;
- Ποια η συγκέντρωση των υπολοίπων ενώσεων στα δείγματα αιθέριων ελαίων;
- Σχετίζεται η διαφορά στη σύσταση των αιθέριων ελαίων με τη γεωγραφική προέλευση των φυτών *O. vulgare* subsp. *hirtum*;

2. Προσδιορισμός του ολικού φαινολικού περιεχομένου των αιθέριων ελαίων των φυτών. Διερεύνηση της διαφοροποίησης του ολικού φαινολικού περιεχομένου των αιθέριων ελαίων των φυτών σε σχέση με την περιοχή προέλευσης.

- Ποιο το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των αιθέριων ελαίων των φυτών;
- Σχετίζεται η διαφορά των αιθέριων ελαίων σε ολικό φαινολικό περιεχόμενο με τη γεωγραφική προέλευση των φυτών *O. vulgare* subsp. *hirtum*;

3. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των αιθέριων ελαίων των φυτών ρίγανης. Διερεύνηση της διαφοροποίησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των αιθέριων ελαίων των φυτών σε σχέση με την περιοχή προέλευσης.
 - Ποια είναι η αντιοξειδωτική ικανότητα των αιθέριων ελαίων των φυτών;
 - Σχετίζεται η διαφορά στην αντιοξειδωτική ικανότητα των αιθέριων ελαίων με τη γεωγραφική προέλευση των φυτών *O. vulgare* subsp. *hirtum*;
4. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων των χημικών αναλύσεων των αιθέριων ελαίων των φυτών ρίγανης με Ανάλυση Διακύμανσης (ANOVA), Πολυμεταβλητής Ανάλυσης Διακύμανσης (MANOVA), Γραμμική Διαχωριστική Ανάλυση (LDA) και Stepwise LDA με σκοπό το διαχωρισμό, την πρόβλεψη και ταξινόμηση των φυτών ρίγανης ως προς τη γεωγραφική περιοχή προέλευσης.
 - Ποιες παράμετροι είναι σημαντικές για τη διάκριση των φυτών *O. vulgare* subsp. *hirtum*;
 - Ποιες από αυτές τις σημαντικές παραμέτρους διαθέτουν την υψηλότερη διακριτική ικανότητα (markers);
 - Η αποκλειστική χρήση του συνδυασμού των παραμέτρων-markers στο στατιστικό μοντέλο βελτιστοποιεί περαιτέρω τη διάκριση των δειγμάτων;
5. Αξιολόγηση των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των φυτών και μελέτη της κατανομής της γενετικής ποικιλότητας με σύγκριση των αλληλουχιών της περιοχής ITS και τη χρήση μοριακών δεικτών RAPDs. Κατασκευή φυλογενετικών δέντρων και ταξινόμηση των φυτών *O. vulgare* subsp. *hirtum* σε σχέση με την περιοχή προέλευσης.
 - Υπάρχει πλήρης διαχωρισμός των φυτών ή όχι;
 - Παρατηρείται γενετική ποικιλότητα στα φυτά καλλιεργούμενης ρίγανης που εξετάστηκαν;
 - Πώς συμπεριφέρονται τα φυτά ρίγανης που προέρχονται από την ίδια περιοχή;

III. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΥΛΙΚΑ

A.1. Δείγματα φυτών από καλλιέργειες ρίγανης

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων που αφορούν τις χημικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 142 δείγματα καλλιεργούμενης ρίγανης τα οποία συλλέχθηκαν κατά τις καλλιεργητικές περιόδους 2017 και 2018, ήταν πέραν του δευτέρου έτους και βιολογικής καλλιέργειας. Τα δείγματα προήλθαν από 12 νομούς της Ελλάδας (**Εικόνα A-1**) και συνολικά περιλάμβαναν 20 καλλιέργειες-τοποθεσίες (πέντε στο νομό Ιωαννίνων, δύο στο νομό Πρεβέζης, δύο στο νομό Κοζάνης, μια στο νομό Τρικάλων, δύο στο νομό Μαγνησίας, μια στο νομό Πιερίας, μια στο νομό Κιλκίς, δύο στο νομό Θεσσαλονίκης, μια στο νομό Αχαΐας, μια στο νομό Ηλείας, μια στο νομό Ρεθύμνου και μια στο νομό Ηρακλείου) (**Πίνακας A-1**).

Η συγκομιδή των δειγμάτων ρίγανης πραγματοποιήθηκε από τους καλλιεργητές κατά τη διάρκεια ακμής της ανθοφορίας των φυτών, στο στάδιο δηλαδή που τα φυτά είχαν τη μεγαλύτερη απόδοση σε αιθέριο έλαιο. Τα δείγματα ελήφθησαν από διάφορα μέρη της καλλιέργειας ώστε να εξασφαλιστεί η αντιπροσωπευτικότητα του δείγματος. Ανάλογα με την περιοχή, η περίοδος συγκομιδής διέφερε από αρχές Ιουνίου έως μέσα Ιουλίου. Όλα τα δείγματα που συλλέχθηκαν αποτελούνταν από ματσάκια ήδη αποξηραμένων κλωναριών ρίγανης (**Παράρτημα I**) ώστε να διασφαλιστεί η ομοιομορφία των δειγμάτων. Σύμφωνα με τους παραγωγούς που παρείχαν τα δείγματα, τα αρχικά μοσχεύματα των καλλιεργούμενων φυτών προήλθαν από πιστοποιημένα πρότυπα φυτώρια του Ελληνικού Γεωργικού Οργανισμού - ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ.

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων που αφορούν τις μοριακές αναλύσεις επιλέχθηκαν 20 αντιπροσωπευτικά δείγματα καλλιεργούμενης ρίγανης (ένα δείγμα ανά καλλιέργεια-τοποθεσία) από τα συνολικά 142 δείγματα (**Πίνακας A-2**).

Πίνακας Α-1. Πληροφορίες σχετικά με τα δείγματα καλλιεργούμενης ρίγανης που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν τη διατριβή.

A/A	ΤΟΠΟΘΕΣΙΑ-ΠΕΡΙΟΧΗ	ΝΟΜΟΣ	ΥΨΟΜΕΤΡΟ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΠΑΡΑΓΩΓΟΣ	ΔΕΙΓΜΑ
1.	ΒΗΣΣΑΝΗ ΠΩΓΩΝΙΟΥ	ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ	754 m	2	ΜΠΑΣΙΟΣ Σ.	ΙΩΑΝΝΙΝΑ (1)
2.	ΣΤΑΥΡΟΣΚΙΑΔΙ ΠΩΓΩΝΙΟΥ	ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ	800 m	4	ΤΣΙΟΥΡΗ Χ.	ΙΩΑΝΝΙΝΑ (2)
3.	ΓΡΑΝΙΤΣΑ	ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ	440 m	2	ΠΑΠΠΑ Φ.	ΙΩΑΝΝΙΝΑ (3)
4.	ΠΕΤΡΑΛΩΝΑ	ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ	720 m	4	ΚΑΣΚΑΝΑΚΟΥ Β.	ΙΩΑΝΝΙΝΑ (4)
5.	ΠΡΩΤΟΠΑΠΠΑΣ	ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ	640 m	2	ΣΤΑΥΡΟΥ Ν.	ΙΩΑΝΝΙΝΑ (5)
6.	ΛΟΥΡΟΣ	ΠΡΕΒΕΖΗΣ	30 m	5	ΔΑΣΚΑΛΟΣ Δ.	ΠΡΕΒΕΖΑ (1)
7.	ΡΩΜΙΑ	ΠΡΕΒΕΖΗΣ	100 m	4	ΜΠΕΚΑΣ Γ.	ΠΡΕΒΕΖΑ (2)
8.	ΙΣΩΜΑ	ΑΧΑΪΑΣ	110 m	10	ΧΡΟΝΟΠΟΥΛΟΣ Δ.	ΑΧΑΪΑ
9.	ΚΑΡΟΥΤΕΣ (ΣΜΙΛΑ)	ΗΛΕΙΑΣ	24 m	10	ΒΑΣΙΛΕΙΑΔΗΣ Χ.	ΗΛΕΙΑ
10.	ΒΡΥΝΑΙΝΑ	ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	520 m	8	ΜΥΛΩΝΑΣ Γ.	ΒΟΛΟΣ (1)
11.	ΣΟΥΡΠΗ	ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	30 m	8	ΚΑΤΣΙΑΒΡΙΑΣ Α.	ΒΟΛΟΣ (2)

12.	ΜΥΚΑΝΗ ΚΑΛΑΜΠΑΚΑΣ	ΤΡΙΚΑΛΩΝ	303 m	11	ΕΥΣΤΑΘΙΟΥ Θ.	ΚΑΛΑΜΠΑΚΑ
13.	ΠΟΛΥΡΡΑΧΟ ΣΕΡΒΙΩΝ	ΚΟΖΑΝΗΣ	567 m	10	ΚΩΝ/ΝΟΥ Ν.	ΚΟΖΑΝΗ (1)
14.	ΒΕΛΒΕΝΤΟ	ΚΟΖΑΝΗΣ	428 m	10	ΤΣΙΜΤΣΙΛΙΑΚΟΣ Ν.	ΚΟΖΑΝΗ (2)
15.	ΑΡΕΤΗ ΛΑΓΚΑΔΑ	ΘΕΣ/ΚΗΣ	425 m	5	ΚΡΙΤΟΠΟΥΛΟΣ Π.	ΘΕΣ/ΚΗ (1)
16.	ΣΟΧΟΣ	ΘΕΣ/ΚΗΣ	630 m	5	ΤΣΙΛΙΓΓΗΡΑΣ Τ.	ΘΕΣ/ΚΗ (2)
17.	ΦΥΣΚΑ	ΚΙΛΚΙΣ	370 m	10	ΟΣΙΠΙΔΗΣ Φ.	ΚΙΛΚΙΣ
18.	ΜΟΣΧΟΠΟΤΑΜΟΣ	ΠΙΕΡΙΑΣ	460 m	12	ΤΖΑΓΚΑΣ Ν.	ΚΑΤΕΡΙΝΗ
19.	ΚΟΥΣΕΣ	ΗΡΑΚΛΕΙΟΥ	125 m	10	ΓΙΑΝΝΟΥΤΣΟΣ Γ.	ΗΡΑΚΛΕΙΟ
20.	ΘΡΟΝΟΣ ΑΜΑΡΙΟΥ	ΡΕΘΥΜΝΟΥ	540 m	10	ΠΑΠΟΥΤΣΑΚΗΣ Λ.	ΡΕΘΥΜΝΟ

Εικόνα Α-1. Νομοί της Ελλάδας από όπου προήλθαν τα δείγματα καλλιεργούμενης ρίγανης:

Βόρεια Ελλάδα (52 δείγματα)
(Κεντρική & Δυτική Μακεδονία)

1. Θεσσαλονίκη
2. Πιερία
3. Κιλκίς
4. Κοζάνη

Θεσσαλία (27 δείγματα)

5. Μαγνησία
6. Τρίκαλα

Ήπειρος (23 δείγματα)

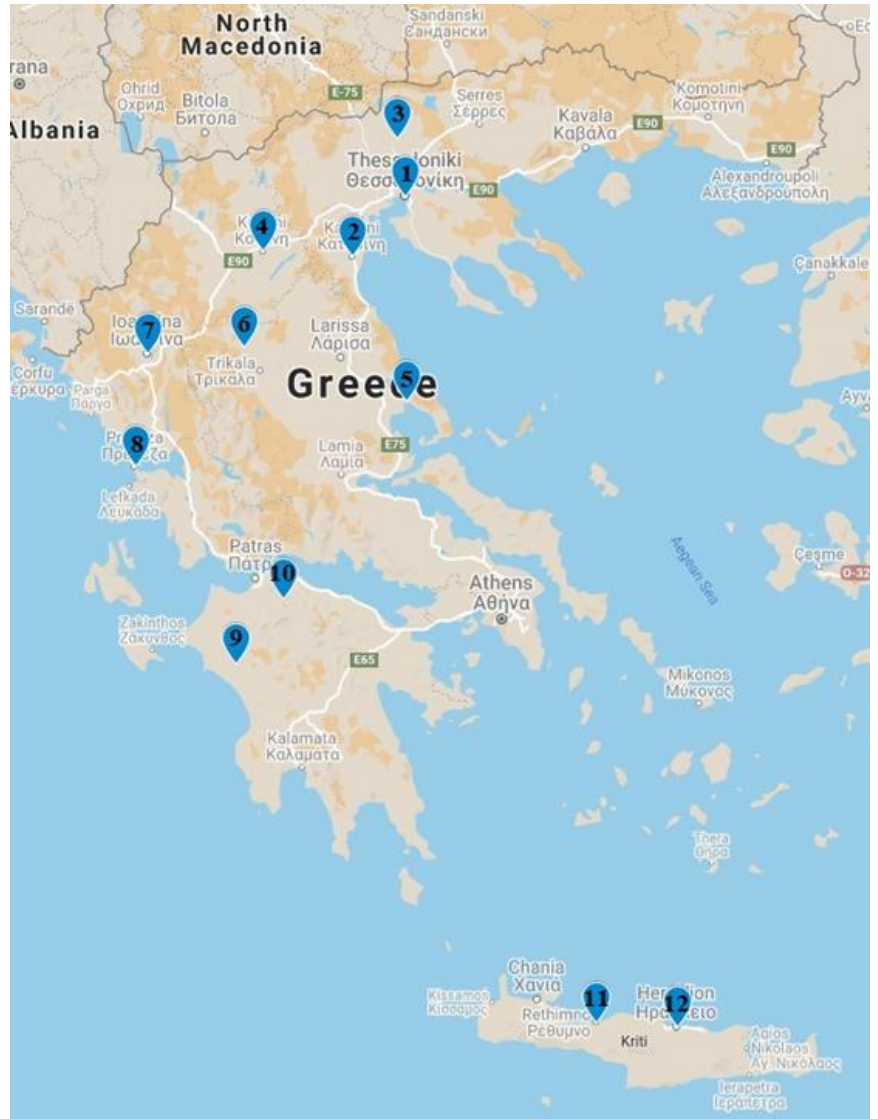
7. Ιωάννινα
8. Πρέβεζα

Πελοπόννησος (20 δείγματα)

9. Ηλεία
10. Αχαΐα

Κρήτη (20 δείγματα)

11. Ρέθυμνο
12. Ηράκλειο



Πίνακας Α-2. Δείγματα ρίγανης που χρησιμοποιήθηκαν στις μοριακές αναλύσεις.

ΔΕΙΓΜΑ	ΚΩΔ.	ΔΕΙΓΜΑ	ΚΩΔ.	ΔΕΙΓΜΑ	ΚΩΔ.	ΔΕΙΓΜΑ	ΚΩΔ.
Θεσ/κη (1)	OR1	Κοζάνη (2)	OR20	Ιωάννινα (2)	OR4	Πρέβεζα (2)	OR10
Θεσ/κη (2)	OR13	Μαγνησία (1)	OR5	Ιωάννινα (3)	OR6	Ηλεία	OR19
Πιερία	OR14	Μαγνησία (2)	OR15	Ιωάννινα (4)	OR8	Αχαΐα	OR2
Κιλκίς	OR17	Τρίκαλα	OR18	Ιωάννινα (5)	OR11	Ρέθυμνο	OR9
Κοζάνη (1)	OR12	Ιωάννινα (1)	OR3	Πρέβεζα (1)	OR7	Ηράκλειο	OR16

A.2. Αντιδραστήρια

Ανάλογα με την εκάστοτε ανάλυση, χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια:

Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης:

- > Μεθανόλη [M= 32.04 g/mol, pro analysis]
- > DPPH (2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζύλιο) [M= 394.32 g/mol]
- > Trolox (6-υδροξυ-2,5,7,8-τετραμεθυλοχρωμανο-2-καρβοξυλικό οξύ) [M= 290,29 g/mol]

Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου:

- > Εξάνιο [M= 86.18 g/mol, for analysis]
- > Μεθανόλη [M= 32.04 g/mol, pro analysis]
- > Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu
- > Ανθρακικό νάτριο [M= 105.99 g/mol, anhydrous for analysis]
- > Γαλλικό οξύ, [M= 170.12 g/mol, anhydrous for synthesis]

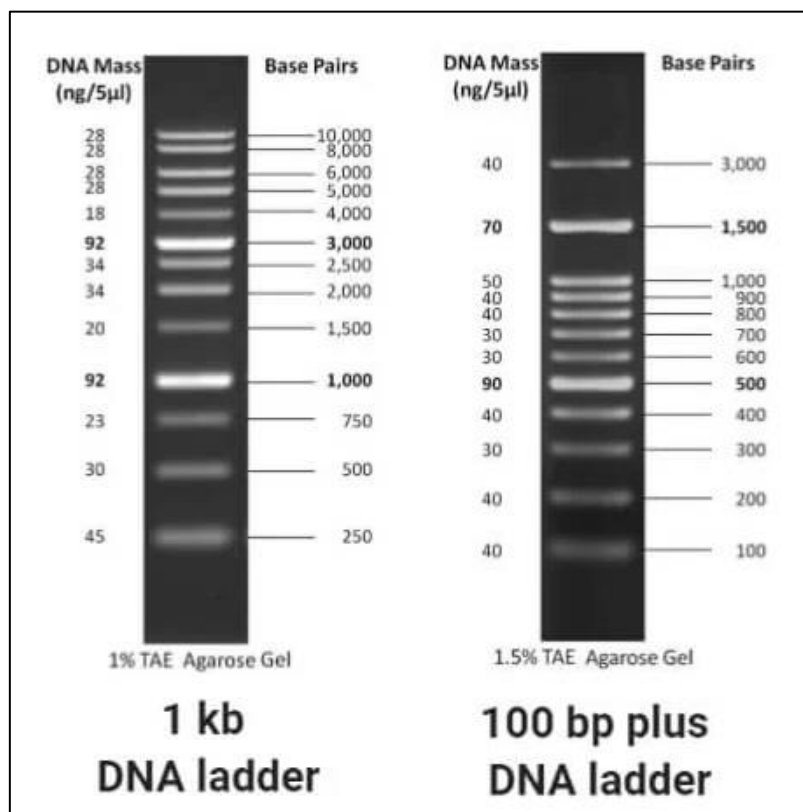
Ποσοτικός και ημιποσοτικός προσδιορισμός συστατικών αιθέριου ελαίου ρίγανης:

- > Μεθανόλη [M= 32.04 g/mol, pro analysis]
- > Εξάνιο [M= 86.18 g/mol, for analysis]
- > 4-μεθυλ-2-πεντανόλη [M= 102.17 g/mol, for synthesis 99%]
- > Καρβακρόλη [M= 150.22 g/mol, analytical standard]
- > Θυμόλη [M= 150.22 g/mol, analytical standard]
- > π-Κυμένιο [M= 134.22 g/mol, analytical standard]
- > γ-Τερπινένιο [M= 136.23 g/mol, analytical standard]

Απομόνωση και ανάλυση DNA:

- > NucleoSpin® Plant II kit (Macherey-Nagel)
- > NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel)
- > Πηκτή αγαρόζης (0.8-1.5%)
- > Χρωστική GelRed® (10.000X) in water (Biotium)
- > BlueJuice Gel Loading Buffer (10X) (Invitrogen)

- > Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1×TAE Buffer
- > Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1×TBE Buffer
- > Δείκτης μοριακών βαρών 1 kb DNA Ladder RTU (250 - 10,000 bp) (Nippon Genetics)
- > Δείκτης μοριακών βαρών 100 bp DNA Ladder H3 RTU (100 - 3000 bp) (Nippon Genetics)
- > Taq polymerase kit (Kapa Biosystems)
- > Αποστειρωμένο, δις απεσταγμένο νερό, ddsH₂O
- > 15 RAPD εκκινητές (Eurofins Genomics, Austria) (**Πίνακας Α-3**). Οι συγκεκριμένοι εκκινητές επιλέχθηκαν έπειτα από μελέτη της σχετικής βιβλιογραφίας (Gounaris et al., 2002; Katsiotis et al., 2009).



Εικόνα Α-2. Δείκτες μοριακών βαρών που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση των ζωνών κατά τη μελέτη ενίσχυσης τμημάτων DNA των φυτών καλλιεργούμενης ρίγανης (Nippon Genetics).

Πίνακας Α-3. Οι RAPD εκκινήτες που δοκιμάσθηκαν κατά την τυχαία πολυμορφική ανάλυση του DNA των γενοτύπων ρίγανης.

α/α	ΟΝΟΜΑ ΕΚΚΙΝΗΤΗ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ (5'-3')
1	OPA-01	CAGGCCCTTC
2	OPA-09	GGGTAACGCC
3	OPA-15	TTCCGAACCC
4	OPA-17	GACCGCTTGT
5	OPA-20	GTTGCGATCC
6	OPAH-01	TCCGCAACCA
7	OPAH-09	AGAACCGAGG
8	OPAG-02	CTGAGGTCCT
9	OPB-01	GTTTCGCTCC
10	OPB-02	TGATCCCTGG
11	OPB-03	CATCCCCCTG
12	OPB-08	GTCCACACGG
13	OPH-18	GAATCGGCCA
14	OPN-20	GGTGCTCCGT
15	OPR-13	GGACGACAAG

2. ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ

B.1. Αποστακτική συσκευή Clevenger

Η παραλαβή των αιθέριων ελαίων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αποστακτικής συσκευής τύπου Clevenger και κατάλληλου θερμομανδύα της εταιρείας Auxilab (Spain) (Εικόνα 11).

B.2. Φυγοκέντρωση μεθανολικών εκχυλισμάτων

Για τον προσδιορισμό της ολικής αντιοξειδωτική δράσης και του ολικού φαινολικού περιεχομένου των δειγμάτων αιθέριων ελαίων χρησιμοποιήθηκε φυγόκεντρος Heraeus Biofuge Primo R, της εταιρείας ThermoFisher Scientific (USA) και κυκλοαναδευτήρας (vortex) της VELP Scientifica.

B.3. Φασματοφωτόμετρο Uv-Vis (υπεριώδες – ορατό)

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης καθώς και του ολικού φαινολικού περιεχομένου των αιθέριων ελαίων των δειγμάτων ρίγανης έγινε με τη χρήση φασματοφωτόμετρου υπεριώδους – ορατού (Uv-Vis), τύπου Lambda 25, της εταιρείας Perkin Elmer (USA). Η καταγραφή και συλλογή των αποτελεσμάτων έγινε με χρήση του προγράμματος UV WinLab (version 5.2.0).

B.4. Αέριος χρωματογράφος – Φασματογράφος μάζας (GC/MS)

Για τον προσδιορισμό των συστατικών των αιθέριων ελαίων χρησιμοποιήθηκε σύστημα αέριου χρωματογράφου σε συνδυασμό με φασματογράφο μάζας τύπου GC System 7890A/ inert XL MDS 5975, της εταιρείας Agilent (USA). Ο διαχωρισμός των ενώσεων έγινε με τη χρήση της πολικής στήλης BP-20 (25m×0.32μm×0.25μm) (J&W Scientific, Folsom, U.S.A.). Η καταγραφή και επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος Agilent Chemstation E.01.00.237 (Germany).

B.5. Θερμικός κυκλοποιητής

Τα στάδια των αλυσιδωτών αντιδράσεων πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR) για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό τμημάτων DNA

πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του θερμικού κυκλοποιητή MyCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

B.6. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων απομόνωσης

Για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων απομόνωσης DNA και PCR χρησιμοποιήθηκε η συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης Thermo Scientific Owl™ σε συνδυασμό με τη γεννήτρια ρεύματος PS 1006P της εταιρείας Apelex. Για την παρατήρηση και φωτογράφιση των αποτελεσμάτων έγινε χρήση της τράπεζας υπεριώδους φωτός, συνδεδεμένη με κάμερα, MS Major Science (UV transilluminator) της εταιρείας Biolab (**Εικόνα Γ.2.**). Για την απομόνωση DNA από πηκτή αγαρόζης μετά από ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένη λεπίδα.

B.7. Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής

Όλοι οι χειρισμοί των βιοχημικών αναλύσεων πραγματοποιήθηκαν σε ασηπτικό περιβάλλον με τη βοήθεια του θαλάμου κάθετης νηματικής ροής (PCR Cabinet) της εταιρείας Biobase.

3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

3.1. Χημικές Μέθοδοι Ανάλυσης

3.1.1. Παραλαβή αιθέριων ελαίων

Η παραλαβή των αιθέριων ελαίων των φυτών ρίγανης έγινε με τη μέθοδο της υδραπόσταξης. Η επιλογή της συγκεκριμένης μεθόδου βασίστηκε στο γεγονός ότι (i) δεν απαιτεί τη χρήση οργανικών διαλυτών, (ii) είναι σχετικά απλή και γρήγορη και (iii) χρησιμοποιείται κατά κόρον στη Βιομηχανία Τροφίμων.

Πριν τη διαδικασία της υδραπόσταξης όλα τα δείγματα ρίγανης επεξεργάστηκαν με το χέρι, ενώ το τελικό τριμμένο προϊόν ρίγανης αποτελούνταν από φύλλα, άνθη και μικρά ξυλαράκια (**Εικόνα Γ-1**).



Εικόνα Γ-1. Αρχική μορφή δείγματος φυτού ρίγανης (αριστερά) και τελική μορφή μετά την επεξεργασία με το χέρι (Τσουμάνη Ελευθερία).

Ειδικότερα, ζυγίστηκαν 20 g από τα δείγματα τριμμένης καλλιεργούμενης ρίγανης τα οποία, μαζί με 300 ml απιονισμένου νερού, τοποθετήθηκαν σε σφαιρική φιάλη των

500 ml. Κατόπιν η φιάλη τοποθετήθηκε σε κατάλληλο θερμομανδύα και συνδέθηκε με συσκευή απόσταξης Clevenger (**Εικόνα 11**) (Clevenger, 1928). Η διαδικασία της υδραπόσταξης διήρκησε τρεις ώρες, καθόλη τη διάρκεια της οποίας εξασφαλίστηκε ήπιος βρασμός καθώς οι μεγάλες θερμοκρασίες έχει βρεθεί ότι υποβαθμίζουν την ποιότητα των εξαγόμενων αιθέριων ελαίων (Saldaña-Mendoza et al., 2022).

Μετά την παραλαβή των αιθέριων ελαίων έγινε χρήση άνυδρου θειικού νατρίου (Na_2SO_4) για την απομάκρυνση της εναπομείνουσας υγρασίας. Τέλος, τα αιθέρια έλαια διηθήθηκαν, τοποθετήθηκαν σε γυάλινα καραμελέ φιαλίδια των 3ml (**Εικόνα Γ-2**) και αποθηκεύτηκαν στο ψυγείο (4°C).

Η ποσότητα αιθέριου ελαίου των δειγμάτων σε όγκο (ml) προσδιορίστηκε μετά το τέλος της απόσταξης απευθείας στη βαθμονομημένη συσκευή Clevenger (**Εικόνα Γ-2**). Η διαδικασία επαναλήφθηκε εις τριπλούν για κάθε δείγμα και ως τελική απόδοση καταγράφηκε η μέση τιμή των τριών αποδόσεων. Η τελική απόδοση εκφράστηκε επί τοις εκατό ως ο όγκος (ml) του αιθέριου ελαίου ανά 100 g ξηρού φυτικού υλικού (ξ.φ.).



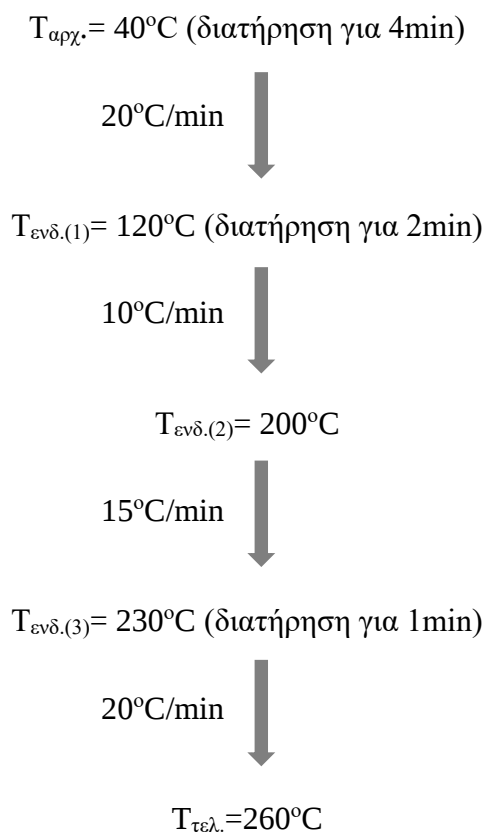
Εικόνα Γ-2. Αριστερά: Βαθμονόμηση στη συσκευή Clevenger που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση του όγκου του παραγόμενου αιθέριου ελαίου των δειγμάτων. Δεξιά: Φιαλίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την αποθήκευση των αιθέριων ελαίων μετά τη διαδικασία του φιλτραρίσματος (Εργαστήριο Χημείας Τροφίμων, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 2020).

3.1.2. Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των συστατικών των αιθέριων ελαίων ρίγανης

Για τον προσδιορισμό της ποιοτικής σύστασης του αιθέριου ελαίου των δειγμάτων ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: 50μl αιθέριου ελαίου ρίγανης τοποθετήθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 5ml και ο όγκος συμπληρώθηκε με εξάνιο μέχρι πληρώσεως. Με τη χρήση μικροσύριγγας, 1 μl του τελικού αυτού διαλύματος μεταφέρθηκε προς ανάλυση στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου (Κεφ. III.2, παράγραφος B.4).

Οι αεριοχρωματογραφικές συνθήκες που ακολουθήθηκαν ήταν οι εξής:

Θερμοκρασιακό πρόγραμμα φούρνου:



Θερμοκρασία εισαγωγέα: 260°C

Αναλογία Split: 30:1

Φέρον αέριο: He

Ρυθμός ροής αερίου: 1.5 ml/min

Θερμοκρασία γραμμής μεταφοράς: 260°C

Θερμοκρασία θαλάμου ιονισμού: 230°C

Θερμοκρασία τετράπολου: 150°C

Εύρος σάρωσης μαζών (m/z): 35-350

Solvent delay: 1.5min

Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν.

Η ταυτοποίηση των ενώσεων έγινε με χρήση της βιβλιοθήκης μαζών Wiley7-Nist05, και τη σύγκριση των δεικτών κατακράτησης (RI) με τους δείκτες Kovats (Kovats Retention Index) για στήλη BP20 και βιβλιογραφικά δεδομένα.

Οι δείκτες κατακράτησης (RI) προσδιορίστηκαν για όλα τα συστατικά με τη χρήση πρότυπου μείγματος αλκανίων (C8-C20) (Fluka, Buchs, Switzerland) το οποίο εισήχθη στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου κάτω από τις ίδιες συνθήκες με τα δείγματα αιθέριου ελαίου και υπολογίστηκαν σύμφωνα με τη σχέση:

$$RI = 100 \times n_0 + [(RT_x - RT_{n_0}) / (RT_{n_1} - RT_{n_0})] \times 100$$

Όπου:

- **RI** = Δείκτης κατακράτησης
- **n₀**= τα άτομα άνθρακα του αλκανίου πριν το πτητικό συστατικό που επιδιώκεται να ταυτοποιηθεί
- **RT_x** = ο χρόνος κατακράτησης του πτητικού συστατικού
- **RT n₀** = ο χρόνος κατακράτησης του αλκανίου πριν το πτητικό συστατικό
- **RT n₁** = ο χρόνος κατακράτησης του αλκανίου μετά το πτητικό συστατικό

Κατά τον προσδιορισμό της ποιοτικής σύστασης έγινε η παραδοχή ότι στο χρωματογράφημα εμφανίστηκαν όλα τα συστατικά τα οποία περιέχονται στο αιθέριο έλαιο. Υπολογίστηκε το σύνολο των ταυτοποιημένων κορυφών επί του συνόλου των κορυφών. Η συνεισφορά κάθε ταυτοποιημένου συστατικού στο αιθέριο έλαιο υπολογίστηκε με την παραδοχή ότι το εμβαδόν όλων των ταυτοποιημένων κορυφών αντιπροσωπεύει το 100% των συστατικών του και τη σχέση:

$$C\% = (Εμβαδό C / Συνολικό εμβαδό χρωματογραφήματος) \times 100$$

Όπου: C= ταυτοποιημένο συστατικό

Από το σύνολο των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα αιθέρια έλαια των φυτών ρίγανης, επιλέξαμε με βάση τη βιβλιογραφία να προσδιορίσουμε ποσοτικά τις τέσσερις πιο χαρακτηριστικές ενώσεις του αιθέριου ελαίου του *O. vulgare* subsp. *hirtum*: την καρβακρόλη, τη θυμόλη, το γ-τερπινένιο και το π-κυμένιο (Kokkini et al., 1997). Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν πρότυπες ενώσεις των τεσσάρων κύριων συστατικών και για καθεμία από αυτές κατασκευάστηκαν πρότυπες καμπύλες με βάση τη συγκέντρωση της εκάστοτε ουσίας (σε εξάνιο) ως προς το αντίστοιχο εμβαδό κορυφής της στο χρωματογράφημα. Για την καρβακρόλη χρησιμοποιήθηκε εύρος συγκεντρώσεων από 100 έως 20.000 ppm, για τη θυμόλη από 50 έως 15.000 ppm, ενώ για το γ-τερπινένιο και π-κυμένιο οι συγκεντρώσεις κυμάνθηκαν μεταξύ 10-5.000 ppm. Από τις εξισώσεις που προέκυψαν υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις των τεσσάρων ουσιών στα αιθέρια έλαια των δειγμάτων.

Για τον ημιποσοτικό προσδιορισμό των υπολοίπων ουσιών έγινε χρήση εσωτερικού προτύπου. Συγκεκριμένα, 50μl αιθέριου ελαίου ρίγανης μαζί με 200μl διαλύματος της πρότυπης ουσίας 4-μεθυλ-2-πεντανόλης (5% σε μεθανόλη) τοποθετήθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 5ml και ο όγκος συμπληρώθηκε με εξάνιο μέχρι πληρώσεως. Με τη χρήση μικροσύριγγας, 1 μl του τελικού αυτού διαλύματος μεταφέρθηκε προς ανάλυση στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου. Οι αεριοχρωματογραφικές συνθήκες που ακολουθήθηκαν ήταν ίδιες με αυτές που περιγράφονται παραπάνω στην ποιοτική ανάλυση. Ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων των ενώσεων στα αιθέρια έλαια έγινε με βάση το εμβαδό του εσωτερικού προτύπου στο χρωματογράφημα και συγκεκριμένα με τη σχέση:

$$C_x = C_{IS} \times E_x/E_{IS}$$

Όπου:

C_x = Συγκέντρωση ένωσης

C_{IS} = Συγκέντρωση εσωτερικού προτύπου

E_x = Εμβαδό ένωσης στο χρωματογράφημα

E_{IS} = Εμβαδό εσωτερικού προτύπου στο χρωματογράφημα

3.1.3. Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου

Για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου του φυτού της ρίγανης, αλλά και των υπολοίπων ΑΦΦ, ακολουθούνται δύο προσεγγίσεις: α) ο προσδιορισμός της τιμής του ολικού φαινολικού περιεχομένου του αιθέριου ελαίου και β) ο προσδιορισμός της τιμής του ολικού φαινολικού περιεχομένου του εκχυλίσματος του φυτού. Τόσο το αιθέριο έλαιο ρίγανης, όσο και το εκχύλισμα ρίγανης περιέχουν μια ποικιλία φαινολικών ενώσεων, με την κύρια διαφορά τους να έγκειται στη σύνθεση αυτών. Έτσι, το αιθέριο έλαιο ρίγανης περιέχει μεγάλες ποσότητες φαινολών, κυρίως καρβακρόλης και θυμόλης, ενώ το εκχύλισμα ρίγανης, είτε υδατικό, είτε σε αλκοόλη, πέραν των ενώσεων του αιθέριου ελαίου περιέχει και άλλες φαινόλες, όπως η ροζμαρίνη, καθώς και διάφορα φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα που ανήκουν στο μη πτητικό κλάσμα των ενώσεων του φυτού (Boroski et al., 2012; Exarchou et al., 2002).

Στα πλαίσια αυτή της διατριβής η μέτρηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου έγινε στο αιθέριο έλαιο των φυτών καλλιεργούμενης ρίγανης *O. vulgare* subsp. *hirtum* με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ικανότητα των φαινολικών ενώσεων να ανάγουν τις ενώσεις του φωσφομολυβδαινικού και του φωσφοβολφραμικού οξέος, οι οποίες περιέχονται στο αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Από την τιμή της απορρόφησης στο φασματοφωτόμετρο (725nm) προσδιορίστηκε το ολικό φαινολικό περιεχόμενο. Κατά την εφαρμογή της μεθόδου, έγινε προσθήκη διαλύματος ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3), καθώς οι φαινολικές ενώσεις μπορούν να δρουν αναγωγικά σε αναγωγικό περιβάλλον.

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν στηρίχτηκαν στη μεθοδολογία των Kosma et al. (2016), έπειτα από μερικές τροποποιήσεις (Kosma et al., 2016).

Αρχικά έγινε απομόνωση του μεθανολικού εκχυλίσματος του αιθέριου ελαίου. Συγκεκριμένα, ζυγίστηκαν $0.1 \pm 0,01$ g δείγματος αιθέριου ελαίου και αναμείχθηκαν με 2 mL εξανίου και 3 mL διαλύματος $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (60:40 v/v). Κατόπιν ισχυρής ανάδευσης σε vortex για 2 λεπτά έγινε φυγοκέντριση στις 4000 στροφές για 10 λεπτά στους 4 °C. Συλλέχθηκε η μεθανολική στοιβάδα και επαναλήφθηκε εκ νέου η εκχύλιση. Τα μεθανολικά εκχυλίσματα που προέκυψαν μεταφέρθηκαν μαζί σε

ογκομετρική φιάλη των 10ml και ο όγκος συμπληρώθηκε με διάλυμα MeOH/H₂O (60:40 v/v) μέχρι τη χαραγή.

Όγκος ίσος με 0.2 ml του μεθανολικού εκχυλίσματος αραιώθηκε με απεσταγμένο νερό έως τα 2.5 ml και έπειτα προστέθηκαν 0.25 ml του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu. Μετά από 3 λεπτά ακολούθησε προσθήκη 0.5 ml υδατικού διαλύματος Na₂CO₃ (20%w/v) και συμπληρώθηκε ο όγκος με απεσταγμένο νερό μέχρι τα 100 ml. Τα δείγματα παρέμειναν για 30 min σε σκοτεινό μέρος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και μετρήθηκε η απορρόφηση του διαλύματος έναντι τυφλού στα 725 nm. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος (Gallic Acid Equivalents, GAE) ανά γραμμάριο αιθέριου ελαίου (mg GAE/g EO) με βάση την καμπύλη αναφοράς που κατασκευάστηκε για τα εύρη συγκεντρώσεων 50-200 mg/kg γαλλικού οξέος.

Όλες οι μετρήσεις έγιναν εις τριπλούν και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ο μέσος όρος των τριών μετρήσεων.

3.1.4. Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων αιθέριων ελαίων ρίγανης βασίστηκε στη δέσμευση των ελεύθερων ριζών με τη μέθοδο DPPH (2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζυλ·) (Payum et al., 2015), ενώ για την ανάλυση αυτή χρησιμοποιήθηκαν και πάλι τα μεθανολικά εκχυλίσματα των αιθέριων ελαίων των οποίων η παρασκευή περιγράφεται παραπάνω. Ειδικότερα, ποσότητα 0.1 ml μεθανολικού εκχυλίσματος μαζί με 2.9 ml διαλύματος DPPH (0.071μM σε MeOH) εισήχθησαν σε κατάλληλη κυψελίδα και τοποθετήθηκαν σε σκοτεινό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου για μισή ώρα. Μετά την παρέλευση της μισής ώρας μετρήθηκε η απορρόφηση του διαλύματος έναντι τυφλού στα 517nm.

Στη συνέχεια κατασκευάστηκε καμπύλη βαθμονόμησης για εύρος συγκεντρώσεων Trolox 10–200 ppm και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μmol ισοδυνάμων Trolox ανά γραμμάριο αιθέριου ελαίου (μmol TE/g EO).

Όλοι οι προσδιορισμοί πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ο μέσος όρος.

3.2. Στατιστική Ανάλυση

3.2.1. Ανάλυση διακύμανσης (ANOVA)

Το μοντέλο για την ανάλυση διακύμανσης ANOVA που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη διατριβή ήταν το απλό μοντέλο με την επίδραση μιας μόνο μεταβλητής:

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}, \begin{cases} i = 1, \dots, \alpha \\ j = 1, \dots, n \end{cases}$$

όπου:

μ : ο συνολικός μέσος του μοντέλου (σταθερό)

τ_i : το πόσο επιδρά το i επίπεδο στο μοντέλο, όπου $i=1, 2, \dots, \alpha$. για τις επιδράσεις των επιπέδων ισχύει: $\sum_{i=1}^{\alpha} \tau_i = 0$

ε_{ij} : τα σφάλματα τα οποία είναι ανεξάρτητα και ακολουθούν κανονική κατανομή με μέση τιμή 0 και διακύμανση σ^2 σταθερή αλλά άγνωστη $N(0, \sigma^2)$.

Έτσι, ακολουθεί ο έλεγχος: $H_0: \tau_1 = \tau_2 = \dots = \tau_{\alpha}$, $H_1: \tau_i \neq 0$ (για τουλάχιστον ένα i). Η συνάρτηση F_0 του παραπάνω ελέγχου ακολουθεί την κατανομή: $F_{\alpha, \alpha-1, N-\alpha}$

- Αν F_0 είναι μεγάλος αριθμός, τότε τα τ_i στατιστικά διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους.
- Αν F_0 είναι μικρός αριθμός, τότε τα τ_i στατιστικά δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους.

3.2.2. Πολυμεταβλητή Ανάλυση Διακύμανσης (MANOVA)

Η τεχνική της Πολυμεταβλητής Ανάλυσης της Διακύμανσης (Multivariate ANalysis Of VAriance-MANOVA) αποτελεί προέκταση της απλής ανάλυσης της διακύμανσης ANOVA και χρησιμοποιείται για τη μελέτη της επίδρασης δύο ή περισσότερων κατηγορικών μεταβλητών σε ένα πλήθος ποσοτικών μεταβλητών. Οι κατηγορικές νοούνται ως ανεξάρτητες μεταβλητές και οι ποσοτικές ως εξαρτημένες. Η MANOVA ελέγχει τις διαφορές μεταξύ των διανυσμάτων των μέσων όρων, δηλαδή ταυτόχρονα

όλων των εξαρτημένων μεταβλητών σε όλα τα επίπεδα των παραγόντων, χρησιμοποιώντας ως βάση τη μήτρα διακυμάνσεων-συνδιακυμάνσεων. Σκοπός της MANOVA είναι να προσδιορίσει αν κάποιες μεταβλητές απόκρισης (εξαρτημένες) μπορούν να επηρεαστούν από το χειρισμό επιλεγμένων ανεξάρτητων μεταβλητών και η ενέργεια αυτή στοχεύει στην ανεύρεση και τη στατιστική τεκμηρίωση της δράσης των κύριων παραγόντων αλλά και των αλληλεπιδράσεών τους, καθώς επίσης και του μεγέθους της σημαντικότητας και της έντασης της σχέσης μεταξύ των εξαρτημένων μεταβλητών. Αν ο έλεγχος F της MANOVA είναι στατιστικά σημαντικός, συμπεραίνουμε ότι κάποιες από τις ανεξάρτητες μεταβλητές ασκούν πραγματικά επίδραση σε κάποιες από τις εξαρτημένες.

Σε γενικές γραμμές η μέθοδος ακολουθεί τα εξής βήματα υπολογισμών:

- > Δημιουργεί μία νέα εξαρτημένη μεταβλητή, τη χαρακτηριζόμενη κανονιστική μεταβλητή (canonical variable), η οποία συντίθεται από το γραμμικό συνδυασμό όλων των εξαρτημένων με τέτοιο τρόπο ώστε να μεγιστοποιεί τη διαφορά απόκρισης αυτής μεταξύ των ομάδων των ανεξάρτητων μεταβλητών, στη συνέχεια μια δεύτερη κανονιστική μεταβλητή λιγότερη σημαντική κ.ο.κ.
- > Ελέγχει αν η νέα μεταβλητή διαφέρει στατιστικά σημαντικά μεταξύ των ανεξάρτητων ομάδων.

Επιπλέον, υπάρχουν κριτήρια που ελέγχουν την ύπαρξη στατιστικά σημαντικών διαφορών των χαρακτηριστικών ριζών των εξαρτημένων μεταβλητών στα διάφορα επίπεδα των ανεξάρτητων:

Έλεγχος του Wilks (Λ). Υπό κανονικές συνθήκες επιλέγεται πρώτος διότι ανιχνεύει αν υπάρχουν διαφορές σε όλες τις χαρακτηριστικές ρίζες και προσεγγίζεται με το κριτήριο της κατανομής F . Όσο μικρότερη τιμή παίρνει τόσο μεγαλύτερη διασπορά τιμών παρατηρείται μεταξύ των ομάδων. Το κριτήριο αυτό δεν προτείνεται όταν υφίσταται κάποιο πρόβλημα, όπως συμβαίνει με την παρουσία μικρού αριθμού παρατηρήσεων του πειράματος (N), άνισων παρατηρήσεων στα συνδυασμένα επίπεδα και αδυναμία συμμόρφωσης με τις προϋποθέσεις εφαρμογής της μεθόδου.

Έχνος του Pillai (V). Ανιχνεύει διαφορές σε όλες τις ρίζες και όταν το δειγματοληπτικό μέγεθος είναι μικρό, το μέγεθος των επαναλήψεων διαφέρει στα κελιά και σε έλλειψη ομοιογένειας των συνδιακυμάνσεων.

Για τον έλεγχο της στατιστικής τους σημαντικότητας χρησιμοποιείται η F -κατανομή. Τιμές των κριτηρίων F των ελέγχων μεγαλύτερες της πιθανότητας αναφοράς 0.05, δηλώνουν ότι παράγεται σημαντική στατιστικά πληροφορία για τυχόν επίδραση των παραγόντων στις μεταβλητές. Έστω $X_1, \dots, X_p$, οι p σημαντικές μεταβλητές που θα χρησιμοποιηθούν στη διακριτική ανάλυση. Τότε η πρώτη διακριτική συνάρτηση ορίζεται από τη σχέση:

$$Z_1 = w_{11}X_1 + w_{12}X_2 + \dots + w_{1p}X_p$$

όπου

w_{ij} είναι η στάθμιση της j μεταβλητής στην i διαχωριστική συνάρτηση.

Τα w_{ij} εκτιμώνται έτσι ώστε να μεγιστοποιείται η ποσότητα

$$\lambda_1 = \frac{SS_{\text{between group of } Z_1}}{SS_{\text{within group of } Z_1}}$$

η οποία ονομάζεται Wilk's Lambda (between: δια-ομαδική διασπορά, within: ενδο-ομαδική διασπορά).

Ακολούθως δημιουργείται η δεύτερη διακριτική συνάρτηση:

$$Z_2 = w_{21}X_1 + w_{22}X_2 + \dots + w_{2p}X_p$$

Με αντίστοιχη μεγιστοποίηση της ποσότητας:

$$\lambda_2 = \frac{SS_{\text{between group of } Z_2}}{SS_{\text{within group of } Z_2}}$$

λαμβάνοντας στην περίπτωση όμως αυτή τον περιορισμό ότι τα αντίστοιχα βάρη για τις συναρτήσεις Z_1 και Z_2 θα πρέπει να είναι ασυσχέτιστα.

Η παραπάνω διαδικασία συνεχίζεται μέχρις ότου καθοριστούν όλες οι δυνατές διακριτικές συναρτήσεις. Το πλήθος των διαχωριστικών συναρτήσεων που απαιτούνται ώστε να διαχωριστούν όσο το δυνατόν καλύτερα οι ομάδες προκύπτει από τη σημαντικότητα της ακόλουθης στατιστικής συνάρτησης:

$$X^2 = [n - 1 - (p + G)/2] \sum_{k=1}^K \ln (1 + \lambda_k) \quad (1)$$

όπου

λ_k : είναι η ιδιοτιμή της k διαχωριστικής συνάρτησης,

n : το μέγεθος του δείγματος,

p : το πλήθος των αρχικών μεταβλητών και

G : το πλήθος των ομάδων.

Μία σημαντική τιμή του συγκεκριμένου στατιστικού σημαίνει ότι υπάρχει τουλάχιστον μία σημαντική διαχωριστική συνάρτηση. Για τις υπόλοιπες διαχωριστικές συναρτήσεις υπολογίζεται ξανά η ίδια σχέση (1), για $k=2, \dots, r$ μέχρι που κάποιο X^2 να μην προκύψει σημαντικό. Γενικά, για να εξετάσουμε αν η r διαχωριστική συνάρτηση είναι σημαντική, χρησιμοποιούμε το στατιστικό:

$$X^2 = [n - 1 - (p + G)/2] \sum_{k=r}^K \ln (1 + \lambda_k)$$

το οποίο έχει $(p-r+1)(G-r)$ βαθμούς ελευθερίας.

Από τη στιγμή που έχουν προκύψει οι διακριτικές συναρτήσεις, το επόμενο ερώτημα είναι με ποιον τρόπο γίνεται η κατάταξη και γενικά ο διαχωρισμός των ομάδων. Για την κατάταξη των περιπτώσεων χρησιμοποιείται κυρίως η στατιστική θεωρία λήψης αποφάσεων. Κατατάσσουμε μία παρατήρηση στον πληθυσμό π_j αν η ποσότητα

$$\ln p_j - 1/2(x - \mu_j)' \sum_{j=1}^{-1} (x - \mu_j)$$

είναι μέγιστη για κάθε j . Ή σε μία πιο απλή μορφή, αν η ποσότητα

$$d_j = \mu_j' \sum_{j=1}^{-1} x - 1/2 \mu_j' \sum_{j=1}^{-1} \mu_j + \ln p_j$$

είναι μέγιστη για κάθε j .

μ : είναι το διάνυσμα των μέσων τιμών της πολυπαραμετρικής κανονικής κατανομής και

Σ : ο πίνακας διακυμάνσεων-συνδιακυμάνσεων.

Ο όρος $\mu_j \Sigma^{-1}$ περιέχει τους συντελεστές της διακριτικής συνάρτησης (συντελεστές Fisher). Έτσι, το d_j είναι το ποσοστό ορθής κατάταξης που έδωσε η διακριτική συνάρτηση για την παρατήρηση x στην ομάδα j . Η σχέση (1) μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια στον καθορισμό των περιοχών- ομάδων διαχωρισμού. Έτσι, ο κανόνας είναι: τοποθετούμε την παρατήρηση x στην ομάδα p_j , αν $d_{\mu} > \ln \left(\frac{p_i}{p_j} \right)$ για κάθε $i \neq j$ όπου

$$d_{ji} = (\mu_j - \mu_i)' \sum^{-1} x - 1/2(\mu_j - \mu_i)' \sum^{-1} (\mu_j - \mu_i)$$

3.2.3. Γραμμική Διαχωριστική Ανάλυση (LDA)

Η Γραμμική Διαχωριστική Ανάλυση (Linear Discriminant Analysis, LDA), είναι απλά μια επέκταση της MANOVA και επιτρέπει να καθοριστούν όχι μόνο οι μεταβλητές οι οποίες δίνουν καλύτερες διακρίσεις ομάδων, αλλά ποιες ομάδες είναι διαφορετικές και ποιες όχι. Η LDA χρησιμοποιεί διακριτές συναρτήσεις για να καθορίσει ποια ομάδα θα αντιστοιχίσει σε κάθε ένα από τα στοιχεία των δεδομένων. Αυτό γίνεται με χρήση μιας τεχνικής ενδοεπικύρωσης, όπου οι διαχωριστικές συναρτήσεις υπολογίζονται αποκλείοντας μια παρατήρηση (παράμετρο-μεταβλητή) από το σύνολο των δεδομένων και στη συνέχεια χρησιμοποιεί τις συναρτήσεις αυτές για να κατατάξει τη παράμετρο αυτή σε μια ομάδα (leave-one-out). Αυτό επαναλαμβάνεται για καθεμία από τις παραμέτρους-μεταβλητές των δεδομένων και καταγράφονται ποιες κατατάξεις έγιναν σωστά και ποιες λάθος. Όταν ολοκληρωθεί η ανάλυση, επιστρέφει το ποσοστό της ορθής κατάταξης-ταξινόμησης των δειγμάτων για κάθε ομάδα. Το μαθηματικό μοντέλο στο οποίο βασίζεται η στατιστική ανάλυση LDA σε n -επιλεγμένες μεταβλητές αποτελείται από γραμμικές διαχωριστικές συναρτήσεις της μορφής:

$$F_i = (c_{i1}v_1 + c_{i2}v_2 + \dots + c_{in}v_n)$$

όπου

$v_1 \dots v_n$ είναι οι τιμές κάθε μιας μεταβλητής που εξετάστηκε και

$c_{i1}, c_{i2}, \dots, c_{in}$ είναι οι συντελεστές συσχέτισης της διαφοροποίησης που επιτυγχάνεται, από τις παραπάνω μεταβλητές.

Για τον υπολογισμό των συντελεστών-φορτίσεων στις διαχωριστικές συναρτήσεις χρησιμοποιήθηκαν οι συντελεστές Fisher, ενώ ο υπολογισμός των πιθανοτήτων σωστής κατάταξης έγινε με βάση το μέγεθος των ομάδων, εφόσον ο αριθμός των δειγμάτων από κάθε περιοχή δεν ήταν ο ίδιος. Επιπλέον, για τον έλεγχο της ομοιογένειας των διακυμάνσεων χρησιμοποιήθηκε ο στατιστικός έλεγχος M του Box (Box's M), βασική προϋπόθεση για να έχουμε αξιόπιστα αποτελέσματα κυρίως στην περίπτωση που τα δείγματα είναι άνισα (ο αριθμός των δειγμάτων από κάθε περιοχή δεν ήταν ο ίδιος) (Field, 2009). Το SPSS δίνει το κριτήριο Box's M για τον έλεγχο της πολυπαραμετρικής ομοιογένειας. Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων ήταν το IBM® SPSS® Statistics 26.0.

Για την επικύρωση των αποτελεσμάτων και του ορθού διαχωρισμού, χρησιμοποιήθηκε η U-μέθοδος ή μέθοδος της ενδοεπικύρωσης (με βάση την ορολογία της στατιστικής από το Ελληνικό Στατιστικό Ινστιτούτο, ΕΣΙ). Η μέθοδος αυτή συχνά αναφέρεται και ως διασταυρούμενη επικύρωση (cross validation) και συνίσταται στην ταξινόμηση της κάθε παρατήρησης σε μία ομάδα με βάση τη συνάρτηση διάκρισης, η οποία δημιουργείται από όλες τις υπόλοιπες παρατηρήσεις. Η μέθοδος της ενδοεπικύρωσης είναι περισσότερο «απαισιόδοξη» μέθοδος εκτίμησης ορθής κατάταξης (Field, 2009), εξαιτίας του γεγονότος ότι υπολογίζει τα ποσοστά αποκλείοντας σε κάθε επανάληψη μία παρατήρηση (leave-one-out). Δημιουργεί έτσι μία διαχωριστική συνάρτηση και στη συνέχεια, με βάση τον διαχωρισμό που δημιουργήθηκε, κατατάσσει την παρατήρηση που αποκλείστηκε. Αυτό γίνεται για όλες τις παρατηρήσεις του δείγματος, οδηγώντας έτσι σε πιο αξιόπιστο διαχωρισμό.

Τέλος, εφαρμόστηκε η Stepwise LDA (SLDA) ως ύστατη μέθοδος ταξινόμησης για τη διάκριση των πιο σημαντικών μεταβλητών-markers μέσω μιας διαδικασίας κλιμακωτής επιλογής μεταβλητών προκειμένου να βελτιστοποιηθεί περαιτέρω η διάκριση. Τα αποτελέσματα ταξινόμησης της SLDA αξιολογήθηκαν με βάση τη μέθοδο ενδοεπικύρωσης leave-one-out. Σύμφωνα με την stepwise διαδικασία, ξεκινάμε από ένα μοντέλο και σε κάθε βήμα ελέγχουμε ποιες μεταβλητές πρέπει να προστεθούν ή να αφαιρεθούν με βάση κάποιο κριτήριο (συνήθως το p -value του β ή του ελέγχου Πιθανοφάνειας). Σταματάμε όταν δεν μπορούμε να προσθέσουμε ή να

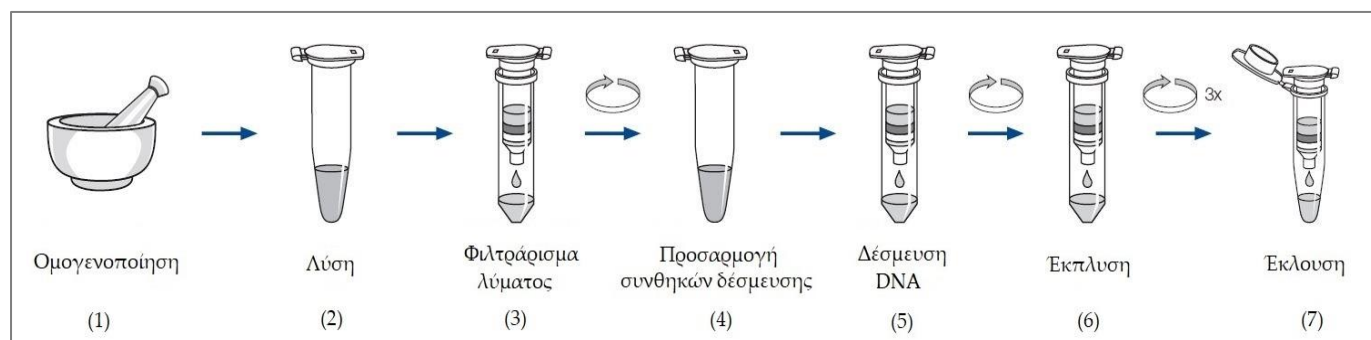
αφαιρέσουμε άλλες μεταβλητές. Συνηθισμένα μοντέλα εκκίνησης είναι το σταθερό (χωρίς καμία μεταβλητή – SPSS) ή το πλήρες (με όλες τις μεταβλητές) (Ντζούφρας, 2007).

3.3. Μοριακή ανάλυση γενοτύπων καλλιεργούμενης ρίγανης

3.3.1. Απομόνωση γενωμικού DNA

Το γενωμικό DNA (gDNA) απομονώθηκε από δείγματα ιστού φύλλων ρίγανης με τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου πακέτου υλικών NucleoSpin Plant II της Macherey-Nagel σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, 2019) με ορισμένες, ωστόσο, τροποποιήσεις. Η μέθοδος βασίζεται στην επιλεκτική και μη-ομοιοπολική πρόσδεση των μορίων DNA σε μια μεμβράνη από γέλη πυριτίας που βρίσκεται στο εσωτερικό κατάλληλης στήλης. Σε συνθήκες υψηλής αλατότητας τα αρνητικά φορτισμένα μόρια DNA έχουν μεγάλη συγγένεια προς τη θετικά φορτισμένη τροποποιημένη πυριτία της μεμβράνης. Η δέσμευση αυτή αναστρέφεται παρουσία ελαφρά αλκαλικού διαλύματος χαμηλής ιοντικής ισχύος και το DNA εκλύεται από τη μεμβράνη (Παλαιολόγου κ.α., 2015b).

Τα βασικά στάδια της μεθόδου απομόνωσης φαίνονται στην **Εικόνα Γ-3**.



Εικόνα Γ-3. Βασικά στάδια απομόνωσης γενωμικού DNA με τη χρήση του kit NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, 2019).

Αναλυτικότερα:

(1). Λειοτρίβηση φυτικού ιστού.

Η λειοτρίβηση του φυτικού υλικού πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια τεσσάρων ατσάλινων σφαιριδίων διαμέτρου 7 mm. Τα σφαιρίδια αυτά, μαζί με 100 mg αποξηραμένων φύλλων ρίγανης, τοποθετήθηκαν σε πλαστικό σωληνάριο τύπου Falcon χωρητικότητας 50 ml και υποβλήθηκαν σε ισχυρή ανάδευση με τη χρήση

μηχανικού αναδευτήρα (vortex) σε θερμοκρασία δωματίου για ένα λεπτό ή έως ότου το τελικό προϊόν να πάρει τη μορφή πούδρας.

(2). Λύση των κυττάρων με τη χρήση του Lysis Buffer PL1 (CTAB buffer).

Ποσότητα ίση με 20 mg από το λειοτριβημένο φυτικό υλικό μεταφέρθηκαν σε σωληνάριο φυγοκέντρισης τύπου Eppendorf των 1.5 ml και προστέθηκαν σε αυτά 600 µl Buffer PL1. Μετά την ανάδευση του μίγματος με χρήση vortex προστέθηκαν σε αυτό 15 µl διαλύματος ενζύμου RNase A (0,01 mg/µl) και ακολούθησε εκ νέου ανάδευση. Το δείγμα τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 65°C για μία ώρα με παράλληλη ανάδευση ανά 5 λεπτά για την αποφυγή δημιουργίας συσσωματωμάτων.

(3). Φιλτράρισμα / Διαύγαση του προϊόντος λύσης των κυττάρων.

Μετά το πέρας της επώασης το δείγμα φυγοκεντρήθηκε (10.000×g) για 5 λεπτά και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε στήλη διήθησης NucleoSpin® Filter (violet ring) η οποία τοποθετήθηκε μέσα σε σωληνάριο συλλογής (collection tube) χωρητικότητας 2 ml. Ακολούθησε φυγοκέντριση (10.000×g) για 2 λεπτά και μεταφορά του καθαρού διαλύματος σε αποστειρωμένο σωληνάριο φυγοκέντρισης τύπου Eppendorf των 1.5 ml.

(4). Προσαρμογή συνθηκών πρόσδεσης του DNA στη μεμβράνη πυριτίας (silica membrane).

Στο διαυγές διάλυμα λύσης προστέθηκαν 675 µl διαλύματος Buffer PC και ακολούθησε ανάδευση πραγματοποιώντας πέντε συνεχείς εισροφήσεις-εκροφήσεις με τη χρήση πιπέτας (pipetting).

(5). Πρόσδεση του DNA στη μεμβράνη πυριτίας.

Το τροποποιημένο διάλυμα λύσης μεταφέρθηκε στη στήλη πρόσδεσης του DNA NucleoSpin® Plant II Column (green ring) η οποία τοποθετήθηκε μέσα σε σωληνάριο συλλογής των 2 ml. Ακολούθησε φυγοκέντριση (10.000×g) για 1 λεπτό ώστε το DNA να προσδεθεί στη μεμβράνη, ενώ οι αποδιαταγμένες πρωτεΐνες, τα πολυσακχαρίδια και τα υπόλοιπα κυτταρικά συστατικά τη διαπερνούν και απομακρύνονται.

(6). Πλύση και στέγνωμα της μεμβράνης πυριτίας.

Η πλύση και η απομάκρυνση της υγρασίας της μεμβράνης πυριτίας της στήλης πραγματοποιήθηκε σε τρία στάδια:

1^η Πλύση. Προστέθηκαν 400 μ l του Buffer PW1 στο σωληνάριο της στήλης, ακολούθησε φυγοκέντριση ($10.000\times g$) για 1 λεπτό και απόρριψη της ροής.

2^η Πλύση. Προστέθηκαν 700 μ l του Buffer PW2 στο σωληνάριο της στήλης, ακολούθησε φυγοκέντριση ($10.000\times g$) για 1 λεπτό και απόρριψη της ροής.

3^η Πλύση – στέγνωμα της μεμβράνης. Προστέθηκαν 200 μ l του Buffer PW2 στο σωληνάριο της στήλης και ακολούθησε φυγοκέντριση ($10.000\times g$) για 2 λεπτά ώστε να διασφαλιστεί η πλήρης απομάκρυνση του διαλύματος πλύσης και το στέγνωμα της μεμβράνης πυριτίας.

(7). Έκλουση του DNA από τη μεμβράνη πυριτίας.

Η στήλη NucleoSpin[®] Plant II Column προσαρμόστηκε σε αποστειρωμένο σωληνάριο φυγοκέντρισης των 1.5 ml και με τη χρήση πιπέτας τοποθετήθηκαν 50 μ l προθερμασμένου στους 65°C διαλύματος έκλουσης (Buffer PE, 5mM Tris-HCl, pH 8.5) στο κέντρο της μεμβράνης της στήλης. Ακολούθησε επώαση στους 65°C για 5 min και φυγοκέντριση ($10.000\times g$) του δείγματος για 1 λεπτό ώστε να πραγματοποιηθεί η έκλουση του DNA. Η διαδικασία επαναλήφθηκε από την αρχή με την εκ νέου προσθήκη 50 μ l Buffer PE (65°C) και το νέο έκλουσμα ενώθηκε με το αρχικό. Τέλος, το διάλυμα καθαρού γενωμικού DNA φυλάχθηκε στους -20 °C μέχρι αναλύσεως.

Ο έλεγχος της επιτυχούς απομόνωσης του γενωμικού DNA και η ποσοτικοποίησή του έγινε οπτικά μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης (1% w/v σε 1xTAE) μιας ποσότητας δείγματος DNA (3 μ l) παράλληλα με ποσοτικό μάρτυρα DNA (5 μ l, 1Kb DNA Ladder plus). Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε συγκρίνοντας την ένταση της ζώνης του DNA του δείγματος με τη ζώνη του μάρτυρα (**Εικόνα Α-2**).

3.3.2. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης

Η ηλεκτροφόρηση των μορίων DNA σε πηκτή αгарόζης πραγματοποιείται σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης και βασίζεται στο γεγονός ότι το αρνητικά φορτισμένο, λόγω των φωσφορικών ομάδων που βρίσκονται στο φωσφοδιεστερικό σκελετό, DNA όταν βρεθεί σε συνεχές ηλεκτρικό πεδίο κινείται δια μέσου της πηκτής προς το θετικό πόλο.

Η κινητικότητα των μορίων DNA μέσα στο στερεό πορώδες υπόστρωμα αгарόζης επηρεάζεται από:

- Το μέγεθος του μορίου DNA. Όσο μικρότερα είναι τα μόρια του DNA τόσο ταχύτερη είναι η κίνησή του καθώς κατά την πορεία τους συναντούν μικρότερη αντίσταση στους πόρους της πηκτής. Επομένως, μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης τα μικρότερα μόρια εντοπίζονται σε χαμηλότερες θέσεις στην πηκτή από ότι τα μεγαλύτερα που κινούνται βραδύτερα.
- Τη συγκέντρωση της αгарόζης. Γενικά, σε πηκτώματα χαμηλής συγκέντρωσης ευνοείται ο διαχωρισμός μεγάλων τμημάτων DNA, ενώ σε πηκτώματα υψηλής συγκέντρωσης ευνοείται ο διαχωρισμός μεγάλων τμημάτων DNA. Ενδεικτικά, στον **Πίνακα Γ-1** αναφέρονται οι συγκεντρώσεις πηκτώματος αгарόζης που είναι κατάλληλες για τον διαχωρισμό μορίων DNA συγκεκριμένου μεγέθους.
- Τη διαμόρφωση του DNA. Μόρια DNA ίδιου μεγέθους αλλά διαφορετικής διαμόρφωσης παρουσιάζουν διαφορετική κινητικότητα στην πηκτή αгарόζης. Τα κυκλικά υπερελικωμένα μόρια κινούνται ταχύτερα και ακολουθούν τα ανοιχτά κυκλικά και τα γραμμικά μόρια DNA. Συνήθως τα μόρια αναλύονται σε ευθύγραμμη διαμόρφωση-linear (π.χ μετά από επώαση με περιοριστικές ενδονουκλεάσες) καθώς ένα γραμμικό μόριο DNA κινείται με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του δεκαδικού λογάριθμου του μοριακού του βάρους.
- Την τάση του ηλεκτρικού πεδίου. Η κινητικότητα του μορίου DNA είναι ανάλογη της τάσης του πεδίου. Ο καλύτερος διαχωρισμός επιτυγχάνεται σε τάση μικρότερη ή ίση των 5 Volt/cm. Σε χαμηλή τάση ευνοείται ο διαχωρισμός μεγάλων

μορίων, ενώ σε υψηλότερη τάση διαχωρίζονται μόνο τα μικρά μόρια DNA (Παλαιολόγου, 2015).

Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης του DNA σε πηκτή αгарόζης ολοκληρώθηκε σε τρία βασικά στάδια (Voytas, 2001; Παλαιολόγου, 2015):

(a) Παρασκευή πηκτής αгарόζης

Παρασκευάστηκαν πηκτώματα αгарόζης συγκέντρωσης 1 ή 1.5% w/v σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X TAE, κατάλληλα για το μέγεθος των μορίων που θέλαμε να διαχωρίσουμε. Το εκάστοτε διάλυμα αгарόζης θερμάνθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων έως ότου η αгарόζη να διαλυθεί πλήρως και το διάλυμα να γίνει διαυγές. Το διάλυμα αφέθηκε να κρυώσει και όταν η θερμοκρασία του έφτασε περίπου τους 50 °C προστέθηκε η χρωστική νουκλεϊκών οξέων GelRed® σε συγκέντρωση 0.5X ώστε να γίνουν ορατές οι ζώνες των μορίων DNA στην πηκτή αгарόζης. Στη συνέχεια, το ρευστό διάλυμα αгарόζης τοποθετήθηκε στο εκμαγείο. Το εκμαγείο είχε προετοιμαστεί κλείνοντας με ειδικούς υποδοχείς τις ανοικτές πλευρές του και τοποθετώντας το «χτένι» ώστε να δημιουργηθούν τα κατάλληλα «πηγαδάκια» εντός των οποίων θα φορτωθούν τα δείγματα. Η ρευστή αгарόζη χύθηκε στο εκμαγείο προσεκτικά ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός φυσαλίδων. Στην περίπτωση σχηματισμού φυσαλίδων η απομάκρυνσή τους πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια ενός tip. Έπειτα, το ρευστό πήκτωμα αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να στερεοποιηθεί και να αποκτήσει γαλακτόχρωμο χρώμα. Μετά την πήξη του πηκτώματος αφαιρέθηκαν προσεκτικά οι υποδοχείς και το «χτένι».

Πίνακας Γ-1. Ενδεικτικές συγκεντρώσεις πηκτωμάτων αгарόζης για τον διαχωρισμό μορίων DNA διαφορετικού μεγέθους. Οι ακριβείς συγκεντρώσεις προσαρμόζονται ανάλογα με τις συστάσεις του κατασκευαστή (Παλαιολόγου, 2015).

Πήκτωμα αγαρόζης % (w/v)	Εύρος διακριτικής ικανότητας	Παρατηρήσεις
0.5	1 kb έως 30 kb	Πηκτώματα χαμηλής συγκέντρωσης – ευνοείται ο διαχωρισμός μεγάλων τμημάτων DNA
0.7	800 bp έως 12 kb	

1.0	500 bp έως 10 kb	
1.2	400 bp έως 7 kb	
1.5	200 bp έως 3 kb	Πηκτώματα υψηλής συγκέντρωσης –ευνοείται ο διαχωρισμός μικρών τμημάτων DNA
2.0	50 bp έως 2 kb	

Όπου: Kb = kilobases, χιλιάδες βάσεων, bp= basepairs, ζεύγη βάσεων

(b) Τοποθέτηση των δειγμάτων και ηλεκτροφόρηση

Το εκμαγείο με την πηκτή αγαρόζης τοποθετήθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστέθηκε η ανάλογη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος TAE στη δεξαμενή μέχρι ύψους 0,5 cm πάνω από την επιφάνεια της πηκτής. Κατά την πλήρωση της δεξαμενής εξασφαλίστηκε η απουσία τυχόν παγιδευμένου αέρα στο εσωτερικό των θέσεων υποδοχής των δειγμάτων.

Στη συνέχεια προστέθηκε κατάλληλος όγκος διαλύματος φόρτωσης (BlueJuice Gel Loading Buffer 10X) στα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα DNA. Καθώς το διάλυμα φόρτωσης έχει μεγαλύτερο ειδικό βάρος από το διάλυμα ηλεκτροφόρησης, λόγω της περιεκτικότητάς του σε γλυκερόλη, το δείγμα DNA κάθεται στον πυθμένα του «πηγαδιού» και μετά την εφαρμογή της διαφοράς δυναμικού εισχωρεί στην πηκτή της αγαρόζης. Επιπλέον, η χρωστική που περιέχει (κυανό της βρωμοφαινόλης) είναι αρνητικά φορτισμένη και κινείται προς την ίδια κατεύθυνση με το DNA, διευκολύνοντας τον μακροσκοπικό εντοπισμό της κινητικότητας του δείγματος στην πηκτή.

Ακολούθησε φόρτωση των δειγμάτων (τελικού όγκου 20μl) στις θέσεις υποδοχής της πηκτής με τη βοήθεια πιπέτας ρυθμιζόμενου όγκου. Παράλληλα φορτώθηκαν και 5 μl πρότυπου δείκτη μοριακών βαρών DNA (1Kb ladder plus) για τον προσδιορισμό της θέσης των ζωνών του DNA στο πήκτωμα. Μετά την τοποθέτηση των δειγμάτων στις θέσεις υποδοχής, εφαρμόστηκε το καπάκι της συσκευής, έτσι ώστε τα ηλεκτρόδια του τροφοδοτικού να συνδεθούν στους πόλους της δεξαμενής ηλεκτροφόρησης. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε τάση 2-5 Volt/cm και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η ρύθμιση της τάσης έγινε ανάλογα με την

απόσταση μεταξύ των ηλεκτροδίων της συσκευής ηλεκτροφόρησης και το μέγεθος των μορίων του DNA που πρόκειται να διαχωριστούν.

Τέλος, το πέρας της ηλεκτροφόρησης καθορίστηκε από τη θέση της χρωστικής του διαλύματος φόρτωσης πάνω στην πηκτή ή /και από την παρατήρηση της πηκτής πάνω στην τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας. Η ηλεκτροφόρηση τερματίστηκε όταν κρίθηκε ότι είχε επιτευχθεί ο επιθυμητός διαχωρισμός των μορίων DNA του δείγματος.

(c) Απεικόνιση των αποτελεσμάτων ηλεκτροφόρησης

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης η πηκτή παρατηρήθηκε σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας και εκτέθηκε σε UV ακτινοβολία προκειμένου να γίνουν ορατά τα σύμπλοκα DNA – φορίζουσα χρωστική ως πορτοκαλόχρωμες ζώνες. Τέλος, η πηκτή φωτογραφήθηκε και αποθηκεύτηκε σε ψηφιακό μέσο (**Εικόνα Γ-4**).



Εικόνα Γ-4. Αριστερά: τράπεζα υπεριώδους φωτός MS Major Science (UV transilluminator), Δεξιά: κάμερα MS Major Science, της εταιρείας Biolab (Εργαστήριο Παραγωγικής Γεωργίας και Φυτοϋγείας, Τμήμα Γεωπονίας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 2022).

3.3.3. Ενίσχυση αλληλουχιών DNA με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

3.3.3.1 Αρχή της μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, γνωστή ως PCR, είναι ένας απλός τρόπος πολλαπλασιασμού συγκεκριμένων τμημάτων του αρχικού γενετικού υλικού, έτσι ώστε να είναι εφικτή η περαιτέρω μελέτη του με διάφορες μεθόδους, όπως η ηλεκτροφόρηση, η πέψη με ένζυμα περιορισμού, η ανάγνωση της αλληλουχίας βάσεων κ.ά.

Η πραγματοποίηση μιας αντίδρασης PCR, η οποία βασίζεται σε χαρακτηριστικά της αντιγραφής του DNA *in vitro*, περιλαμβάνει την ανάμιξη των εξής συστατικών:

- Μήτρα DNA: είναι το DNA που περιέχει την αλληλουχία που θέλουμε να ενισχύσουμε (αλληλουχία-στόχος) π.χ. το απομονωμένο γενωμικό DNA ενός οργανισμού. Μικρές ποσότητες DNA (της τάξης των 25-100 ng ανά αντίδραση τελικού όγκου 50 µl) είναι επαρκείς για τις περισσότερες αντιδράσεις PCR.
- Ειδικό ζεύγος εκκινητών (primers): Οι εκκινητές είναι μονόκλωνα ολιγονουκλεοτίδια μήκους 17 – 30 bp, που παράγονται συνθετικά και είναι συμπληρωματικοί στις παράπλευρες αλληλουχίες των άκρων του προς ενίσχυση τμήματος DNA.
- Μίγμα των τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs: dATP, dTTP, dCTP, dGTP) όπου το κάθε ελεύθερο νουκλεοτίδιο έχει συγκέντρωση 0,2 mM.
- Ρυθμιστικό διάλυμα: Το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) μιας αντίδρασης PCR ρυθμίζει το pH και το ιοντικό περιβάλλον της αντίδρασης ώστε να είναι το βέλτιστο για τη λειτουργία της DNA πολυμεράσης. Το pH ρυθμίζεται στο ~8,5 από την παρουσία Tris-HCl στο ρυθμιστικό διάλυμα, ενώ η ιοντική ισχύς παρέχεται από ιόντα K⁺ ή Na⁺.

- Διάλυμα $MgCl_2$: Τα ιόντα Mg^{2+} σχηματίζουν σύμπλοκα με τα dNTPs και σταθεροποιούν τις αλληλεπιδράσεις της DNA πολυμεράσης με το DNA και τα dNTPs. Συνήθης βέλτιστη συγκέντρωση $MgCl_2$ είναι τα 1,5 mM.
- Θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση (Taq DNA polymerase): Η πολυμεράση που χρησιμοποιείται στην PCR έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus* (Taq), το οποίο έχει ως φυσικό περιβάλλον τις θερμές πηγές. Η Taq πολυμεράση έχει τη βασική ιδιότητα να παραμένει δραστική σε υψηλές θερμοκρασίες. Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της είναι $72^{\circ}C$, ενώ δεν καταστρέφεται από τη θέρμανση ακόμη και στους $95^{\circ}C$ για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα (Παλαιολόγου et al., 2015a).

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε 3 κύρια στάδια τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά για 25 -40 κύκλους (**Εικόνα Γ-5**):

(1). Αποδιάταξη ή μετουσίωση του DNA (denaturation):

Στο στάδιο αυτό διαχωρίζονται οι αλυσίδες της διπλής έλικας του DNA με θέρμανση στους $95^{\circ}C$ για περίπου 30 sec έως 1 min. Συγκεκριμένα, η υψηλή θερμοκρασία σπάει τους δεσμούς υδρογόνου που συνδέουν τις δύο αλυσίδες μεταξύ τους και έτσι διαχωρίζονται. Συνήθως προηγείται ένα αρχικό στάδιο θέρμανσης στους $95^{\circ}C$ για 2-5 min ώστε να επιτευχθεί ο πλήρης διαχωρισμός του δίκλωνου μορίου DNA.

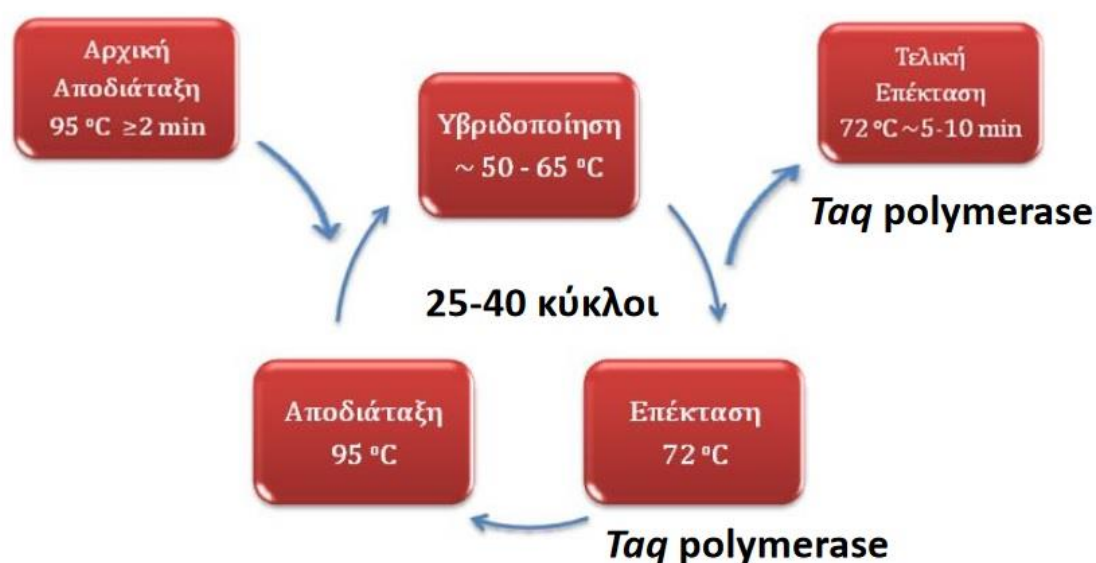
(2). Υβριδοποίηση των εκκινητών (annealing):

Η θερμοκρασία μειώνεται απότομα στους $48 - 60^{\circ}C$ για περίπου 30 sec έως 1 min και έτσι οι εκκινητές προσδένονται στις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες σε κάθε αλυσίδα. Η θερμοκρασία και ο απαιτούμενος χρόνος ψύξης ποικίλλουν ανάλογα με το μήκος και τη σύσταση των εκκινητών σε βάσεις G και C. Προσθέτοντας εκκινητές σε περίσσεια αποφεύγουμε την υβριδοποίηση του αρχικού DNA με τον εαυτό του.

(3). Επέκταση / επιμήκυνση (extension / elongation):

Η θερμοκρασία αυξάνεται στους $72^{\circ}C$ για περίπου 1 - 2 min ώστε να γίνει η αντίδραση πολυμερισμού από το ένζυμο DNA πολυμεράση, το οποίο συνθέτει απέναντι από κάθε μονόκλωνη αλυσίδα τη συμπληρωματική της. Επομένως θα παραχθούν δύο δίκλωνα από ένα αρχικό δίκλωνο μόριο DNA αφού η κάθε

μονόκλωνη αλυσίδα χρησιμοποιείται ως εκμαγείο κατά την αντίδραση πολυμερισμού. Ο κύκλος που αναφέρθηκε παραπάνω θα επαναληφθεί πολλές φορές. Σε κάθε κύκλο τα αντίγραφα που έχουν δημιουργηθεί χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία για τον επόμενο κύκλο και ο αριθμός των αντιγράφων αυξάνεται με γεωμετρική πρόοδο, δηλαδή μετά από n κύκλους λαμβάνονται $2n$ δίκλωνα μόρια DNA. Μετά την ολοκλήρωση των απαιτούμενων κύκλων η θερμοκρασία παραμένει στους 72°C για 5-10 λεπτά ώστε να πραγματοποιηθεί η τελική επιμήκυνση των νέων κλώνων. Η διαδικασία πραγματοποιείται σε ειδική συσκευή, τον θερμικό κυκλοποιητή (Thermal cycler) (Εικόνα Γ-6). Η συσκευή αυτή φέρνει θερμαινόμενη πλάκα με ειδικές υποδοχές για τα σωληνάκια PCR (PCR tubes) μέσα στα οποία βρίσκεται το μίγμα των αντιδραστηρίων και μπορεί να εναλλάσσει θερμοκρασίες με ταχύτητα και ακρίβεια (Sambrook and Russell, 2001; Παλαιολόγου κ.α., 2015a).



Εικόνα Γ-5. Βασικά στάδια της τεχνικής PCR (Παυλίδης, 2019).

3.3.3.2 Ενίσχυση της ενδομεταγραφόμενης περιοχής (ITS) του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA (nrDNA).

Για την ενίσχυση της ITS περιοχής του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα το απομονωμένο γενωμικό DNA από τα υπό μελέτη δείγματα καλλιεργούμενης ρίγανης και οι καθολικοί εκκινητές (universal primers) ITS1 και ITS4 (White et al., 1990):

ITS1: 5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG- 3'

ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

Η όλη διαδικασία της προετοιμασίας των δειγμάτων έγινε υπό ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής και όλα τα υλικά και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αποστειρωμένα. Επίσης, η όλη διαδικασία έγινε μέσα σε πάγο ώστε να διατηρείται η θερμοκρασία χαμηλή. Για έλεγχο τυχόν επιμολύνσεων χρησιμοποιήθηκε αρνητικός μάρτυρας, ο οποίος, αντί για δείγμα DNA, περιείχε υπερκάθαρο νερό στην ίδια ποσότητα.

Αντίδραση PCR

Για τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκαν σωληνάκια τύπου Eppendorf όγκου 200μl και το πακέτο υλικών Taq polymerase kit της εταιρείας Kapa Biosystems.

Σύσταση της αντίδρασης PCR:

Αντιδραστήρια	Όγκος ανά αντίδραση (μl)
Υπερκάθαρο νερό (PCR grade water)	25,1
5xBuffer C	10
25 mM MgCl ₂	5
dNTPs (10 mM το καθένα)	1
BSA (50μg/μl)	0,5
Εκκινητής ITS1 (10 pmols/μl)	1,5
Εκκινητής ITS4 (10 pmols/μl)	1,5
Γενωμικό DNA	5 (~50 ng)

Taq DNA polymerase (5 unit/μl)	0,4
Τελικός όγκος	50

Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν με τον θερμικό κυκλοποιητή MyCycler της Bio-Rad (**Εικόνα Γ-6**) και το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το εξής:

Στάδιο 1^ο: Αρχική μετουσίωση του DNA.

Θέρμανση στους 95°C για 5min.

Στάδιο 2^ο: Κύκλος.

Μετουσίωση του DNA στους 95°C για 30 sec

Υβριδισμός εκκινητών στους 58°C για 15 sec

Επιμήκυνση στους 72°C για 45 sec.

(Ο παραπάνω κύκλος επαναλήφθηκε 35 φορές)

Στάδιο 3^ο: Τελική επιμήκυνση.

Διατήρηση στους 72°C για 2 min.

Μετά την ολοκλήρωση του προγράμματος η θερμοκρασία μειώθηκε στους 4 °C ώστε να αποθηκευτούν προσωρινά τα προϊόντα PCR. Η μακροχρόνια αποθήκευσή τους έγινε στους -20 °C.

Προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχής ενίσχυση της ITS περιοχής του nrDNA, δείγμα όγκου 5μl από κάθε προϊόν PCR ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης 1,5% w/v σε ρυθμιστικό διάλυμα 1×TAE με την εφαρμογή συνεχούς ηλεκτρικού πεδίου τάσης 70 Volt για 90 min. Η εκτίμηση του αριθμού των βάσεων των εμφανιζόμενων ζωνών έγινε σε σχέση με πρότυπο δείκτη μοριακών βαρών DNA (1 Kb DNA Ladder plus).



Εικόνα Γ-6. Θερμικός κυκλοποιητής BioRad MyCycler Thermal Cycler και το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διαδικασία PCR για την ενίσχυση της ITS περιοχής (Εργαστήριο Παραγωγικής Γεωργίας και Φυτοϋγείας, Τμήμα Γεωπονίας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 2022).

3.3.3.3 Ενίσχυση δεικτών RAPD

Για την ανίχνευση γενετικής ποικιλότητας μεταξύ των δειγμάτων καλλιεργούμενης ρίγανης δοκιμάστηκαν 15 δεκαμερείς εκκινητές (Πίνακας Α-3).

Αντίδραση PCR

Για τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκαν σωληνάκια τύπου Eppendorf όγκου 200μl και το πακέτο υλικών Taq polymerase kit της εταιρείας Kapa Biosystems.

Σύσταση της αντίδρασης PCR:

Αντιδραστήρια	Όγκος ανά αντίδραση (μl)
Υπερκάθαρο νερό (PCR grade water)	10,55
5xBuffer C	5
25 mM MgCl ₂	2,5

dNTPs (10 mM το καθένα)	0,5
BSA (50μg/μl)	0,25
Εκκινητής	1
Γενωμικό DNA	5 (~50 ng)
Taq DNA polymerase (5 unit/μl)	0,2
Τελικός όγκος	25

Για την προετοιμασία των δειγμάτων ακολουθήθηκε παρόμοια διαδικασία με αυτή που αναφέρεται στην **Παράγραφο 3.3.3.2.**

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε περιλάμβανε τα εξής στάδια:

Στάδιο 1^ο: Αρχική μετουσίωση του DNA.

Θέρμανση στους 95°C για 5min.

Στάδιο 2^ο: Κύκλος.

Μετουσίωση του DNA στους 95°C για 30 sec

Υβριδισμός εκκινητών στους 39°C για 30 sec

Επιμήκυνση στους 72°C για 2min.

(Ο παραπάνω κύκλος επαναλήφθηκε 40 φορές)

Στάδιο 3^ο: Τελική επιμήκυνση.

Διατήρηση στους 72°C για 7 min.

Μετά την ολοκλήρωση του προγράμματος, η θερμοκρασία μειώθηκε στους 4 °C ώστε να αποθηκευτούν προσωρινά τα προϊόντα PCR. Η μακροχρόνια αποθήκευσή τους έγινε στους -20 °C.

Τα προϊόντα PCR διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1,5% w/v σε ρυθμιστικό διάλυμα 1xTAE. Σε κάθε πηγαδάκι της πηκτής φορτώθηκε δείγμα όγκου 18μl στο οποίο προστέθηκαν 2μl 10X loading Buffer και εφαρμόστηκε συνεχές ηλεκτρικό πεδίο τάσης 100 Volt για 3 h. Για την ανίχνευση των ζωνών DNA προστέθηκε η χρωστική νουκλεϊκών οξέων GelRed® σε συγκέντρωση 0.5X στο

διάλυμα αγαρόζης. Η εκτίμηση του αριθμού των βάσεων των εμφανιζόμενων ζωνών έγινε σε σχέση με πρότυπο δείκτη μοριακών βαρών DNA (1Kb DNA Ladder plus). Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης η πηκτή εκτέθηκε σε υπεριώδη ακτινοβολία και φωτογραφήθηκε. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με βάση αυτές τις φωτογραφίες.

3.3.4. Ανάκτηση τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης (gel extraction)

Ο καθαρισμός των παραγόμενων προϊόντων PCR είναι αναγκαίος πριν την αλληλούχησή τους, καθώς είναι απαραίτητο να απομακρυνθούν αποτελεσματικά εκκινητές, dNTPs, ένζυμα και άλατα από το μίγμα της PCR αντίδρασης. Η διαδικασία που επιλέχθηκε ήταν αυτή της ανάκτησης DNA από πηκτή αγαρόζης ώστε να διασφαλιστεί η καθαρότητα του προϊόντος πριν τον περαιτέρω χειρισμό του. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο πακέτο υλικών NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, 2022).

(1). Ηλεκτροφόρηση αντιδράσεων PCR.

Δείγμα όγκου 25 μ l από την κάθε αντίδραση PCR ηλεκτροφορήθηκε παράλληλα με πρότυπο δείκτη μοριακών βαρών DNA (1Kb DNA Ladder plus) σε πηκτή αγαρόζης (1,5 % w/v σε 1xTAE) με την εφαρμογή συνεχούς ηλεκτρικού πεδίου τάσης 60 Volt για 180 min.

(2). Αποκοπή τμήματος DNA/διαλυτοποίηση πηκτής.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης η πηκτή τοποθετήθηκε σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας και με τη χρήση αποστειρωμένου νυστεριού αποκόπηκε από την πηκτή το τμήμα εκείνο που περιείχε την επιθυμητή ζώνη DNA. Το κομμάτι αυτό τοποθετήθηκε σε προζυγισμένο αποστειρωμένο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα τύπου Eppendorf. Η διαδικασία έγινε γρήγορα ώστε να μην εκτεθεί το DNA για πολλή ώρα στην UV ακτινοβολία καθώς υπήρχε κίνδυνος καταστροφής του DNA. Το βάρος του τμήματος της πηκτής προσδιορίστηκε με ζυγό ακριβείας και για κάθε 100 mg πηκτής

αγαρόζης προστέθηκαν 200 μ L διαλύματος πρόσδεσης NTI. Ακολούθησε επώαση στους 50 °C για περίπου 10 min, με περιστασιακή ανάδευση με μηχανικό αναδευτήρα (vortex) κάθε 2 min έως ότου να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη.

(3). Δέσμευση DNA στη μεμβράνη πυριτίας.

Για τη διαδικασία δέσμευσης του DNA έγινε χρήση της στήλης NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column που περιέχει μεμβράνη από γέλη πυριτίας (silica membrane). Η στήλη τοποθετήθηκε σε σωληνάριο συλλογής των 2ml και αποχύθηκε σε αυτή σταδιακά το παραπάνω μίγμα σε ποσότητα μέχρι 700 μ l τη φορά. Ακολούθησε φυγοκέντριση (11.000 $\times$ g) για 30 sec και στη συνέχεια το παραγόμενο υγρό απορρίφθηκε, ενώ η στήλη -μαζί με το δεσμευμένο σε αυτή DNA- τοποθετήθηκε πάλι στο σωληνάριο συλλογής. Η διαδικασία επαναλήφθηκε όπου ήταν απαραίτητο.

(4). Έκπλυση της μεμβράνης πυριτίας

Προστέθηκαν 700 μ l Buffer NT3 (διάλυμα πλύσης) στο σωληνάριο της στήλης, ακολούθησε φυγοκέντριση (11.000 $\times$ g) για 30 sec και απόρριψη του παραγόμενου υγρού. Η διαδικασία επαναλήφθηκε δύο φορές.

(5). Ξήρανση της μεμβράνης πυριτίας.

Για να διασφαλιστεί η πλήρης απομάκρυνση του διαλύματος πλύσης NT3 από τη μεμβράνη πυριτίας, καθώς τυχόν υπολείμματα αιθανόλης σε αυτή δύνανται να αναστείλουν κάποιες επιθυμητές ενζυματικές αντιδράσεις, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντριση της στήλης (11.000 $\times$ g) για 1 min καθώς και επώασή της στους 70 °C για 4 min.

(6). Έκλυση DNA.

Αρχικά έγινε μεταφορά της στήλης σε αποστειρωμένο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα τύπου Eppendorf όγκου 1.5 ml. Με τη χρήση πιπέτας τοποθετήθηκαν στο κέντρο της μεμβράνης 30 μ l Buffer NE (5mM Tris- HCl, pH=8,5) και ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (18-25 °C) για 1 min. Μετά το πέρας της επώασης η στήλη φυγοκεντρήθηκε (11.000 $\times$ g) για 1 λεπτό ώστε να πραγματοποιηθεί η έκλυση του DNA. Τέλος, το διάλυμα καθαρού DNA φυλάχθηκε στους -20 °C.

3.3.5. Ανάλυση των δεδομένων - Κατασκευή φυλογενετικών δένδρων

3.3.5.1 Ανάλυση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών της ITS περιοχής του nrDNA

Τα προϊόντα των αντιδράσεων PCR, μετά την απομόνωση και τον καθαρισμό τους, στάλθηκαν προς προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας στο εργαστήριο VBC- Biotech στην Αυστρία. Στη συνέχεια, οι παραγόμενες αλληλουχίες συγκρίθηκαν με αλληλουχίες κατατεθειμένες στη βάση δεδομένων του National Center for Biotechnology Information (NCBI) χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα BLASTN.

Τέλος, κατασκευάστηκαν φυλογενετικά δένδρα με τις μεθόδους UPGMA και Neighbor Joining και τη χρήση του λογισμικού Molecular Evolutionary Genetics Analysis, MEGA11 (Tamura et al., 2021). Η αξιοπιστία του δένδρου εκτιμήθηκε πραγματοποιώντας 1000 επαναλήψεις (bootstraps) (Felsenstein, 1985).

3.3.5.2 Φυλογενετική ανάλυση με βάση τις ενισχυμένες περιοχές με RAPD εκκινητές.

Για κάθε εκκινητή (primer) κατασκευάστηκε μήτρα στην οποία εντοπίστηκαν τα ενισχυμένα τμήματα του DNA, η παρουσία ή απουσία των οποίων δηλώνονταν με το συμβολισμό 1 ή 0 αντίστοιχα. Η συγγένεια μεταξύ των δειγμάτων προσδιορίστηκε με βάση το συντελεστή ομοιότητας του Jaccard. Ο συντελεστής αυτός χρησιμοποιείται ευρέως για κυρίαρχους δείκτες, όπως είναι οι δείκτες RAPDs και δίνεται από τον τύπο: $J_{ij} = a / (n - d)$. Έτσι συγκρίνοντας δύο διαφορετικά δείγματα τα a και d εκφράζουν ταυτόχρονη παρουσία (a) ή απουσία (d) των δύο ενισχυμένων ζωνών DNA. Αντίστοιχα, υπάρχουν άλλες δύο περιπτώσεις όπου μπορεί να υπάρχει παρουσία μιας ενισχυμένης ζώνης στο ένα δείγμα και απουσία της στο άλλο. Εκεί έχουμε τις περιπτώσεις c και b . Το άθροισμα των $a+b+c+d$ συμβολίζεται με το γράμμα n (Jaccard, 1912).

Ο συντελεστής ομοιότητας του Jaccard μπορεί να λαμβάνει τιμές μεταξύ 0 και 1. Όσο πλησιέστερα βρίσκεται ο συντελεστής στην τιμή 1 τόσο τα δείγματα μοιάζουν

γενετικά. Αντίστοιχα, στην περίπτωση που ο συντελεστής πλησιάζει την τιμή 0, αυξάνεται η γενετική διαφοροποίηση των δειγμάτων, ενώ όταν η τιμή του ισούται με 1 τα δείγματα ταυτίζονται (Jaccard, 1912).

Με βάση τους συντελεστές ομοιότητας του Jaccard κατασκευάστηκαν πίνακες γενετικών αποστάσεων για κάθε δείγμα, από τους οποίους αντλήθηκαν τα στοιχεία για την κατασκευή φυλογενετικών δενδρογραμμάτων με το πρόγραμμα MEGA 11. Κατά την εισαγωγή των δεδομένων στο πρόγραμμα επιλέχθηκε η μέθοδος αποστάσεων ανά ζεύγος (pairwise distance), ενώ για την ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι UPGMA και Neighbor Joining. Η αξιοπιστία του δένδρου εκτιμήθηκε πραγματοποιώντας 1000 επαναλήψεις (bootstraps) (Felsenstein, 1985).

IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

IV.1. ΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

IV.1.1. Περιεκτικότητα των καλλιεργούμενων φυτών *O. vulgare* subsp. *hirtum* σε αιθέριο έλαιο

Η ποιότητα των καλλιεργούμενων φυτών ρίγανης καθορίζεται κυρίως από την εκατοστιαία περιεκτικότητα των φυτών σε αιθέριο έλαιο και από τη σύσταση αυτού, ανάλογα με τη χρήση για την οποία προορίζεται. Η απόδοση των φυτών του είδους *O. vulgare* σε αιθέριο έλαιο, όπως αναφέρεται και στο **Κεφ. 2.4**, μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με διάφορους επιμέρους παράγοντες, όπως το είδος και τον χημειότυπο της ρίγανης, τις συνθήκες καλλιέργειας, τις μεθόδους συγκομιδής, τις τεχνικές εκχύλισης κ.α. Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η σχέση της απόδοσης αποκλειστικά με την περιοχή προέλευσης των δειγμάτων χωρίς να εξετάζονται άλλοι επιμέρους παράγοντες.

Στον **Πίνακα IV-1** δίνονται η μέση εκατοστιαία περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο και η τυπική απόκλιση αυτής (Standard Deviation-SD), όπως υπολογίστηκαν για όλα τα δείγματα καλλιεργούμενης ρίγανης ανάλογα με την περιοχή προέλευσης. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ml αιθέριου ελαίου ανά 100 g (% v/w) ξηρού φυτικού υλικού (ξ.φ.) (Reinhard, 1972). Αντίστοιχα, στο **Σχήμα IV-1** βλέπουμε σε απεικόνιση τα δεδομένα του **Πίνακα IV-1**.

Τα δείγματα ομαδοποιήθηκαν ανάλογα με τους νομούς και εφεξής οι περιοχές καλλιέργειας των δειγμάτων θα φέρουν το όνομα του κάθε νομού.

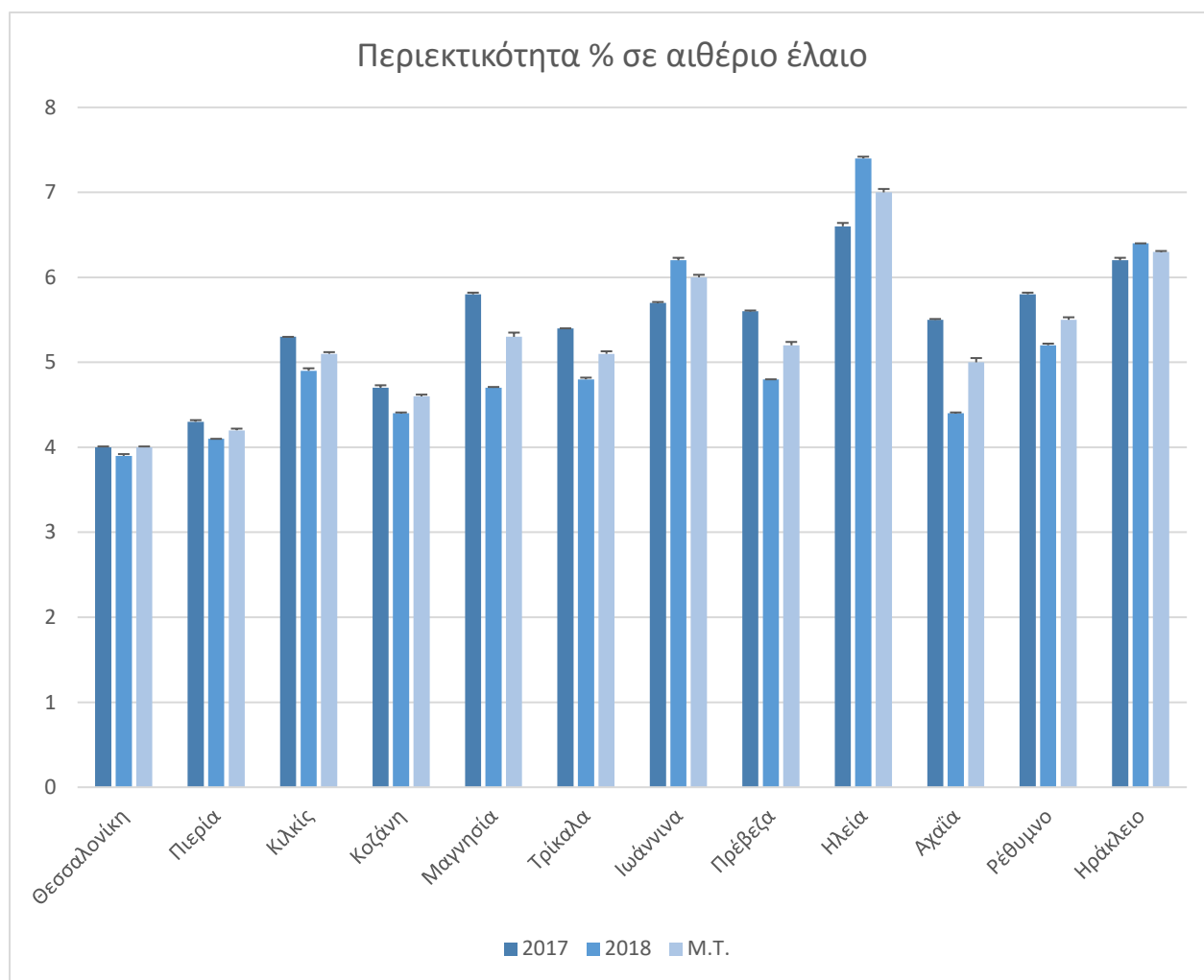
Πίνακας IV-1. Μέση εκατοστιαία περιεκτικότητα και τυπική απόκλιση των δειγμάτων καλλιεργούμενης ρίγανης *O. vulgare* subsp. *hirtum* σε αιθέριο έλαιο ανάλογα με την περιοχή προέλευσης για τις χρονιές 2017, 2018 καθώς και η μέση τιμή (Μ.Τ.) της περιεκτικότητας συνολικά και για τις δύο χρονιές.

ΜΕΣΗ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ % $\pm$ SD
ΦΥΤΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΟΥΜΕΝΗΣ ΡΙΓΑΝΗΣ ΣΕ ΑΙΘΕΡΙΟ
ΕΛΑΙΟ (ml /100 g ξ.φ.)

ΠΕΡΙΟΧΕΣ	2017	2018	Μ.Τ.
Θεσσαλονίκη	4,04 $\pm$ 0,03	3,93 $\pm$ 0,01	3,99 $\pm$ 0,02 ^a
Πιερία	4,42 $\pm$ 0,01	4,14 $\pm$ 0,00	4,28 $\pm$ 0,01 ^b
Κιλκίς	5,27 $\pm$ 0,01	4,88 $\pm$ 0,01	5,01 $\pm$ 0,01 ^c
Κοζάνη	4,66 $\pm$ 0,01	4,40 $\pm$ 0,01	4,53 $\pm$ 0,00 ^d
Μαγνησία	5,80 $\pm$ 0,02	4,69 $\pm$ 0,01	5,25 $\pm$ 0,05 ^e
Τρίκαλα	5,39 $\pm$ 0,00	4,77 $\pm$ 0,02	5,08 $\pm$ 0,03 ^c
Ιωάννινα	5,68 $\pm$ 0,01	6,22 $\pm$ 0,03	5,95 $\pm$ 0,02 ^f
Πρέβεζα	5,57 $\pm$ 0,01	4,81 $\pm$ 0,00	5,19 $\pm$ 0,01 ^g
Ηλεία	6,61 $\pm$ 0,04	7,39 $\pm$ 0,02	7,00 $\pm$ 0,04 ^h
Αχαΐα	5,48 $\pm$ 0,01	4,40 $\pm$ 0,01	4,94 $\pm$ 0,05 ⁱ
Ρέθυμνο	5,79 $\pm$ 0,02	5,18 $\pm$ 0,02	5,49 $\pm$ 0,03 ^j
Ηράκλειο	6,22 $\pm$ 0,03	6,41 $\pm$ 0,00	6,32 $\pm$ 0,01 ^k

[^{a,b,...} Τιμές με διαφορετικούς εκθέτες στην ίδια στήλη είναι στατιστικά σημαντικές όπως προκύπτει από την εφαρμογή της ANOVA ($p < 0.05$)]

Στο γράφημα που ακολουθεί (**Σχήμα IV-1**) παρατηρούμε και οπτικά πλέον τη διακύμανση που παρουσιάζουν τα δείγματα ρίγανης σε απόδοση σε αιθέριο έλαιο ανάλογα με το έτος συλλογής και την περιοχή καλλιέργειας.



Σχήμα IV-1. Διάγραμμα μέσης εκατοστιαίας περιεκτικότητας των φυτών καλλιεργούμενης ρίγανης σε αιθέριο έλαιο ανάλογα με την περιοχή προέλευσης για τις χρονιές 2017, 2018 και η μέση τιμή (M.T.) της περιεκτικότητας συνολικά και για τις δύο χρονιές.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η μεγαλύτερη απόδοση σε αιθέριο έλαιο των δειγμάτων καλλιεργούμενης ρίγανης που εξετάστηκαν καταγράφηκε τη χρονιά 2018 ($7,39 \pm 0,02$ %) στην Ηλεία, ενώ την ίδια χρονιά καταγράφηκε και η μικρότερη απόδοση ($3,93 \pm 0,01$ %) στην περιοχή της Θεσσαλονίκης. Στο συνολικό άθροισμα, η μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο έφτασε το 7,00% ($\pm 0,04$) στα δείγματα της Ηλείας, ενώ η μικρότερη το 3,99% ($\pm 0,02$) στα δείγματα της Θεσσαλονίκης. Γενικά, τα δείγματα ρίγανης από την περιοχή της Ηλείας κατέγραψαν τη μεγαλύτερη απόδοση σε αιθέριο έλαιο, ενώ τα δείγματα από την περιοχή της Θεσσαλονίκης είχαν τη μικρότερη απόδοση και για τις δύο χρονιές ξεχωριστά, αλλά και συνολικά.

Πιο αναλυτικά, για τη χρονιά 2017 η σειρά κατάταξης των περιοχών σύμφωνα με την περιεκτικότητα των δειγμάτων ρίγανης σε αιθέριο έλαιο ήταν η εξής:

Θεσσαλονίκη (4,04%) < Πιερία (4,42%) < Κοζάνη (4,66%) < Κιλκίς (5,27%) < Τρίκαλα (5,39%) < Αχαΐα (5,48%) < Πρέβεζα (5,57%) < Ιωάννινα (5,68%) < Ρέθυμνο (5,79%) < Μαγνησία (5,80%) < Ηράκλειο (6,22%) < Ηλεία (6,61%).

Για τη χρονιά 2018 η σειρά διαμορφώθηκε ως εξής:

Θεσσαλονίκη (3,93%) < Πιερία (4,14%) < Αχαΐα, Κοζάνη (4,40%) < Μαγνησία (4,69%) < Τρίκαλα (4,77%) < Πρέβεζα (4,81%) < Κιλκίς (4,88%) < Ρέθυμνο (5,18%) < Ιωάννινα (6,22%) < Ηράκλειο (6,41%) < Ηλεία (7,39%).

Ενώ, συνολικά και για τις δύο χρονιές η κατάταξη ήταν η εξής:

Θεσσαλονίκη (3,99%) < Πιερία (4,28%) < Κοζάνη (4,53%) < Αχαΐα (4,94%) < Κιλκίς (5,01%) < Τρίκαλα (5,08%) < Πρέβεζα (5,19%) < Μαγνησία (5,25%) < Ρέθυμνο (5,49%) < Ιωάννινα (5,95%) < Ηράκλειο (6,32%) < Ηλεία (7,00%).

Όπως παρατηρούμε, οι περιοχές της Θεσσαλονίκης, της Πιερίας και της Κοζάνης κατέχουν σταθερά, με αυτή τη σειρά, τις τρεις πρώτες θέσεις ως περιοχές προέλευσης δειγμάτων ρίγανης με τη χαμηλότερη περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο και ξεχωριστά για τις χρονιές 2017, 2018, αλλά και συνολικά. Αντίστοιχα, το Ηράκλειο και η Ηλεία είναι σταθερά στις τελευταίες θέσεις έχοντας τις υψηλότερες αποδόσεις σε αιθέριο έλαιο, ενώ οι υπόλοιπες περιοχές καταλαμβάνουν διάφορες ενδιάμεσες θέσεις χωρίς να παρατηρείται κάποιο ιδιαίτερο μοτίβο.

Συνολικά, για τις 12 περιοχές που μελετήθηκαν, τα δείγματα από μόνο τρεις από αυτές (τα Ιωάννινα, την Ηλεία και το Ηράκλειο) σημείωσαν αύξηση της περιεκτικότητάς τους σε αιθέριο έλαιο το 2018 συγκριτικά με το 2017, ενώ οι υπόλοιπες εννέα περιοχές σημείωσαν μείωση. Η μεγαλύτερη μείωση σε απόδοση αιθέριου ελαίου μεταξύ των δύο καλλιεργητικών περιόδων καταγράφηκε στα δείγματα ρίγανης από την περιοχή της Μαγνησίας, με συνολική μείωση το 2018 κατά -1,11% από το 2017, ενώ ακολούθησαν τα δείγματα ρίγανης από την Αχαΐα με μείωση κατά -1,08%. Η μείωση των δειγμάτων ρίγανης των υπολοίπων περιοχών κυμάνθηκε από -0,11% (Θεσσαλονίκη) έως -0,76% (Πρέβεζα).

Αντίστοιχα, η μεγαλύτερη αύξηση σε απόδοση αιθέριου ελαίου καταγράφηκε στα δείγματα ρίγανης από την περιοχή της Ηλείας (+0,78%), ενώ ακολούθησαν τα δείγματα από τα Ιωάννινα (+0,54%) και τελευταία αυτά από το Ηράκλειο (+0,19%). Τέλος, η μεγαλύτερη συνολική διαφορά σε απόδοση αιθέριου ελαίου μεταξύ των δύο καλλιεργητικών περιόδων καταγράφηκε στα δείγματα ρίγανης από την περιοχή της Μαγνησίας (1,11%), ενώ η μικρότερη στα δείγματα από την περιοχή της Θεσσαλονίκης (0,11%).

Όπως παρατηρούμε στον **Πίνακα IV-1**, οι τιμές της απόδοσης σε αιθέριο έλαιο των δειγμάτων καλλιεργούμενης ρίγανης στο σύνολό τους κυμάνθηκαν από ~ 4% μέχρι 7%. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με την πλειοψηφία των δεδομένων που υπάρχουν στη βιβλιογραφία σχετικά με την περιεκτικότητα καλλιεργούμενων φυτών ρίγανης *O. vulgare* subsp. *hirtum* σε αιθέριο έλαιο. Ωστόσο, πρέπει να τονιστεί ότι οι περισσότερες περιπτώσεις που εξετάζονται στη βιβλιογραφία αφορούν πειραματικές καλλιέργειες και όχι εμπορικές όπως συμβαίνει στην παρούσα διατριβή. Ενδεικτικά παρατίθενται κάποιες από αυτές:

Ο Γαβαλάς (2004) πραγματοποίησε μεταφύτευση ενός αριθμού αυτοφυών πληθυσμών *O. vulgare* subsp. *hirtum* και ενός καλλιεργούμενου από τη Βόρεια και Κεντρική Ελλάδα, σε πειραματικούς αγρούς και κατέγραψε τις μεταβολές στα γνωρίσματά τους μέσα σε διάστημα τριών χρόνων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας, παρατηρήθηκε μια σημαντική διακύμανση στις τιμές της περιεκτικότητας σε αιθέρια έλαια των πληθυσμών *O. vulgare* subsp. *hirtum*. Πιο συγκεκριμένα, το περιεχόμενο αιθέριο έλαιο ανά φυτό κυμάνθηκε από 2,3 έως 9,0 ml /100 g (ξ.φ.), με τη μικρότερη τιμή να καταγράφεται σε δείγμα προερχόμενο από την περιοχή της Πιερίας και τη μεγαλύτερη σε δείγμα προερχόμενο από την περιοχή της Αργαλαστής. Γενικά, παρατηρήθηκαν μεγάλες τιμές απόδοσης στην πλειοψηφία των υπό μελέτη φυτών του υποείδους *hirtum*, με τις υψηλότερες τιμές (>6,8%) να καταγράφονται σε φυτά προερχόμενα από τις περιοχές Ποσειδί, Αιγαιοπελαγίτικα, Ν. Σκιώνη, Ν. Ρόδα, Στρατωνικό, Αργαλαστή, Πορταριά, Πύλι και Ναύπακτο (Γαβαλάς, 2004).

Λίγο υψηλότερες τιμές απόδοσης κατέγραψαν οι Economou et al. (2014) όταν μελέτησαν τη συμπεριφορά επιλεγμένων φυτών της οικογένειας Lamiaceae πλούσιων

σε καρβακρόλη, κάτω από διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας. Συγκεκριμένα, συνέκριναν την περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο και τη σύσταση των αιθέριων ελαίων φυτών που είχαν μεταφυτευτεί σε πειραματικές καλλιέργειες στην Ικαρία και την Αθήνα, τα οποία προέρχονταν από αυτοφυείς πληθυσμούς της Ικαρίας. Οι τιμές περιεκτικότητας των φυτών *O. vulgare* subsp. *hirtum* σε αιθέριο έλαιο στη συγκεκριμένη έρευνα είναι οι υψηλότερες που έχουν καταγραφεί μέχρι στιγμής στη βιβλιογραφία: τα φυτά από τις καλλιέργειες στην Αθήνα κατέγραψαν ποσοστά απόδοσης 8,17% και 10,77%, ενώ από τις καλλιέργειες στην Ικαρία 8,10% και 7,77%. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι δεν υφίσταται σημαντική επίδραση της τοποθεσίας στο περιεχόμενο αιθέριο έλαιο των υπό μελέτη φυτών, γεγονός το οποίο μαρτυρά ότι η μεταφορά των γενοτύπων από τους γηγενείς οικοτόπους και η καλλιέργειά τους αλλού δεν επηρέασαν σημαντικά αυτό το χαρακτηριστικό (Economou et al., 2014).

Αντίστοιχα, η Τσούρα (2016), μελέτησε την ικανότητα εγκλιματισμού των φυτών *O. vulgare* subsp. *hirtum*, *O. onites* και *S. thymbra* σε συνθήκες εκτατικής καλλιέργειας στο αγρόκτημα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών στην περιοχή των Σπάτων, κατά την καλλιεργητική περίοδο 2014-2015. Τα προς μελέτη φυτά προήλθαν αρχικά από την Ικαρία, ενώ η μητρική φυτεία είχε εγκατασταθεί σε πειραματικό αγρό του Εργαστηρίου Γεωργίας. Κατά τη διάρκεια της συλλογής των φυτών, η φυτεία στα Σπάτα, η οποία είχε προκύψει με αγενή πολλαπλασιασμό των φυτών της μητρικής φυτείας, διένυε τον δεύτερο χρόνο της. Μετά την απομόνωση των αιθέριων ελαίων με τη μέθοδο της υδραπόσταξης, βρέθηκε ότι η περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο για το υπό μελέτη *O. vulgare* subsp. *hirtum* κυμάνθηκε από 6,1% έως 8,3% (v/w), για το *O. onites* από 2,1% έως 5,3% (v/w) και για το *S. thymbra* από 4,9% έως 6,3% (v/w) (Τσούρα, 2016).

Αρκετά μικρότερες αποδόσεις σε αιθέριο έλαιο (3,36%) κατέγραψαν με τη σειρά τους οι Węglarz et al. (2020), οι οποίοι μελέτησαν τις ποιοτικές διαφορές μεταξύ της ελληνικής ρίγανης (*O. vulgare* subsp. *hirtum*) και της κοινής ρίγανης (*O. vulgare* subsp. *vulgare*) σε καλλιεργούμενα φυτά της Κεντρικής Ευρώπης (Węglarz et al., 2020). Αντίστοιχα, οι Krol et al. (2020), κατά την προσπάθειά τους να καταγράψουν την επίδραση του αζώτου στην παραγωγή και την ποιότητα της καλλιεργούμενης ελληνικής ρίγανης, βρήκαν ότι τα ποσοστά απόδοσης των φυτών ρίγανης *O. vulgare*

subsp. *hirtum* σε αιθέριο έλαιο κυμάνθηκαν μεταξύ 1,79-2,76% τον πρώτο χρόνο καλλιέργειας, ενώ αυξήθηκαν σε 3,41- 4,35% τις επόμενες χρονιές (Król et al., 2020).

Οι Aytac et al. (2022), μελέτησαν τη δράση του χουμικού οξέος στην αντιμικροβιακή δραστηριότητα, την απόδοση σε αιθέριο έλαιο και τη σύνθεση του αιθέριου ελαίου φυτών ρίγανης *O. vulgare* subsp. *hirtum* προερχόμενα από πειραματικούς αγρούς του Πανεπιστημίου Eskişehir Osmangazi στην επαρχία Eskişehir της Τουρκίας. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν κατά το ίδιο χρονικό διάστημα με την παρούσα έρευνα και τα αποτελέσματα κατέγραψαν ανάλογες αποδόσεις για τις χρονιές 2017-2018: 5,14% και 5,79% αντίστοιχα (φυτά καλοκαιρινής σοδειάς). Ωστόσο, σύμφωνα με τα δεδομένα τους, παρατηρήθηκε αύξηση της απόδοσης από χρονιά σε χρονιά, κάτι που καταγράφηκε σε ελάχιστες περιοχές της παρούσας έρευνας (Aytaç et al., 2022).

Οι Stefanakis et al. (2022) μελέτησαν την επίδραση της εποχής της συγκομιδής της καλλιέργειας στην απόδοση σε αιθέριο έλαιο πέντε φυτικών ειδών της οικογένειας Lamiaceae, μεταξύ των οποίων και του *O. vulgare* subsp. *hirtum* (καλλιέργεια σε θερμοκήπιο και καλλιέργεια σε χωράφι). Τα αποτελέσματά έδειξαν ότι, όπως και σε προηγούμενες αντίστοιχες μελέτες (Węglarz et al., 2020), η μεγαλύτερη απόδοση του φυτού *O. vulgare* subsp. *hirtum* σε αιθέριο έλαιο καταγράφεται κατά την πλήρη άνθησή του, την εποχή δηλαδή που οι παραγωγοί ρίγανης πραγματοποιούν συνήθως τη συγκομιδή του φυτού. Οι τιμές της περιεκτικότητας του *O. vulgare* subsp. *hirtum* κατά την πλήρη άνθησή του σε αιθέριο έλαιο άγγιζαν το 6,89% στην καλλιέργεια σε χωράφι και το 5,93% στην καλλιέργεια σε θερμοκήπιο (Stefanakis et al., 2022).

IV.1.2. Ποιοτική και ποσοτική σύσταση αιθέριων ελαίων

Ποιοτική σύσταση

Αν και η υψηλή περιεκτικότητα της ρίγανης σε αιθέριο έλαιο είναι σαφώς επιθυμητή και κερδοφόρα, η σύνθεση του αιθέριου ελαίου είναι αυτή που κάνει ουσιαστικά το φυτό να ξεχωρίζει, αφού του προσδίδει χαρακτηριστικό άρωμα και ξεχωριστό χημικό χαρακτήρα. Συνεπώς, η μελέτη της χημικής σύνθεσης του αιθέριου ελαίου είναι εξίσου σημαντική καθώς αποτελεί μια βασική πτυχή της ποιότητάς του και καθορίζει ανάλογα την τιμή του προϊόντος στην αγορά.

Το αιθέριο έλαιο του φυτού *O. vulgare* subsp. *hirtum* εκτιμάται ιδιαίτερα για την υψηλή περιεκτικότητά του σε φαινολικές ενώσεις, κυρίως την καρβακρόλη και τη θυμόλη, οι οποίες διαθέτουν σημαντικές αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (βλ. **Κεφ. 2.4**). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι ποσότητες της καρβακρόλης και της θυμόλης, παρουσιάζουν, κατά βάση, αρνητική συσχέτιση στα φυτά της ρίγανης. Ενδέχεται, επομένως, να λάβουν πολλές ενδιάμεσες τιμές και η μία ένωση να υπερισχύει της άλλης και το αντίθετο. Αν και το υποείδος *hirtum* θεωρείται ένα από τα κορυφαία αρτύματα ρίγανης, μπορεί να έχει χαμηλή συγκέντρωση καρβακρόλης (<5%), οπότε να κυριαρχεί η θυμόλη και να χάνεται το χαρακτηριστικό άρωμα της ρίγανης (Γαβαλάς, 2004). Οι σχετικές συγκεντρώσεις αυτών των ενώσεων, καθώς και η παρουσία άλλων ευεργετικών συστατικών, συμβάλλουν στη συνολική ποιότητα και τη δραστηριότητα του αιθέριου ελαίου της ρίγανης.

Όσον αφορά τις βιομηχανικές εφαρμογές, ο καθαρός χημειότυπος καρβακρόλης (με έως και 80% καρβακρόλη) θεωρείται ίσως ο πιο πολύτιμος λόγω της αποδεδειγμένης βιολογικής δραστηριότητας αυτού του φαινολικού μονοτερπενίου (Baricevic, 2002). Καθώς είναι πολλοί και πολύπλοκοι οι παράγοντες που επηρεάζουν το ποιος χημειότυπος θα επικρατήσει σε ένα φυτό ρίγανης (γενετική ποικιλότητα, περιβαλλοντικές συνθήκες, παρουσία απειλών κ.α.), η καλλιέργειά του για την παραγωγή σταθερά ποιοτικών προϊόντων σε σχέση με την εκμετάλλευση των αυτοφυών πληθυσμών είναι επιτακτική (Παναγόπουλος, 2012).

Η σύνθεση των αιθέριων ελαίων των καλλιεργούμενων φυτών ρίγανης, όπως προσδιορίστηκε με τη βοήθεια της οργανολογίας GC και GC-MS, καταγράφεται συνολικά και για τις δύο χρονιές στον **Πίνακα IV-2**.

Στα σχήματα που ακολουθούν (**Σχήματα IV-2, IV-3 και IV-4**) παρουσιάζεται η συνεισφορά της κάθε κατηγορίας ενώσεων στο συνολικό αιθέριο έλαιο των δειγμάτων καλλιεργούμενων φυτών ρίγανης (*O. vulgare* subsp. *hirtum*) της εκάστοτε περιοχής σύμφωνα με τα αποτελέσματα του **Πίνακα IV-2**.

Πίνακας IV-2. Μέση τιμή της επί τοις εκατό αναλογίας (%) των συστατικών των αιθέριων ελαίων δειγμάτων καλλιεργούμενης ρίγανης (*O.vulgare* subsp. *hirtum*) σύμφωνα με την περιοχή προέλευσης. Τα 4 κύρια συστατικά και τα ποσοστά τους σημειώνονται με μπλε χρώμα.

α/α^i	ΕΝΩΣΕΙΣ	RI _{EXP}	RI _{LIT}	ΘΕΣ/ΚΗ	ΠΗΡΙΑ	ΚΙΑΚΙΣ	ΚΟΖΑΝΗ	ΜΑΓΝΗΣΙΑ	ΤΡΙΚΑΛΑ	ΙΩΑΝΝΙΝΑ	ΠΕΡΕΒΕΖΑ	ΗΛΕΙΑ	ΑΧΑΪΑ	ΠΕΘΥΜΝΟ	ΗΡΑΚΛΕΙΟ
1	α -πινένιο	1012	1012	0.26 ±0.04 ^a	0.62 ±0.29 ^{ab}	0.60 ±0.32 ^{ab}	0.75 ±0.28 ^b	0.53 ±0.25 ^{ab}	0.85 ±0.17 ^b	0.62 ±0.37 ^{ab}	0.73 ±0.28 ^b	0.90 ±0.13 ^b	0.54 ±0.37 ^{ab}	0.71 ±0.17 ^b	0.80 ±0.13 ^b
2	α -θουγένιο	1019	1017		0.09 ±0.02 ^a	0.56 ±0.29 ^{bc}	0.90 ±0.37 ^{cde}	0.45 ±0.14 ^b	0.59 ±0.21 ^{bc}	0.70 ±0.38 ^{bcd}	0.96 ±0.39 ^{de}	1.03 ±0.28 ^e	0.68 ±0.21 ^{bcd}	0.67 ±0.15 ^{bcd}	0.06 ±0.01 ^a
3	καμφένιο	1054	1055				0.16 ±0.10 ^c	TR ^{ii a}		0.13 ±0.04 ^{bc}	0.12 ±0.07 ^{bc}	0.16 ±0.05 ^c	0.07 ±0.01 ^{ab}		
4	β -πινένιο	1096	1100				0.15 ±0.06 ^{bc}			0.11 ±0.01 ^{ab}	0.12 ±0.01 ^{bc}	0.17 ±0.02 ^c	0.07 ±0.03 ^a	0.06 ±0.02 ^a	
5	δ -3-καρένιο	1143	1138							0.06 ±0.04 ^a		0.09 ±0.03 ^b			
6	α -φελλανδρένιο	1166	1166			0.16 0.03 ^b	0.19 ±0.07 ^b	0.05 ±0.02 ^a		0.18 ±0.11 ^b	0.22 ±0.04 ^{bc}	0.29 ±0.03 ^c	0.22 ±0.05 ^{bc}		0.07 ±0.03 ^a
7	β -μυρκένιο	1175	1175	0.55 ±0.25 ^a	0.91 ±0.32 ^{ab}	1.39 ±0.56 ^{cd}	1.46 ±0.39 ^{cd}	1.20 ±0.52 ^{bcd}	1.32 ±0.34 ^{bcd}	1.51 ±0.53 ^{cd}	1.51 ±0.66 ^{cd}	2.01 ±0.25 ^e	1.47 ±0.29 ^{cd}	1.65 ±0.22 ^{de}	1.15 ±0.38 ^{bc}
8	α -τερπινένιο	1191	1201	0.67 ±0.30 ^a	1.09 ±0.16 ^{ab}	1.45 ±0.72 ^{bc}	1.63 ±0.37 ^c	1.22 ±0.58 ^{bc}	1.57 ±0.45 ^{bc}	1.46 ±0.54 ^{bc}	1.58 ±0.28 ^{bc}	2.48 ±0.23 ^d	1.63 ±0.32 ^c	1.56 ±0.33 ^{bc}	1.26 ±0.34 ^{bc}
9	λεμονένιο	1199	1208		0.14 ±0.05 ^{ab}	0.16 ±0.05 ^{abc}	0.25 ±0.04 ^{cd}	0.12 ±0.07 ^a	0.22 ±0.07 ^{abcd}	0.24 ±0.06 ^{bcd}	0.26 ±0.12 ^{cd}	0.38 ±0.03 ^e	0.29 ±0.05 ^{de}	0.29 ±0.06 ^{de}	0.19 ±0.07 ^{abcd}

10	β-φελλανδρένιο	1221	1228		0.10 ±0.05 ^{abc}	0.18 ±0.03 ^{cd}	0.29 ±0.04 ^d	0.08 ±0.03 ^{ab}	0.11 ±0.06 ^{bc}	0.28 ±0.06 ^d	0.28 ±0.08 ^d	0.29 ±0.02 ^d	0.28 ±0.02 ^d	0.24 ±0.02 ^d	0.07 ±0.02 ^{ab}
11	γ-τερπινένιο	1243	1246	2.7 ±1.1 ^a	3.1 ±1.1 ^a	5.8 ±1.2 ^{bcd}	7.0 ±1.5 ^{cde}	5.4 ±1.7 ^{bc}	6.7 ±1.9 ^{cde}	7.0 ±1.6 ^{cde}	7.0 ±2.8 ^{cde}	10.5 ±1.3 ^f	8.2 ±2.2 ^e	7.3 ±1.1 ^{de}	4.1 ±1.4 ^{ab}
12	3-οκτανόνη	1255	1252			0.09 ±0.05 ^{ab}	0.21 ±0.02 ^c	0.14 ±0.03 ^{bc}	0.22 ±0.09 ^c	0.24 ±0.09 ^c	0.22 ±0.10 ^c	0.23 ±0.01 ^c	0.24 ±0.10 ^c		
13	π-κυμένιο	1270	1269	6.6 ±3.5 ^a	11.1 ±3.2 ^{cde}	8.3 ±1.4 ^{ab}	9.8 ±1.0 ^{bc}	8.9 ±2.3 ^b	12.26 ±0.70 ^e	8.5 ±2.0 ^{ab}	10.5 ±4.2 ^{bcd}	11.98 ±0.91 ^{de}	10.0 ±2.7 ^{bcd}	12.03 ±0.83 ^{de}	12.5 ±3.0 ^e
14	α-τερπινολένιο	1280	1282			TR ^a	0.14 ±0.01 ^{bc}	TR ^a		0.15 ±0.03 ^{bc}	0.15 ±0.08 ^{bc}	0.16 ±0.01 ^c	0.12 ±0.04 ^{bc}	0.11 ±0.05 ^b	TR ^a
15	1-οκτεν-3-όλη	1448	1447	0.41 ±0.07 ^{bcd}	0.57 ±0.15 ^d	0.50 ±0.09 ^{bcd}	0.34 ±0.11 ^{bc}	0.52 ±0.22 ^{bcd}	1.07 ±0.34 ^e	0.54 ±0.17 ^{cd}	0.45 ±0.07 ^{bcd}	0.32 ±0.17 ^b	0.41 ±0.16 ^{bcd}	0.10 ±0.04 ^a	0.43 ±0.07 ^{bcd}
16	cis- ένυδρο σαβινένιο	1462	1471	0.49 ±0.13 ^{ab}	0.51 ±0.20 ^{abc}	0.67 ±0.18 ^c	0.58 ±0.19 ^{bc}	0.56 ±0.21 ^{bc}	0.36 ±0.06 ^a	0.50 ±0.12 ^{ab}	0.55 ±0.28 ^{bc}	0.49 ±0.21 ^{ab}	0.68 ±0.17 ^c	0.43 ±0.14 ^{ab}	0.52 ±0.08 ^{abc}
17	trans- ένυδρο σαβινένιο	1546	1556	0.39 ±0.14 ^{ab}	0.43 ±0.10 ^{abc}	0.50 ±0.14 ^{bc}	0.46 ±0.03 ^{abc}	0.50 ±0.17 ^{bc}	0.44 ±0.10 ^{abc}	0.37 ±0.06 ^{ab}	0.39 ±0.15 ^{ab}	0.34 ±0.02 ^a	0.47 ±0.07 ^{abc}	0.38 ±0.02 ^{ab}	0.54 ±0.27 ^c
18	οξικό βορνύλιο	1561	1566							TR					
19	καρυοφυλλένιο	1598	1590	1.75 ±0.27 ^{bcd}	2.43 ±0.39 ^d	2.08 ±0.14 ^{cd}	1.92 ±0.16 ^{cd}	1.77 ±0.59 ^{cd}	1.96 ±0.73 ^{cd}	1.72 ±0.06 ^{bcd}	1.74 ±0.24 ^{bcd}	1.50 ±0.51 ^{bc}	1.13 ±0.14 ^{ab}	0.74 ±0.11 ^a	1.45 ±0.16 ^{bc}
20	4-τερπινεόλη	1604	1605	1.22 ±0.27 ^{bc}	0.85 ±0.44 ^b	0.82 ±0.30 ^{bc}	1.28 ±0.43 ^c	1.20 ±0.18 ^{bc}	0.33 ±0.12 ^a	1.00 ±0.62 ^{bc}	0.88 ±0.26 ^{bc}	0.17 ±0.04 ^a	0.89 ±0.01 ^{bc}	0.80 ±0.13 ^{bc}	1.25 ±0.31 ^{bc}
21	μεθυλαιθέρας της καρβακρόλης	1610	1601	0.79 ±0.24 ^d	0.88 ±0.33 ^d	0.61 ±0.16 ^{cd}	0.43 ±0.07 ^{bc}	0.41 ±0.09 ^{bc}	0.64 ±0.12 ^{cd}	0.20 ±0.03 ^{ab}	0.27 ±0.12 ^{ab}		0.27 ±0.03 ^{ab}		0.70 ±0.26 ^{cd}

22	<i>cis</i> -διϋδροκαρβόνη	1629	-				0.05 ±0.02 ^b			0.16 ±0.07 ^a	0.05 ±0.03 ^b				
23	<i>α</i> -χουμουλένιο	1668	1677		0.09 ±0.04 ^{ab}	0.10 ±0.04 ^b	0.27 ±0.04 ^c	0.05 ±0.00 ^{ab}		0.23 ±0.10 ^c	0.21 0.07 ^c	0.10 ±0.02 ^b	0.09 ±0.00 ^b		
24	<i>α</i> -τερπινεόλη	1698	1698				TR								
25	βορνεόλη	1702	1717	1.41 ±0.30 ^g	1.16 ±0.23 ^{ef}	1.06 ±0.56 ^{ef}	0.90 ±0.09 ^{cde}	1.20 ±0.34 ^{fg}	1.03 ±0.06 ^{def}	0.80 ±0.32 ^{bcd}	0.75 ±0.38 ^{bc}	0.51 ±0.02 ^a	0.65 ±0.04 ^{ab}	0.51 ±0.02 ^a	0.84 ±0.10 ^{bcde}
26	<i>β</i> -βισαβολένιο	1726	1722	1.33 ±0.09 ^{bcd}	1.45 ±0.55 ^{bcd}	0.87 ±0.15 ^a	1.24 ±0.37 ^{bcd}	1.19 ±0.32 ^{bc}	1.53 ±0.16 ^d	1.06 ±0.37 ^{ab}	1.10 ±0.25 ^{ab}	1.32 ±0.16 ^{bcd}	1.22 ±0.33 ^{bcd}	1.45 ±0.16 ^{cd}	2.07 ±0.13 ^e
27	<i>δ</i> -καδινένιο	1733	1756				0.25 ±0.04 ^c			0.13 ±0.02 ^a	0.17 ±0.09 ^b				
28	<i>p</i> -κυμεν-8-όλη	1851	1865				0.06 ±0.00 ^b				TR ^a			TR ^a	
29	οξικό καρβακρύλιο	1875	1880				TR ^{ab}			TR ^b					
30	οξειδίο του καρυοφυλλενίου	1973	1994	1.72 ±0.27 ^h	1.31 ±0.36 ^g	0.96 ±0.51 ^{defg}	0.68 ±0.14 ^{bcde}	1.00 ±0.08 ^{fg}	0.72 ±0.20 ^{cdef}	0.66 ±0.26 ^{abcd}	0.68 ±0.13 ^{bcde}	0.37 ±0.05 ^a	0.52 ±0.08 ^{abc}	0.40 ±0.08 ^{ab}	0.98 ±0.34 ^{efg}
31	σπαθουλενόλη	2122	2136				0.08 ±0.04 ^c			TR ^{ab}	TR ^{abc}	0.06 ±0.02 ^{bc}			
32	4-ισοπροπυλο-μ- κρεσόλη	2155	-				0.08 ±0.05 ^b			TR ^a	0.14 ±0.04 ^c	0.20 ±0.02 ^d	0.17 ±0.03 ^{cd}	0.13 ±0.05 ^c	
33	θυμόλη	2173	2186	10.89 ±0.94^{ab}	10.2 ±3.1^a	12.9 ±4.8^{ab}	8.4 ±2.2^a	13.0 ±3.4^{ab}	16.5 ±6.0^b	10.6 ±4.0^{ab}	13.7 ±4.7^{ab}	35.2 ±1.9^d	34.7 ±3.3^d	24.01 ±0.74^c	7.4 ±1.9^a
34	5-ισοπροπυλο-μ- κρεσόλη	2208	-				0.10 ±0.03 ^b		TR ^a	0.10 ±0.02 ^b	0.18 ±0.05 ^c		0.26 ±0.09 ^d	0.14 ±0.08 ^{bc}	

35	καρβακρόλη	2211	2212	68.8 ±4.6 ^f	63.0 ±4.8 ^{cde}	60.3 ±5.9 ^{de}	59.9 ±3.6 ^{de}	60.0 ±8.3 ^{de}	51.6 ±4.0 ^{bc}	60.0 ±9.7 ^{de}	55.1 ±4.5 ^{cd}	28.74 ±0.93 ^a	34.8 ±2.0 ^a	46.2 ±2.7 ^b	63.6 ±7.7 ^{ef}
	Κύρια συστατικά ⁱⁱⁱ			88.99	87.40	87.30	85.10	87.30	87.06	86.10	86.30	86.42	87.70	89.54	87.60
	Μονοτερπένια			10.80	17.18	18.58	22.74	17.98	23.59	20.87	23.38	30.43	23.53	24.60	20.26
	Οξυγονωμένα μονοτερπένια			83.98	77.00	76.79	72.24	76.94	70.87	73.82	71.95	65.67	72.84	72.59	74.79
	Σεσκιτερπένια			3.08	3.97	3.05	3.68	3.01	3.49	3.14	3.22	2.92	2.44	2.19	3.52
	Οξυγονωμένα σεσκιτερπένια			1.72	1.31	0.96	0.76	1.00	0.72	0.66	0.68	0.43	0.52	0.40	0.98
	Λοιπές ενώσεις			0.41	0.57	0.59	0.55	0.66	1.29	0.78	0.67	0.55	0.65	0.10	0.43

ⁱ Οι ενώσεις καταγράφηκαν σύμφωνα με τη σειρά έκλουσης από την πολική στήλη BP-20

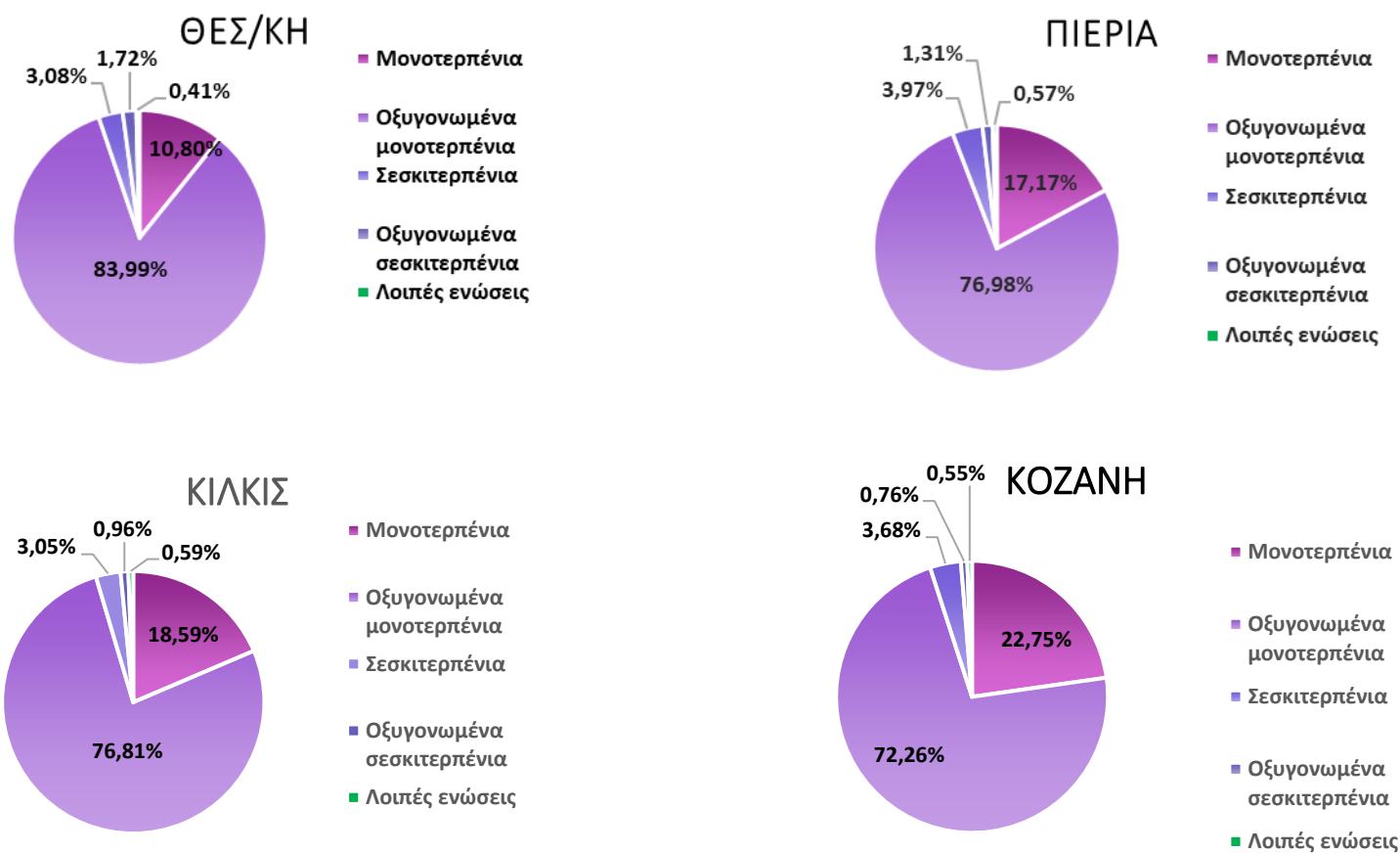
ⁱⁱ Συγκεντρώσεις μικρότερες του 0.05% σημειώθηκαν ως tr (traces-ίχνη)

ⁱⁱⁱ Ολικό ποσοστό των τεσσάρων κύριων συστατικών των αιθέριων ελαίων των δειγμάτων (καρβακρόλη, θυμόλη, γ-τερπινένιο και π-κυμένιο)

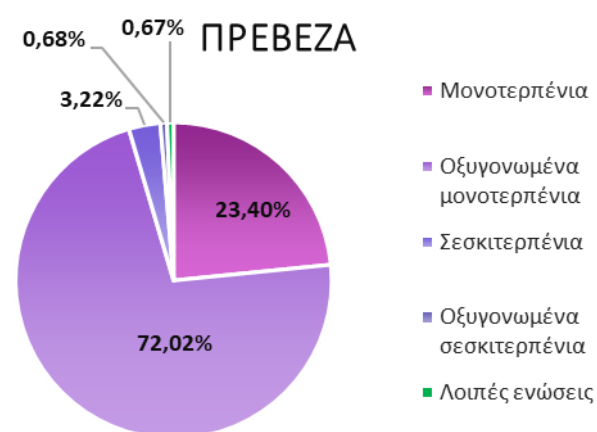
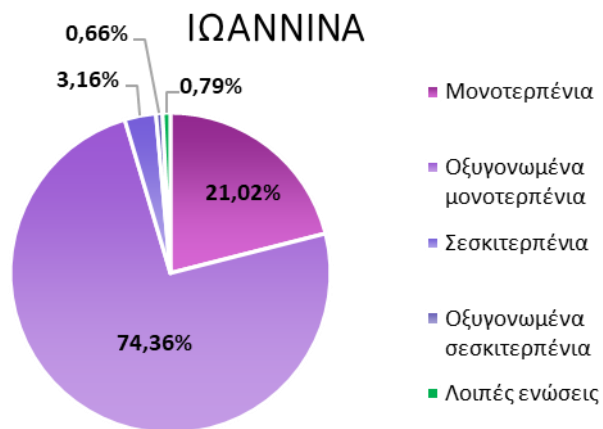
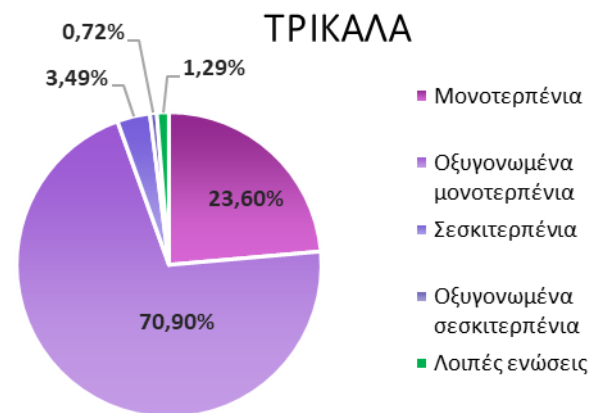
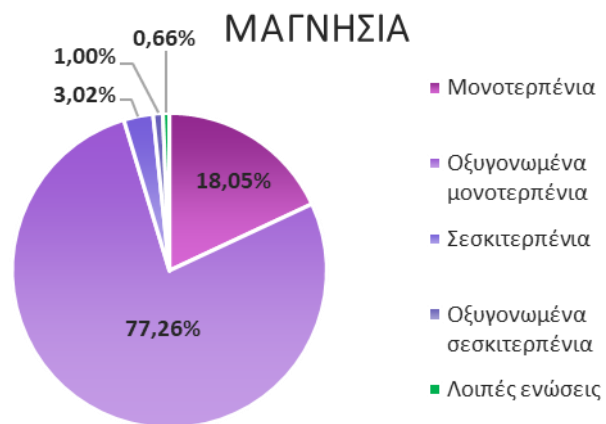
^{ab...} Τιμές με διαφορετικούς εκθέτες στην ίδια γραμμή είναι στατιστικά σημαντικές όπως προκύπτει από την εφαρμογή της ANOVA (p<0.05)

RI_{EXP}: Πειραματική τιμή σχετικών δεικτών κατακράτησης (RI)

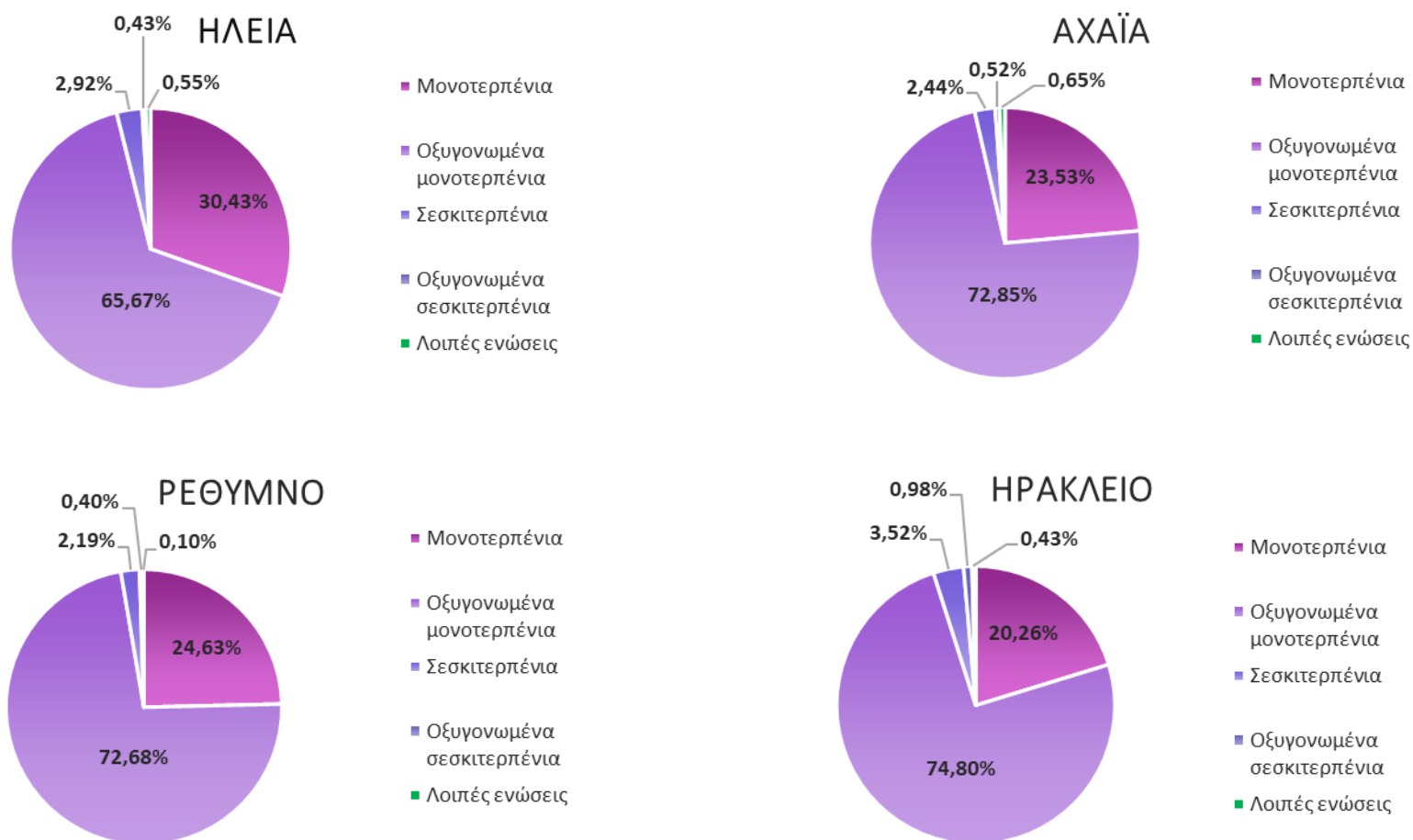
RI_{LIT}: Βιβλιογραφική τιμή σχετικών δεικτών κατακράτησης (NIST MS search)



Σχήμα IV-2. Συνεισφορά της κάθε κατηγορίας ενώσεων στο συνολικό αιθέριο έλαιο των δειγμάτων καλλιεργούμενων φυτών ρίγανης (*O. vulgare* subsp. *hirtum*) από την περιοχή της Θεσσαλονίκης, της Πιερίας, του Κιλκίς και της Κοζάνης.



Σχήμα IV-3. Συνεισφορά της κάθε κατηγορίας ενώσεων στο συνολικό αιθέριο έλαιο των δειγμάτων καλλιεργούμενων φυτών ρίγανης (*O. vulgare* subsp. *hirtum*) από την περιοχή της Μαγνησίας, των Τρικάλων, των Ιωαννίνων και της Πρέβεζας.



Σχήμα IV-4. Συνεισφορά της κάθε κατηγορίας ενώσεων στο συνολικό αιθέριο έλαιο των δειγμάτων καλλιεργούμενων φυτών ρίγανης (*O. vulgare* subsp. *hirtum*) από την περιοχή της Ηλείας, της Αχαΐας, του Ρεθύμνου και του Ηρακλείου.

Κατά τη χρωματογραφική ανάλυση των αιθέριων ελαίων των καλλιεργούμενων φυτών *O. vulgare* subsp. *hirtum* της παρούσας διατριβής ταυτοποιήθηκαν συνολικά 35 ενώσεις. Τα αιθέρια έλαια των φυτών ρίγανης από την περιοχή της Κοζάνης και των Ιωαννίνων βρέθηκαν τα πιο άφθονα από άποψη ενώσεων, με 33 ταυτοποιημένες ενώσεις συνολικά, ενώ ακολούθησαν σε φθίνουσα σειρά τα αιθέρια έλαια των φυτών από τις περιοχές της Πρέβεζας, της Ηλείας και της Αχαΐας με 31, 28 και 27 ενώσεις αντίστοιχα. Τα δείγματα αιθέριου ελαίου από την περιοχή της Θεσσαλονίκης κατέγραψαν τα λιγότερα συστατικά, μόνο 16 στο σύνολο, ενώ τα δείγματα των υπολοίπων περιοχών που μελετήθηκαν κατέγραψαν κατά μέσο όρο 22 ενώσεις το καθένα.

Τα συστατικά των αιθέριων ελαίων στο μεγαλύτερο τους μέρος αποτελούνταν από οξυγονωμένα μονοτερπένια (65,67 – 83,98%) και μονοτερπενικούς υδρογονάνθρακες (10,80 – 30,43%), ενώ σε χαμηλότερα ποσοστά ακολούθησαν οι σεσκιτερπενικοί υδρογονάνθρακες (2,44 – 3,97%) , τα οξυγονωμένα σεσκιτερπένια (0,40 – 1,92%) και οι λοιπές ενώσεις (0,10 – 1,29%).

Οι ενώσεις που βρέθηκαν παρούσες σε όλα τα δείγματα αιθέριων ελαίων ήταν δεκαπέντε στον αριθμό και ήταν οι ακόλουθες: α -πινένιο, β -μυρκενίο, α -τερπινένιο, γ -τερπινένιο, π -κυμένιο, 1-οκτεν-3-όλη, ένυδρο *cis*-σαβινένιο, ένυδρο *trans*-σαβινένιο, καρυοφυλλένιο, 4-τερπινεόλη, βορνεόλη, β -βισαβολένιο, οξείδιο καρυοφυλλενίου, θυμόλη και καρβακρόλη. Στην πλειοψηφία τους οι ενώσεις αυτές ανήκουν στην κατηγορία των μονοτερπενίων, ενώ μόνο τρεις από αυτές ανήκουν στην κατηγορία των σεσκιτερπενίων. Πιο αναλυτικά, οι κατηγορίες των ενώσεων αυτών, καθώς και το άρωμα που προσδίδουν δίνονται στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας IV-3).

Πίνακας IV-3. Κατηγορίες των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν σε όλα τα δείγματα αιθέριου ελαίου των φυτών καλλιεργούμενης ρίγανης και το άρωμα που τις χαρακτηρίζει (<http://www.flavornet.org/index.html>).

Ταυτοποιημένη ένωση	Κατηγορία ένωσης	Άρωμα
α -πινένιο	Μονοτερπένιο	Πεύκο, τερεβινθέλαιο
β -μυρκένιο	Μονοτερπένιο	Βάλσαμο, μούχλα, μπαχαρικά
α -τερπινένιο	Μονοτερπένιο	Λεμόνι
γ -τερπινένιο	Μονοτερπένιο	Βενζίνη, τερεβινθέλαιο
π -κυμένιο	Μονοτερπένιο	Κίτρο, διαλύτης, βενζίνη
1-οκτεν-3-όλη	Μονοτερπένιο	Αγγούρι, γη, λουλούδι, μανιτάρι
ένυδρο <i>cis</i> -σαβινένιο	Μονοτερπένιο	Ξύλο, βάλσαμο
ένυδρο <i>trans</i> -σαβινένιο	Μονοτερπένιο	Βάλσαμο
καρυοφυλλένιο	Σεσκιτερπένιο	Ξύλο
4-τερπινεόλη	Μονοτερπένιο	Τερεβινθέλαιο, μοσχοκάρυδο, μούχλα
βορνεόλη	Μονοτερπένιο	Καμφορά
β -βισαβολένιο	Σεσκιτερπένιο	Βάλσαμο
οξείδιο του καρυοφυλλενίου	Σεσκιτερπένιο	Μπαχαρικά, βότανα
θυμόλη	Μονοτερπένιο	Θυμάρι
καρβακρόλη	Μονοτερπένιο	Ρίγανη

Σε όλες τις περιπτώσεις, πέραν από τα δείγματα από την περιοχή της Ηλείας, η καρβακρόλη υπήρξε το συστατικό με το μεγαλύτερο ποσοστό στα αιθέρια έλαια των δειγμάτων καλλιεργούμενης ρίγανης. Τα ποσοστά της καρβακρόλης στα αιθέρια έλαια των δειγμάτων ρίγανης κυμάνθηκαν από 28,74% έως 68,8%, με το υψηλότερο ποσοστό να καταγράφεται στα δείγματα ρίγανης από την περιοχή της Θεσσαλονίκης και το μικρότερο στα δείγματα ρίγανης από την περιοχή της Ηλείας.

Η θυμόλη, το δεύτερο κατ' αναλογία συστατικό στα δείγματα αιθέριου ελαίου των φυτών ρίγανης που εξετάστηκαν στην παρούσα διατριβή, κατέγραψε τις υψηλότερες τιμές στα δείγματα από τις περιοχές της Ηλείας και της Αχαΐας (35,2% και 34,7% αντίστοιχα), ενώ οι χαμηλότερες βρέθηκαν στα δείγματα αιθέριου ελαίου από την περιοχή του Ηρακλείου (7,4%). Επιπλέον, τα χαμηλότερα ποσοστά γ-τερπινενίου και π-κυμενίου καταγράφηκαν στα δείγματα της Θεσσαλονίκης (2,7% και 6,6% αντίστοιχα), ενώ τα υψηλότερα ποσοστά καταγράφηκαν στην περίπτωση του γ-τερπινενίου στα δείγματα της Ηλείας (10,5%) και του π-κυμενίου στα δείγματα του Ηρακλείου (12,5%).

Αξίζει να σημειωθεί ότι το άθροισμα των ποσοστών της καρβακρόλης και της θυμόλης βρέθηκε σε όλα τα δείγματα αιθέριου ελαίου που εξετάστηκαν μεγαλύτερο από 60% (**Πίνακας IV-4**), κάτι που συμφωνεί με τα ποσοστά που καταγράφονται στην Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία (Węglarz et al., 2020).

Πίνακας IV-4. Ποσοστά της θυμόλης, της καρβακρόλης και του αθροίσματός τους στα δείγματα αιθέριου ελαίου ρίγανης που ταυτοποιήθηκαν με βάση την περιοχή προέλευσης.

ΠΕΡΙΟΧΕΣ	Ποσοστό θυμόλης	Ποσοστό καρβακρόλης	Σύνολο ποσοστών
Θεσσαλονίκη	10,89	68,80	79,69
Περία	10,2	63,0	73,2
Κιλκίς	12,9	60,3	73,2
Κοζάνη	8,4	59,9	68,3
Μαγνησία	13,0	60,0	73,0
Τρίκαλα	16,5	51,6	68,1

Ιωάννινα	10,6	60,0	70,6
Πρέβεζα	13,7	55,1	68,8
Ηλεία	35,20	28,74	63,94
Αχαΐα	34,7	34,8	69,5
Ρέθυμνο	24,01	46,20	70,21
Ηράκλειο	7,4	63,6	71,0

Σε επιπλέον ταύτιση με τη βιβλιογραφία, τα τέσσερα βασικά συστατικά που βρέθηκαν σε σημαντικές ποσότητες σε όλα τα δείγματα ήταν τα αρωματικά μονοτερπένια καρβακρόλη, θυμόλη, π -κυμένιο και γ -τερπινένιο (Bosabalidis and Kokkini, 1997; Esen et al., 2007; Karousou and Kokkini, 2003; Khan et al., 2018; Kokkini et al., 2004, 1997, 1994; Lagouri et al., 1993; Sivropoulou et al., 1996; Skoula et al., 1999). Παρά τις ποσοτικές διακυμάνσεις των τεσσάρων αυτών συστατικών στα δείγματα αιθέριου ελαίου ρίγανης διαφορετικών περιοχών, τα αθροίσματα των ποσοστών τους φαίνεται να παραμένουν σχεδόν σταθερά και υψηλότερα από το 80%, συγκεκριμένα μεταξύ 85,1% και 89,54% (βλ. **Πίνακα IV-2**). Αυτό το εύρος ποσοστών ευθυγραμμίζεται με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας, καθώς και οι Kokkini (1996) και Vokou et al. (1993) ανέφεραν ένα παρόμοιο εύρος για τα τέσσερα κύρια συστατικά (από 85,0% έως 96,8%) όταν μελέτησαν τη σύνθεση των αιθέριων ελαίων αυτοφυών φυτών *O. vulgare* subsp. *hirtum* διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης κατά τη διάρκεια διαφορετικών εποχών (Kokkini, 1996; Vokou et al., 1993).

Κάτω από μια πιο αναλυτική ματιά, έξι επιπλέον ενώσεις, τέσσερα μονοτερπένια (β -μυρκένιο, α -τερπινένιο, 4-τερπινεόλη και βορνεόλη) και δύο σесκιτερπένια (καρνοφυλλένιο και β -βισαβολένιο) παρουσίασαν σχετικά υψηλά ποσοστά σε όλα τα δείγματα αιθέριου ελαίου ρίγανης. Το καρνοφυλλένιο, ένα δικυκλικό σесκιτερπένιο, ήταν το πέμπτο πιο άφθονο συστατικό σε οχτώ από τα δώδεκα συνολικά δείγματα αιθέριου ελαίου που εξετάστηκαν, σημειώνοντας ποσοστά από 1,72% (Ιωάννινα) έως 2,43% (Πιερία). Στα υπόλοιπα τέσσερα από τα δώδεκα δείγματα, τη θέση του πέμπτου σε αφθονία συστατικού έλαβε το μονοτερπένιο α -τερπινένιο για τις περιοχές

της Ηλείας και της Αχαΐας (2,48% και 1,63% αντίστοιχα), το β -μυρκενίο στην περίπτωση του Ρεθύμνου (1,65%), ενώ στην περίπτωση του Ηρακλείου το σесκιτερπένιο β -βισαβολένιο πέτυχε το πέμπτο υψηλότερο ποσοστό με 2,07%. Πέραν αυτών των ενώσεων, τα οξυγονωμένα μονοτερπένια 4-τερπινεόλη και βορνεόλη ήταν επίσης σημαντικά παρόντα σε όλα τα δείγματα αιθέριου ελαίου. Η χαμηλότερη τιμή της 4-τερπινεόλης σημειώθηκε στο δείγμα που προήρθε από την περιοχή της Ηλείας (0,17%) και η υψηλότερη στο δείγμα από την Κοζάνη (1,28%). Ομοίως, η βορνεόλη έφτασε το υψηλότερο ποσοστό στο δείγμα αιθέριου ελαίου ρίγανης από τη Θεσσαλονίκη (1,41%) και το χαμηλότερο στο δείγμα της Ηλείας και του Ρεθύμνου (αμφότερα 0,51%).

Το υψηλό ποσοστό μονοτερπενίων είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα των φυτών ρίγανης *O. vulgare* subsp. *hirtum*, συνεπώς τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με αυτά της σχετικής βιβλιογραφίας (Khan et al., 2019; Kosakowska et al., 2019; Putievsky et al., 1988; Werker et al., 1985).

Οι Goliaris et al. (2003) μελέτησαν τη σύσταση των αιθέριων ελαίων φυτών *O. vulgare* subsp. *hirtum* που είχαν επιλέξει από τέσσερις αυτοφυείς πληθυσμούς και είχαν μεταφύτευσει σε πειραματικές καλλιέργειες σε περιοχές της Βόρειας και Κεντρικής Ελλάδας. Τα αποτελέσματα της αεριοχρωματογραφικής ανάλυσης των δειγμάτων κατέγραψαν 22 συνολικά ταυτοποιημένες ενώσεις, ενώ όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν και τα οποία ονομάστηκαν σύμφωνα με την περιοχή συλλογής των αυτοφυών πληθυσμών (Όλυμπος, Άθως, Βέρμιο και Πήλιο), απέδωσαν αρκετά υψηλά ποσοστά καρβακρόλης. Συγκεκριμένα, τα ποσοστά αυτής κυμάνθηκαν από 79,4% (Άθως) μέχρι 92,9% (Όλυμπος), ενώ τα ποσοστά της θυμόλης παρέμειναν αρκετά χαμηλά αφού κυμάνθηκαν μεταξύ 0,04% (Πήλιο) και 0,55% (Άθως). Παρόμοια με την παρούσα έρευνα, τα τέσσερα κυρίαρχα συστατικά που ταυτοποιήθηκαν σε όλα τα δείγματα αιθέριου ελαίου ήταν η καρβακρόλη, η θυμόλη, το γ -τερπινένιο και το π -κυμένιο (Goliaris et al., 2003).

Σε αντίστοιχη έρευνα πάνω σε καλλιεργούμενα φυτά *O. vulgare* subsp. *hirtum* από την περιοχή της Τουρκίας, οι Esen et al. (2007), κατέγραψαν σημαντικά μεγάλες διακυμάνσεις στα ποσοστά της καρβακρόλης (από 5,3 έως 85,4%) και της θυμόλης (0,3 έως 68,0%) (Esen et al., 2007). Τέτοιου είδους αποκλίσεις, ωστόσο, υποστηρίζουν περαιτέρω τον ισχυρισμό ότι το υποείδος αυτό χαίρει σημαντικής

διαφοροποίησης (Kokkini, 1996; Vokou et al., 1993), γεγονός το οποίο φαίνεται να ισχύει και για τα καλλιεργούμενα φυτά.

Άλλη μια μελέτη που επιβεβαιώνει ότι αυτή η μεγάλη διακύμανση στα ποσοστά των ενώσεων των αιθέριων ελαίων του φυτού *O. vulgare* subsp. *hirtum* συναντάται και σε πληθυσμούς καλλιεργούμενων φυτών είναι αυτή των Sarrou et al. (2017). Η εν λόγω ερευνητική ομάδα ανέπτυξε ένα πρόγραμμα συμβατικής καλλιέργειας επιλεγμένων πληθυσμών *O. vulgare* subsp. *hirtum* προερχόμενων από αυτοφυή φυτά από την περιοχή της Σαμοθράκης, με σκοπό τη δημιουργία μιας νέας ποικιλίας με επιθυμητά αγρονομικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά. Η σύσταση των αιθέριων ελαίων καταγράφηκε τόσο για τον αρχικό πληθυσμό, όσο και για μεμονωμένα φυτά της καλλιέργειας και σύμφωνα με τα αποτελέσματα ταυτοποιήθηκαν συνολικά 21 ενώσεις. Τα ποσοστά της καρβακρόλης στα αιθέρια έλαια των φυτών του αρχικού πληθυσμού κυμάνθηκαν μεταξύ του 79,94% και 82,37%, ενώ των επιλεγμένων μεμονωμένων φυτών της καλλιέργειας μεταξύ του 52,00% και 87,30%. Επιπλέον, ενώ στα καλλιεργημένα φυτά η θυμόλη έφτασε σε ποσοστό το 0,08%, δεν ανιχνεύτηκε καθόλου στον αρχικό πληθυσμό. Μετά την καρβακρόλη, το γ-τερπινένιο και το π-κυμένιο υπήρξαν τα πιο άφθονα συστατικά των αιθέριων ελαίων των δειγμάτων με ποσοστά 4,67% και 3,51% αντίστοιχα για τον αρχικό πληθυσμό και 3,88% και 5,64% για τα φυτά της καλλιέργειας. Τέλος, το ποσοστό των απλών μονοτερπενίων άγγιξε το 15,35%, ενώ αυτό των οξυγονωμένων μονοτερπενίων άγγιξε το 81,64%, ποσοστά αρκετά συγκρίσιμα με την παρούσα έρευνα (10,8-30,43% και 65,67-83,98% αντίστοιχα) (Sarrou et al., 2017).

Οι Αcímonić et al. (2020) μελέτησαν τη χημική σύσταση καλλιεργούμενων φυτών *O. vulgare* subsp. *hirtum* και *O. dictamnus*, τα οποία είχαν προμηθευτεί από την τοπική αγορά της Θεσσαλονίκης. Μετά την απομόνωση των αιθέριων ελαίων των φυτών, προχώρησαν στην καταγραφή των ενώσεων σύμφωνα με την οποία ταυτοποίησαν 28 ενώσεις για το δείγμα *hirtum* και 31 για το *dictamnus*. Ως κύριο συστατικό του αιθέριου ελαίου του φυτού *hirtum* καταγράφηκε η καρβακρόλη, με ποσοστό 78,5%, ακολουθούμενη από το π-κυμένιο με 6,8% και το γ-τερπινένιο με 4,4%. Η θυμόλη βρέθηκε με χαμηλότερο ποσοστό, μόνο 0,5%, ενώ το άθροισμα των τεσσάρων βασικών συστατικών άγγιξε το 90,2% (Αcímonić et al., 2020).

Ο Βελόπουλος (2022), θέλοντας να εξετάσει την επίδραση των υπερήχων στην ποιότητα και την απόδοση σε αιθέριο έλαιο του φυτού *O. vulgare* subsp. *hirtum*, συνέκρινε τρεις διαφορετικές μεθόδους απόσταξης: την κλασική απόσταξη, την απόσταξη με προκατεργασία υπερήχων και την απόσταξη με ταυτόχρονη χρήση υπερήχων. Η ρίγανη που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την έρευνα είχε παραληφθεί από μια εμπορική εταιρεία στην περιοχή της Θέρμης (Θεσσαλονίκη) και είχε συλλεχθεί τον Ιούνιο του 2020. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά της, οι ενώσεις καρβακρόλη και θυμόλη κατέλαβαν αθροιστικά ποσοστά αρκετά υψηλότερα από αυτά που καταγράφηκαν στην παρούσα έρευνα (63,94 – 79,69%), συγκεκριμένα μεταξύ 81,88 – 83,26%, ενώ η ένωση που υπερίσχυε ήταν η καρβακρόλη, με ποσοστά 75,26 – 78,11%. Η θυμόλη ακολούθησε σε ποσοστό 5,08 – 7,00%, το *π*-κυμένιο σε ποσοστό 6,65 – 7,21%, ενώ το *γ*-τερπινένιο σε ποσοστό 3,30 – 3,43%. Οι τρεις μέθοδοι που εξετάστηκαν δεν φάνηκε να επηρεάζουν σημαντικά τα ποσοστά αυτά, παρ' όλα αυτά, παρουσιάστηκε μια μικρή αύξηση στη συγκέντρωση της καρβακρόλης (78,11%) κατά την απόσταξη με προκατεργασία υπερήχων έναντι της κλασικής απόσταξης (76,26%), αλλά και μια μείωση της συγκέντρωσης της θυμόλης (5,08%) έναντι της κλασικής απόσταξης (7,00%) (Βελόπουλος, 2022).

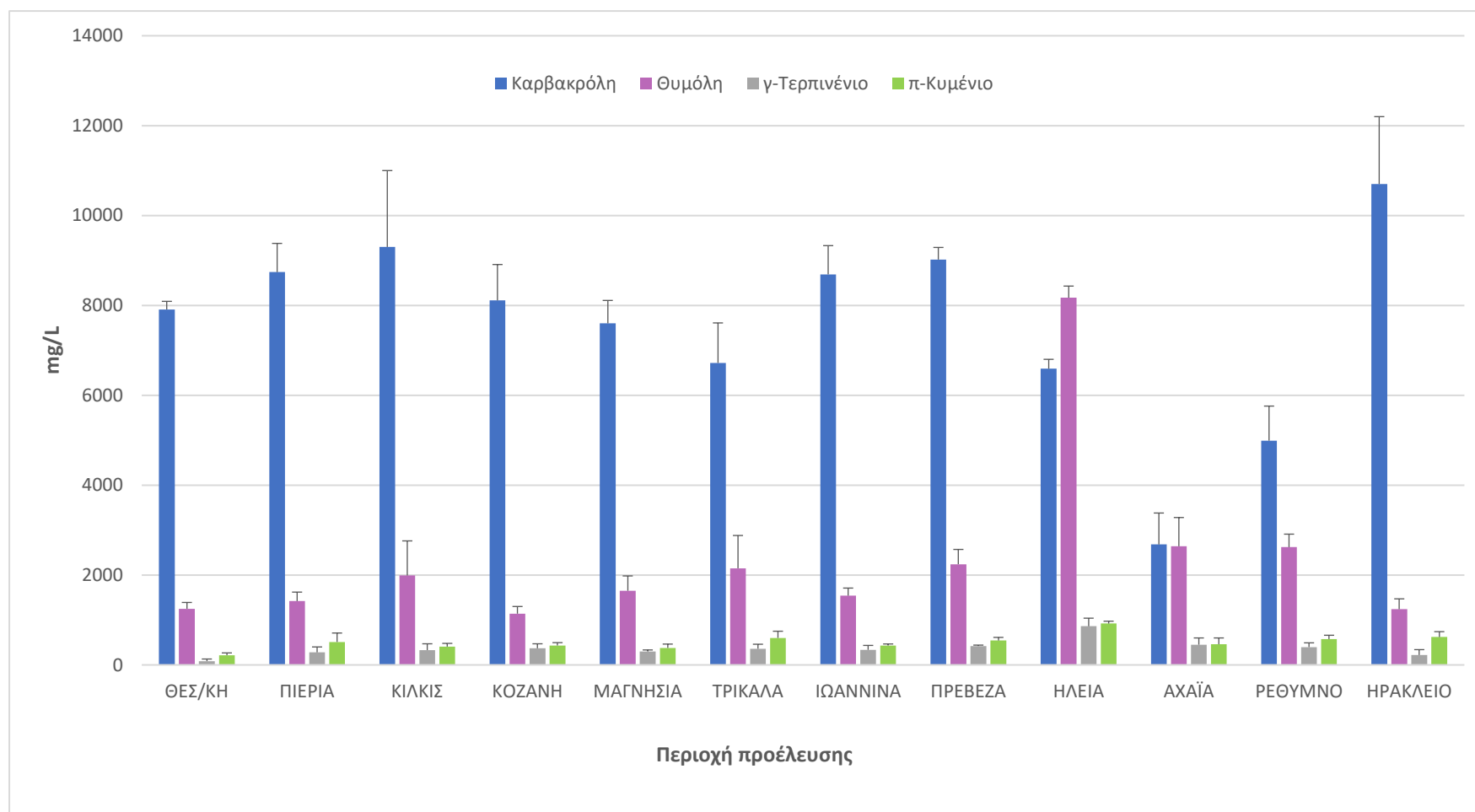
Ποσοτικός προσδιορισμός

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των τεσσάρων κύριων συστατικών έγινε με τη βοήθεια των αντίστοιχων προτύπων ενώσεων από τις οποίες κατασκευάστηκαν πρότυπες καμπύλες με βάση τη συγκέντρωση. Η μέση τιμή της συγκέντρωσης των ενώσεων, καθώς και η τυπική τους απόκλιση (standard deviation, SD), καταγράφονται στον **Πίνακα IV-5**. Στο **Σχήμα IV-5** παρουσιάζεται γραφικά η διακύμανση των εν λόγω συγκεντρώσεων.

Πίνακας IV-5. Μέση τιμή της συγκέντρωσης (mg/L) και τυπική απόκλιση (SD) των τεσσάρων βασικών συστατικών των αιθέριων ελαίων ρίγανης με βάση την περιοχή προέλευσης.

Περιοχή	Καρβακρόλη (mg/L) ± SD	Θυμόλη (mg/L) ± SD	γ-Τερπινένιο (mg/L) ± SD	π-Κυμένιο (mg/L) ± SD	Σύνολο
Θεσσαλονίκη	7910 ± 180 ^{cde}	1250 ± 140 ^{ab}	84 ± 47 ^a	217 ± 50 ^a	9461
Περία	8740 ± 640 ^{de}	1420 ± 200 ^{abc}	280 ± 120 ^{abc}	510 ± 200 ^{bcd}	10950
Κιλκίς	9300 ± 1700 ^{ef}	1990 ± 770 ^{bcde}	330 ± 140 ^{bc}	407 ± 72 ^{bc}	12027
Κοζάνη	8110 ± 800 ^{cde}	1140 ± 160 ^a	370 ± 100 ^{bc}	433 ± 63 ^{bcd}	10053
Μαγνησία	7600 ± 510 ^{cd}	1650 ± 330 ^{abcd}	298 ± 35 ^{bc}	378 ± 85 ^{ab}	9926
Τρίκαλα	6720 ± 890 ^c	2150 ± 730 ^{cde}	360 ± 100 ^{bc}	600 ± 150 ^{cd}	9830
Ιωάννινα	8690 ± 640 ^{de}	1540 ± 170 ^{abcd}	336 ± 98 ^{bc}	432 ± 34 ^{bcd}	10998
Πρέβεζα	9020 ± 270 ^{de}	2240 ± 330 ^{de}	420 ± 21 ^{bc}	543 ± 70 ^{bcd}	12223
Ηλεία	6590 ± 210 ^c	8170 ± 260 ^f	860 ± 180 ^d	920 ± 53 ^e	16540
Αχαΐα	2680 ± 700 ^a	2640 ± 640 ^e	450 ± 150 ^c	460 ± 140 ^{bcd}	6230
Ρέθυμνο	4990 ± 770 ^b	2620 ± 290 ^e	396 ± 95 ^{bc}	575 ± 85 ^{bcd}	8581
Ηράκλειο	10700 ± 1500 ^f	1240 ± 230 ^{ab}	220 ± 120 ^{ab}	620 ± 120 ^d	12780

^{ab...} Τιμές με διαφορετικούς εκθέτες στην ίδια στήλη είναι στατιστικά σημαντικές όπως προκύπτει από την εφαρμογή της ANOVA (p<0.05)



Σχήμα IV-5. Διακύμανση των συγκεντρώσεων (mg/L) των τεσσάρων βασικών συστατικών των αιθέριων ελαίων ρίγανης και οι τυπικές τους αποκλίσεις (SD) ανάλογα με την περιοχή προέλευσης των δειγμάτων καλλιεργούμενης ρίγανης.

Όπως παρατηρούμε από τα αποτελέσματα, τα δείγματα αιθέριου ελαίου ρίγανης με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε καρβακρόλη προήλθαν από την περιοχή του Ηρακλείου (10700 ± 1500 mg/L), ενώ αυτά με τη μικρότερη συγκέντρωση από την περιοχή της Αχαΐας (2680 ± 700 mg/L). Συνολικά, η κατανομή των περιοχών ανάλογα με τη συγκέντρωση σε καρβακρόλη, σε φθίνουσα σειρά, κυμάνθηκε ως εξής (οι περιοχές αντιπροσωπεύουν τα δείγματα που προέρχονται από αυτές):

Ηράκλειο > Κιλκίς > Πρέβεζα > Πιερία > Ιωάννινα > Κοζάνη > Θεσσαλονίκη > Μαγνησία > Τρίκαλα > Ηλεία > Ρέθυμνο > Αχαΐα.

Αντίστοιχα, για την περίπτωση της θυμόλης, η σειρά διαμορφώθηκε ως εξής :

Ηλεία (8170 ± 260 mg/L) > Αχαΐα > Ρέθυμνο > Πρέβεζα > Τρίκαλα > Κιλκίς > Μαγνησία > Ιωάννινα > Πιερία > Θεσσαλονίκη > Ηράκλειο > Κοζάνη (1140 ± 160 mg/L).

Για το γ-τερπινένιο:

Ηλεία (860 ± 180 mg/L) > Αχαΐα > Πρέβεζα > Ρέθυμνο > Κοζάνη > Τρίκαλα > Ιωάννινα > Κιλκίς > Μαγνησία > Πιερία > Ηράκλειο > Θεσσαλονίκη (84 ± 47 mg/L).

Ενώ, τέλος, για το π-κυμένιο:

Ηλεία (920 ± 53 mg/L) > Ηράκλειο > Τρίκαλα > Ρέθυμνο > Πρέβεζα > Πιερία > Αχαΐα > Κοζάνη > Ιωάννινα > Κιλκίς > Μαγνησία > Θεσσαλονίκη (217 ± 50 mg/L).

Συγκεντρωτικά και για τις τέσσερεις βασικές ενώσεις, η σειρά είχε ως εξής:

Ηλεία (16540 mg/L) > Ηράκλειο > Πρέβεζα > Κιλκίς > Ιωάννινα > Πιερία > Κοζάνη > Μαγνησία > Τρίκαλα > Θεσσαλονίκη > Ρέθυμνο > Αχαΐα (6230 mg/L).

Τα δείγματα αιθέριου ελαίου ρίγανης από την περιοχή της Ηλείας ήταν σταθερά πρώτα σε συγκέντρωση σε τρεις εκ των τεσσάρων βασικών ενώσεων, ενώ κατείχαν και την υψηλότερη με διαφορά αθροιστική τιμή των συγκεντρώσεων των τεσσάρων βασικών ενώσεων (16540 mg/L).

Ημιποσοτικός προσδιορισμός

Ο προσδιορισμός των υπολοίπων ενώσεων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της οργανολογίας GC, GC/MS και οι συγκεντρώσεις τους υπολογίστηκαν ημιποσοτικά με τη βοήθεια γνωστής συγκέντρωσης εσωτερικού προτύπου, της ουσίας 4-μεθυλ-2-πεντανόλης (βλ. **Κεφ. 3.1.2.**). Η μέση τιμή των συγκεντρώσεων των ενώσεων, μαζί με την τυπική τους απόκλιση, καταγράφονται στους πίνακες που ακολουθούν (**Πίνακες IV-6α και IV-6β**).

Πίνακας IV-6α. Μέση τιμή της συγκέντρωσης (mg/L) και τυπική απόκλιση (SD) των συστατικών των αιθέριων ελαίων των φυτών καλλιεργούμενης ρίγανης (*O. vulgare* subsp. *hirtum*) από τις περιοχές Θεσσαλονίκη, Πιερία, Κιλκίς, Κοζάνη, Μαγνησία και Τρίκαλα.

ΕΝΩΣΕΙΣ	ΘΕΣ/ΚΗ		ΠΙΕΡΙΑ		ΚΙΛΚΙΣ		ΚΟΖΑΝΗ		ΜΑΓΝΗΣΙΑ		ΤΡΙΚΑΛΑ	
	MT	±SD	MT	±SD	MT	±SD	MT	±SD	MT	±SD	MT	±SD
<i>α</i> -πινένιο	17,32 ^a	0,68	25,8 ^{ab}	2,4	44,9 ^d	5,1	29,1 ^{abc}	2,9	30,9 ^{bc}	7,3	38,0 ^{bcd}	6,1
<i>α</i> -θουγένιο			8,55 ^a	0,24	42 ^{bc}	13	35 ^{bc}	13	28 ^b	10	26,0 ^b	7,0
καμφένιο							7,90 ^c	0,53	3,87 ^a	0,26		
<i>β</i> -πινένιο							7,66 ^c	0,59				
<i>α</i> -φελλανδρόνιο					12,0 ^{cd}	1,9	8,3 ^b	1,2	4,7 ^a	1,2		
<i>β</i> -μυρκένιο	25,4 ^a	3,2	37,0 ^{ab}	3,8	58,9 ^{bcd}	4,4	60 ^{cd}	11	49 ^{bcd}	22	58 ^{bcd}	19
<i>α</i> -τερπινένιο	27,7 ^a	2,6	39 ^{ab}	14	64 ^{cd}	17	63 ^{bcd}	13	50 ^{abc}	15	68 ^{cd}	16
λεμονένιο			13,09 ^{bcd}	0,81	12,1 ^{abcd}	2,7	9,2 ^a	1,9	11,0 ^{abc}	3,0	14,3 ^{cde}	1,4
<i>β</i> -φελλανδρόνιο			9,98 ^{bc}	0,11	13,7 ^d	1,1	10,9 ^{cd}	1,7	6,9 ^{ab}	5,0	5,93 ^a	0,56
3-οκτανόνη					9,67 ^{ab}	0,85	8,4 ^a	1,1	11,4 ^{abcd}	2,7	14,13 ^d	0,16
<i>α</i> -τερπινολένιο					7,65 ^{def}	0,08	6,36 ^{bc}	0,39	3,29 ^a	0,08		

1-οκτεν-3-όλη	25,00^{cd}	0,95	22,4^{bc}	4,1	38,8^e	2,9	16,4^b	2,5	29,2^d	2,3	40,4^e	6,5
<i>cis</i> - ένυδρο σαβινένιο	25,2^a	1,0	18,9^a	4,2	45,3^c	4,6	25,3^a	6,8	34,0^b	3,3	17,4^a	2,1
<i>trans</i> - ένυδρο σαβινένιο	18,3^{ab}	2,9	18,15^{ab}	0,32	38,9^d	4,3	17,34^{ab}	0,72	26,4^c	8,7	21,6^{abc}	3,4
καρυοφυλλένιο	58,2^b	7,4	101^c	10	81^{bc}	24	71,9^b	6,4	69^b	11	80^{bc}	25
4-τερπινεόλη	42,1^{cd}	2,7	35,5^{cd}	3,8	47,6^d	3,4	49^d	13	49^d	15	16,6^{ab}	4,0
μεθυλαιθέρας της καρβακρόλης	29,5^{bc}	3,4	36,0^c	9,6	45,0^d	2,8	16,7^a	4,0	25,6^b	6,9	28,10^b	0,83
<i>cis</i> -διϋδροκαρβόνη							4,85^a	0,27				
<i>α</i> -χουμουλένιο			8,3^b	2,9	10,8^c	1,0	9,94^{bc}	0,86	5,22^a	0,66		
<i>α</i> -τερπινεόλη							4,55	0,22				
βορνεόλη	45,4^{efg}	4,0	42,8^{defg}	4,7	51,0^g	3,6	32,7^{bc}	2,6	46,4^{fg}	8,0	39,6^{cdef}	2,7
<i>β</i> -βισαβολένιο	43,6^a	6,4	51,0^{ab}	9,3	48,0^{ab}	3,3	43^a	10	45^a	11	64,0^{bc}	4,4
<i>δ</i> -καδινένιο							9,1^b	1,0				
<i>p</i> -κυμεν-8-όλη							5,20^c	0,64				
οξικό καρβακρύλιο							3,87^b	0,20				
οξειδίο του καρυοφυλλενίου	56,6^f	6,9	47,9^{ef}	1,8	49,7^{ef}	1,0	27,4^b	4,2	41,5^{de}	6,2	30,5^{bc}	3,1
σπαθουλενόλη							5,81^c	0,53				

4-ισοπροπυλο-μ-κρεσόλη							5,59 ^b	0,30				
5-ισοπροπυλο-μ-κρεσόλη							6,07 ^b	0,30			2,37 ^a	0,04
Σύνολο	414,32		514,37		721,02		600,53		570,38		564,93	

^{a,b,...}Τιμές με διαφορετικούς εκθέτες στην ίδια γραμμή είναι στατιστικά σημαντικές όπως προκύπτει από την εφαρμογή της ANOVA ($p < 0.05$). Ο Πίνακας IV-6β είναι συνέχεια του IV-6α.

Πίνακας IV-6β. Μέση τιμή της συγκέντρωσης (mg/L) και τυπική απόκλιση (SD) των συστατικών των αιθέριων ελαίων των φυτών καλλιεργούμενης ρίγανης (*O. vulgare* subsp. *hirtum*) από τις περιοχές Ιωάννινα, Πρέβεζα, Ηλεία, Αχαΐα, Ρέθυμνο και Ηράκλειο.

ΕΝΩΣΕΙΣ	ΙΩΑΝΝΙΝΑ		ΠΡΕΒΕΖΑ		ΗΛΕΙΑ		ΑΧΑΪΑ		ΡΕΘΥΜΝΟ		ΗΡΑΚΛΕΙΟ	
	MT	±SD	MT	±SD	MT	±SD	MT	±SD	MT	±SD	MT	±SD
α-πινένιο	26 ^{ab}	12	28,9 ^{abc}	9,3	40,5 ^{cd}	6,9	31,2 ^{bc}	3,8	27,8 ^{abc}	5,6	34,0 ^{bcd}	8,7
α-θουγγένιο	32 ^{bc}	12	38 ^{bc}	11	47 ^c	14	37,1 ^{bc}	6,5	25,8 ^b	4,5	8,9 ^a	2,6
καμφένιο	7,2 ^{bc}	3,1	5,59 ^{ab}	0,85	7,78 ^c	0,98	5,8 ^b	1,0				
β-πινένιο	6,3 ^b	1,2	5,36 ^b	0,34	7,9 ^c	1,2	6,00 ^b	0,80	3,92 ^a	0,44		
δ-3-καρένιο	4,41 ^a	0,49			5,73 ^b	0,87						

<i>α</i> -φελλανδρένιο	9,0 ^b	1,9	9,9 ^{bc}	1,0	13,1 ^d	1,7	13,0 ^d	2,7			9,12 ^b	0,68
<i>β</i> -μυρκένιο	66 ^d	16	60,0 ^{cd}	5,8	91 ^e	14	71,1 ^{de}	9,1	62,9 ^{cd}	9,4	42,5 ^{abc}	5,6
<i>α</i> -τερπινένιο	61,2 ^{bcd}	6,9	62,5 ^{bcd}	9,8	112 ^e	14,	76,1 ^d	9,4	58 ^{bcd}	14	49,4 ^{abc}	10,0
λεμονένιο	11,3 ^{abcd}	2,4	10,5 ^{ab}	1,0	17,0 ^e	2,0	14,6 ^{de}	1,6	11,1 ^{abcd}	2,5	11,72 ^{abcd}	0,51
<i>β</i> -φελλανδρένιο	13,7 ^d	2,4	10,96 ^{cd}	0,71	13,2 ^{cd}	1,6	13,7 ^d	1,3	10,06 ^{bc}	0,49	9,6 ^{bc}	1,7
3-οκτανόνη	11,6 ^{bcd}	4,3	9,7 ^{ab}	1,1	10,36 ^{abc}	0,89	13,2 ^{cd}	1,5				
<i>α</i> -τερπινολένιο	7,9 ^{ef}	1,3	6,81 ^{cd}	0,90	7,04 ^{cde}	0,66	7,46 ^{def}	0,68	5,54 ^b	0,31	8,09 ^f	0,27
1-οκτεν-3-όλη	18,0 ^b	7,0	17,9 ^b	1,3	16,1 ^b	1,5	19,8 ^{bc}	2,4	5,16 ^a	0,22	16,7 ^b	4,7
<i>cis</i> - ένυδρο σαβινένιο	17,5 ^a	5,9	21,9 ^a	1,8	19,8 ^a	6,8	36,3 ^b	3,4	16,6 ^a	4,3	18,7 ^a	5,5
<i>trans</i> - ένυδρο σαβινένιο	15,9 ^a	2,8	15,5 ^a	2,5	16,3 ^{ab}	1,2	22,8 ^{bc}	3,2	15 ^a	1,5	18,7 ^{ab}	2,6
οξικό βορνύλιο	3,74 ^b	0,83										
καρυοφυλλένιο	73 ^b	15	67,1 ^b	8,6	75,1 ^{bc}	9,8	59 ^b	16	28,2 ^a	5,1	58 ^b	15
4-τερπινεόλη	41,6 ^{cd}	9,1	36,8 ^{cd}	5,8	7,45 ^a	0,66	51,9 ^d	7,9	29,4 ^{bc}	3,4	48 ^d	15
μεθυλαιθέρας της καρβακρόλης	9,6 ^a	2,5	10,7 ^a	3,3			13,4 ^a	1,2			31,7 ^{bc}	4,1
<i>cis</i> -διϋδροκαρβόνη	8,0 ^b	3,2	3,8 ^a	1,6								
<i>α</i> -χουμουλένιο	10,4 ^{bc}	1,2	8,85 ^{bc}	0,95	5,84 ^a	0,15	6,1 ^a	1,4				

βορνεόλη	36^{bcd}	10	29,7^b	4,4	21,1^a	2,3	36,8^{bcd}	2,1	18,8^a	2,0	34,7^{bcd}	6,7
<i>β</i>-βισαβολένιο	42,5^a	6,1	43^a	14	59,7^{ab}	9,0	61^{ab}	16	56,5^{ab}	5,2	78^c	10
<i>δ</i>-καδινένιο	7,0^a	2,3	7,6^a	1,5								
<i>p</i>-κυμεν-8-όλη			3,42^b	0,69					2,89^a	0,14		
οξικό καρβακρύλιο	3,37^a	0,53										
οξείδιο του καρνοφυλλενίου	28,3^{bc}	7,7	27,6^b	7,3	16,4^a	2,1	29,6^{bc}	4,4	15,4^a	3,1	37,7^{cd}	8,7
σπαθουλενόλη	3,74^{ab}	0,64	3,34^a	0,67	4,32^b	0,74						
4-ισοπροπυλο-μ-κρεσόλη	3,66^a	0,41	6,2^b	1,4	8,8^c	1,3	12,0^d	1,3	6,36^b	0,62		
5-ισοπροπυλο-μ-κρεσόλη	6,1^b	1,1	8,0^c	2,2			13,4^d	1,5	6,8^{bc}	1,0		
Σύνολο	585,02		559,63		623,52		651,16		406,23		515,53	

^{a,b,...}Τιμές με διαφορετικούς εκθέτες στην ίδια γραμμή είναι στατιστικά σημαντικές όπως προκύπτει από την εφαρμογή της ANOVA ($p < 0.05$). Ο Πίνακας IV-6β είναι συνέχεια του IV-6α.

Από τις ενώσεις που υπολογίστηκαν με ημιποσοτικό προσδιορισμό, η ένωση με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ήταν το α -τερπινένιο (112 ± 14 mg/L, Ηλεία), ακολουθούμενη από το καρυοφυλλένιο (101 ± 10 mg/L, Πιερία) και το β -μυρκενίο (91 ± 14 mg/L, Ηλεία).

Η σειρά κατάταξης των περιοχών ανάλογα με το συνολικό άθροισμα των συγκεντρώσεων των ενώσεων που προσδιορίστηκαν ημιποσοτικά διαμορφώθηκε ως εξής (σε φθίνουσα σειρά):

Κιλκίς ($721,02$ mg/L) > Αχαΐα > Ηλεία > Κοζάνη > Ιωάννινα > Μαγνησία > Τρίκαλα > Πρέβεζα > Πιερία > Ηράκλειο > Θεσσαλονίκη > Ρέθυμνο ($406,23$ mg/L).

Συνολική εικόνα

Λαμβάνοντας υπόψη τον ποσοτικό και τον ημιποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν με την αεριοχρωματογραφική ανάλυση και συνδυάζοντας ενδεικτικά τα δεδομένα τους, η σειρά κατάταξης παραμένει σταθερή και παρόμοια με αυτή που καταγράφηκε για το άθροισμα των τεσσάρων βασικών ενώσεων (βλ. **Πίνακα IV-2**). Κάτι τέτοιο είναι αναμενόμενο εξάλλου λόγω της υψηλής συγκέντρωσης των τεσσάρων βασικών συστατικών (καρβακρόλη, θυμόλη, γ -τερπινένιο και π -κυμένιο).

IV.1.3. Ολικό φαινολικό περιεχόμενο

Τα φυτά του είδους *O. vulgare* είναι γνωστά για την πλούσια περιεκτικότητά τους σε φαινολικές ενώσεις οι οποίες συμβάλλουν στις ευεργετικές τους ιδιότητες. Η ποσότητα των φαινολικών συστατικών στα φυτά ρίγανης μπορεί να ποικίλλει και αντίστοιχα, η σύνθεση των φαινολικών ενώσεων μπορεί να είναι διαφορετική, ακόμη και μεταξύ διαφορετικών τμημάτων του ίδιου φυτού (Özer et al., 2020). Εκτός από τον γενότυπο, οι περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς και οι συνθήκες χειρισμού μπορούν να επηρεάσουν τη συνολική περιεκτικότητα των φυτών της ρίγανης σε φαινολικά συστατικά.

Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας IV-7) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου των μεθανολικών εκχυλισμάτων των δειγμάτων αιθέριου ελαίου των καλλιεργούμενων φυτών ρίγανης (*O. vulgare* subsp. *hirtum*) ανάλογα με την περιοχή προέλευσης. Ταυτόχρονα, κατασκευάστηκε διάγραμμα (Σχήμα IV-6) για την καλύτερη οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων και τη διευκόλυνση της σύγκρισης μεταξύ των δειγμάτων.

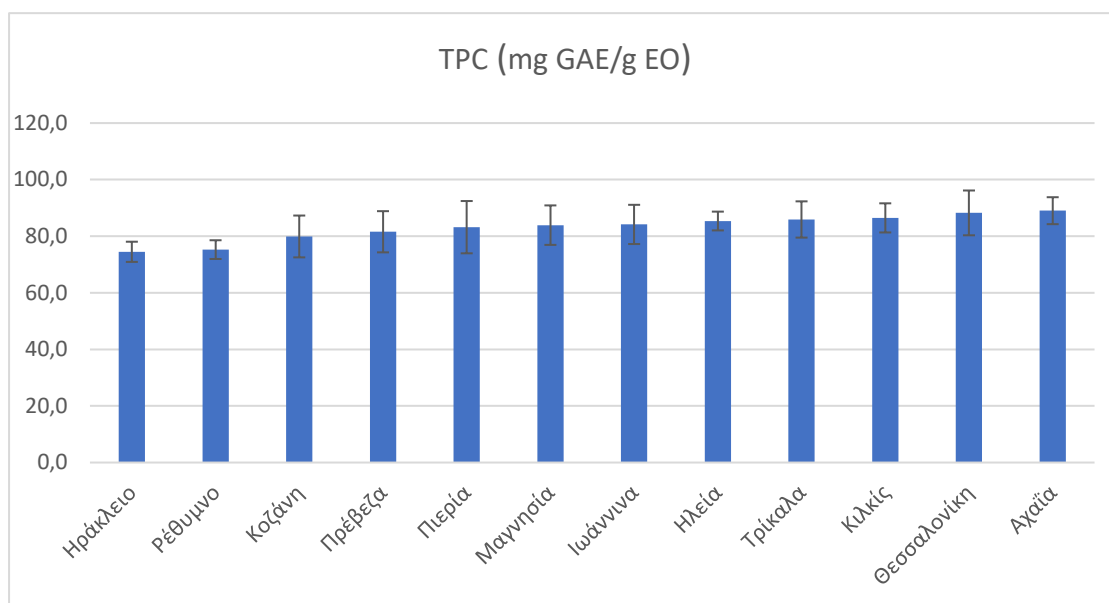
Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος (Gallic Acid Equivalents, GAE) ανά γραμμάριο αιθέριου ελαίου (mg GAE/g EO).

Πίνακας IV-7. Μέση τιμή και τυπική απόκλιση του ολικού φαινολικού περιεχόμενου (TPC) των μεθανολικών εκχυλισμάτων των δειγμάτων αιθέριου ελαίου καλλιεργούμενων φυτών ρίγανης (*O. vulgare* subsp. *hirtum*) ανάλογα με την περιοχή προέλευσης.

ΠΕΡΙΟΧΗ	Θεσ/κη	Πιερία	Κιλκίς	Κοζάνη	Μαγνησία	Τρίκαλα
TPC	88.3	83.2	86.5	79.9	83.9	85.9
(mg GAE/g EO)	± 7.9 ^b	± 9.2 ^{ab}	± 5.2 ^{ab}	± 7.4 ^{ab}	± 7.0 ^{ab}	± 6.4 ^{ab}

ΠΕΡΙΟΧΗ	Ιωάννινα	Πρέβεζα	Ηλεία	Αχαΐα	Ρέθυμνο	Ηράκλειο
TPC	84.2	81.6	85.4	89.0	75.3	74.5
(mg GAE/g EO)	± 6.9 ^{ab}	± 7.3 ^{ab}	± 3.3 ^{ab}	± 4.8 ^b	± 3.3 ^a	± 3.6 ^a

^{ab} Τιμές με διαφορετικούς εκθέτες είναι στατιστικά σημαντικές όπως προκύπτει από την εφαρμογή της ANOVA ($p < 0.05$)



Σχήμα IV-6. Διάγραμμα τιμών του ολικού φαινολικού περιεχομένου, με τις τυπικές αποκλίσεις, των μεθανολικών εκχυλισμάτων δειγμάτων αιθέριου ελαίου καλλιεργούμενων φυτών ρίγανης (*O. vulgare* subsp. *hirtum*) από τις δώδεκα περιοχές της Ελλάδας (mg GAE/g EO) σε αύξουσα σειρά.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, οι συνολικές τιμές TPC όλων των δειγμάτων κυμάνθηκαν από $74,5 \pm 3,6$ mg GAE/g EO (Ηράκλειο) έως $89,0 \pm 4,8$ mg GAE/g EO (Αχαΐα). Όπως παρατηρούμε και στο διάγραμμα, δεν παρατηρήθηκαν μεγάλες διακυμάνσεις του ολικού φαινολικού περιεχομένου μεταξύ των δειγμάτων διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης.

Όσον αφορά τη σύγκριση των τιμών TPC μεταξύ των δειγμάτων ρίγανης που αναλύθηκαν στην παρούσα έρευνα, η ακολουθία των περιοχών που παρουσιάζονται στο **Σχήμα IV-6** δεν φαίνεται να συσχετίζεται άμεσα ούτε με τα ποσοστά της καρβακρόλης ή της θυμόλης ξεχωριστά, ούτε με το άθροισμα των ποσοστών των δύο βασικών αυτών ενώσεων (καρβακρόλη + θυμόλη), ούτε ακόμη με τα συνολικά ποσοστά όλων των ενώσεων (βλ. **Πίνακες IV-2 και IV-4**). Πιο αναλυτικά, τα δείγματα αιθέριου ελαίου ρίγανης που προέρχονται από την περιοχή του Ηρακλείου κατέχουν την πρώτη θέση σε συγκέντρωση καρβακρόλης, όπως φαίνεται στο **Σχήμα IV-5**. Σε αντίθεση, τα δείγματα από την Αχαΐα βρίσκονται στο τέλος αυτής της κατάταξης, παρά το γεγονός ότι θα περίμενε κανείς να είναι αντίστροφα. Μια πιθανή εξήγηση για αυτό είναι ότι οι διαφορές στις τιμές του ολικού φαινολικού περιεχομένου και τα ποσοστά των κύριων ενώσεων είναι τόσο μικρές, που ενδέχεται να μην είναι δυνατή η αξιόπιστη διάκρισή τους λόγω τυπικών σφαλμάτων. Μια πιο

λεπτομερής ανάλυση με τη χρήση HPLC (High-performance liquid chromatography-Υγρή χρωματογραφία) θα μπορούσε ενδεχομένως να προσφέρει επιπλέον ενδείξεις για την αιτία αυτού του φαινομένου (Michiu et al., 2022).

Η προσπάθεια σύγκρισης του εύρους των τιμών του ολικού φαινολικού περιεχομένου που καταγράφονται σε αυτή τη διατριβή με αντίστοιχα της βιβλιογραφίας είναι κάπως δύσκολη καθώς υπάρχουν ελάχιστες αναφορές όπου εξετάζεται το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο του αιθέριου ελαίου της ρίγανης εν συγκρίσει με αυτό της ξηρής δρόγης (εκχύλισμα). Η σύγκριση, επομένως, περιορίστηκε σε παρόμοιες αναλύσεις TPC σε αιθέρια έλαια ρίγανης και άλλων ΑΦΦ καθώς, όπως ειπώθηκε και στο **Κεφ. 3.1.3.**, τα αιθέρια έλαια και τα φυτικά εκχυλίσματα περιέχουν διαφορετικές ποσότητες φαινολικών συστατικών, οπότε θεωρήθηκαν μη συγκρίσιμα μεγέθη.

Ο Βελόπουλος (2022) μελέτησε την επίδραση των τεχνικών παραλαβής του αιθέριου ελαίου στις τιμές του ολικού φαινολικού περιεχομένου δειγμάτων ρίγανης *O. vulgare* subsp. *hirtum* που είχε προμηθευτεί από εμπορική εταιρεία στην περιοχή της Θέρμης. Οι τιμές ολικού φαινολικού περιεχομένου που κατέγραψε ήταν αρκετά μικρότερες από αυτές που υπολογίστηκαν για τα αιθέρια έλαια των δειγμάτων ρίγανης της παρούσας έρευνας. Συγκεκριμένα, οι υψηλότερες τιμές TPC (23,20 mg GAE/g EO) προέκυψαν όταν η εξαγωγή των αιθέριων ελαίων των δειγμάτων ρίγανης έγινε με την εφαρμογή της απόσταξης με προκατεργασία υπερήχων, ενώ αρκετά χαμηλότερες τιμές TPC (12,40 mg GAE/g EO) βρέθηκαν σε αιθέρια έλαια τα οποία παραλήφθηκαν με εφαρμογή της απόσταξης με ταυτόχρονη δράση υπερήχων. Τέλος, τις χαμηλότερες τιμές TPC απέδωσαν τα αιθέρια έλαια που αποκτήθηκαν με την κλασική απόσταξη (5,22 mg GAE/g EO). Τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν τον συγγραφέα στο συμπέρασμα ότι η χρήση υπερήχων, πριν ή κατά τη διάρκεια της απόσταξης, επιδρά θετικά στη συγκέντρωση του ολικού φαινολικού περιεχομένου στα αιθέρια έλαια (Βελόπουλος, 2022).

Οι Pasiadis et al. (2021), κατά τη διερεύνηση της χημικής σύστασης των αιθέριων ελαίων ΑΦΦ που καλλιεργούνται σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας, κατέγραψαν τιμή TPC για το αιθέριο έλαιο ρίγανης *O. vulgare* L. από την περιοχή της Φθιώτιδας ίση με $42,6 \pm 3,9$ mg GAE/g EO. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά τους, το αιθέριο έλαιο της ρίγανης κατείχε την υψηλότερη τιμή TPC ανάμεσα στα φυτά που εξετάστηκαν. Συγκριτικά με την παρούσα έρευνα, ωστόσο, τα ποσοστά TPC ήταν

αρκετά χαμηλά, γεγονός το οποίο μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες, όπως στην προέλευση του δείγματος (πιθανόν συμβατική και όχι βιολογική καλλιέργεια), στην τεχνική εξαγωγής των αιθέριων ελαίων, στις συνθήκες αποθήκευσης, κ.α. (Pasias et al., 2021). Ομοίως, οι Semiz et al. (2018), κατά τη μελέτη τεσσάρων διαφορετικών ειδών *Origanum* (*O. majorana*, *O. onites*, *O. hypericifolium* και *O. sipyleum*), βρήκαν παρόμοια ποσοστά TPC με τους Pasias et al. (2021), τα οποία κυμάνθηκαν μεταξύ 3,81 και 47,54 mg GAE/g EO (Semiz et al., 2018).

Διευρύνοντας τη μελέτη της βιβλιογραφίας σε άλλα ΑΦΦ, παρατίθενται κάποιες σχετικές μελέτες που αφορούν τον προσδιορισμό ολικού φαινολικού περιεχομένου δειγμάτων αιθέριου ελαίου του *Thymus capitatus*, ενός φυτού που ανήκει στην ίδια οικογένεια (Lamiaceae) με αυτή της ρίγανης *O. vulgare*.

Οι Benoutman et al. (2022), μελέτησαν τη φυτοχημική σύσταση, καθώς και την αντιοξειδωτική και αντιμυκητιακή δράση ενός είδους θυμαριού, του *T. capitatus*, από αυτοφυή πληθυσμό στην περιοχή του Μαρόκο. Κατά τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου του φυτού, οι ερευνητές εξέτασαν και συνέκριναν τρία διαφορετικά κλάσματα: το μεθανολικό εκχύλισμα, το ακετονικό εκχύλισμα και το αιθέριο έλαιο από φύλλα *T. capitatus*. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι το μεθανολικό εκχύλισμα κατείχε την υψηλότερη τιμή TPC ($73,00 \pm 6,18$ mg GAE/g ξ.φ.), ακολουθούμενο από το ακετονικό εκχύλισμα ($20,45 \pm 2,18$ mg GAE/g ξ.φ.) και τέλος, το αιθέριο έλαιο με τιμή TPC $5,18 \pm 0,68$ mg GAE/g EO (Benoutman et al., 2022). Το εύρημα αυτό υποστηρίζει περαιτέρω την άποψη ότι υπάρχει μεγάλη διαφορά στη σύσταση και την περιεκτικότητα των φαινολικών συστατικών ανάμεσα στο εκχύλισμα και το αιθέριο έλαιο του ίδιου φυτού.

Παρόμοια, οι Maniki et al. (2023), μελέτησαν τη χημική σύνθεση, τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες και τις ιδιότητες antibiofilm του αιθέριου ελαίου του *T. capitatus* από βιολογική καλλιέργεια στο νησί της Λήμνου. Οι συγγραφείς βρήκαν πολύ υψηλά ποσοστά ολικού φαινολικού περιεχομένου, συγκεκριμένα $231,32 \pm 16,71$ mg GAE/g EO, αρκετά υψηλότερα από μια παρόμοια μελέτη από τους Aljabeili et al. (2018) που βρήκαν ποσοστά TPC στο αιθέριο έλαιο του *T. vulgaris* ίσα με $177,3 \pm 1,9$ mg GAE/g EO (Aljabeili et al., 2018; Maniki et al., 2023).

IV.1.4. Αντιοξειδωτική ικανότητα

Κατά γενικό κανόνα, η αντιοξειδωτική ικανότητα των αιθέριων ελαίων των φυτών καθορίζεται από τη χημική τους σύνθεση. Έτσι, οι δευτερογενείς μεταβολίτες, όπως οι φαινολικές ενώσεις και τα τερπένια που περιέχονται στα αιθέρια έλαια των ΑΦΦ, είναι γνωστοί για την ισχυρή αντιοξειδωτική τους δράση (Bhavaniramya et al., 2019).

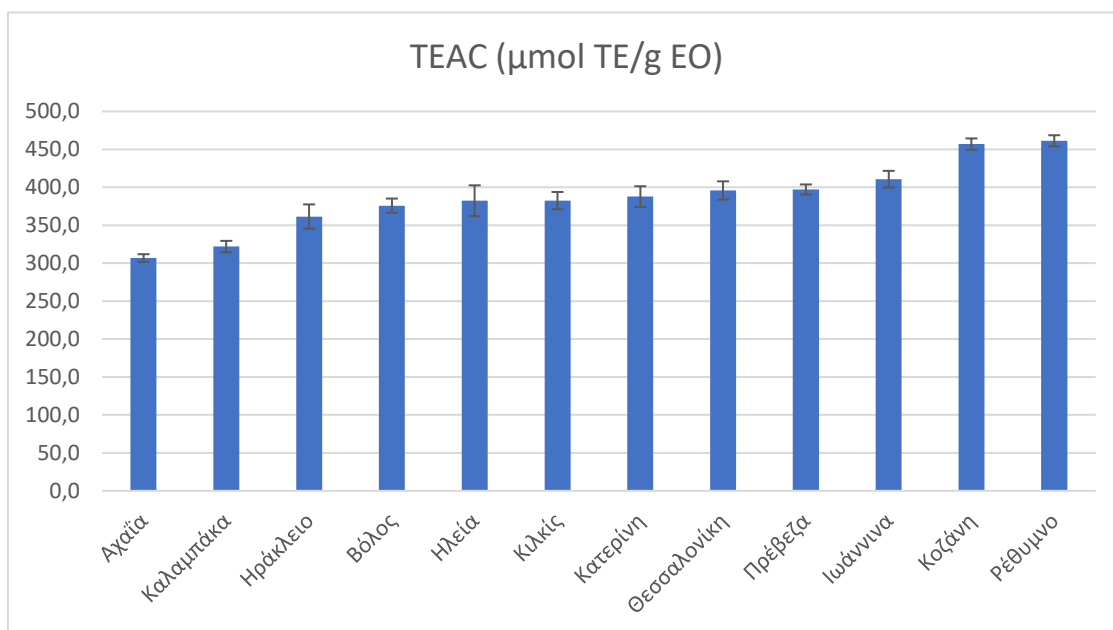
Στον πίνακα που ακολουθεί (**Πίνακας IV-8**) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας (TEAC) των μεθανολικών εκχυλισμάτων των δειγμάτων αιθέριου ελαίου ρίγανης με βάση την περιοχή προέλευσης. Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη Trolox και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε μmol ισοδυνάμων Trolox ανά γραμμάριο αιθέριου ελαίου ρίγανης ($\mu\text{mol TE/g EO}$). Ταυτόχρονα, κατασκευάστηκε διάγραμμα (**Σχήμα IV-7**) για την καλύτερη οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων και τη διευκόλυνση της σύγκρισης μεταξύ των δειγμάτων.

Πίνακας IV-8. Μέση τιμή και τυπική απόκλιση της αντιοξειδωτικής ικανότητας (TEAC) των μεθανολικών εκχυλισμάτων των αιθέριων ελαίων ρίγανης ανάλογα με την περιοχή προέλευσης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα Trolox ($\mu\text{mol TE/g EO}$).

Περιοχή	Θεσ/κη	Πιερία	Κιλκίς	Κοζάνη	Μαγνησία	Τρίκαλα
TEAC ($\mu\text{mol TE/g EO}$)	396 $\pm 12^{\text{cd}}$	388 $\pm 14^{\text{c}}$	383 $\pm 11^{\text{c}}$	457.0 $\pm 7.4^{\text{e}}$	375.8 $\pm 9.4^{\text{bc}}$	321.9 $\pm 7.5^{\text{a}}$
Περιοχή	Ιωάννινα	Πρέβεζα	Ηλεία	Αχαΐα	Ρέθυμνο	Ηράκλειο
TEAC ($\mu\text{mol TE/g EO}$)	411 $\pm 11^{\text{d}}$	397.1 $\pm 6.7^{\text{cd}}$	382 $\pm 20^{\text{c}}$	306.8 $\pm 5.0^{\text{a}}$	461.3 $\pm 7.3^{\text{e}}$	361 $\pm 16^{\text{b}}$

^{ab...} Τιμές με διαφορετικούς εκθέτες είναι στατιστικά σημαντικές όπως προκύπτει από την εφαρμογή της ANOVA ($p < 0.05$)

Σχήμα IV-7. Διάγραμμα των μέσων τιμών αντιοξειδωτικής ικανότητας (TEAC), με τις τυπικές τους αποκλίσεις, των μεθανολικών εκχυλισμάτων δειγμάτων αιθέριου ελαίου ρίγανης από τις δώδεκα περιοχές της Ελλάδας ($\mu\text{mol TE/g EO}$) σε αύξουσα σειρά.



Σύμφωνα με τον **Πίνακα IV-8**, στο σύνολό τους, οι τιμές TEAC των δειγμάτων αιθέριου ελαίου ρίγανης που μελετήθηκαν κυμάνθηκαν μεταξύ $306,8 \pm 5,0 \mu\text{mol TE/g EO}$ (Αχαΐα) και $461,3 \pm 7,3 \mu\text{mol TE/g EO}$ (Ρέθυμνο). Στην περίπτωση της αντιοξειδωτικής δράσης των αιθέριων ελαίων ρίγανης, επομένως, καταγράφηκαν κάποιες σχετικές διακυμάνσεις μεταξύ των τιμών TEAC ανά περιοχή, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα του **Σχήματος IV-7**.

Όσον αφορά τη σύγκριση των τιμών TEAC μεταξύ των δειγμάτων αιθέριου ελαίου ρίγανης της συγκεκριμένης έρευνας, η σειρά των περιοχών που καταγράφεται στο **Σχήμα IV-7** δεν φαίνεται να έχει κάποια άμεση συσχέτιση ούτε με το ποσοστό της καρβακρόλης ή της θυμόλης ξεχωριστά, ούτε με το άθροισμα των ποσοστών των δύο βασικών ενώσεων (καρβακρόλη + θυμόλη), αλλά ούτε με τα συνολικά ποσοστά όλων των ενώσεων (βλ. **Πίνακες IV-2 και IV-4**).

Σε παρόμοια συμπεράσματα κατέληξε η ερευνητική ομάδα των Nakas et al. (2023) οι οποίοι στην εργασία τους πάνω στη βελτιστοποίηση της απόσταξης των φυτών ρίγανης *O. vulgare* subsp. *hirtum* μελέτησαν την *in vitro* αντιοξειδωτική δράση των παραγόμενων αιθέριων ελαίων με τη μέθοδο DPPH. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα

της έρευνας, δεν καταγράφηκε κάποια σαφής συσχέτιση μεταξύ των τιμών της αντιοξειδωτικής δράσης και των αντίστοιχων συγκεντρώσεων σε θυμόλη και καρβακρόλη. Σχετικά με αυτό, οι συγγραφείς επισημαίνουν ότι θα πρέπει ίσως να ληφθεί υπόψη το γεγονός πως, πέραν της καρβακρόλης και της θυμόλης, που ήταν τα κυρίαρχα συστατικά, το αιθέριο έλαιο ρίγανης περιέχει και κάποια άλλα πρόσθετα βιοενεργά συστατικά, των οποίων η σύσταση φαίνεται να ποικίλλει ανάλογα με τις συνθήκες απόσταξης. Έτσι, όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση, θα πρέπει πιθανόν να αποδοθεί μια συνεργιστική δράση, που πιθανώς εξηγεί τις μικρές διαφορές στις τιμές συσχέτισης με την DPPH (Nakas et al., 2023).

Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός ότι στην παρούσα διατριβή δεν παρατηρήθηκε και κάποια εμφανής συσχέτιση μεταξύ της αντιοξειδωτικής δράσης των δειγμάτων και του ολικού φαινολικού τους περιεχομένου, καθώς οι υψηλές τιμές TPC δεν φαίνεται αναλογούν σε υψηλές τιμές TEAC. Έτσι, ενώ τα δείγματα αιθέριου ελαίου από την περιοχή της Αχαΐας κατείχαν την υψηλότερη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά, αντίθετα απέδωσαν τα χαμηλότερα ποσοστά TEAC. Τέτοιες ασυμφωνίες έχουν, ωστόσο, καταγραφεί και σε άλλες παρόμοιες έρευνες.

Οι Semeniciu et al. (2018) θέλησαν να συγκρίνουν και να ταξινομήσουν με τη βοήθεια της χημειομετρίας τα αιθέρια έλαια φυτών βασιλικού, λεβιστικού, θυμαριού και τριφυλλιού, σύμφωνα με τις χημικές και βιολογικές τους ιδιότητες. Αφού μελέτησαν την αντιοξειδωτική ικανότητα των αιθέριων ελαίων, βρήκαν ότι το θυμάρι κατείχε την υψηλότερη τιμή TEAC ($197,0 \pm 0,23 \mu\text{mol TE/g EO}$), ακολουθούμενο από αυτή του βασιλικού ($105,0 \pm 1,09 \mu\text{mol TE/g EO}$), του μαϊντανού ($39,4 \pm 0,02 \mu\text{mol TE/g EO}$) και τέλος, του λεβιστικού ($35,9 \pm 0,27 \mu\text{mol TE/g EO}$). Ωστόσο, παρατήρησαν ότι οι αντίστοιχες τιμές TPC των φυτών αυτών δεν ήταν σε πλήρη συμφωνία με τις τιμές TEAC: ενώ οι τιμές TPC του αιθέριου ελαίου βασιλικού και μαϊντανού ήταν παρόμοιες, η αντιοξειδωτική δράση του βασιλικού ήταν περίπου 3 φορές υψηλότερη. Αν και η συγκέντρωση των οξυγονωμένων μονοτερπενίων στο δείγμα του βασιλικού ήταν υψηλή, δεν εντόπισαν κάποια σημαντική συσχέτιση αυτής με τις τιμές TEAC. Αντιθέτως, διαπίστωσαν μια θετική συσχέτιση μεταξύ TEAC και τη συγκέντρωση των φαινυλοπροπανοειδών. Οι συγγραφείς, λοιπόν, έφτασαν στο συμπέρασμα ότι τα φαινυλοπροπανοειδή στην πραγματικότητα ευθύνονται κυρίως για την

αντιοξειδωτική δράση των αιθέριων ελαίων και όχι τόσο τα οξυγονωμένα μονοτερπένια (Semeniuc et al., 2018).

Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι Yan et al. (2016) κατά τη μελέτη τους πάνω στη διακύμανση της αντιοξειδωτικής ικανότητας φυτών ρίγανης (*O. vulgare*). Η τιμή της ικανότητας απορρόφησης ριζών οξυγόνου (ORAC) δεν βρέθηκε να έχει κάποια συσχέτιση με τη σύσταση του αιθέριου ελαίου των 352 δειγμάτων ρίγανης που ερευνήθηκαν, ενώ αναφέρθηκε μόνο μια ασθενής συσχέτιση μεταξύ των τιμών TPC και του περιεχομένου των αιθέριων ελαίων (Yan et al., 2016).

Οι Simirgiotis et al. (2020) ανέφεραν και αυτοί την έλλειψη συσχέτισης μεταξύ των τιμών TPC και TEAC κατά τη μελέτη αιθέριου ελαίου ρίγανης από την περιοχή της Χιλής. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, η έλλειψη αυτή θα μπορούσε να αποδοθεί στο γεγονός ότι η μέθοδος Folin-Ciocalteu αντανάκλα την παρουσία όλων των αναγωγικών ουσιών σε μια μήτρα και όχι μόνο των πολυφαινολικών. Επομένως, η παρουσία μη φαινολικών ουσιών δεν μπορεί να αποκλειστεί και οι ερμηνείες των αποτελεσμάτων ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) πρέπει να λαμβάνονται υπόψη με βάση αυτούς τους περιορισμούς. Επιπλέον, κατά την ίδια μελέτη, παρατηρήθηκε ότι δεν υπήρχε συσχέτιση μεταξύ της χημικής σύνθεσης των αιθέριων ελαίων και των αποτελεσμάτων TPC ή TEAC, όπως και στην παρούσα έρευνα (Simirgiotis et al., 2020).

Τα τελευταία χρόνια μελετάται η πιθανότητα ύπαρξης κάποιας μορφής συνεργιστικής δράσης των οξυγονούχων ενώσεων που ίσως ενισχύει περαιτέρω την αντιοξειδωτική ικανότητα του αιθέριου ελαίου της ρίγανης (Kosakowska et al., 2021; Kulisic et al., 2004; Βελόπουλος, 2022). Στο πλαίσιο αυτό, οι Milos & Makota (2012) μελέτησαν την παρουσία συνεργιστικής δράσης μεταξύ των τεσσάρων βασικών ενώσεων του αιθέριου ελαίου της ρίγανης: της καρβακρόλης, της θυμόλης, του π -κυμενίου και της θυμοκινόνης. Στα αποτελέσματά τους κατέγραψαν την ύπαρξη συνεργιστικής δράσης σε όλα τα ζεύγη ενώσεων, πλην, ωστόσο, του π -κυμενίου και της θυμοκινόνης, μεταξύ των οποίων φάνηκε να υπερτερεί το ανταγωνιστικό φαινόμενο. Ταυτόχρονα, σύμφωνα με την ίδια έρευνα, βρέθηκε ότι η θυμόλη έχει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από την καρβακρόλη (Milos and Makota, 2012). Αντίθετα, οι Al-Mansori et al. (2020) μελέτησαν αποκλειστικά την αλληλεπίδραση θυμόλης-καρβακρόλης και δεν

εντόπισαν κάποια συνεργιστική δράση μεταξύ τους, παρόλο που και οι δύο υπό μελέτη φαινόλες εμφάνισαν υψηλή αντιοξειδωτική δράση (Al-Mansori et al., 2020).

Στη μελέτη τους, οι Kosakowska et al. (2021) βρήκαν παρόμοια αποτελέσματα όταν συνέκριναν την αντιοξειδωτική δράση των αιθέριων ελαίων και των αιθανολικών εκχυλισμάτων ελληνικής ρίγανης (*O. vulgare* subsp. *hirtum*) με εκείνα της κοινής ρίγανης (*O. vulgare* subsp. *vulgare*). Κατά την εφαρμογή της μεθόδου DPPH, το αιθέριο έλαιο του subsp. *hirtum* κατέγραψε μια τιμή ίση με $220,29 \pm 2,83$ $\mu\text{mol Trolox/g EO}$, ενώ του subsp. *vulgare*, ίση με $218,78 \pm 2,68$ $\mu\text{mol Trolox/g EO}$. Αξίζει να αναφερθεί ότι στην εν λόγω μελέτη, το ποσοστό των φαινολικών μονοτερπενίων του αιθέριου ελαίου της ελληνικής ρίγανης άγγιξε το 39,79%, ενώ της κοινής ρίγανης περιορίστηκε στο 7,11%. Έτσι, παρόλο που θα περίμενε κανείς να επικρατήσει κατά πολύ η ελληνική ρίγανη σε τιμές αντιοξειδωτικής ικανότητας λόγω των υψηλότερων επιπέδων καρβακρόλης και θυμόλης που περιέχει, η ποσότητα των οξυγονωμένων και μονοτερπενικών υδρογονανθράκων της κοινής ρίγανης φαίνεται να μείωσε τη διαφορά (Kosakowska et al., 2021).

Γενικά, τα αιθέρια έλαια των ΑΦΦ, όπως η ρίγανη, θεωρούνται πλούσια σε φαινολικά συστατικά και χρησιμοποιούνται πλέον ολοένα και περισσότερο στη Βιομηχανία Τροφίμων καθώς επιβραδύνουν την οξειδωτική αποικοδόμηση των λιπιδίων και βελτιώνουν την ποιότητα και τη θρεπτική αξία των τροφίμων (Semiz et al., 2018). Επιπλέον, οι καταναλωτές φαίνεται να έχουν κάνει στροφή στη χρήση προϊόντων που περιέχουν φυσικά αντιοξειδωτικά, έναντι των συνθετικών αντιοξειδωτικών όπως το BHT (βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο) και το BHA (βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη), καθώς θεωρούνται καλύτερα και ασφαλέστερα για τον ανθρώπινο οργανισμό. Ως εκ τούτου τα τελευταία χρόνια στον τομέα της Βιομηχανίας Τροφίμων, με τη βοήθεια της έρευνας, προσπαθούν να προστεθούν φυσικά αντιοξειδωτικά όπου αυτό είναι δυνατό (Pokorný, 1991). Πολλά αιθέρια έλαια ΑΦΦ ενσωματώνονται πλέον σε πραγματικά συστήματα τροφίμων (π.χ. ψωμί) ή ενεργές συσκευασίες, καθώς και σε ζωοτροφές, βελτιώνοντας τα τρόφιμα και αυξάνοντας το χρόνο ζωής τους (Alarcon-Rajo et al., 2017; Chouliara et al., 2007; Plati et al., 2021).

Οι Tsimidou et al. (1995) θέλησαν να δοκιμάσουν τις αντιοξειδωτικές ικανότητες της ρίγανης έναντι άλλων φυτών, καθώς και έναντι συνθετικών αντιοξειδωτικών, σε λάδι

από σκουμπρί. Οι αναλύσεις έδειξαν ότι η ρίγανη είχε αντίστοιχη αντιοξειδωτική δράση με αυτή του δεντρολίβανου, αλλά ανώτερη από τα υπόλοιπα φυτά που εξετάστηκαν. Επιπλέον, βρέθηκε ότι 1% (w/w) ρίγανης έχει αντίστοιχη δράση με 200 ppm συνθετικού αντιοξειδωτικού tBHQ (tert-butylhydroquinone), όταν αυτή προστέθηκε στο εδώδιμο έλαιο (Tsimidou et al., 1995). Παρόμοιες μελέτες έχουν δείξει ότι το αιθέριο έλαιο ρίγανης εμποδίζει σημαντικά την οξείδωση του ζωικού λίπους και επιβραδύνει την οξείδωση του λίπους των πουλερικών κατά τη συντήρηση σε ψύξη ή κατάψυξη (Milos et al., 2000; Namiki, 1990; Pokorný, 1991).

Εκτός από τις δοκιμές σε κρέας και ψάρι έχουν γίνει προσπάθειες ενσωμάτωσης του αιθέριου ελαίου της ρίγανης και σε γαλακτοκομικά συστήματα, όπως προϊόντα και συσκευασίες τυριών (Christaki et al., 2021) καθώς και ροφήματα γάλακτος (Boroski et al., 2012). Επιπλέον, έχει μελετηθεί η επίδραση της ρίγανης στη βελτίωση της ποιότητας και του χρόνου ζωής των ζυμαρικών (Boroski et al., 2011) και ορισμένων εδώδιμων λαδιών (Peñalvo et al., 2016).

IV.2. ΠΟΛΥΜΕΤΑΒΛΗΤΗ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος SPSS 26.0. Η ανάλυση των μέσων όρων των τιμών που προέκυψαν από τις χημικές μεθόδους ανάλυσης πραγματοποιήθηκε με την Πολυδιάστατη Ανάλυση Διακύμανσης (MANOVA). Σκοπός της στατιστικής ανάλυσης ήταν να καθοριστούν εκείνες οι παράμετροι οι οποίες είναι σημαντικές για τη διαφοροποίηση των δειγμάτων ρίγανης με βάση τη γεωγραφική προέλευση. Ως ανεξάρτητη μεταβλητή τέθηκε η γεωγραφική περιοχή προέλευσης των δειγμάτων ρίγανης και ως εξαρτημένες οι αναλυτικές παράμετροι (απόδοση σε αιθέριο έλαιο, συστατικά αιθέριων ελαίων, εκατοστιαία αναλογία συστατικών αιθέριων ελαίων, ολικό φαινολικό περιεχόμενο, αντιοξειδωτική δράση, αλλά και συνδυασμοί αυτών).

Αρχικά το σύνολο των δειγμάτων υποβλήθηκε σε MANOVA, ωστόσο, καθώς ορισμένες περιοχές αλληλεπικαλύπτονταν, τα δείγματα χωρίστηκαν σε δύο γεωγραφικές ομάδες και υποβλήθηκαν εκ νέου σε ανάλυση MANOVA. Οι ομάδες χωρίστηκαν έτσι ώστε να καλύπτεται κατά το δυνατόν περισσότερο το σύνολο των γεωγραφικών διαμερισμάτων:

ΟΜΑΔΑ Α ΟΜΑΔΑ Β	
ΗΛΕΙΑ	ΑΧΑΪΑ
ΗΡΑΚΛΕΙΟ	ΡΕΘΥΜΝΟ
ΤΡΙΚΑΛΑ	ΜΑΓΝΗΣΙΑ
ΘΕΣ/ΚΗ	ΠΙΕΡΙΑ
ΚΙΛΚΙΣ	ΚΟΖΑΝΗ
ΠΡΕΒΕΖΑ	ΙΩΑΝΝΙΝΑ

Στη συνέχεια εφαρμόστηκε η Γραμμική Διαχωριστική Ανάλυση (LDA), η οποία χρησιμοποιεί τις επιλεγμένες εξαρτημένες μεταβλητές που προκύπτουν από την MANOVA με σκοπό να ερευνηθεί η πιθανότητα κατηγοριοποίησης των δειγμάτων με βάση τη γεωγραφική περιοχή προέλευσης. Για τον υπολογισμό των ποσοστών ορθής κατάταξης χρησιμοποιήθηκαν τόσο η μέθοδος της αντικατάστασης, όσο και της ενδοεπικύρωσης. Η μέθοδος της ενδοεπικύρωσης αποτελεί μια περισσότερο «απαισιόδοξη» μέθοδος υπολογισμών ορθής κατάταξης, καθώς υπολογίζει τα ποσοστά αφήνοντας σε κάθε επανάληψη μία παρατήρηση εκτός. Δημιουργεί έτσι μία διαχωριστική συνάρτηση και στη συνέχεια, με βάση το διαχωρισμό, κατατάσσει την παρατήρηση που αφέθηκε. Αυτό γίνεται για όλες τις παρατηρήσεις του δείγματος οδηγώντας έτσι σε έναν πιο αξιόπιστο διαχωρισμό. Επιπλέον, για τον έλεγχο της ομοιογένειας των διακυμάνσεων χρησιμοποιήθηκε ο στατιστικός έλεγχος M του Box, (Box's M) βασική προϋπόθεση για να έχουμε αξιόπιστα αποτελέσματα, κυρίως στην περίπτωση που τα δείγματα είναι άνισα (Field, 2009).

Σαν τελικό βήμα της στατιστικής ανάλυσης εφαρμόστηκε η Stepwise LDA (SLDA), ως ύστατη μέθοδος ταξινόμησης, ώστε να αναγνωριστούν οι πιο σημαντικές μεταβλητές-markers. Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα μέσω μιας κλιμακωτής προσθαφαίρεσης μεταβλητών η οποία και βελτιστοποιεί τον διαχωρισμό. Τα αποτελέσματα από την ανάλυση αυτή αξιολογήθηκαν με βάση τη μέθοδο ενδοεπικύρωσης leave-one-out.

IV.2.1. Ομάδα Α

Συστατικά αιθέριων ελαίων - Ολικά φαινολικά - Αντιοξειδωτική ικανότητα

Το σύνολο των αποτελεσμάτων των χημικών αναλύσεων (απόδοση σε αιθέριο έλαιο, συστατικά αιθέριων ελαίων, εκατοστιαία αναλογία συστατικών αιθέριων ελαίων, ολικό φαινολικό περιεχόμενο, αντιοξειδωτική δράση, αλλά και συνδυασμοί αυτών) της Ομάδας Α επεξεργάστηκε αρχικά με την Πολυδιάστατη Ανάλυση Διακύμανσης (MANOVA). Οι παράμετροι και όλοι οι πιθανοί συνδυασμοί αυτών αξιολογήθηκαν με βάση τόσο τη μέθοδο της αντικατάστασης, όσο και τη μέθοδο της ενδοεπικύρωσης και όσες από αυτές απέδωσαν ποσοστά χαμηλότερα του 50% αποκλείστηκαν από τη στατιστική ανάλυση. Ο συνδυασμός των παραμέτρων που επιλέχθηκε τελικά να

επεξεργαστεί με την Πολυδιάστατη Ανάλυση Διακύμανσης (MANOVA) ήταν η εκατοστιαία αναλογία των συστατικών των αιθέριων ελαίων, το ολικό φαινολικό περιεχόμενο και η αντιοξειδωτική δράση. Όπως φανερώνουν οι δείκτες Pillai's Trace= 4,779, ($F=14,857$, $p\text{-value}=<0,000$) και Wilks' Lambda=0,000 ($F=33,458$, $p\text{-value}=<0,000$) η ανάλυση είναι σημαντική, γεγονός που καταδεικνύει ότι υπάρχει σημαντική πολυμεταβλητή επίδραση των παραμέτρων αυτών στην περιοχή προέλευσης της ρίγανης. Οι παράμετροι που βρέθηκαν σημαντικές ($p\text{-value}<0,05$) παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας IV-9: ΟΜΑΔΑ Α: Στατιστικά σημαντικές μεταβλητές ($p<0,05$) (επί τοις εκατό αναλογία των συστατικών των αιθέριων ελαίων, ολικό φαινολικό περιεχόμενο και αντιοξειδωτική ικανότητα).

ΕΞΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΜΕΤΑΒΛΗΤΕΣ	ΟΜΑΔΑ Α	
	<i>F</i>	<i>p-value</i>
<i>α</i> - πινένιο	3,747	0,006
<i>α</i> - θουγένιο	16,479	0,000
καμφένιο	19,979	0,000
<i>β</i> - πινένιο	43,232	0,000
<i>δ</i> -3-καρένιο	19,328	0,000
<i>α</i> - φελλανδρένιο	16,598	0,000
<i>β</i> - μυρκένιο	7,314	0,000
<i>α</i> - τερπινένιο	12,833	0,000
λεμονένιο	12,281	0,000
<i>β</i> - φελλανδρένιο	8,004	0,000
<i>γ</i> - τερπινένιο	17,102	0,000
3-οκτανόνη	9,956	0,000
<i>π</i> -κυμένιο	12,625	0,000
<i>α</i> - τερπινολένιο	11,586	0,000
1-οκτεν-3-όλη	13,330	0,000
<i>cis</i> -ένυδρο σαβινένιο	3,399	0,010
<i>trans</i> - ένυδρο σαβινένιο	1,948	0,101
καρυοφυλλένιο	4,710	0,001
4-τερπινεόλη	14,092	0,000
μεθυλαιθέρας της καρβακρόλης	5,480	0,000
<i>cis</i> -διϋδροκαρβόνη	2,623	0,034
<i>α</i> - χουμουλένιο	8,666	0,000
βορνεόλη	17,003	0,000
<i>β</i> - βισαβολένιο	40,163	0,000
<i>δ</i> -καδινένιο	11,646	0,000
<i>π</i> -κυμεν-8-όλη	10,009	0,000
οξείδιο του καρυοφυλλενίου	20,672	0,000

σπαθουλενόλη	3,750	0,005
4-ισοπροπυλο-μ-κρεσόλη	64,496	0,000
θυμόλη	19,504	0,000
5-ισοπροπυλο-μ-κρεσόλη	28,198	0,000
καρβακρόλη	59,721	0,000
Ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC)	6,587	0,000
Αντιοξειδωτική ικανότητα (TEAC)	2,726	0,029

Στη συνέχεια της επεξεργασίας, οι 33 παράμετροι που βρέθηκαν σημαντικές ($p < 0,05$) αναλύθηκαν με τη βοήθεια της Γραμμικής Διαχωριστικής Ανάλυσης (LDA) προκειμένου να διαπιστωθεί αν μπορούν να διαχωρίσουν την προέλευση της ρίγανης στις έξι διαφορετικές περιοχές της Ομάδας Α. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δημιουργούνται τρεις στατιστικά σημαντικές διαχωριστικές συναρτήσεις:

1^η: Wilks' Lambda=0,000, $X^2=661,668$, $\beta_e=150$ με $p\text{-value}=0,000 < 0,05$,

2^η: Wilks' Lambda=0,000, $X^2=469,112$, $\beta_e=116$ με $p\text{-value}=0,000 < 0,05$ και

3^η: Wilks' Lambda=0,001, $X^2=306,040$, $\beta_e=84$ με $p\text{-value}=0,001 < 0,05$.

Ο έλεγχος για την ομοιογένεια των διακυμάνσεων (Box's M) είναι μη σημαντικός στο 5% επίπεδο σημαντικότητας (169,516, με $F=1,702$, $p\text{-τιμή}=0,059$), γεγονός που φανερώνει ότι υπάρχει ομοιογένεια των διακυμάνσεων των δειγμάτων για κάθε περιοχή.

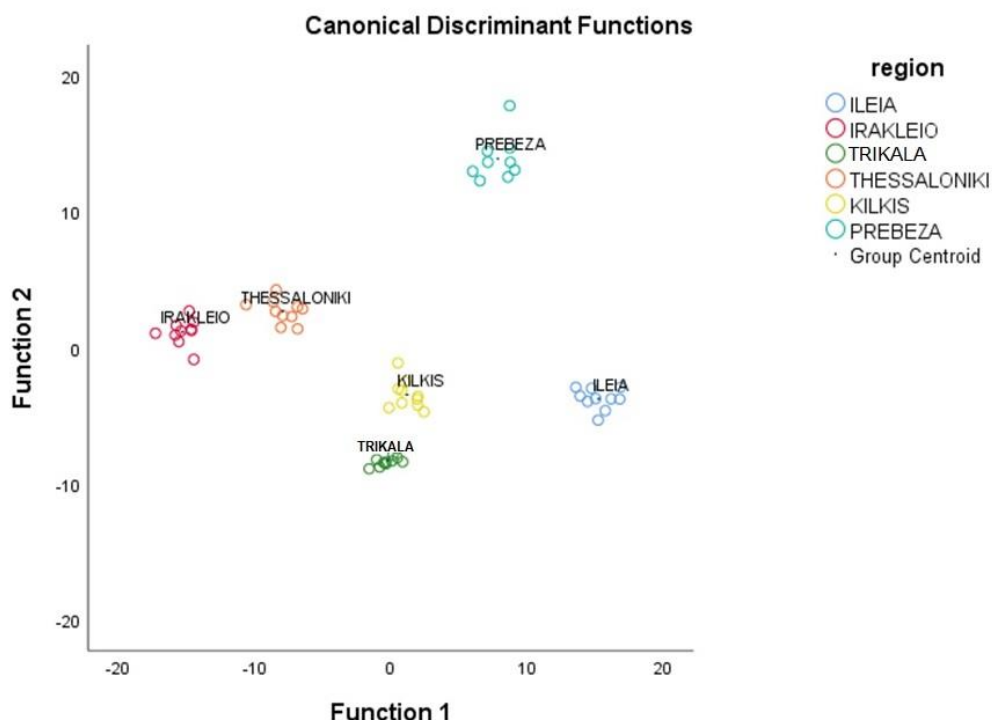
Η πρώτη διαχωριστική συνάρτηση ερμηνεύει το 53,5% της συνολικής διασποράς με κανονική κατανομή $R^2=0,995$, η δεύτερη διαχωριστική συνάρτηση ερμηνεύει το 25,8% της συνολικής διασποράς με κανονική κατανομή $R^2=0,991$ και η τρίτη διαχωριστική συνάρτηση ερμηνεύει το 13,3% της συνολικής διασποράς με κανονική κατανομή $R^2=0,982$. Το συνολικό ερμηνευμένο ποσοστό αγγίζει το 92,7% της συνολικής διακύμανσης το οποίο είναι πάρα πολύ ικανοποιητικό. Οι τιμές των κέντρων των ομάδων (τετμημένη και τεταγμένη στο διάγραμμα κατανομής) είναι οι μέσες τιμές των παραμέτρων, όπως αυτές ορίζονται από τις διαχωριστικές συναρτήσεις και για κάθε ομάδα-γεωγραφική περιοχή προέλευσης φαίνονται στο **Σχήμα IV-8**. Για την Ηλεία είναι (15,246, -3,748), για το Ηράκλειο (-15,280, 1,156), για τα Τρίκαλα (-0,247, -8,277), για τη Θεσσαλονίκη (-7,958, 2,675), για το Κιλκίς

(1,195, -3,456) και για την Πρέβεζα (7,853, 13,864). Στο **Σχήμα IV-8** μπορούμε να παρατηρήσουμε τον πλήρη διαχωρισμό των περιοχών προέλευσης της ρίγανης.

Στον **Πίνακα IV-10** δίνονται τα αποτελέσματα των κατατάξεων χρησιμοποιώντας τόσο τη μέθοδο της αντικατάστασης, όσο και τη μέθοδο της ενδοεπικύρωσης. Παρατηρούμε ότι το 100% του συνόλου των παρατηρήσεων κατατάχθηκαν σωστά χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της αντικατάστασης, ενώ το ποσοστό αυτό μειώθηκε στο 93,3% όταν χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ενδοεπικύρωσης.

Πίνακας IV-10: Αποτελέσματα διαχωρισμού και ταξινόμησης των δειγμάτων ρίγανης της Ομάδας Α ως προς την περιοχή προέλευσης με βάση την επί τοις εκατό αναλογία των συστατικών των αιθέριων ελαίων, το ολικό φαινολικό περιεχόμενο και την αντιοξειδωτική ικανότητα.

		ΠΕΡΙΟΧΗ	Predicted Group Membership					Total	
		ΗΛΕΙΑ	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	ΤΡΙΚΑΛΑ	ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ	ΚΙΛΚΙΣ	ΠΡΕΒΕΖΑ		
Original	Count	ΗΛΕΙΑ	10	0	0	0	0	0	10
		ΗΡΑΚΛΕΙΟ	0	10	0	0	0	0	10
		ΤΡΙΚΑΛΑ	0	0	11	0	0	0	11
		ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ	0	0	0	10	0	0	10
		ΚΙΛΚΙΣ	0	0	0	0	10	0	10
		ΠΡΕΒΕΖΑ	0	0	0	0	0	9	9
	%	ΗΛΕΙΑ	100,0	0	0	0	0	0	100,0
		ΗΡΑΚΛΕΙΟ	0	100,0	0	0	0	0	100,0
		ΤΡΙΚΑΛΑ	0	0	100,0	0	0	0	100,0
		ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ	0	0	0	100,0	0	0	100,0
		ΚΙΛΚΙΣ	0	0	0	0	100,0	0	100,0
		ΠΡΕΒΕΖΑ	0	0	0	0	0	100,0	100,0
Cross-validated	Count	ΗΛΕΙΑ	10	0	0	0	0	0	10
		ΗΡΑΚΛΕΙΟ	0	10	0	0	0	0	10
		ΤΡΙΚΑΛΑ	0	0	10	0	0	1	11
		ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ	0	0	0	10	0	0	10
		ΚΙΛΚΙΣ	0	0	0	1	9	0	10
		ΠΡΕΒΕΖΑ	1	0	0	1	0	7	9
	%	ΗΛΕΙΑ	100,0	0	0	0	0	0	100,0
		ΗΡΑΚΛΕΙΟ	0	100,0	0	0	0	0	100,0
		ΤΡΙΚΑΛΑ	0	0	90,9	0	0	9,1	100,0
		ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ	0	0	0	100,0	0	0	100,0
		ΚΙΛΚΙΣ	0	0	0	10,0	90,0	0	100,0
		ΠΡΕΒΕΖΑ	11,1	0	0	11,1	0	77,8	100,0



Σχήμα IV-8. Διάγραμμα ταξινόμησης των δειγμάτων ρίγανης της Ομάδας Α ως προς την περιοχή προέλευσης με βάση την επί τοις εκατό αναλογία των συστατικών των αιθέριων ελαίων, το ολικό φαινολικό περιεχόμενο και την αντιοξειδωτική ικανότητα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, οι περιοχές της Ηλείας, του Ηρακλείου και της Θεσσαλονίκης διαχωρίζονται σε ποσοστό 100%, ενώ ακολουθούν τα Τρίκαλα με 90,9%, το Κιλκίς με 90% και τέλος η Πρέβεζα με 77,8%.

Τέλος, με τη βοήθεια της ανάλυσης Stepwise LDA (SLDA) εντοπίστηκαν οι μεταβλητές εκείνες που επιδεικνύουν την ισχυρότερη διαχωριστική ικανότητα (markers). Έτσι, από τις συνολικές 33 στατιστικά σημαντικές παραμέτρους της Ομάδας Α που εξετάστηκαν, η ανάλυση SLDA κατέδειξε 16 μεταβλητές ως markers (**Πίνακας IV-11**). Για την επιβεβαίωση της διαχωριστικής τους ικανότητας πραγματοποιήθηκε εκ νέου κατάταξη των δειγμάτων ρίγανης της Ομάδας Α. Ο **Πίνακας IV-12** δίνει τα αποτελέσματα των κατατάξεων με τη χρήση των μεταβλητών που προέκυψαν από την Stepwise LDA, χρησιμοποιώντας τόσο τη μέθοδο της αντικατάστασης, όσο και τη μέθοδο της ενδοεπικύρωσης.

Παρατηρούμε ότι το 100% του συνόλου των παρατηρήσεων κατατάχθηκαν σωστά, χρησιμοποιώντας τόσο τη μέθοδο της αντικατάστασης, όσο και τη μέθοδο της

ενδοεπικύρωσης. Το ποσοστό, επομένως, αυξήθηκε από το 93.3% που είχε προκύψει αρχικά με τη μέθοδο της ενδοεπικύρωσης και τη χρήση των 33 παραμέτρων. Ωστόσο, στο αντίστοιχο διάγραμμα κατανομής που προέκυψε (**Σχήμα IV-9**) φαίνεται να υπάρχει αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των δειγμάτων των περιοχών Κιλκίς-Τρίκαλα.

Λαμβάνοντας υπόψιν, επομένως και το διάγραμμα κατανομής παρατηρούμε ότι για την Ομάδα Α επιτυγχάνεται 100% ορθή ταξινόμηση για τις περιοχές Ηράκλειο, Θεσσαλονίκη, Πρέβεζα και Ηλεία.

Πίνακας IV-11. ΟΜΑΔΑ Α: Στατιστικά σημαντικές μεταβλητές ($p < 0,05$) που σύμφωνα με την ανάλυση Stepwise LDA παρουσιάζουν ισχυρή διαχωριστική ικανότητα.

Εισαγωγή/Απομάκρυνση μεταβλητών^{a,b,c}

α/α	Ένωση	Wilks' Lambda							
		Exact F				Approximate F			
		Statistic	df1	df2	Sig.	Statistic	df1	df2	Sig.
1	5-ισοπροπυλο-μ-κρεσόλη	64,496	5	54,000	,000				
2	β- βισαβολένιο	47,970	10	106,000	,000				
3	δ-καδινένιο					45,775	20	170,098	0,000
4	1-οκτεν-3-όλη					43,008	25	187,244	0,000
5	οξείδιο του καρνοφυλλενίου					39,775	35	204,348	0,000
6	γ- τερπινένιο					40,309	40	207,663	0,000
7	cis-διϋδροκαρβόνη					40,688	45	208,872	0,000
8	θυμόλη					42,397	50	208,596	0,000
9	α- φελλανδρένιο					45,815	50	208,596	0,000
10	α- θουγένιο					43,336	55	207,253	0,000
11	α- τερπινένιο					44,462	60	205,130	0,000
12	α- τερπινολένιο					44,288	65	202,428	0,000
13	π-κυμεν-8-όλη					43,999	70	199,287	0,000
14	μεθυλαιθέρας της καρβακρόλης					44,431	75	195,809	0,000
15	π-κυμένιο					44,081	80	192,069	0,000
16	α- πινένιο					45,947	80	192,069	0,000

Σε κάθε βήμα εισάγεται η μεταβλητή η οποία ελαχιστοποιεί το ολικό Wilks' Lambda.

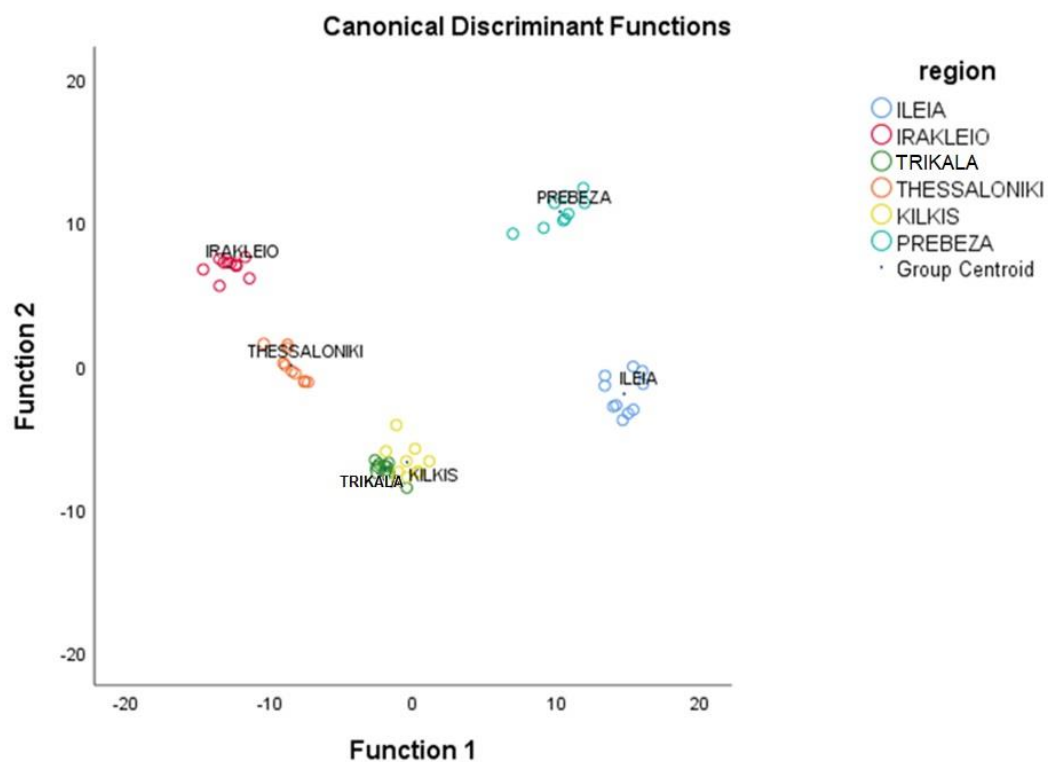
a. Μέγιστος αριθμός βημάτων: 68.

b. Ελάχιστο εισαγόμενο partial F: 3.84.

c. Μέγιστο αφαιρούμενο partial F: 2.71.

Πίνακας IV-12: Αποτελέσματα διαχωρισμού και ταξινόμησης των δειγμάτων ρίγανης της Ομάδας Α ως προς την περιοχή προέλευσης με βάση το συνδυασμό των μεταβλητών που ταυτοποιήθηκαν ως markers.

		Predicted Group Membership						Total
ΠΕΡΙΟΧΗ		ΗΛΕΙΑ	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	ΤΡΙΚΑΛΑ	ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ	ΚΙΛΚΙΣ	ΠΡΕΒΕΖΑ	
Original	Count	ΗΛΕΙΑ	10	0	0	0	0	10
		ΗΡΑΚΛΕΙΟ	0	10	0	0	0	10
		ΤΡΙΚΑΛΑ	0	0	11	0	0	11
		ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ	0	0	0	10	0	10
		ΚΙΛΚΙΣ	0	0	0	0	10	10
		ΠΡΕΒΕΖΑ	0	0	0	0	9	9
	%	ΗΛΕΙΑ	100,0	,0	,0	,0	,0	100,0
		ΗΡΑΚΛΕΙΟ	,0	100,0	,0	,0	,0	100,0
		ΤΡΙΚΑΛΑ	,0	,0	100,0	,0	,0	100,0
		ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ	,0	,0	,0	100,0	,0	100,0
		ΚΙΛΚΙΣ	,0	,0	,0	,0	100,0	100,0
		ΠΡΕΒΕΖΑ	,0	,0	,0	,0	100,0	100,0
Cross-validated	Count	ΗΛΕΙΑ	10	0	0	0	0	10
		ΗΡΑΚΛΕΙΟ	0	10	0	0	0	10
		ΤΡΙΚΑΛΑ	0	0	11	0	0	11
		ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ	0	0	0	10	0	10
		ΚΙΛΚΙΣ	0	0	0	0	10	10
		ΠΡΕΒΕΖΑ	0	0	0	0	9	9
	%	ΗΛΕΙΑ	100,0	,0	,0	,0	,0	100,0
		ΗΡΑΚΛΕΙΟ	,0	100,0	,0	,0	,0	100,0
		ΤΡΙΚΑΛΑ	,0	,0	100,0	,0	,0	100,0
		ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ	,0	,0	,0	100,0	,0	100,0
		ΚΙΛΚΙΣ	,0	,0	,0	,0	100,0	100,0
		ΠΡΕΒΕΖΑ	,0	,0	,0	,0	100,0	100,0



Σχήμα IV-9. Διάγραμμα ταξινόμησης των δειγμάτων ρίγανης της Ομάδας Α ως προς την περιοχή προέλευσης με βάση τον συνδυασμό των μεταβλητών που ταυτοποιήθηκαν ως markers.

IV.2.2. Ομάδα Β

Συστατικά αιθέριων ελαίων - Ολικά φαινολικά - Αντιοξειδωτική ικανότητα

Το σύνολο των αποτελεσμάτων των χημικών αναλύσεων (απόδοση σε αιθέριο έλαιο, συστατικά αιθέριων ελαίων, εκατοστιαία αναλογία συστατικών αιθέριων ελαίων, ολικό φαινολικό περιεχόμενο, αντιοξειδωτική δράση, αλλά και συνδυασμοί αυτών) της Ομάδας Β επεξεργάστηκε αρχικά με την Πολυδιάστατη Ανάλυση Διακύμανσης (MANOVA). Οι παράμετροι και όλοι οι πιθανοί συνδυασμοί αυτών αξιολογήθηκαν με βάση τόσο τη μέθοδο της αντικατάστασης, όσο και τη μέθοδο της ενδοεπικύρωσης και όσες από αυτές απέδωσαν ποσοστά χαμηλότερα του 50% αποκλείστηκαν από τη στατιστική ανάλυση. Ο συνδυασμός των παραμέτρων που επιλέχθηκε τελικά να επεξεργαστεί με την Πολυδιάστατη Ανάλυση Διακύμανσης (MANOVA) ήταν η εκατοστιαία αναλογία των συστατικών των αιθέριων ελαίων, το ολικό φαινολικό περιεχόμενο και η αντιοξειδωτική δράση. Η ανάλυση είναι σημαντική, όπως φανερώνουν οι δείκτες Pillai's Trace = 4,323, ($F=7,426$, $p\text{-value} < 0,000$) και Wilks' Lambda=0,000 ($F=12,097$, $p\text{-value} < 0,000$), γεγονός που καταδεικνύει ότι και στην Ομάδα Β υπάρχει σημαντική πολυμεταβλητή επίδραση των παραμέτρων αυτών στην περιοχή προέλευσης της ρίγανης. Οι παράμετροι που βρέθηκαν σημαντικές ($p\text{-value} < 0,05$) παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας IV-14: ΟΜΑΔΑ Β: Στατιστικά σημαντικές μεταβλητές ($p < 0,05$) (επί τοις εκατό αναλογία των συστατικών των αιθέριων ελαίων, ολικό φαινολικό περιεχόμενο και αντιοξειδωτική ικανότητα).

ΕΞΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΜΕΤΑΒΛΗΤΕΣ	ΟΜΑΔΑ Β	
	<i>F</i>	<i>p-value</i>
α - πινένιο	0,707	0,620
α - θουγένιο	7,269	0,000
καμφένιο	6,349	0,000
β - πινένιο	12,184	0,000
δ -3-καρένιο	7,860	0,000
α - φελλανδρένιο	16,736	0,000
β - μυρκένιο	3,602	0,006
α - τερπινένιο	2,341	0,050
λεμονένιο	4,912	0,001
β - φελλανδρένιο	12,216	0,000
γ - τερπινένιο	8,733	0,000

3-οκτανόνη	10,266	0,000
π-κυμένιο	4,350	0,002
α-τερπινολένιο	23,839	0,000
1-οκτεν-3-όλη	10,677	0,000
cis-ένυδρο σαβινένιο	2,573	0,033
trans-ένυδρο σαβινένιο	2,545	0,035
οξικό βορνύλιο	1,049	0,395
καρνοφυλλένιο	7,956	0,000
4-τερπινεόλη	1,743	0,135
μεθυλαιθέρας της καρβακρόλης	8,447	0,000
cis-διϋδροκαρβόνη	9,498	0,000
α-χουμουλένιο	16,284	0,000
α-τερπινεόλη	1,253	0,293
βορνεόλη	18,737	0,000
β-βισαβολένιο	2,540	0,035
δ-καδινένιο	46,986	0,000
π-κυμεν-8-όλη	9,047	0,000
οξικό καρβακρύλιο	2,416	0,044
οξειδίο του καρνοφυλλενίου	13,091	0,000
σπαθουλενόλη	5,293	0,000
4-ισοπροπυλο-μ-κρεσόλη	20,953	0,000
θυμόλη	40,470	0,000
5-ισοπροπυλο-μ-κρεσόλη	22,509	0,000
καρβακρόλη	33,509	0,000
Ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC)	4,570	0,001
Αντιοξειδωτική ικανότητα (TEAC)	26,044	0,000

Στη συνέχεια της ανάλυσης, οι 32 παράμετροι που βρέθηκαν σημαντικές ($p < 0,05$) αναλύθηκαν με τη βοήθεια της Γραμμικής Διαχωριστικής Ανάλυσης (LDA) προκειμένου να διαπιστωθεί αν μπορούν να διαχωρίσουν την προέλευση της ρίγανης στις έξι διαφορετικές περιοχές της Ομάδας Β. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δημιουργούνται τρεις στατιστικά σημαντικές διαχωριστικές συναρτήσεις:

1^η: Wilks' Lambda=0,000, $X^2=671,051$, $\beta_e=160$ με $p\text{-value}=0,000 < 0,05$,

2^η: Wilks' Lambda=0,001, $X^2=448,496$, $\beta_e=124$ με $p\text{-value}=0,000 < 0,05$ και

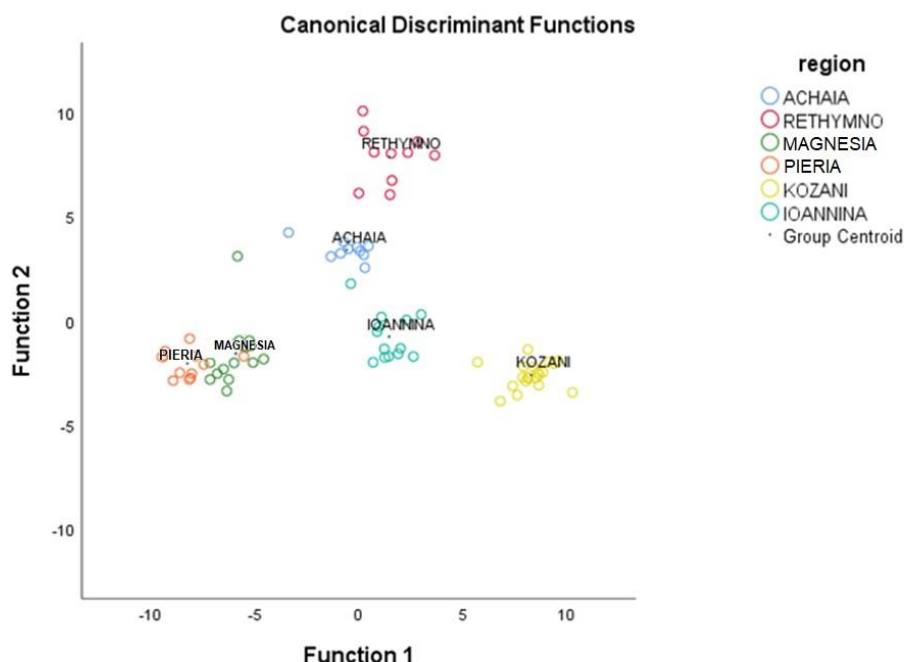
3^η: Wilks' Lambda=0,009, $X^2=287,835$, $\beta_e=90$ με $p\text{-value}=0,001 < 0,05$.

Ο έλεγχος για την ομοιογένεια των διακυμάνσεων (Box's M) είναι μη σημαντικός στο 5% επίπεδο σημαντικότητας (174,858, με $F=1,885$, $p\text{-τιμή}=0,052$), γεγονός που

φανερώνει ότι υπάρχει ομοιογένεια των διακυμάνσεων των δειγμάτων για κάθε περιοχή της Ομάδας Β.

Η πρώτη διαχωριστική συνάρτηση ερμηνεύει το 58,5% της συνολικής διασποράς με κανονική κατανομή $R^2=0,987$, η δεύτερη διαχωριστική συνάρτηση ερμηνεύει το 20,2% της συνολικής διασποράς με κανονική κατανομή $R^2=0,963$ και η τρίτη διαχωριστική συνάρτηση ερμηνεύει το 12,2% της συνολικής διασποράς με κανονική κατανομή $R^2=0,942$. Το συνολικό ερμηνευμένο ποσοστό αγγίζει το 91,0% της συνολικής διακύμανσης, το οποίο είναι ένα πάρα πολύ ικανοποιητικό ποσοστό.

Οι τιμές των κέντρων των ομάδων (τετμημένη και τεταγμένη στο διάγραμμα κατανομής) είναι οι μέσες τιμές των παραμέτρων, όπως αυτές ορίζονται από τις διαχωριστικές συναρτήσεις και για κάθε ομάδα-γεωγραφική περιοχή προέλευσης φαίνονται στο **Σχήμα IV-10**. Για την Αχαΐα είναι (-0,586, 3,384), για το Ρέθυμνο (1,464, 7,866), για τη Μαγνησία (-5,917, -1,583), για την Πιερία (-8,250, -2,060), για την Κοζάνη (8,297, -2,618) και για τα Ιωάννινα (1,457, 0,777). Στο **Σχήμα IV-10** μπορούμε να παρατηρήσουμε τον ικανοποιητικό διαχωρισμό των περιοχών προέλευσης της ρίγανης.



Σχήμα IV-10. Διάγραμμα ταξινόμησης των δειγμάτων ρίγανης της Ομάδας Β ως προς την περιοχή προέλευσης με βάση την επί τοις εκατό αναλογία των συστατικών των αιθέριων ελαίων, το ολικό φαινολικό περιεχόμενο και την αντιοξειδωτική ικανότητα.

Στον **Πίνακα IV-15** καταγράφονται τα αποτελέσματα των κατατάξεων χρησιμοποιώντας τόσο τη μέθοδο της αντικατάστασης, όσο και τη μέθοδο της ενδοεπικύρωσης. Παρατηρούμε ότι το 98,8% του συνόλου των παρατηρήσεων κατατάχθηκαν σωστά χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της αντικατάστασης, ενώ το ποσοστό αυτό μειώθηκε στο 82,7% όταν χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ενδοεπικύρωσης.

Πίνακας IV-15: Αποτελέσματα διαχωρισμού και ταξινόμησης των δειγμάτων ρίγανης της Ομάδας Β ως προς την περιοχή προέλευσης με βάση τα συστατικά των αιθέριων ελαίων, το ολικό φαινολικό περιεχόμενο και την αντιοξειδωτική ικανότητα.

		ΠΕΡΙΟΧΗ	Predicted Group Membership					Total	
			ΑΧΑΪΑ	ΡΕΘΥΜΝΟ	ΜΑΓΝΗΣΙΑ	ΠΙΕΡΙΑ	ΚΟΖΑΝΗ		ΙΩΑΝΝΙΝΑ
Original	Count	ΑΧΑΪΑ	10	0	0	0	0	0	10
		ΡΕΘΥΜΝΟ	0	10	0	0	0	0	10
		ΜΑΓΝΗΣΙΑ	0	0	15	1	0	0	16
		ΠΙΕΡΙΑ	0	0	0	12	0	0	12
		ΚΟΖΑΝΗ	0	0	0	0	20	0	20
		ΙΩΑΝΝΙΝΑ	0	0	0	0	0	13	13
	%	ΑΧΑΪΑ	100,0	0	0	0	0	0	100,0
		ΡΕΘΥΜΝΟ	0	100,0	0	0	0	0	100,0
		ΜΑΓΝΗΣΙΑ	0	0	93,8	6,3	0	0	100,0
		ΠΙΕΡΙΑ	0	0	0	100,0	0	0	100,0
		ΚΟΖΑΝΗ	0	0	0	0	100,0	0	100,0
		ΙΩΑΝΝΙΝΑ	0	0	0	0	0	100,0	100,0
Cross-validated ^b	Count	ΑΧΑΪΑ	10	0	0	0	0	0	10
		ΡΕΘΥΜΝΟ	1	9	0	0	0	0	10
		ΜΑΓΝΗΣΙΑ	2	0	8	5	0	1	16
		ΠΙΕΡΙΑ	0	0	1	11	0	0	12
		ΚΟΖΑΝΗ	0	0	0	0	20	0	20
		ΙΩΑΝΝΙΝΑ	2	0	1	0	1	9	13
	%	ΑΧΑΪΑ	100,0	0	0	0	0	0	100,0
		ΡΕΘΥΜΝΟ	10,0	90,0	0	0	0	0	100,0
		ΜΑΓΝΗΣΙΑ	12,5	0	50,0	31,3	0	6,3	100,0
		ΠΙΕΡΙΑ	0	0	8,3	91,7	0	0	100,0
		ΚΟΖΑΝΗ	0	0	0	0	100,0	0	100,0
		ΙΩΑΝΝΙΝΑ	15,4	0	7,7	0	7,7	69,2	100,0

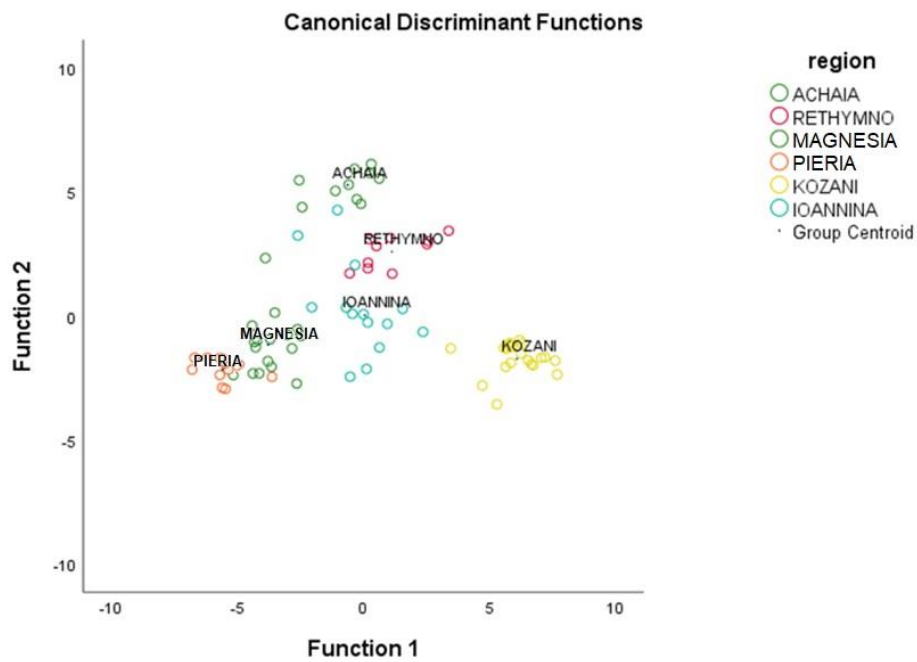
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, οι περιοχές της Αχαΐας και της Κοζάνης διαχωρίζονται πλήρως με ποσοστό 100%, ενώ ακολουθούν σε φθίνουσα σειρά η Πιερία (91,7%), το Ρέθυμνο (90%), τα Ιωάννινα (69,2%) και τέλος η Μαγνησία με 50%.

Τέλος, με τη βοήθεια της ανάλυσης Stepwise LDA (SLDA) εντοπίστηκαν οι μεταβλητές εκείνες που επιδεικνύουν την ισχυρότερη διαχωριστική ικανότητα (markers). Έτσι, από τις συνολικές 32 στατιστικά σημαντικές παραμέτρους της Ομάδας Β που εξετάστηκαν, η ανάλυση SLDA κατέδειξε 14 μεταβλητές ως markers (**Πίνακας IV-16**).

Για την επιβεβαίωση της διαχωριστικής τους ικανότητας πραγματοποιήθηκε εκ νέου κατάταξη των δειγμάτων ρίγανης της Ομάδας Β. Ο **Πίνακας IV-17** δίνει τα αποτελέσματα των κατατάξεων με τη χρήση των μεταβλητών που προέκυψαν από τη Stepwise LDA χρησιμοποιώντας τόσο τη μέθοδο της αντικατάστασης, όσο και τη μέθοδο της ενδοεπικύρωσης.

Παρατηρούμε ότι το 93.9% του συνόλου των παρατηρήσεων κατατάχθηκαν σωστά χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της αντικατάστασης και το 87.8% με τη μέθοδο της ενδοεπικύρωσης. Η Αχαΐα διαχωρίστηκε με ποσοστό 100%, ακολούθησε η Κοζάνη με 95%, η Μαγνησία με 93.8%, το Ρέθυμνο με 90%, η Πιερία με 83.3% και τέλος τα Ιωάννινα με το χαμηλότερο ποσοστό, 64.3%. Αν και σε επιμέρους περιπτώσεις το ποσοστό ενδοεπικύρωσης μειώθηκε, το συνολικό ποσοστό αυξήθηκε από το 82.7% που είχε προκύψει αρχικά με τη χρήση και των 32 παραμέτρων.

Στο αντίστοιχο διάγραμμα κατανομής που προέκυψε (**Σχήμα IV-12**) παρατηρείται και πάλι κάποια αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των δειγμάτων των περιοχών Μαγνησία-Πιερία, καθώς και Ιωάννινα-Ρέθυμνο, ενώ οι περιοχές της Κοζάνης και της Αχαΐας φαίνεται να διαχωρίζονται πλήρως. Λαμβάνοντας υπόψιν, επομένως και το διάγραμμα κατανομής παρατηρούμε ότι για την Ομάδα Β επιτυγχάνεται 100% ορθή ταξινόμηση για την περιοχή της Αχαΐας και της Κοζάνης.



Σχήμα IV-12. Διάγραμμα ταξινόμησης των δειγμάτων ρίγανης της Ομάδας Β ως προς την περιοχή προέλευσης με βάση τις παραμέτρους που ταυτοποιήθηκαν ως markers.

Πίνακας IV-16. ΟΜΑΔΑ Β: Στατιστικά σημαντικές μεταβλητές ($p < 0,05$) που σύμφωνα με την ανάλυση Stepwise LDA παρουσιάζουν ισχυρή διαχωριστική ικανότητα.

Εισαγωγή/Απομάκρυνση μεταβλητών ^{a,b,c}									
Step	Entered	Statistic	Exact <i>F</i>			Wilks' Lambda			
			df1	df2	Sig.	Approximate <i>F</i>			
						Statistic	df1	df2	Sig.
1	δ-καδινένιο	46,986	5	75,000	,000				
2	θυμόλη	37,411	10	148,000	,000				
3	TEAC, TPC					30,227	15	201,922	,000
4	4-ισοπροπυλο-μ-κρεσόλη					25,923	20	239,747	,000
5	δ-3-καρένιο					23,893	25	265,255	,000
6	α-φελλανδρένιο					23,284	30	282,000	,000
7	καρυοφυλλένιο					22,753	35	292,687	,000
8	cis-διϋδροκαρβόνη					22,403	40	299,200	,000
9	β-πινένιο					21,674	45	302,810	,000
10	α-θουγένιο					20,675	50	304,371	,000
11	π-κυμεν-8-όλη					19,937	55	304,457	,000
12	1-οκτεν-3-όλη					19,849	60	303,465	,000
13	π-κυμένιο					19,361	65	301,670	,000
14	οξειδιο του καρυοφυλλενίου					19,105	70	299,267	,000

Σε κάθε βήμα εισάγεται η μεταβλητή η οποία ελαχιστοποιεί το ολικό Wilks' Lambda.

a. Μέγιστος αριθμός βημάτων: 62.

b. Ελάχιστο εισαγόμενο partial *F*: 3.84.

c. Μέγιστο αφαιρούμενο partial *F*: 2.71.

Πίνακας IV-17: Αποτελέσματα διαχωρισμού και ταξινόμησης των δειγμάτων ρίγανης της Ομάδας Β ως προς την περιοχή προέλευσης με βάση τις μεταβλητές που ταυτοποιήθηκαν ως markers.

		ΠΕΡΙΟΧΗ	Predicted Group Membership					Total	
			ΑΧΑΪΑ	ΡΕΘΥΜΝΟ	ΜΑΓΝΗΣΙΑ	ΠΙΕΡΙΑ	ΚΟΖΑΝΗ		ΙΩΑΝΝΙΝΑ
Original	Count	ΑΧΑΪΑ	10	0	0	0	0	0	10
		ΡΕΘΥΜΝΟ	0	10	0	0	0	0	10
		ΜΑΓΝΗΣΙΑ	0	0	15	1	0	0	16
		ΠΙΕΡΙΑ	0	0	1	11	0	0	12
		ΚΟΖΑΝΗ	0	0	0	0	20	0	20
		ΙΩΑΝΝΙΝΑ	2	0	1	0	0	11	14
	%	ΑΧΑΪΑ	100,0	0	0	0	0	0	100,0
		ΡΕΘΥΜΝΟ	0	100,0	0	0	0	0	100,0
		ΜΑΓΝΗΣΙΑ	0	0	93,8	6,3	0	0	100,0
		ΠΙΕΡΙΑ	0	0	8,3	91,7	0	0	100,0
		ΚΟΖΑΝΗ	0	0	0	0	100,0	0	100,0
		ΙΩΑΝΝΙΝΑ	14,3	0	7,1	0	0	78,6	100,0
Cross-validated ^b	Count	ΑΧΑΪΑ	10	0	0	0	0	0	10
		ΡΕΘΥΜΝΟ	1	9	0	0	0	0	10
		ΜΑΓΝΗΣΙΑ	0	0	15	1	0	0	16
		ΠΙΕΡΙΑ	0	0	2	10	0	0	12
		ΚΟΖΑΝΗ	0	0	0	0	19	1	20
		ΙΩΑΝΝΙΝΑ	2	0	2	0	1	9	14
	%	ΑΧΑΪΑ	100,0	0	0	0	0	0	100,0
		ΡΕΘΥΜΝΟ	10,0	90,0	0	0	0	0	100,0
		ΜΑΓΝΗΣΙΑ	0	0	93,8	6,3	0	0	100,0
		ΠΙΕΡΙΑ	0	0	16,7	83,3	0	0	100,0
		ΚΟΖΑΝΗ	0	0	0	0	95,0	5,0	100,0
		ΙΩΑΝΝΙΝΑ	14,3	0	14,3	0	7,1	64,3	100,0

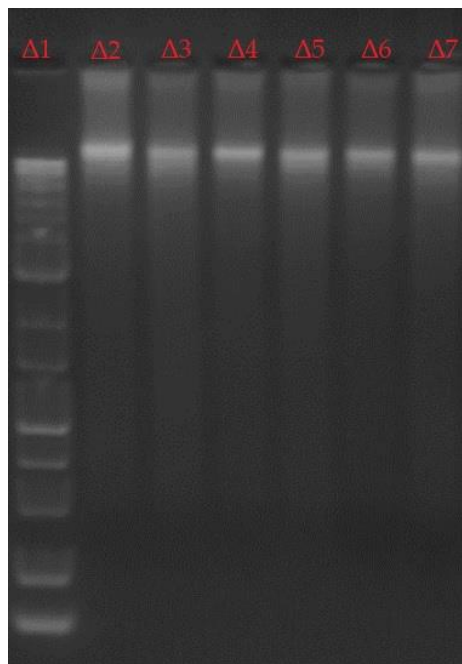
IV.3. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

Η σημασία της αξιολόγησης της γενετικής ποικιλότητας και των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των δειγμάτων στα καλλιεργήσιμα φυτά είναι μεγάλη καθώς μπορεί να παρέχει πληροφορίες σχετικά με την κατάσταση της γενετικής βάσης των σημερινών εμπορικών ποικιλιών. Καλλιεργούμενα φυτά με μεγάλη γενετική ποικιλότητα δίνουν την ευκαιρία στους παραγωγούς και τους επιστήμονες να αναπτύξουν νέες και βελτιωμένες ποικιλίες με καθορισμένα επιθυμητά χαρακτηριστικά (Govindaraj et al., 2015).

Τα αποτελέσματα των μεθόδων μοριακής ταυτοποίησης που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση των φυλογενετικών σχέσεων και της γενετικής παραλλακτικότητας των δειγμάτων καλλιεργούμενης ρίγανης *O. vulgare* subsp. *hirtum* αναλύθηκαν και οπτικοποιήθηκαν με την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων, η αξιοπιστία των οποίων εξετάστηκε με τη βοήθεια της στατιστικής τεχνικής bootstrapping (Felsenstein, 1985).

IV.3.1. Απομόνωση γενωμικού DNA από φυτικό υλικό γενοτύπων ρίγανης

Το γενωμικό DNA απομονώθηκε από ιστό αποξηραμένων φύλλων καλλιεργούμενης ρίγανης *O. vulgare* subsp. *hirtum* (20 mg) με τη χρήση του πακέτου υλικών NucleoSpin Plant II της Macherey-Nagel, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ο έλεγχος της επιτυχούς απομόνωσης DNA και η ποσοτικοποίησή του έγιναν οπτικά μετά από ηλεκτροφόρηση μιας ποσότητας δείγματος DNA (3 μ l) σε πηκτή αгарόζης (1% w/v σε 1xTAE) μαζί με ποσοτικό μάρτυρα γνωστής συγκέντρωσης (5 μ l, 1Kb DNA Ladder). Όπως φαίνεται στην **Εικόνα IV-1**, οι απομονώσεις DNA από τα δείγματα ρίγανης έδωσαν επαρκή ποσότητα για τις αντιδράσεις PCR.



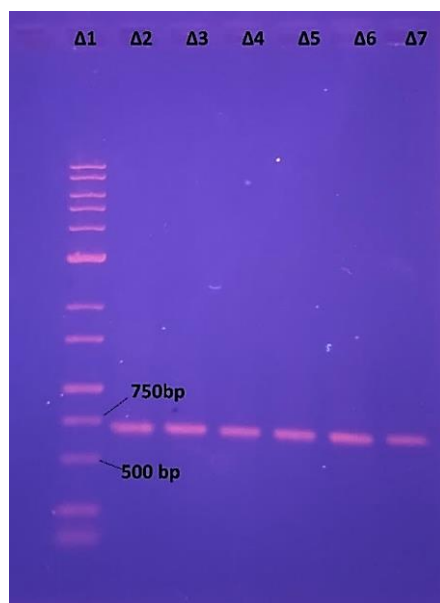
Εικόνα IV-1. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% w/v γενωμικού DNA (δείγμα 3μl/100μl) από διαφορετικούς γενοτύπους ρίγανης *O. vulgare* subsp. *hirtum*: OR3 (Δ2), OR5 (Δ3), OR7 (Δ4), OR10 (Δ5), OR13 (Δ6), OR15 (Δ7). Δ1: 1 Kb DNA Ladder.

IV.3.2. Φυλογενετική ανάλυση των δειγμάτων καλλιεργούμενης ρίγανης *O. vulgare* subsp. *hirtum* με βάση τις αλληλουχίες της περιοχής ITS του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA (nrDNA)

Η ενδομεταγραφόμενη περιοχή (ITS) του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA (nrDNA) μπορεί να χρησιμεύσει ως δείκτης για τη διαφοροποίηση των δειγμάτων ελληνικής ρίγανης καθώς οι παραλλαγές αλληλουχίας που παρουσιάζει βοηθούν στη διάκρισή τους με βάση την περιοχή προέλευσης.

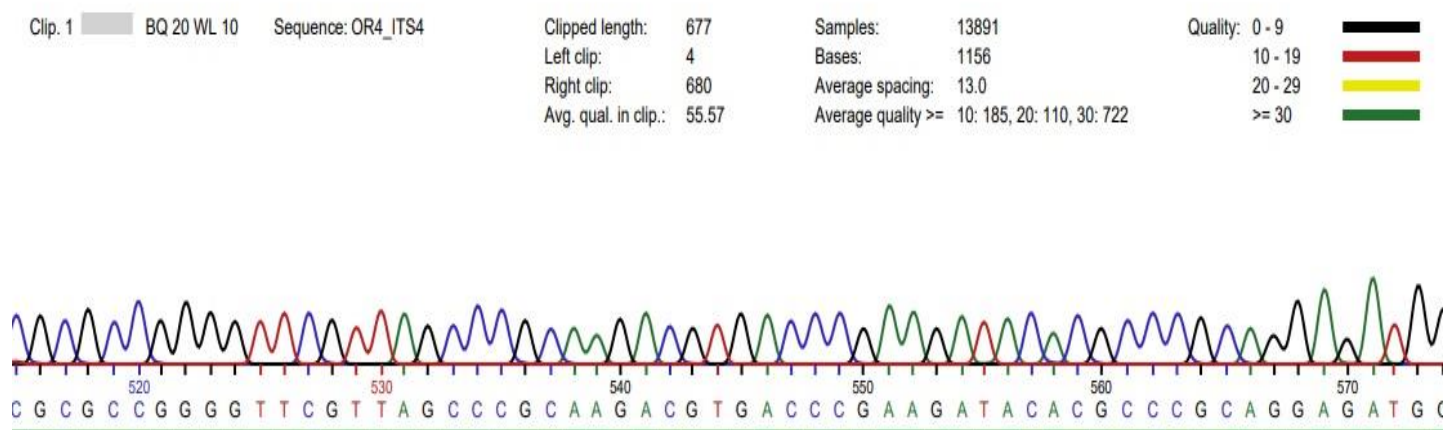
Το γενωμικό DNA που απομονώθηκε από όλα τα δείγματα ρίγανης χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για την ενίσχυση των αλληλουχιών της περιοχής ITS του nrDNA με την τεχνική PCR. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν οι ITS1 και ITS4. Η επιτυχής ενίσχυση της συγκεκριμένης περιοχής ελέγχθηκε μετά από ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR σε πηκτή αгарόζης 1,5% (w/v σε 1xTAE).

Στην **Εικόνα IV-2** παρουσιάζεται η εμφάνιση πηκτής αгарόζης μετά από ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR που αντιστοιχούν στις ενισχυμένες ITS περιοχές του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA των προς εξέταση δειγμάτων ρίγανης. Το μέγεθος των προϊόντων PCR ήταν ~ 700 bp.



Εικόνα IV-2: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% w/v των προϊόντων PCR με εκμαγείο το γενωμικό DNA των δειγμάτων καλλιεργούμενης ρίγανης *O. vulgare* subsp. *hirtum*: OR6 (Δ2), OR8 (Δ3), OR9 (Δ4), OR12 (Δ5), OR16 (Δ6), OR20 (Δ7) και εκκινητές: ITS1 και ITS4. Δ1: 1 Kb DNA Ladder.

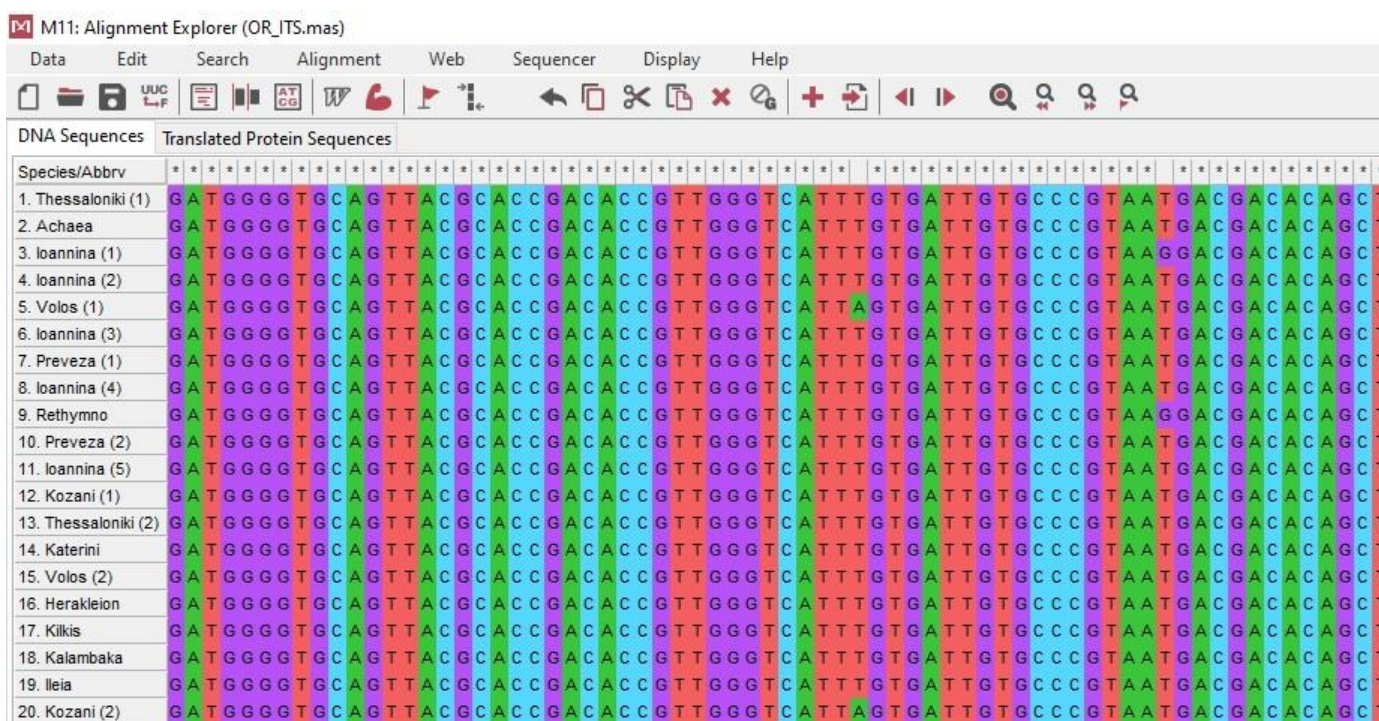
Τα προϊόντα των αντιδράσεων PCR καθαρίστηκαν με τη χρήση του πακέτου υλικών PCR-clean up gel extraction της Macherey- Nagel (βλ. **Κεφ. ΙΙΙ Γ.3.4.**) και στάλθηκαν προς προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας (**Εικόνα IV-3**) σε κατάλληλο εργαστήριο (VBC- Biotech, Austria). Τα αποτελέσματα της ανάγνωσης των νουκλεοτιδιακών αλληλουχιών παρουσιάζονται στο **Παράρτημα ΙΙΙ**.



Εικόνα IV-3: Παράδειγμα επιτυχημένης αλληλούχησης μέρους της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της περιοχής ITS του δείγματος OR4.

Στη συνέχεια οι ITS αλληλουχίες των δειγμάτων καλλιεργούμενης ρίγανης *O. vulgare* subsp. *hirtum* συγκρίθηκαν με κατατεθειμένες αλληλουχίες στη βάση δεδομένων NCBI χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα BLASTN. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και οι 20 αλληλουχίες που μελετήθηκαν παρουσίασαν μεγάλο ποσοστό ομοιότητας (>98%) με αλληλουχίες της GenBank οι οποίες έχουν καταχωρηθεί ως αλληλουχίες του γένους *O. vulgare* L.

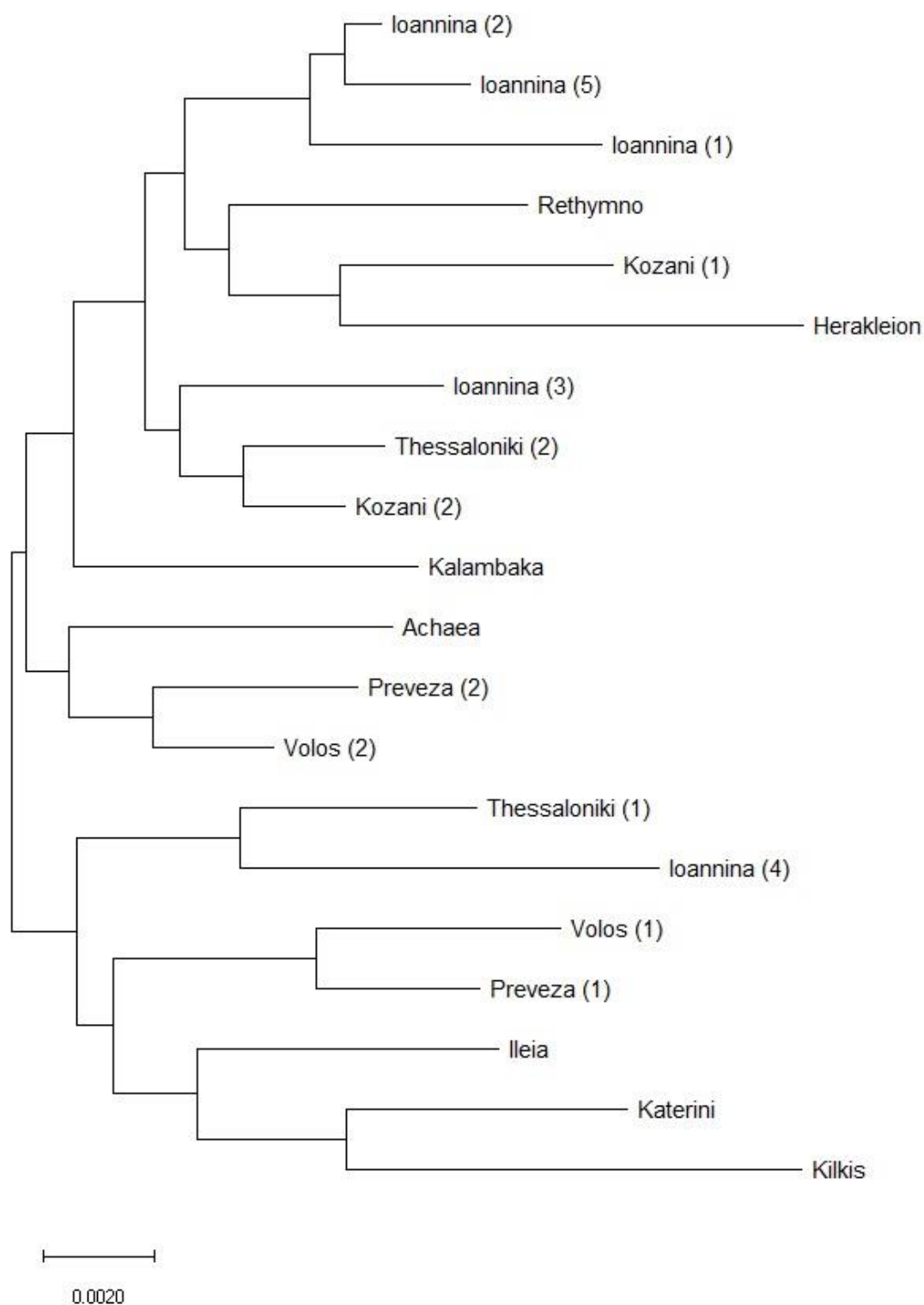
Για να εντοπιστούν οι περιοχές ομοιότητας και διαφοροποίησης των δειγμάτων ρίγανης, οι εν λόγω αλληλουχίες ευθυγραμμίστηκαν με τη χρήση του αλγόριθμου MUSCLE (Edgar, 2004) και τη βοήθεια του προγράμματος MEGA11 (Tamura et al., 2021) (**Εικόνα IV-4**).



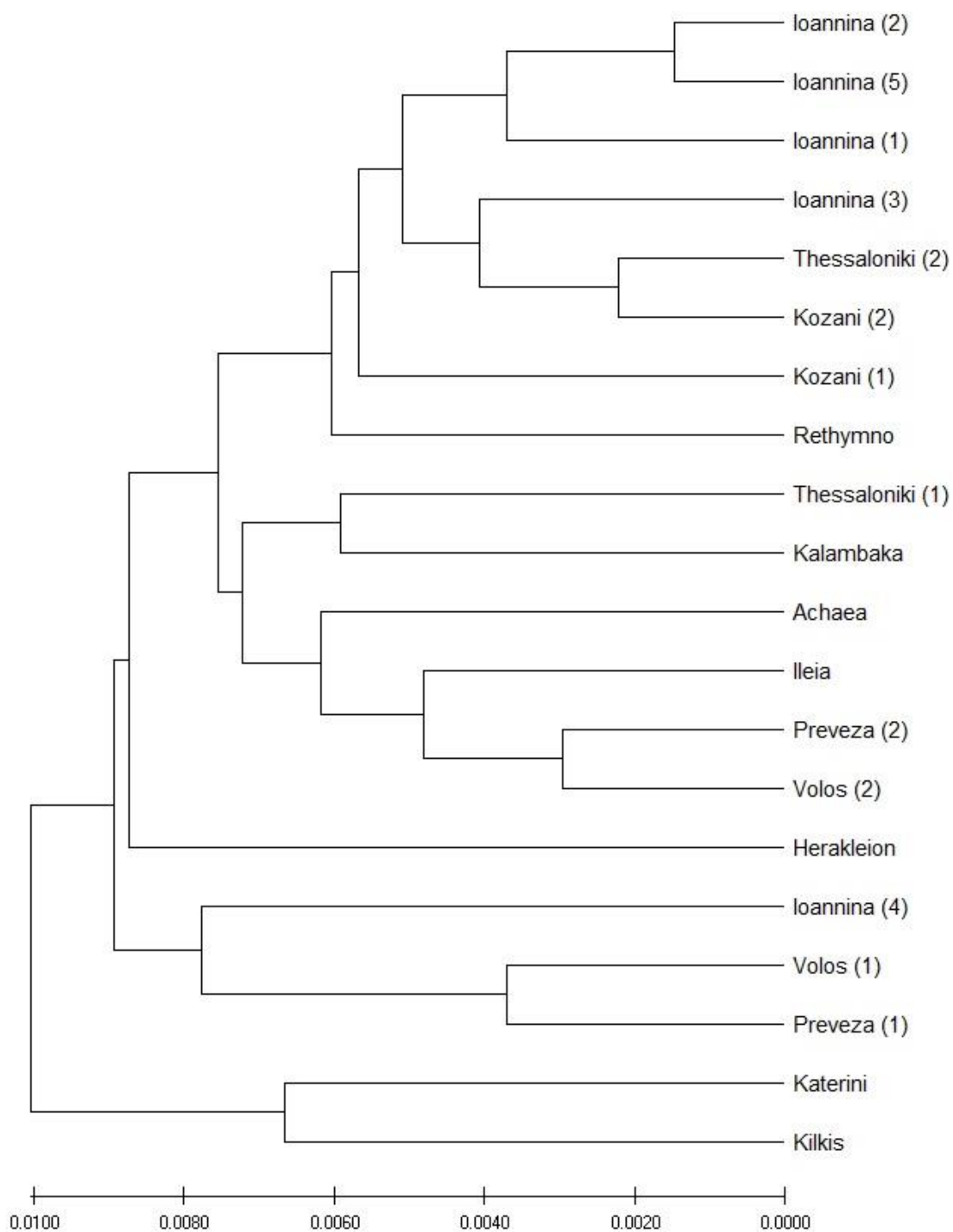
Εικόνα IV-4. Προοδευτική πολλαπλή στοίχιση των αλληλουχιών όλων των δειγμάτων καλλιεργούμενης ρίγανης με τη χρήση του αλγόριθμου MUSCLE του προγράμματος MEGA11. Τελικό μήκος αλληλουχιών: 695 bp (685 bp χωρίς κενά).

Μετά την ευθυγράμμιση των αλληλουχιών, κατασκευάστηκαν τα φυλογενετικά δέντρα με τις μεθόδους Neighbor-Joining (Saitou and Nei, 1987) και UPGMA (Sneath and Sokal, 1973). Η αξιοπιστία και η σταθερότητα των σχέσεων του δενδρογράμματος εκτιμήθηκε μέσω 1000 bootstrap δειγμάτων (Felsenstein, 1985). Στις **Εικόνες IV-5** και **IV-6** απεικονίζονται τα βέλτιστα εξελικτικά δέντρα. Τα μήκη των κλαδιών είναι σχεδιασμένα σε κλίμακα και αντικατοπτρίζουν τις εξελικτικές αποστάσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του

φυλογενετικού δέντρου. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο *p*-distance (Nei and Kumar, 2000) και εκφράζονται σε αριθμούς διαφορετικών βάσεων ανά τοποθεσία. Η συγκεκριμένη ανάλυση περιλάμβανε 20 αλληλουχίες νουκλεοτιδίων και όλες οι θέσεις που περιείχαν κενά και ελλιπή δεδομένα εξαλείφθηκαν (επιλογή πλήρους διαγραφής). Καταγράφηκαν συνολικά 675 θέσεις στο τελικό σύνολο δεδομένων.



Εικόνα IV-5. Φυλογενετικές σχέσεις των δειγμάτων καλλιεργούμενης ρίγανης *O. vulgare* subsp. *hirtum* οι οποίες βασίζονται στις αλληλουχίες της περιοχής ITS του nrDNA. Το φυλογενετικό δένδρο κατασκευάστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο Neighbor –Joining (NJ). Η ράβδος 0.002 αντιπροσωπεύει τη σχετική απόκλιση των αλληλουχιών.



Εικόνα IV-6. Φυλογενετικές σχέσεις των δειγμάτων καλλιεργούμενης ρίγανης *O. vulgare* subsp. *hirtum* οι οποίες βασίζονται στις αλληλουχίες της περιοχής ITS του nrDNA. Το φυλογενετικό δένδρο κατασκευάστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο UPGMA. Η ράβδος 0.01 αντιπροσωπεύει τη σχετική απόκλιση των αλληλουχιών.

Μέθοδος NJ

Στο δενδρόγραμμα της **Εικόνας IV-5** παρατηρείται ο διαχωρισμός των δειγμάτων καλλιεργούμενης ρίγανης *O. vulgare* subsp. *hirtum* σε δύο εμφανείς ομάδες. Στην πρώτη ομάδα εντάσσονται τα δείγματα Ιωάννινα (1), (2), (3) και (5), καθώς και τα δείγματα Βόλος (2), Πρέβεζα (2), Θεσσαλονίκη (2), Κοζάνη (1) και (2), Καλαμπάκα, Ρέθυμνο, Ηράκλειο και Αχαΐα. Στη δεύτερη ομάδα εντάσσονται τα δείγματα Ηλεία, Κατερίνη, Κιλκίς, Θεσσαλονίκη (1), Ιωάννινα (4), Βόλος (1) και Πρέβεζα (1).

Η πρώτη ομάδα διαχωρίζεται κι άλλο, σε δύο αρχικά υποομάδες. Στην πρώτη υποομάδα το δείγμα Αχαΐα διαχωρίζεται από τα δείγματα Πρέβεζα (2) και Βόλος (2), τα οποία ομαδοποιούνται, ενώ στη δεύτερη υποομάδα το δείγμα Καλαμπάκα διαχωρίζεται από όλα τα υπόλοιπα δείγματα, τα οποία διακλαδίζονται περαιτέρω. Στις τελικές διακλαδώσεις, το δείγμα Ιωάννινα (3) διαχωρίζεται από τα δείγματα Θεσσαλονίκη (2) και Κοζάνη (2), τα οποία ομαδοποιούνται, το δείγμα Ρέθυμνο διαχωρίζεται από το Κοζάνη (1) και το Ηράκλειο, τα οποία επίσης ομαδοποιούνται και τέλος το Ιωάννινα (1) διαχωρίζεται από το Ιωάννινα (2) και (5), τα οποία ομαδοποιούνται.

Η δεύτερη ομάδα διαχωρίζεται κι αυτή σε δύο αρχικά υποομάδες. Στην πρώτη υποομάδα τα δείγματα Θεσσαλονίκη (1) και Ιωάννινα (4) διαχωρίζονται και ομαδοποιούνται, ενώ τα υπόλοιπα διαχωρίζονται περαιτέρω, διαμορφώνοντας τις τελικές διακλαδώσεις όπου διαχωρίζονται και ομαδοποιούνται τα δείγματα Βόλος (1) και Πρέβεζα (1), ενώ στον άλλο κλάδο το δείγμα Ηλεία διαχωρίζεται από τα δείγματα Κατερίνη και Κιλκίς, τα οποία επίσης ομαδοποιούνται.

Όπως παρατηρούμε, η φυλογενετική ανάλυση με τη μέθοδο NJ έδειξε ότι υπάρχει υψηλή γενετική παραλλακτικότητα των δειγμάτων σε μοριακό επίπεδο, ακόμα και σε αυτά που προέρχονται από την ίδια περιοχή.

Μέθοδος UPGMA

Στο δενδρόγραμμα της **Εικόνας IV-6** παρατηρείται και πάλι ο διαχωρισμός των δειγμάτων καλλιεργούμενης ρίγανης *O. vulgare* subsp. *hirtum* σε δύο εμφανείς ομάδες. Στην πρώτη ομάδα εντάσσονται μόνο δύο δείγματα, τα Κιλκίς και Κατερίνη, τα οποία και ομαδοποιούνται. Στη δεύτερη ομάδα, τα υπόλοιπα δείγματα διαχωρίζονται αρχικά σε δύο υποομάδες.

Στην πρώτη υποομάδα το δείγμα Ιωάννινα (4) διαχωρίζεται από τα δείγματα Πρέβεζα (1) και Βόλος (1), τα οποία ομαδοποιούνται, ενώ στη δεύτερη υποομάδα το δείγμα Ηράκλειο διαχωρίζεται από όλα τα υπόλοιπα, τα οποία διακλαδίζονται περαιτέρω. Στις επόμενες διακλαδώσεις, τα δείγματα διαχωρίζονται εκ νέου σε δύο υποομάδες. Η πρώτη υποομάδα αποτελείται από τα δείγματα Θεσσαλονίκη (1), Καλαμπάκα, Αχαΐα, Ηλεία, Πρέβεζα (2) και Βόλος (2). Η δεύτερη υποομάδα αποτελείται από τέσσερα δείγματα των Ιωαννίνων (1,2,3 και 5), το δείγμα Θεσσαλονίκη (2), τα δείγματα Κοζάνη (1) και (2) και το Ρέθυμνο. Στην πρώτη υποομάδα αρχικά διαχωρίζονται τα δείγματα Θεσσαλονίκη (1) και Καλαμπάκα, τα οποία ομαδοποιούνται και έπειτα διαχωρίζονται αρχικά το δείγμα Αχαΐα και έπειτα Ηλεία, ενώ το δείγμα Πρέβεζα (2) και Βόλος (2) ομαδοποιούνται. Στη δεύτερη υποομάδα διαχωρίζεται αρχικά το δείγμα Ρέθυμνο, έπειτα το Κοζάνη (1) και τα υπόλοιπα δείγματα διακλαδίζονται και πάλι. Στην πρώτη διακλάδωση διαχωρίζεται το δείγμα Ιωάννινα (1), ενώ τα δείγματα Ιωάννινα (2) και (5) ομαδοποιούνται και στη δεύτερη διακλάδωση το δείγμα Ιωάννινα (3) διαχωρίζεται ενώ τα δείγματα Θεσσαλονίκη (2) και Κοζάνη (2) ομαδοποιούνται.

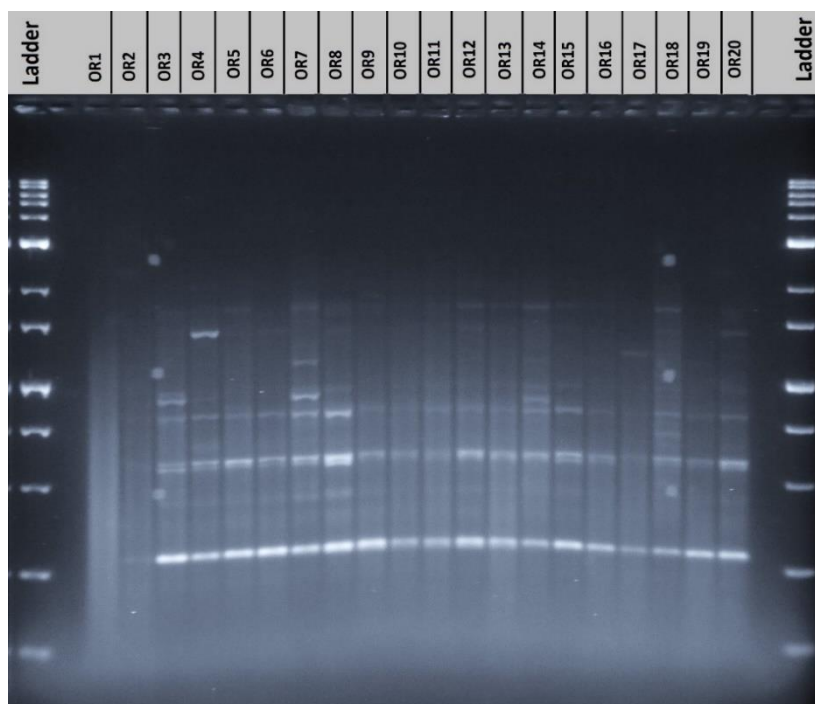
Όπως παρατηρούμε και με τη μέθοδο UPGMA η φυλογενετική ανάλυση έδειξε μεγάλη γενετική ποικιλότητα μεταξύ των δειγμάτων ακόμα και σε αυτά που προέρχονται από την ίδια περιοχή.

Σύμφωνα και με τις δύο μεθόδους, παρατηρείται ο πλήρης διαχωρισμός των δειγμάτων καλλιεργούμενης ρίγανης *O. vulgare* subsp. *hirtum* αν και προκύπτουν κοινά εξελικτικά μονοπάτια. Τα δείγματα που καταγράφηκαν ως τα πιο κοντινά εξελικτικά και με τις δύο μεθόδους ήταν τα Ιωάννινα (2) – Ιωάννινα (5), Θεσσαλονίκη (2) – Κοζάνη (2), Πρέβεζα (1) – Βόλος (1) και Πρέβεζα (2) – Βόλος (2). Ωστόσο, η σχέση αυτή δε φαίνεται να αντανακλάται στις χημικές ιδιότητες των δειγμάτων καθώς δεν παρατηρείται κάποια ομοιότητα στις χημικές ιδιότητές τους (όσον αφορά τα ζεύγη δειγμάτων διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης).

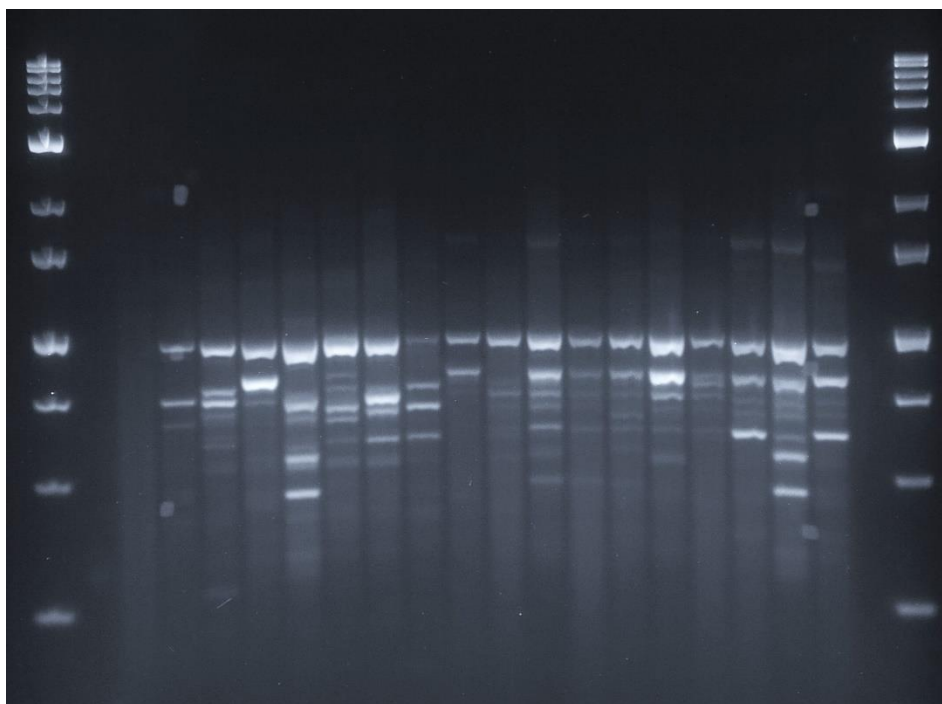
Σημαντικό είναι επίσης το γεγονός ότι η ομαδοποίηση των δειγμάτων δεν έγινε πάντα σύμφωνα με τη γεωγραφική θέση των περιοχών προέλευσης. Για παράδειγμα, το δείγμα Βόλος (1) ομαδοποιήθηκε με το δείγμα Πρέβεζα (1) και όχι με το Βόλος (2). Το ίδιο παρατηρούμε και για τα δείγματα Ιωάννινα (3) και (4), τα οποία διαχωρίστηκαν από τα υπόλοιπα δείγματα από την περιοχή των Ιωαννίνων.

IV.3.3. Φυλογενετική ανάλυση των δειγμάτων καλλιεργούμενης ρίγανης *O. vulgare* subsp. *hirtum* με τη χρήση μοριακών δεικτών RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA, Τυχαίως Πολλαπλασιαζόμενα Πολυμορφικά τμήματα DNA)

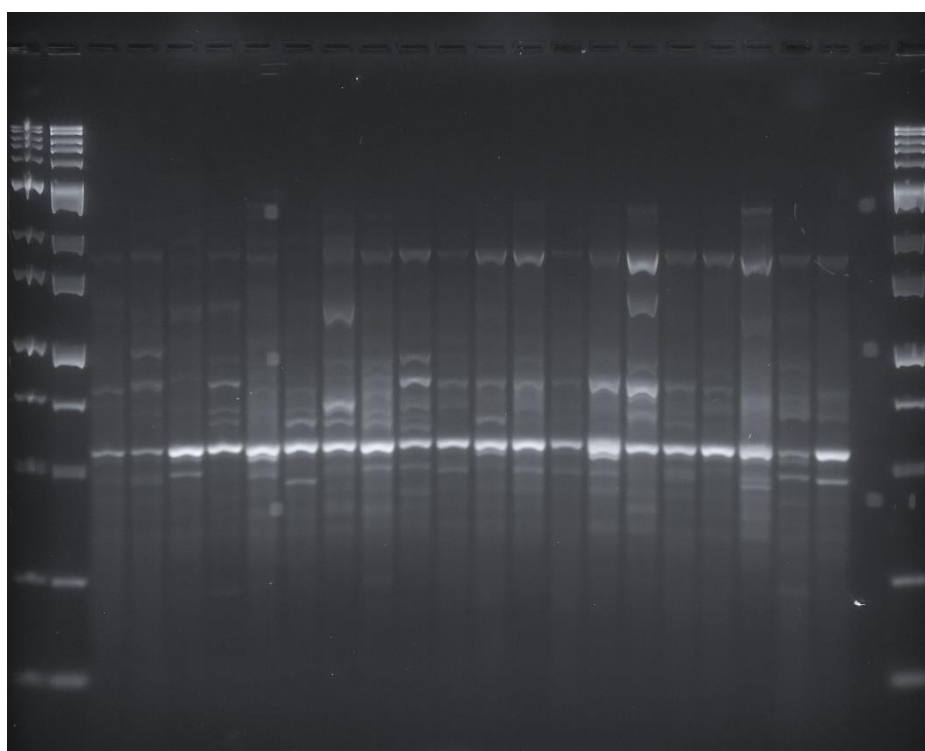
Από τους 15 εκκινητές (Πίνακας Α-2) που δοκιμάστηκαν στην παρούσα διατριβή, ευκρινή αριθμό ζωνών έδωσαν οι 13. Οι εκκινητές που δεν έδωσαν αποτέλεσμα ήταν ο OPB-02 και ο OPA-17. Οι εκκινητές OPA-01, OPB-01 και OPB-03, παρόλο που έδωσαν αποτελέσματα δεν εμφάνισαν ιδιαίτερο πολυμορφισμό, οπότε και δεν συμπεριλήφθηκαν στα τελικά αποτελέσματα.



Εικόνα IV-7. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1.5 % w/v των προϊόντων PCR με εκμαγείο το γενωμικό DNA των 20 δειγμάτων ρίγανης και εκκινητή το OPAH-01



Εικόνα IV-8. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1.5 % w/v των προϊόντων PCR με εκμαγείο το γενωμικό DNA των 20 δειγμάτων ρίγανης και εκκινητή το OPB-08.



Εικόνα IV-9. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1.5 % w/v των προϊόντων PCR με εκμαγείο το γενωμικό DNA των 20 δειγμάτων ρίγανης και εκκινητή το OPAN-20.

Πίνακας IV-16. Οι εκκινητές που έδωσαν προϊόντα PCR, ο αριθμός των ενισχυμένων και πολυμορφικών ζωνών DNA καθώς και το ποσοστό πολυμορφισμού για κάθε εκκινητή.

RAPD εκκινητής	Αριθμός ενισχυμένων ζωνών	Αριθμός πολυμορφικών ζωνών	Ποσοστό πολυμορφισμού (%)
OPA-09	16	8	50%
OPA-15	10	8	80%
OPA-20	4	3	75%
OPAG-02	11	5	45%
OPAH-01	11	7	64%
OPAH-09	7	4	57%
OPB-08	13	10	77%
OPH-18	9	4	44%
OPN-20	13	9	69%
OPR-13	13	8	62%
ΣΥΝΟΛΟ	107	66	62%

Σύμφωνα με τον **Πίνακα IV-16**, ο συνολικός αριθμός των ενισχυμένων ζωνών DNA που έδωσαν οι τυχαίοι εκκινητές ήταν 107, από τις οποίες πολυμορφικές ήταν οι 66. Το συνολικό ποσοστό πολυμορφισμού, επομένως, ανήλθε στο 62%.

Ο OPA-09 έδωσε τις περισσότερες ενισχυμένες ζώνες DNA, 16 στο σύνολο, ενώ οι εκκινητές OPA-20 και OPAH-09 έδωσαν τους μικρότερους αριθμούς ζωνών DNA, 4 και 7 ζώνες αντίστοιχα. Τα μεγαλύτερα ποσοστά πολυμορφισμού παρουσίασαν οι εκκινητές OPA-15 και OPB-06 με ποσοστά 80% και 77% αντίστοιχα, ενώ τα μικρότερα ποσοστά παρουσίασαν οι OPH-18 και OPAG-02 με ποσοστά 44% και 45% αντίστοιχα.

Το πρώτο βήμα στην ανάλυση των δεδομένων ήταν ο υπολογισμός των συντελεστών ομοιότητας του Jaccard για όλα τα δείγματα καλλιεργούμενης ρίγανης *O. vulgare* subsp.

hirtum που εξετάστηκαν και η κατασκευή μιας μήτρας ομοιότητας βασισμένη σε αυτούς τους συντελεστές.

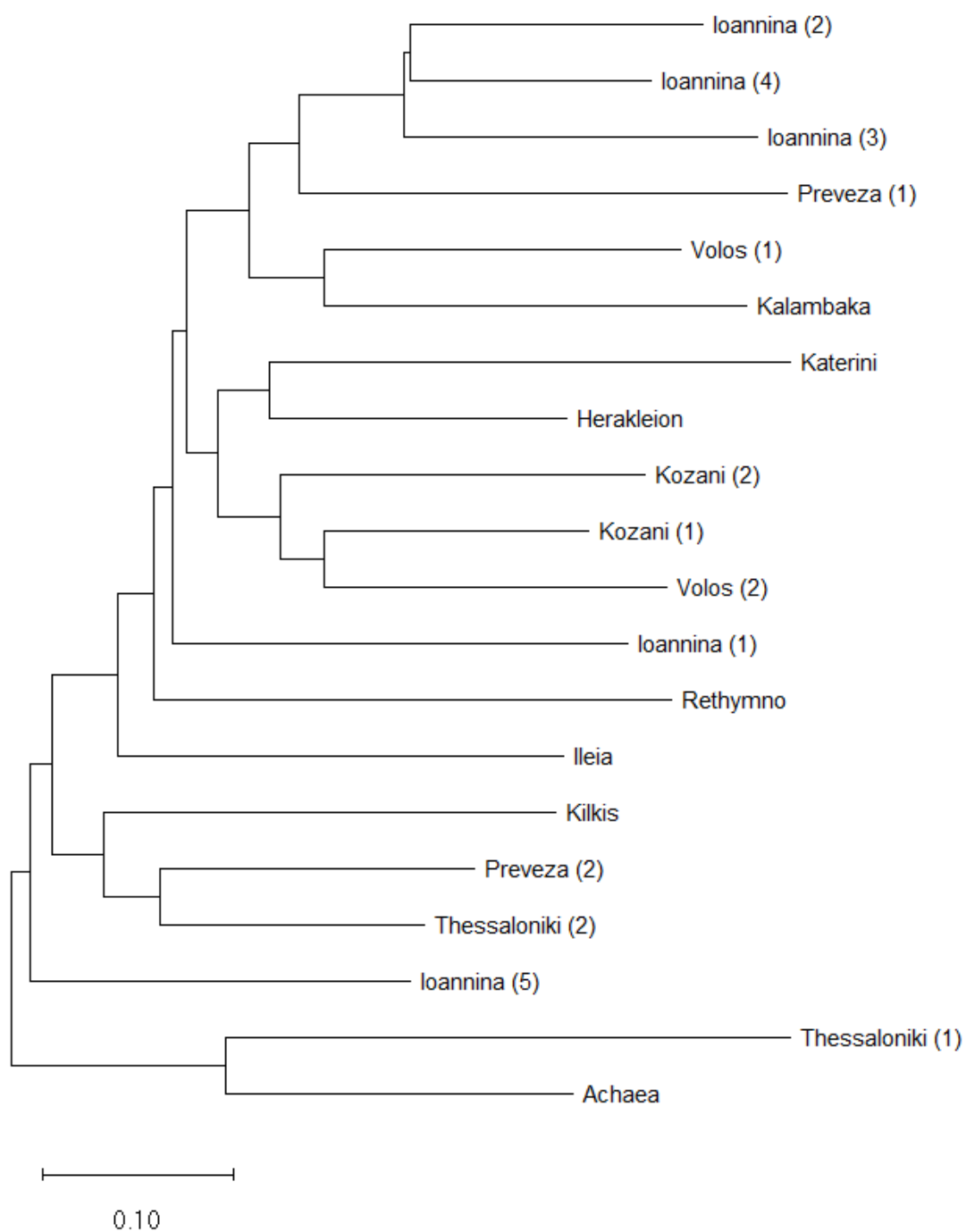
Στον **Πίνακα IV-17** παρουσιάζεται η γενετική συγγένεια μεταξύ των 20 δειγμάτων καλλιεργούμενης ρίγανης *O. vulgare* subsp. *hirtum* με βάση το συντελεστή ομοιότητας του Jaccard. Οι τιμές του συντελεστή ομοιότητας κυμάνθηκαν από 0.159 μέχρι 0.718. Αναλυτικότερα:

- > Η μεγαλύτερη γενετική ομοιότητα σύμφωνα με τις τιμές του συντελεστή Jaccard καταγράφηκε μεταξύ των δειγμάτων: Ιωάννινα (2) – Ιωάννινα (4) (**0.718**), Πρέβεζα (2) – Θεσσαλονίκη (2) (**0.694**), Κοζάνη (1) – Βόλος (2) (**0.679**) και Κοζάνη (1) – Κοζάνη (2) (**0.679**).
- > Οι μικρότερες τιμές του συντελεστή Jaccard, που επισημαίνουν και τη μικρότερη γενετική ομοιότητα, καταγράφηκαν κατά πλειοψηφία στο δείγμα Θεσσαλονίκη (1) και συγκεκριμένα μεταξύ των δειγμάτων: Θεσσαλονίκη (1) – Ιωάννινα (3) (**0.159**), Θεσσαλονίκη (1) – Καλαμπάκα (**0.182**), Θεσσαλονίκη (1) – Ιωάννινα (5) (**0.185**) και Θεσσαλονίκη (1) – Πρέβεζα (1) (**0.190**).

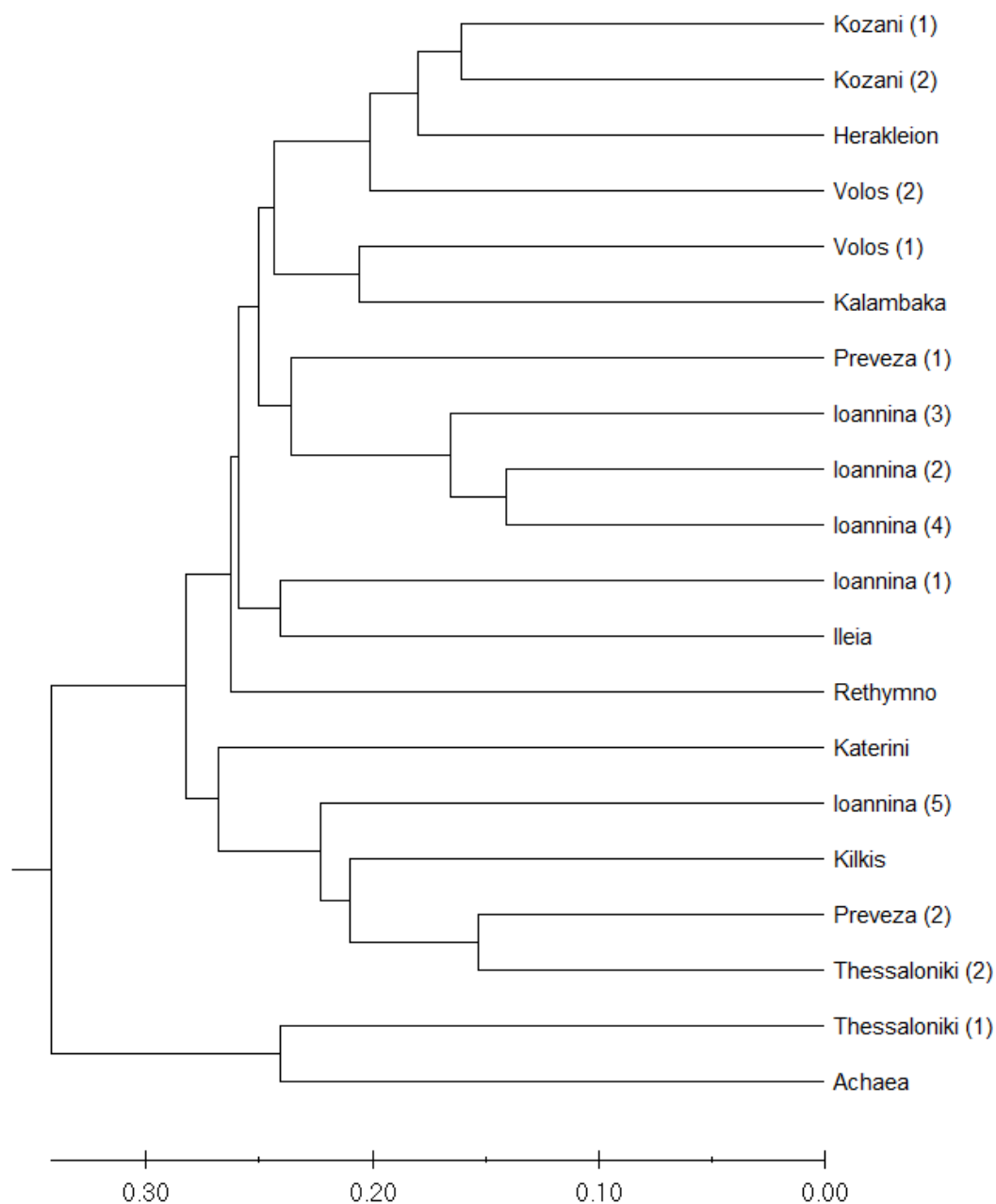
Από τους συντελεστές ομοιότητας του **Πίνακα IV-17** υπολογίστηκαν οι γενετικές αποστάσεις, οι οποίες στη συνέχεια αναλύθηκαν με τις μεθόδους UPGMA και NJ του προγράμματος MEGA11 (Tamura et al., 2021) και προέκυψαν τα φυλογενετικά δένδρογράμματα που ακολουθούν (**Εικόνες IV-10** και **IV-11**). Για τον υπολογισμό των γενετικών αποστάσεων χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής απόστασης Jaccard, ο οποίος προέκυψε από την αφαίρεση της τιμής του συντελεστή ομοιότητας Jaccard από τη μονάδα.

Πίνακας IV-17. Τιμές του συντελεστή ομοιότητας Jaccard για τα δείγματα ρίγανης με βάση την παρουσία ή απουσία ζωνών DNA.

	OR1	OR2	OR3	OR4	OR5	OR6	OR7	OR8	OR9	OR10	OR11	OR12	OR13	OR14	OR15	OR16	OR17	OR18	OR19	OR20
OR1	1,000																			
OR2	0,519	1,000																		
OR3	0,279	0,391	1,000																	
OR4	0,188	0,269	0,478	1,000																
OR5	0,228	0,339	0,525	0,541	1,000															
OR6	0,159	0,281	0,455	0,662	0,521	1,000														
OR7	0,190	0,254	0,441	0,545	0,468	0,506	1,000													
OR8	0,185	0,299	0,507	0,718	0,568	0,676	0,532	1,000												
OR9	0,229	0,388	0,473	0,493	0,426	0,493	0,457	0,544	1,000											
OR10	0,364	0,500	0,447	0,348	0,431	0,323	0,333	0,358	0,440	1,000										
OR11	0,412	0,462	0,511	0,460	0,433	0,419	0,379	0,424	0,471	0,564	1,000									
OR12	0,240	0,365	0,518	0,514	0,563	0,471	0,458	0,565	0,508	0,563	0,444	1,000								
OR13	0,371	0,541	0,479	0,353	0,509	0,328	0,379	0,403	0,415	0,694	0,561	0,625	1,000							
OR14	0,222	0,354	0,463	0,316	0,424	0,329	0,375	0,397	0,339	0,438	0,440	0,509	0,500	1,000						
OR15	0,280	0,352	0,554	0,521	0,522	0,500	0,486	0,571	0,492	0,453	0,429	0,679	0,481	0,419	1,000					
OR16	0,273	0,413	0,549	0,493	0,492	0,448	0,435	0,545	0,537	0,533	0,565	0,654	0,600	0,569	0,544	1,000				
OR17	0,306	0,366	0,373	0,400	0,393	0,333	0,304	0,368	0,396	0,622	0,537	0,510	0,537	0,479	0,411	0,479	1,000			
OR18	0,182	0,279	0,443	0,506	0,589	0,488	0,458	0,512	0,333	0,358	0,343	0,588	0,403	0,464	0,507	0,457	0,388	1,000		
OR19	0,302	0,477	0,519	0,493	0,424	0,448	0,414	0,545	0,482	0,500	0,532	0,458	0,500	0,404	0,517	0,538	0,440	0,397	1,000	
OR20	0,255	0,388	0,446	0,493	0,492	0,449	0,417	0,544	0,458	0,543	0,442	0,679	0,596	0,456	0,569	0,627	0,480	0,479	0,482	1,000



Εικόνα IV-10. Φυλογενετικές σχέσεις των δειγμάτων καλλιεργούμενης ρίγανης *O. vulgare* subsp. *hirtum* οι οποίες βασίζονται στις γενετικές αποστάσεις Jaccard. Το φυλογενετικό δένδρο κατασκευάστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο Neighbor –Joining (NJ). Τα μήκη των κλαδιών είναι σχεδιασμένα σε κλίμακα και αντικατοπτρίζουν τις γενετικές αποστάσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου. Στην ανάλυση συμμετείχαν 20 νουκλεοτιδικές αλληλουχίες.



Εικόνα IV-11. Φυλογενετικές σχέσεις των δειγμάτων καλλιεργούμενης ρίγανης *O. vulgare* subsp. *hirtum* οι οποίες βασίζονται στις γενετικές αποστάσεις Jaccard. Το φυλογενετικό δένδρο κατασκευάστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο UPGMA (Cophenetic value: 0.74). Τα μήκη των κλαδιών είναι σχεδιασμένα σε κλίμακα και αντικατοπτρίζουν τις γενετικές αποστάσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου. Στην ανάλυση συμμετείχαν 20 νουκλεοτιδικές αλληλουχίες.

Μέθοδος NJ

Στο δενδρόγραμμα της **Εικόνας IV-10** παρατηρείται ο διαχωρισμός των δειγμάτων καλλιεργούμενης ρίγανης *O. vulgare* subsp. *hirtum* σε δύο εμφανείς ομάδες. Στην πρώτη ομάδα εντάσσονται μόνο δύο δείγματα, τα Θεσσαλονίκη (1) και Αχαΐα, τα οποία και ομαδοποιούνται. Στη δεύτερη ομάδα, το δείγμα Ιωάννινα (5) διαχωρίζεται αρχικά από τα υπόλοιπα δείγματα και προκύπτουν δύο νέες υποομάδες.

Στην πρώτη υποομάδα το δείγμα Κιλκίς διαχωρίζεται από τα δείγματα Πρέβεζα (2) και Θεσσαλονίκη (2), τα οποία ομαδοποιούνται. Στη δεύτερη υποομάδα διαχωρίζονται σταδιακά από τα υπόλοιπα δείγματα αρχικά το δείγμα Ηλεία, έπειτα το δείγμα Ρέθυμνο και τέλος το Ιωάννινα (1). Τα υπόλοιπα δείγματα διαχωρίζονται εκ νέου σε δύο υποομάδες. Η πρώτη υποομάδα αποτελείται από τα δείγματα Κατερίνη, Ηράκλειο, Κοζάνη (2), Κοζάνη (1) και Βόλος (2). Η δεύτερη υποομάδα αποτελείται από τα τρία δείγματα των Ιωαννίνων (1,2 και 3) και τα δείγματα Πρέβεζα (1), Καλαμπάκα και Βόλος (1). Στην πρώτη υποομάδα αρχικά διαχωρίζονται τα δείγματα Κατερίνη και Ηράκλειο, τα οποία ομαδοποιούνται και έπειτα διαχωρίζεται αρχικά το δείγμα Κοζάνη (2), ενώ τα δείγματα Κοζάνη (1) και Βόλος (2) ομαδοποιούνται. Στη δεύτερη υποομάδα διαχωρίζονται και ομαδοποιούνται τα δείγματα Βόλος (1) και Καλαμπάκα και τα υπόλοιπα διαχωρίζονται και πάλι. Σταδιακά διαχωρίζεται το δείγμα Πρέβεζα (1), έπειτα το Ιωάννινα (3), ενώ τα Ιωάννινα (2) και Ιωάννινα (4) ομαδοποιούνται.

Όπως παρατηρούμε και η φυλογενετική ανάλυση με τη μέθοδο NJ έδειξε μεγάλη γενετική ποικιλότητα μεταξύ των δειγμάτων ακόμα και σε αυτά που προέρχονται από την ίδια περιοχή.

Μέθοδος UPGMA

Το δενδρόγραμμα της **Εικόνας IV-11** παρουσιάζει αρκετές ομοιότητες με αυτό της **Εικόνας IV-10**, με ορισμένες, ωστόσο, διαφοροποιήσεις. Συγκεκριμένα, παρατηρείται και πάλι ο διαχωρισμός των δειγμάτων σε δύο εμφανείς ομάδες. Στην πρώτη ομάδα εντάσσονται δύο δείγματα, τα Θεσσαλονίκη (1) και Αχαΐα, τα οποία και ομαδοποιούνται, ακριβώς όπως στη μέθοδο NJ. Στη δεύτερη ομάδα, προκύπτουν δύο μεγάλες υποομάδες.

Στην πρώτη υποομάδα διαχωρίζονται σταδιακά από τα υπόλοιπα δείγματα αρχικά το δείγμα Πιερία, έπειτα το δείγμα Ιωάννινα (5) και τέλος το δείγμα Κιλκίς, ενώ τα δείγματα Πρέβεζα

(2) και Θεσσαλονίκη (2) ομαδοποιούνται. Στη δεύτερη υποομάδα, τα υπόλοιπα δείγματα διαχωρίζονται εκ νέου σε δύο υποομάδες, αφού πρώτα διαχωρίζεται το δείγμα Ρέθυμνο και ομαδοποιούνται τα δείγματα Ηλεία και Ιωάννινα (1). Η πρώτη υποομάδα αποτελείται από τα δείγματα Καλαμπάκα, Ηράκλειο, Κοζάνη (1) και (2) και Βόλος (1) και (2). Η δεύτερη υποομάδα αποτελείται από τα τρία δείγματα των Ιωαννίνων (2,3 και 4) και το δείγμα Πρέβεζα (1). Στην πρώτη υποομάδα αρχικά διαχωρίζονται τα δείγματα Καλαμπάκα και Μαγνησία (1) και ομαδοποιούνται, ενώ από τα υπόλοιπα διαχωρίζονται αρχικά το δείγμα Μαγνησία (2) και έπειτα το δείγμα Ηράκλειο, ενώ τα δείγματα Κοζάνη (1) και (2) ομαδοποιούνται. Στη δεύτερη υποομάδα διαχωρίζονται σταδιακά το δείγμα Πρέβεζα (1) και έπειτα το Ιωάννινα (3), ενώ τα δείγματα Ιωάννινα(2) και Ιωάννινα (4) ομαδοποιούνται.

Σύμφωνα με τα δενδρογράμματα που προκύπτουν και με τις δύο μεθόδους, παρατηρείται και πάλι πλήρης διαχωρισμός των δειγμάτων. Τα δείγματα που καταγράφηκαν ως τα πιο κοντινά εξελικτικά και με τις δύο μεθόδους ήταν αυτά που καταγράφηκαν και παραπάνω με τον συντελεστή ομοιότητας του Jaccard: Ιωάννινα (2) – Ιωάννινα (4), Πρέβεζα (2) – Θεσσαλονίκη (2) και Καλαμπάκα – Βόλος (1). Ωστόσο, ούτε σε αυτή την περίπτωση παρατηρήθηκε κάποια σημαντική ομοιότητα μεταξύ των χημικών ιδιοτήτων των δειγμάτων προερχόμενα από διαφορετικές περιοχές.

Όπως και κατά τη φυλογενετική ανάλυση των δειγμάτων με βάση τις αλληλουχίες της περιοχής ITS, η ομαδοποίηση των δειγμάτων με τη χρήση μοριακών δεικτών RAPDs δεν πρόκυψε πάντα σύμφωνα με τη γεωγραφική θέση των περιοχών προέλευσης. Για παράδειγμα, το δείγμα Θεσσαλονίκη (1) ομαδοποιήθηκε με το δείγμα Αχαΐα και όχι με το Θεσσαλονίκη (2). Το ίδιο παρατηρούμε και για τα δείγματα Ιωάννινα (1) και (5), τα οποία διαχωρίστηκαν από τα υπόλοιπα των Ιωαννίνων. Ωστόσο, τα δείγματα Ιωάννινα (2) και (4) ομαδοποιήθηκαν και με τις δύο μεθόδους, ενώ τα δείγματα Κοζάνη (1) και (2) ομαδοποιήθηκαν με τη μέθοδο UPGMA.

Αντίστοιχα υψηλή διαφοροποίηση σε επίπεδο DNA κατέγραψαν και οι Φιλοθέου κ.α. (2006) οι οποίοι μελέτησαν την παραλλακτικότητα επιλεγμένων εγχώριων οικοτύπων ρίγανης (τρεις τοπικούς οικότυπους, έναν πληθυσμό του αγροκτήματος ΤΕΙ Θεσσαλονίκης και έναν εμπορικό τύπο ρίγανης), τόσο με βάση τα μορφολογικά γνωρίσματα όσο και σε μοριακό επίπεδο. Στη συγκεκριμένη έρευνα χρησιμοποιήθηκαν μοριακοί δείκτες τύπου RAPD και από τους 30 τυχαίους εκκινητές που δοκιμάστηκαν αρχικά, ανιχνεύσιμο πολυμορφισμό μεταξύ των γενοτύπων εμφάνισαν οι επτά. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της έρευνάς

τους έδειξαν ότι οι δείκτες RAPDs μπορούν να αποτελέσουν μια αποτελεσματική μέθοδο για τη μελέτη και χαρακτηρισμό γενετικού υλικού ρίγανης. Επιπρόσθετα, ο συνδυασμός δεδομένων από μοριακούς δείκτες με φαινοτυπικά γνωρίσματα που έχουν εμπορική σημασία (αιθέριο έλαιο, βάρος φυλλώματος και βλαστού κ.α.) βρέθηκε αποτελεσματικότερος στην εκτίμηση της υπάρχουσας παραλλακτικότητας στη ρίγανη (Φιλοθέου κ.α., 2006).

Σε παρόμοια προσπάθεια διερεύνησης της γενετικής παραλλακτικότητας αυτοφυών, ωστόσο, φυτών ελληνικής ρίγανης (*O. vulgare* subsp. *hirtum*) οι Katsiotis et al. (2009) χρησιμοποίησαν και αυτοί μοριακούς δείκτες RAPDs. Η ανάλυση μοριακής διακύμανσης (AMOVA) των αποτελεσμάτων αποκάλυψε ότι η γενετική παραλλακτικότητα κατανεμήθηκε κυρίως εντός των πληθυσμών, ενώ η γενετική απόσταση μεταξύ πληθυσμών από διαφορετικές γεωγραφικές τοποθεσίες βρέθηκε σημαντική, μαρτυρώντας την αξιοσημείωτη γενετική διαφοροποίηση εντός των αυτοφυών πληθυσμών του υποείδους (Katsiotis et al., 2009).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την παρούσα έρευνα, η οποία αφορούσε τον χαρακτηρισμό και την προσπάθεια διαφοροποίησης φυτών καλλιεργούμενης ρίγανης *O. vulgare* subsp. *hirtum* διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης με τη χρήση ενόργανης ανάλυσης, χημειομετρίας και ανάλυσης DNA, προέκυψαν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

* Η περιεκτικότητα των φυτών καλλιεργούμενης ρίγανης *O. vulgare* subsp. *hirtum* σε αιθέριο έλαιο ήταν αρκετά υψηλή και κυμάνθηκε από ~ 4 μέχρι 7 ml /100 g ξ.φ. Τα δείγματα ρίγανης από την περιοχή της Ηλείας κατέγραψαν τη μεγαλύτερη απόδοση σε αιθέριο έλαιο, ενώ τα δείγματα από την περιοχή της Θεσσαλονίκης τη μικρότερη.

* Η σύσταση των αιθέριων ελαίων διαφοροποιήθηκε αρκετά από δείγμα σε δείγμα, αφού από τις 35 ενώσεις που καταγράφηκαν συνολικά μόνο 15 βρέθηκαν παρούσες σε όλα τα δείγματα.

* Τα συστατικά των αιθέριων ελαίων στο μεγαλύτερο τους μέρος αποτελούνταν από οξυγονωμένα μονοτερπένια (65,67 – 83,98%) και μονοτερπενικούς υδρογονάνθρακες (10,80 – 30,43%), ενώ σε χαμηλότερα ποσοστά ακολούθησαν οι σεσκιτερπενικοί υδρογονάνθρακες (2,44 – 3,97%) , τα οξυγονωμένα σεσκιτερπένια (0,40 – 1,92%) και οι λοιπές ενώσεις (0,10 – 1,29%).

* Στα αιθέρια ελαία των φυτών καλλιεργούμενης ρίγανης το πιο άφθονο συστατικό βρέθηκε να είναι η καρβακρόλη, με εξαίρεση μόνο στα δείγματα αιθέριου ελαίου από την περιοχή της Ηλείας όπου βρέθηκε η θυμόλη. Τα ποσοστά της καρβακρόλης κυμάνθηκαν από 28,74% έως 68,8%, με το υψηλότερο ποσοστό να καταγράφεται στα αιθέρια ελαία των φυτών ρίγανης από την περιοχή της Θεσσαλονίκης και το μικρότερο στα αιθέρια ελαία των φυτών από την περιοχή της Ηλείας. Το δεύτερο πιο άφθονο συστατικό βρέθηκε να είναι η θυμόλη, με ποσοστά από 7,4% έως 35,2%, με το υψηλότερο ποσοστό αυτής να καταγράφεται στα φυτά από την Ηλεία και το μικρότερο στα αιθέρια έλαια των φυτών από το Ηράκλειο.

* Το άθροισμα των ποσοστών των τεσσάρων βασικών συστατικών των αιθέριων ελαίων ρίγανης (καρβακρόλη, θυμόλη, γ-τερπινένιο και π-κυμένιο) κυμάνθηκε από 85,1% έως 89,54%,

με την υψηλότερη τιμή να καταγράφεται στα αιθέρια έλαια φυτών ρίγανης από την περιοχή του Ρεθύμνου και τη χαμηλότερη στα αιθέρια έλαια φυτών από την περιοχή της Κοζάνης.

* Τα αιθέρια έλαια ρίγανης με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε καρβακρόλη ήταν από την περιοχή του Ηρακλείου (10700 ± 1500 mg/L), ενώ αυτά με τη μικρότερη συγκέντρωση, από την περιοχή της Αχαΐας (2680 ± 700 mg/L). Συνολικά, η κατανομή των αιθέριων ελαίων των φυτών ρίγανης ανάλογα με τη συγκέντρωση σε καρβακρόλη, σε φθίνουσα σειρά, κυμάνθηκε ως εξής: Ηράκλειο > Κιλκίς > Πρέβεζα > Πιερία > Ιωάννινα > Κοζάνη > Θεσσαλονίκη > Μαγνησία > Τρίκαλα > Ηλεία > Ρέθυμνο > Αχαΐα.

* Όσον αφορά το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο, οι τιμές TPC των αιθέριων ελαίων των φυτών ρίγανης που μελετήθηκαν δεν διαφοροποιήθηκαν σημαντικά από περιοχή σε περιοχή. Συγκεκριμένα, οι τιμές βρέθηκαν σχετικά υψηλές και κυμάνθηκαν από $74,5 \pm 3,6$ mg GAE/g EO έως $89,0 \pm 4,8$ mg GAE/g EO. Τη χαμηλότερη τιμή TPC κατέγραψαν τα δείγματα αιθέριου ελαίου από την περιοχή του Ηρακλείου, ενώ τη μεγαλύτερη τα δείγματα από την περιοχή της Αχαΐας.

* Παρόμοια, κατά τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των αιθέριων ελαίων των φυτών ρίγανης, οι τιμές βρέθηκαν και σε αυτή την ανάλυση σχετικά υψηλές, αν και σε αυτή την περίπτωση καταγράφηκαν κάποιες σχετικές διακυμάνσεις μεταξύ των τιμών TEAC ανά περιοχή, οι οποίες κυμάνθηκαν μεταξύ $306,8 \pm 5,0$ μ mol TE/g EO (Αχαΐα) και $461,3 \pm 7,3$ μ mol TE/g EO (Ρέθυμνο). Η υψηλότερη τιμή TEAC καταγράφηκε στα δείγματα αιθέριου ελαίου από την περιοχή του Ρεθύμνου και η χαμηλότερη στα δείγματα της Αχαΐας.

* Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων που αποκτήθηκαν από τις χημικές αναλύσεις και συγκεκριμένα ο συνδυασμός της εκατοστιαίας αναλογίας των συστατικών των αιθέριων ελαίων, του ολικού φαινολικού περιεχομένου και της αντιοξειδωτικής δράσης, απέδωσε ικανοποιητικά σωστά ποσοστά ταξινόμησης και για τις δύο ομάδες καλλιέργειας ρίγανης ως προς τη γεωγραφική προέλευση. Συγκεκριμένα, για την Ομάδα Α το ορθό ποσοστό ταξινόμησης άγγιξε το 93,3% με τη μέθοδο ενδοεπικύρωσης, ενώ για την Ομάδα Β το ορθό ποσοστό ταξινόμησης άγγιξε το 82,7%. Από τα υψηλά ποσοστά ορθής ταξινόμησης που βρέθηκαν και στις δύο ομάδες δειγμάτων ρίγανης συμπεραίνουμε ότι η Πολυμεταβλητή Ανάλυση αποτελεί

ένα ισχυρό εργαλείο για τη γεωγραφική διαφοροποίηση των καλλιεργούμενων φυτών ρίγανης *O. vulgare* subsp. *hirtum*.

* Όσον αφορά την ανάλυση Stepwise, αναγνωρίστηκαν 16 μεταβλητές της Ομάδας Α και 14 μεταβλητές της Ομάδας Β με ισχυρή διαχωριστική ικανότητα (markers). Η εκ νέου στατιστική ανάλυση των ομάδων με τη χρήση του συνδυασμού αυτών των μεταβλητών έδειξε ότι υπήρξε βελτίωση των ποσοστών ενδοεπικύρωσης και στις δύο ομάδες, γεγονός που φανερώνει ότι οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν μπορούν να λειτουργήσουν αποτελεσματικά ως markers για τον διαχωρισμό των δειγμάτων ρίγανης με βάση την περιοχή προέλευσης.

* Η φυλογενετική ανάλυση των δειγμάτων ρίγανης με βάση τις αλληλουχίες της περιοχής ITS του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA κατέγραψε μεγάλο ποσοστό ομοιότητας (>98%) των δειγμάτων με καταχωρημένες αλληλουχίες του γένους *O. vulgare* L. Τα δενδρογράμματα που κατασκευάστηκαν με τις μεθόδους UPGMA και NJ έδειξαν ότι υπάρχει πλήρης διαχωρισμός των δειγμάτων ρίγανης ακόμα και αυτών που προέρχονται από την ίδια περιοχή.

* Τέλος, η φυλογενετική ανάλυση των δειγμάτων ρίγανης με τη χρήση μοριακών δεικτών RAPDs έδειξε ότι ο συνολικός αριθμός των ενισχυμένων ζωνών DNA που έδωσαν οι εκκινητές ήταν 107, ενώ οι πολυμορφικές ανήλθαν στις 66 (συνολικό ποσοστό πολυμορφισμού: 62%). Σύμφωνα με τα δενδρογράμματα που προέκυψαν με τις μεθόδους UPGMA και NJ, παρατηρήθηκε και πάλι πλήρης διαχωρισμός των δειγμάτων. Επομένως, οι δείκτες RAPDs αποτελούν μια αποτελεσματική μέθοδο για τη μελέτη και την ταυτοποίηση γενετικού υλικού φυτών καλλιεργούμενης ρίγανης *O. vulgare* subsp. *hirtum*, ακόμα και φυτών προερχόμενων από την ίδια γεωγραφική περιοχή.

* Βάσει των μοριακών αναλύσεων, τα φυτά που εξετάστηκαν παρουσίασαν μεγάλη γενετική ποικιλότητα, υποδεικνύοντας ότι αυτό το χαρακτηριστικό δεν περιορίζεται μόνο στα αυτοφυή φυτά του υποείδους, αλλά αφορά και τα φυτά που καλλιεργούνται.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ - ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ

Τα ευρήματα αυτής της διατριβής πρέπει να εξεταστούν υπό το φως ορισμένων περιορισμών. Παρόλο που τα αποτελέσματα παρέχουν ικανοποιητικά προκαταρκτικά στοιχεία ως προς τη διάκριση των φυτών καλλιεργούμενης ρίγανης *O. vulgare* subsp. *hirtum*, θα πρέπει να καταγραφεί ότι η διαφοροποίησή τους εξετάστηκε μόνο σε σχέση με τη γεωγραφική τους προέλευση. Οποιαδήποτε επίδραση άλλων κλιματικών και φυσιογραφικών παραγόντων της εκάστοτε καλλιέργειας (π.χ. έκθεση, υψόμετρο, έδαφος κ.α.) που ενδέχεται να έπαιξε ρόλο στη διαφοροποίηση των εξεταζόμενων φυτών ρίγανης δεν αποτέλεσε αντικείμενο αυτή της έρευνας και ως εκ τούτου αποδόθηκε στην επίδραση της γεωγραφικής θέσης.

Η περαιτέρω διερεύνηση της διαφοροποίησης των φυτών καλλιεργούμενης ρίγανης *O.vulgare* subsp. *hirtum* με χρήση μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων, καλλιεργειών και μεθόδων ανάλυσης παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Ενδεικτικά, κάποιες προτάσεις για μελλοντική έρευνα περιλαμβάνουν:

- Διεύρυνση της μελέτης με χρήση περισσότερων δειγμάτων και καλλιεργειών.
- Διεύρυνση της μελέτης με χρήση δειγμάτων ρίγανης από συμβατικές καλλιέργειες.
- Διεύρυνση της μελέτης με χρήση περισσότερων αναλυτικών μεθόδων και ενσωμάτωση των αποτελεσμάτων στο στατιστικό μοντέλο.
- Μελέτη της επίδρασης της περιοχής προέλευσης δειγμάτων καλλιεργούμενης ρίγανης στη συγκέντρωση επιλεγμένων φαινολικών ενώσεων.
- Μελέτη της επίδρασης της περιοχής προέλευσης δειγμάτων καλλιεργούμενης ρίγανης στη συγκέντρωση των πτητικών συστατικών με τη χρήση HS-SPME.
- Μελέτη των φυσικών χρωστικών των αιθέριων ελαίων του *O. vulgare* subsp. *hirtum*.

ΔΙΕΘΝΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aćimović, M., Stanković, J., Cvetković, M., Simin, N., Beara, I., Lesjak, M., Popović, V., 2020.** Chemical composition of *Origanum dictamnus* and *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* from Greece, in: GEA (Geo Eco-Eco Agro) International Conference, 28-29 May 2020, Montenegro - Book of Proceedings Article: 244–249.
- Adam, K., Sivropoulou, A., Kokkini, S., Lanaras, T., Arsenakis, M., 1998.** Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticose* essential oils against human pathogenic fungi. *J Agric Food Chem* **46**: 1739–1745.
- Alarcon-Rojo, A.D., Janacua-Vidales, H., Renteria-Monterrubbio, A., 2017.** Oregano essential oil in animal production, in: Hany A. El-Shemy (Ed.), InTechOpen. *Active Ingredients from Aromatic and Medicinal Plants*. **13**(1): 225-229.
- Alekseeva, M., Zagorcheva, T., Atanasov, I., Rusanov, K., 2020.** *Origanum vulgare* L. – A review on genetic diversity, cultivation, biological activities and perspectives for molecular breeding. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* **26**: 1183–1197.
- Aljabeili, H.S., Barakat, H., Abdel-Rahman, H.A., 2018.** Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of thyme essential oil (*Thymus vulgaris*). *Food Nutr Sci* **9**: 433–446.
- Al-Mansori, B., El-Ageeli, W.H., Alsagheer, S.H., Ben-Khayal, F.A.F., 2020.** Antioxidant activity-synergistic effects of thymol and carvacrol. *Al-Mukhtar Journal of Sciences* **35**: 185–194.
- Álvarez, I., Wendel, J.F., 2003.** Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol Phylogenet Evol* **29**: 417–434.
- Arcila-Lozano, C.C., Loarca-Piña, G., Lecona, S., Gonzalez, E., 2004.** Oregano: Properties, composition and biological activity. *Arch Latinoam Nutr* **54**(1):100-111.
- Arif, I.A., Bakir, M.A., Khan, H.A., Al Farhan, A.H., Al Homaidan, A.A., Bahkali, A.H., Al Sadoon, M., Shobrak, M., 2010.** A brief review of molecular techniques to assess plant diversity. *Int J Mol Sci* **11**: 2079–2096.

- Asensio, C.M., Nepote, V., Grosso, N.R., 2012.** Sensory attribute preservation in extra virgin olive oil with addition of oregano essential oil as natural antioxidant. *J Food Sci* **77**(9): 294-301.
- Asensio, C.M., Nepote, V., Grosso, N.R., 2011.** Chemical stability of extra-virgin olive oil added with oregano essential oil. *J Food Sci* **76**(7):445-450.
- Asplund, R.O., 1968.** Monoterpenes: relationship between structure and inhibition of germination. *Phytochemistry* **7**: 1995–1997.
- Aytaç, Z., Gülbandılar, A., Kürkçüoğlu, M., 2022.** Humic acid improves plant yield, antimicrobial activity and essential oil composition of oregano (*O. vulgare* L. subsp. *hirtum* (Link.) Ietswaart). *Agronomy* **12**(9): 2086.
- Bampidis, V., Azimonti, G., Bastos, M. de L., Christensen, H., Kouba, M., Kos Durjava, M., López-Alonso, M., López Puente, S., Marcon, F., Mayo, B., Pechová, A., Petkova, M., Ramos, F., Sanz, Y., Villa, R.E., Woutersen, R., Brantom, P., Chesson, A., Westendorf, J., Gregoret, L., Manini, P., Dusemund, B., (FEEDAP) 2019.** Safety and efficacy of an essential oil from *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietsw. for all animal species. *EFSA Journal* **17**(12): 5909, 14 pp.
- Baricevic, D., Bartol, T., 2000.** The biological/pharmacological activity of the *Salvia* genus, in: V. *Pharmacology* **11**: 143-184.
- Baricevic, D.; Bartol, T., 2002.** The biological/pharmacological activity of the *Origanum* genus., in: Kintzios, S. (Ed.), *Oregano: The Genera Origanum and Lippia*. Taylor and Francis, New Fetter Lane, London, **8**: 176–213.
- Baser, K.H.C., 2008.** Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Curr Pharm Des* **14**: 3106–19.
- Baser, K.H.C., Buchbauer, G., 2010.** Handbook of essential oils: science, technology, and applications. Taylor & Francis Group.
- Bejar, E., 2019.** Adulteration of oregano herb and essential oil. *Bot. Adulterants Prev. Bull.* **10**: 1–10.

- Bejlali, B., 1996.** *Origanum*: what does this mean? The case of Morocco, in: Padulosi, S. (Ed.), *Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano* **14**(IV): 138.
- Beltrán, J.M.G., Espinosa, C., Guardiola, F.A., Esteban, M.Á., 2018.** In vitro effects of *Origanum vulgare* leaf extracts on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes, cytotoxic, bactericidal and antioxidant activities. *Fish Shellfish Immunol* **79**: 1–10.
- Benoutman, A., Erbiai, E.H., Edderdaki, F.Z., Cherif, E.K., Saidi, R., Lamrani, Z., Pintado, M., Pinto, E., Esteves Da Silva, J.C.G., Maouni, A., 2022.** Phytochemical composition, antioxidant and antifungal activity of *Thymus capitatus*, a medicinal plant collected from Northern Morocco. *Antibiotics* **11**(5): 681.
- Bernáth, J., 1996.** Some scientific and practical aspects of production and utilization of oregano in central Europe, in: Padulosi, S. (Ed.), *Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano* **14**(IV): 75-92.
- Betancourt, L., Rodriguez, F., Phandanouvong, V., Ariza-Nieto, C., Hume, M., Nisbet, D., Afanador-Téllez, G., Van Kley, A.M., Nalian, A., 2014.** Effect of *Origanum* chemotypes on broiler intestinal bacteria. *Poult Sci* **93**: 2526–2535.
- Bhavaniramya, S., Vishnupriya, S., Al-Aboody, M.S., Vijayakumar, R., Baskaran, D., 2019.** Role of essential oils in food safety: antimicrobial and antioxidant applications. *Grain & Oil Science and Technology* **2**(2): 49–55.
- Biondi, D., Cianci, P., Geraci, C., Ruberto, G., Piattelli, M., 1993.** Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from Sicilian aromatic plants. *Flavour Fragr J* **8**: 331–337.
- Black, C., Haughey, S.A., Chevallier, O.P., Galvin-King, P., Elliott, C.T., 2016.** A comprehensive strategy to detect the fraudulent adulteration of herbs: The oregano approach. *Food Chem* **210**: 551–557.
- Boroski, M., de Aguiar, A.C., Boeing, J.S., Rotta, E.M., Wibby, C.L., Bonafé, E.G., de Souza, N.E., Visentainer, J.V., 2011.** Enhancement of pasta antioxidant activity with oregano and carrot leaf. *Food Chem* **125**(2): 696–700.

- Boroski, M., Giroux, H.J., Sabik, H., Petit, H. V, Visentainer, J. V, Matumoto-Pintro, P.T., Britten, M., 2012.** Use of oregano extract and oregano essential oil as antioxidants in functional dairy beverage formulations. *LWT - Food Science and Technology* **47**: 167–174.
- Bosabalidis, A., Kokkini, S., 1997.** Intraspecific variation of leaf anatomy in *Origanum vulgare* grown wild in Greece. *Botanical Journal of the Linnean Society* **123**: 353–362.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W., 1980.** Construction of a genetic linkage map in man using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Am J Hum Genet.* **32**:314-331.
- Bouhdid, S., Skali, S.N., Idaomar, M., Zhiri, A., Baudoux, D., Amensour, M., Abrini, J., 2008.** Antibacterial and antioxidant activities of *Origanum compactum* essential oil. *Afr J Biotechnol* **7**(10): 1563–1570.
- Budavari, S. (Ed.), 1989.** The Merck index : an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals.
- Bullerman, L.B., Lieu, F.Y., Seier, S.A., 1977.** Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils, cinnamic aldehyde and eugenol. *J. Food Sci.* **42**:1107-1109.
- Calpouzos, L., 1954.** Botanical aspects of Oregano. *Econ Bot* **8**: 222–233.
- Carlström, A., 1984.** New Species of *Alyssum*, *Consolida*, *Origanum* and *Umbilicus* from the SE Aegean Sea. *Willdenowia* **14**: 15–26.
- Cavero, S., García-Risco, M.R., Marín, F.R., Jaime, L., Santoyo, S., Señoráns, F.J., Reglero, G., Ibañez, E., 2006.** Supercritical fluid extraction of antioxidant compounds from oregano: chemical and functional characterization via LC–MS and in vitro assays. *J Supercrit Fluids* **38**(1): 62–69.
- Chouliara, E., Karatapanis, A., Savvaidis, I.N., Kontominas, M.G., 2007.** Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of fresh chicken breast meat, stored at 4 °C. *Food Microbiol* **24**: 607–617.

- Christaki, S., Moschakis, T., Kyriakoudi, A., Biliaderis, C.G., Mourtzinis, I., 2021.** Recent advances in plant essential oils and extracts: delivery systems and potential uses as preservatives and antioxidants in cheese. *Trends Food Sci Technol* **116**: 264–278.
- Clevenger, J.F., 1928.** Apparatus for the determination of volatile oil. *J Am Pharm Assoc* **17**(4): 345–349.
- Cohen, S.M., Eisenbrand, G., Fukushima, S., Gooderham, N.J., Guengerich, F.P., Hecht, S.S., Rietjens, I.M.C.M., Rosol, T.J., Davidsen, J.M., Harman, C.L., Lu, V., Taylor, S. V., 2021.** FEMA GRAS assessment of natural flavor complexes: *Origanum* oil, *thyme* oil and related phenol derivative-containing flavoring ingredients. *Food and Chemical Toxicology* **155**.
- Conner, D.E., Beuchat, L.R., Worthington, R.E., Hitchcock, H.L., 1984.** Effects of essential oils and oleoresins of plants on ethanol production, respiration and sporulation of yeasts. *Int J Food Microbiol* **1**: 63–74.
- Cox, S.D., Markham, J.L., 2007.** Susceptibility and intrinsic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to selected plant volatile compounds. *J Appl Microbiol* **103**: 930–936.
- Cross, D.E., McDevitt, R.M., Hillman, K., Acamovic, T., 2007.** The effect of herbs and their associated essential oils on performance, dietary digestibility and gut microflora in chickens from 7 to 28 days of age. *Br Poult Sci* **48**: 496–506.
- Daferera, D.J., Ziogas, B.N., Polissiou, M.G., 2003.** The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection* **22**: 39–44.
- Daferera, D.J., Ziogas, B.N., Polissiou, M.G., 2000.** GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *J Agric Food Chem* **48**: 2576–2581.
- Danin, A., 1990.** Two new species of *Origanum* (Labiatae) from Jordan. *Willdenowia* **19**: 401–404.
- Danin, A., Künne, I., 1996.** *Origanum jordanicum* (Labiatae), a new species from Jordan, and notes on the other species of *O.* sect. *Campanulaticalyx*. *Willdenowia* **25**: 601–611.

- D'Antuono, F., Galletti, G., Bocchini, P., 2000.** Variability of essential oil content and composition of *Origanum vulgare* L. populations from a North Mediterranean area (Liguria Region, Northern Italy). *Ann Bot.* **86**(3): 471-478.
- Depicker, A., De Loose, M., Van Bockstaele, E., 1994.** The role of biotechnology in plant breeding. *Acta Hortic* **355**: 195–208.
- Di Pasqua, R., Hoskins, N., Betts, G., Mauriello, G., 2006.** Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. *J Agric Food Chem* **54**: 2745–2749.
- Dimopoulos, P., Raus, T., Bergmeier, E., Constantinidis, T., Iatrou, G., Kokkini, S., Strid, A., Tzanoudakis, D., 2013.** Vascular plants of Greece: an annotated checklist. *Englera* **31**. Serial publication of the Botanic Garden and Botanical Museum Berlin-Dahlem.
- Drabova, L., Alvarez-Rivera, G., Suchanova, M., Schusterova, D., Pulkrabova, J., Tomaniova, M., Kocourek, V., Chevallier, O., Elliott, C., Hajslova, J., 2019.** Food fraud in oregano: pesticide residues as adulteration markers. *Food Chem* **276**: 726-734.
- Ebani, V.V., Mancianti, F., 2020.** Use of essential oils in veterinary medicine to combat bacterial and fungal infections. *Vet Sci* **7**: 1–35.
- Economou, G., Panagopoulos, G., Karamanos, A., Tarantilis, P., Kalivas, D., Kotoulas, V., 2014.** An assessment of the behavior of carvacrol - rich wild Lamiaceae species from the eastern Aegean under cultivation in two different environments. *Ind Crops Prod* **54**: 62–69.
- Economou, G., Panagopoulos, G., Tarantilis, P., Kalivas, D., Kotoulas, V., Travlos, I.S., Polysiou, M., Karamanos, A., 2011.** Variability in essential oil content and composition of *Origanum hirtum* L., *Origanum onites* L., *Coridothymus capitatus* (L.) and *Satureja thymbra* L. populations from the Greek island Ikaria. *Ind Crops Prod* **33**: 236–241.
- Edgar, R.C., 2004.** MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* **5**: 113.
- Eggersdorfer, M., 2000.** Terpenes. in: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, (Ed.).

- Elakovich, S.D., 1988.** Terpenoids as models for new agrochemicals, in: Cutler, H.G. (Ed.), *Biologically Active Natural Products* **380**: 250–261.
- Esen, G., Azaz, A.D., Kurkcuoglu, M., Baser, H., Tinmaz, A., 2007.** Essential oil and antimicrobial activity of wild and cultivated *Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum* (Link) letswaart from the Marmara region, Turkey. *Flavour Fragr J* **22**: 371–376.
- Ettayebi, K., El Yamani, J., Rossi-Hassani, B.D., 2000.** Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* **183**(1): 191–195.
- Evans, J.D., Martin, S.A., 2000.** Effects of thymol on ruminal microorganisms. *Curr Microbiol* **41**: 336–340.
- Exarchou, V., Nenadis, N., Tsimidou, M., Gerothanassis, I.P., Troganis, A., Boskou, D., 2002.** Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek sage, and summer savory. *J Agric Food Chem* **50**: 5294–5299.
- Felsenstein, J., 1985.** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**(4): 783–791.
- Fernandes, R.P.P., Trindade, M.A., Lorenzo, J.M., de Melo, M.P., 2018.** Assessment of the stability of sheep sausages with the addition of different concentrations of *Origanum vulgare* extract during storage. *Meat Sci* **137**: 244–257.
- Fernandes, R.P.P., Trindade, M.A., Tonin, F.G., Pugine, S.M.P., Lima, C.G., Lorenzo, J.M., de Melo, M.P., 2017.** Evaluation of oxidative stability of lamb burger with *Origanum vulgare* extract. *Food Chem* **233**: 101–109.
- Ferri, G., Alù, M., Corradini, B., Beduschi, G., 2009.** Forensic botany: species identification of botanical trace evidence using a multigene barcoding approach. *Int J Legal Med* **123**: 395–401.
- Field, A., 2009.** Discovering statistics using SPSS ISM (London, England), 3rd Edition, Sage Publications Ltd.

- Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G., Scheffer, J.J.C., 2008.** Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour Fragr J* **23**: 213–226.
- Fischer, N.H., 1986.** The function of mono and sesquiterpenes as plant germination and growth regulators., in: Putnam, A.R.; T.C.S. (Ed.), *The Science of Allelopathy*, 203–218.
- Fleisher, A., Fleisher, Z., 1988.** Identification of biblical hyssop and origin of the traditional use of oregano-group herbs in the Mediterranean region. *Econ Bot* **42**: 232–241.
- Fleisher, A., Sneer, N., 1982.** Oregano spices and *Origanum* chemotypes. *J Sci Food Agric* **33**: 441–446.
- Friedman, M., Buick, R., Elliott, C.T., 2006.** Antimicrobial activities of plant compounds against antibiotic-resistant *Micrococcus luteus*. *Int J Antimicrob Agents* **28**: 156–158.
- Gill, A.O., Holley, R.A., 2006.** Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *Int J Food Microbiol* **108**: 1–9.
- Goliaris, A.H., Chatzopoulou, P.S., Katsiotis, S.T., 2003.** Production of new Greek Oregano clones and analysis of their essential oils. *J Herbs Spices Med Plants* **10**: 29–35.
- Gounaris, Y., Skoula, M., Fournaraki, C., Drakakaki, G., Makris, A., 2002.** Comparison of essential oils and genetic relationship of *Origanum x intercedens* to its parental taxa in the island of Crete. *Biochem Syst Ecol* **30**(3): 249-258.
- Govindaraj, M., Vetriventhan, M., Srinivasan, M., 2015.** Importance of genetic diversity assessment in crop plants and its recent advances: an overview of its analytical perspectives. *Genetics Research International* **2015**.
- Gravanis, F.T., Chouliaras, N., Vagelas, I.K., Gougoulas, N., Sabani, P., Wogiatzi, E., 2005.** The effect of oregano (*Origanum vulgare*) as an alternative soil-borne pathogen control agent, on soil organic matter biodegradation and other soil chemical properties, in: *BCPC International Congress Crop Science and Technology* **1**: 105-108.

- Guenther, E., 1947.** The essential oils - Vol 1: History - origin in plants - production - analysis.
- Gutiérrez-Grijalva, E.P., Picos-Salas, M.A., Leyva-López, N., Criollo-Mendoza, M.S., Vazquez-Olivo, G., Basilio Heredia, J., Heredia, J.B., 2018.** Flavonoids and phenolic acids from Oregano: occurrence, biological activity and health benefits. *Plants* **7**(1): 2.
- Hallmann, E., Sabala, P., 2020.** Organic and conventional herbs quality reflected by their antioxidant compounds concentration. *Appl. Sci.* **10**(10): 3468.
- Harborne, J.B., Turner, B.L., 1984.** Plant chemosystematics. *Econ Bot* **39**: 430.
- Hearne, C.M., Ghosh, S., Todd, J.A., 1992.** Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends Genet* **8**: 288–294.
- Holder, M., Lewis, P.O., 2003.** Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. *Nat Rev Genet.* **4**: 275–284.
- Ibrahim, S.K., Traboulsi, A.F., El-Haj, S., 2006.** Effect of essential oils and plant extracts on hatching, migration and mortality of *Meloidogyne incognita*. *Phytopathol Mediterr* **45**: 238–246.
- Ietswaart, J.H., 1980.** A taxonomic revision of the genus *Origanum* (Labiatae), 1st ed. Springer Dordrecht, Amsterdam.
- Iowa University Libraries, 2023.** Oregano – Roots of Medicine. Iowa, University Libraries.
- Jaccard, P., 1912.** The distribution of the flora in the Alpine zone. *New Phytol* **XI**(2): 37–50.
- Jedrzejczyk, I., 2018.** Study on genetic diversity between *Origanum* L. species based on genome size and ISSR markers. *Ind Crops Prod* **126**: 201–207.
- Judis, J., 1963.** Studies on the mechanism of action of phenolic disinfectants II. Patterns of release of radioactivity from *Escherichia coli* labeled by growth on various compounds. *J Pharm Sci* **52**: 126–131.
- Juven, B., Henis, Y., Jacoby, B., 1972.** Studies on the mechanism of the antimicrobial action of oleuropein. *Journal of Applied Bacteriology* **35**: 559–567.

- Karousou, R., Dardioti, A., Kokkini, S., 1998.** *Origanum vulgare* L. in the Balkan Peninsula and Anatolia: distribution and morphological variation. in: Tsekos, I., Moustakas, M. (Eds) *Progress in Botanical Research*, 73–76.
- Karousou, R., Kokkini, S., 2003.** The genus *Origanum* (Labiatae) in Crete: distribution and essential oils. *Boccone* **16**: 717–721.
- Karpouhtsis, I., Pardali, E., Feggou, E., Kokkini, S., Scouras, Z.G., Mavragani-Tsipidou, P., 1998.** Insecticidal and genotoxic activities of oregano essential oils. *J Agric Food Chem* **46**: 1111–1115.
- Katsiotis, A., Nikoloudakis, N., Linos, A., Drossou, A., Constantinidis, T., 2009.** Phylogenetic relationships in *Origanum* spp. based on rDNA sequences and intra-genetic variation of Greek *O. vulgare* subsp. *hirtum* revealed by RAPD. *Sci Hortic* **121**: 103–108.
- Khan, M., Khan, S.T., Khan, N.A., Mahmood, A., Al-Kedhairi, A.A., Alkhathlan, H.Z., 2018.** The composition of the essential oil and aqueous distillate of *Origanum vulgare* L. growing in Saudi Arabia and evaluation of their antibacterial activity. *Arabian Journal of Chemistry* **11**: 1189–1200.
- Khan, M., Khan, S.T., Khan, Mujeeb, Mousa, A.A., Mahmood, A., Alkhathlan, H.Z., 2019.** Chemical diversity in leaf and stem essential oils of *Origanum vulgare* L. and their effects on microbicidal activities. *AMB Express* **9**: 176.
- Khan, S., Baeshen, M., Ramadan, H., Baeshen, N., 2019.** ITS2: An ideal DNA barcode for the arid medicinal plant *Rhazya Stricta*. *Pharmaceut Med* **33**: 53–61.
- Kikuzaki, H., Nakatani, N., 1989.** Structure of a new antioxidative phenolic acid from oregano (*Origanum vulgare* L.). *Agric. Biol. Chem.* **53**(2): 519-524.
- Kintzios, S.E., 2002.** Oregano: The genera *Origanum* and *Lippia*. Taylor & Francis, New Fetter Lane, London.

- Knowles, J.R., Roller, S., Murray, D.B., Naidu, A.S., 2005.** Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual-species biofilm development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Appl Environ Microbiol* **71**: 797–803.
- Kokkini, S., 1996.** Taxonomy, diversity and distribution of *Origanum* species in: Padulosi, S. (Ed.), *Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano* **14**(IV): 2-12.
- Kokkini, S., Karagiannakidou, V., Hanlidou, E., Vokou, D., 1988.** Geographical and altitudinal distribution of the Lamiaceae in Greece. *Phyton (Austria)* **28**(2): 215-228.
- Kokkini, S., Karousou, R., Dardioti, A., Krigas, N., Lanaras, T., 1997.** Autumn essential oils of Greek oregano. *Phytochemistry* **44**: 883–886.
- Kokkini, S., Karousou, R., Hanlidou, E., 2003.** Herbs: Herbs of the Labiatae. In: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 3082-3090.
- Kokkini, S., Karousou, R., Hanlidou, E., Lanaras, T., 2004.** Essential oil composition of Greek (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) and Turkish (*O. onites*) oregano: a tool for their distinction. *Journal of Essential Oil Research* **16**: 334–338.
- Kokkini, S., Karousou, R., Vokou, D., 1994.** Pattern of geographic variations of *Origanum vulgare* trichomes and essential oil content in Greece. *Biochem Syst Ecol* **22**: 517–528.
- Kokkini, S., Vokou, D., 1993.** The hybrid *Origanum*×*intercedens* from the island of Nisyros (SE Greece) and its parental taxa; comparative study of essential oils and distribution. *Biochem Syst Ecol* **21**: 397–403.
- Kokkini, S., Vokou, D., 1989.** Carvacrol-rich plants in Greece. *Flavour Fragr J* **4**: 1–7.
- Kokkini, S., Vokou, D., Karousou, R., 1991.** Morphological and chemical variation of *Origanum vulgare* L. in Greece. *Botanica Chronica* **10**: 337–346.
- Kosakowska, O., Węglarz, Z., Bączek, K., 2019.** Yield and quality of ‘Greek oregano’ (*Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum*) herb from organic production system in temperate climate. *Ind Crops Prod* **141**: 111782.

- Kosakowska, O., Węglarz, Z., Pióro-Jabrucka, E., Przybył, J.L., Kraśniewska, K., Gniewosz, M., Bączek, K., 2021.** Antioxidant and antibacterial activity of essential oils and hydroethanolic extracts of Greek oregano (*O. vulgare* L. subsp. *hirtum* (link) Ietswaart) and common oregano (*O. vulgare* L. subsp. *vulgare*). *Molecules* **26**(4): 988.
- Kosma, I., Badeka, A., Vatavali, K., Kontakos, S., Kontominas, M., 2016.** Differentiation of Greek extra virgin olive oils according to cultivar based on volatile compound analysis and fatty acid composition. *European Journal of Lipid Science and Technology* **118**: 849–861.
- Koukoulitsa, C., Zika, C., Geromichalos, G.D., Demopoulos, V.J., Skaltsa, H., 2006.** Evaluation of aldose reductase inhibition and docking studies of some secondary metabolites, isolated from *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*. *Bioorg Med Chem* **14**: 1653–1659.
- Krause, S.T., Liao, P., Crocoll, C., Boachon, B., Förster, C., Leidecker, F., Wiese, N., Zhao, D., Wood, J.C., Buell, C.R., Gershenzon, J., Dudareva, N., Degenhardt, J., 2021.** The biosynthesis of thymol, carvacrol, and thymohydroquinone in Lamiaceae proceeds via cytochrome P450s and a short-chain dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci* **118**(52).
- Król, B., Sęczyk, Ł., Kołodziej, B., Paszko, T., 2020.** Biomass production, active substance content, and bioaccessibility of Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart) following the application of nitrogen. *Ind Crops Prod* **148**.
- Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V., Milos, M., 2004.** Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chem* **85**(4): 633–640.
- Lagouri, V., Blekas, G., Tsimidou, M., Kokkini, S., Boskou, D., 1993.** Composition and antioxidant activity of essential oils from oregano plants grown wild in Greece. *Z Lebensm Unters Forsch* **197**(1): 20–23.
- Lawrence, B.M., 1984.** The botanical and chemical aspects of oregano. *Perfumer and Flavorist* **9**: 41-51.
- Lee, S.Y., Jin, H.H., 2008.** Inhibitory activity of natural antimicrobial compounds alone or in combination with nisin against *Enterobacter sakazakii*. *Lett Appl Microbiol* **47**: 315–321.

- Li, D.Z., Gao, L.M., Li, H.T., Wang, H., Ge, X.J., Liu, J.Q., Chen, Z.D., Zhou, S.L., Chen, S.L., Yang, J.B., Fu, C.X., Zeng, C.X., Yan, H.F., Zhu, Y.J., Sun, Y.S., Chen, S.Y., Zhao, L., Wang, K., Yang, T., Duan, G.W., 2011.** Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *Proc Natl Acad Sci* **108**(49): 19641–19646.
- Lu, M., Dai, T., Murray, C.K., Wu, M.X., 2018.** Bactericidal property of oregano oil against multidrug-resistant clinical isolates. *Front Microbiol* **9**: 2329.
- Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, 2022.** PCR clean-up and Gel extraction (Rev.07) NucleoSpin®.
- Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, 2019.** Genomic DNA from plant Protocol at a glance (Rev. 11) NucleoSpin® Plant II.
- Maniki, E., Kostoglou, D., Paterakis, N., Nikolaou, A., Kourkoutas, Y., Papachristoforou, A., Giaouris, E., 2023.** Chemical composition, antioxidant, and antibiofilm properties of essential oil from *Thymus capitatus* plants organically cultured on the Greek island of Lemnos. *Molecules* **28**(3): 1154.
- Manohar, V., Ingram, C., Gray, J., Talpur, N.A., Echard, B.W., Bagchi, D., Preuss, H.G., 2001.** Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. *Mol Cell Biochem* **228**: 111–117.
- Maquet, A., Lievens A., V. Paracchini V., Kaklamanos G., B. de la Calle, Garland L., Papoci S., Pietretti D., Zdiniakova T., Breidbach A., Omar Onaindia J., Boix Sanfeliu A., Dimitrova T., Ulberth F., 2021.** Results of an EU wide Coordinated Control Plan to establish the prevalence of fraudulent practices in the marketing of herbs and spices, *Publications Office of the European Union*, Luxembourg.
- Margaris, N.S., 1981.** Adaptive strategies in plants dominating Mediterranean-type ecosystems. in: *Ecosystems of the World, 11: Mediterranean type shrublands*, 309-316.
- Mathlouthi, N., Bouzaïenne, T., Oueslati, I., Recoquillay, F., Hamdi, M., Urdaci, M., Bergaoui, R., 2012.** Use of rosemary, oregano, and a commercial blend of essential oils in broiler chickens: In vitro antimicrobial activities and effects on growth performance. *J Anim Sci* **90**: 813–823.

- Michiu, D., Socaciu, M.-I., Fogarasi, M., Jimborean, A.M., Ranga, F., Mure, sanMure, san, V., Semeniuc, C.A., 2022.** Implementation of an analytical method for spectrophotometric evaluation of total phenolic content in essential oils. *Molecules* **27**(4), 1345.
- Milos, M., Makota, D., 2012.** Investigation of antioxidant synergisms and antagonisms among thymol, carvacrol, thymoquinone and *p*-cymene in a model system using the Briggs–Rauscher oscillating reaction. *Food Chem* **131**: 296–299.
- Milos, M., Mastelic, J., Jerkovic, I., 2000.** Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*). *Food Chem* **71**: 79–83.
- Moore-Neibel, K., Gerber, C., Patel, J., Friedman, M., Jaroni, D., Ravishankar, S., 2013.** Antimicrobial activity of oregano oil against antibiotic-resistant *Salmonella enterica* on organic leafy greens at varying exposure times and storage temperatures. *Food Microbiol* **34**: 123–129.
- Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Manuel Domínguez, J., Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, M.J., Carlos Parajó, J., 2001.** Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem* **72**:145-171.
- Muller, C.H., Muller, W.H., Haines, B.L., 1964.** Volatile growth inhibitors produced by aromatic shrubs. *Science* **143**: 471–473.
- Muller, W.H., 1986.** Allelochemical mechanisms in the inhibition of herbs by chaparral shrubs. in A. R. Putnam and C. S. Tang (Eds.). *The Science of Allelopathy*, 189–199.
- Nakas, A., Giannarelli, G., Fotopoulos, I., Chainoglou, E., Peperidou, A., Kontogiannopoulos, K.N., Tsiaprazi-Stamou, A., Varsamis, V., Gika, H., Hadjipavlou-Litina, D., Assimopoulou, A.N., 2023.** Optimizing the distillation of Greek oregano -Do process parameters affect bioactive aroma constituents and in vitro antioxidant activity? *Molecules* **28**(3): 971.
- Namiki, M., 1990.** Antioxidants/antimutagens in food. *Crit Rev Food Sci Nutr* **29**(4): 273–300.
- Nei, M., Kumar, S., 2000.** Molecular evolution and phylogenetics. *Oxford University Press*.

- Netopilova, M., Houdkova, M., Rondevaldova, J., Kmet, V., Kokoska, L., 2018.** Evaluation of in vitro growth-inhibitory effect of carvacrol and thymol combination against *Staphylococcus aureus* in liquid and vapour phase using new broth volatilization chequerboard method. *Fitoterapia* **129**: 185–190.
- Nostro, A., Marino, A., Blanco, A.R., Cellini, L., Di Giulio, M., Pizzimenti, F., Roccaro, A.S., Bisignano, G., 2009.** In vitro activity of carvacrol against staphylococcal preformed biofilm by liquid and vapour contact. *J Med Microbiol* **58**: 791–797.
- Nybom, H., Weising, K., Rotter, B., 2014.** DNA fingerprinting in botany: past, present, future. *Investig Genet* **5**: 1–35.
- Oka, Y., Nacar, S., Putievsky, E., Ravid, U., Yaniv, Z., Spiegel, Y., 2000.** Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. *Phytopathology* **90**: 710–715.
- Olmedo, R.H., Asensio, C.M., Grosso, N.R., 2015.** Thermal stability and antioxidant activity of essential oils from aromatic plants farmed in Argentina. *Ind Crops Prod* **69**: 21–28.
- Özer, Z., Çarıkçı, S., Yılmaz, H., Kılıç, T., Dirmenci, T., Gören, A.C., 2020.** Determination of secondary metabolites of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* and *O. vulgare* subsp. *vulgare* by LC-MS/MS. *Journal of Chemical Metrology* **14**: 25–34.
- Pardavella, I., Daferera, D., Tselios, T., Skiada, P., Giannakou, I., 2020.** The use of essential oil and hydrosol extracted from *Cuminum cyminum* seeds for the control of *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne javanica*. *Plants* **10**: 1–14.
- Pasias, I.N., Ntakoulas, D.D., Raptopoulou, K., Gardeli, C., Proestos, C., 2021.** Chemical composition of essential oils of aromatic and medicinal herbs cultivated in Greece—benefits and drawbacks. *Foods* **10**(10): 2354.
- Patterson, H.D., Weatherup, S.T.C., 1984.** Statistical criteria for distinctness between varieties of herbage crops. *J Agric Sci* **102**: 59–68.

- Payum, T., Das, A.K., Shankar, R., Tamuly, C., Hazarika, M., 2015.** Antioxidant potential of *Solanum Spirale* shoot and berry : a medicinal food plant used in Arunachal Pradesh. *American Journal of Pharmtech Research* 5: 307–314.
- Pearson, D.A., Frankel, E.N., Aeschbach, R., German, J.B., 1997.** Inhibition of endothelial cell-mediated oxidation of low-density lipoprotein by rosemary and plant phenolics. *J Agric Food Chem* 45: 578–582.
- Peñalvo, G.C., Robledo, V.R., Callado, C.S.C., Santander-Ortega, M.J., Castro-Vázquez, L., Victoria Lozano, M., Arroyo-Jiménez, M.M., 2016.** Improving green enrichment of virgin olive oil by oregano. Effects on antioxidants. *Food Chem* 197: 509–515.
- Pérez-Conesa, D., Cao, J., Chen, L., McLandsborough, L., Weiss, J., 2011.** Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 biofilms by micelle-encapsulated eugenol and carvacrol. *J Food Prot* 74: 55–62.
- Pérez-Conesa, D., McLandsborough, L., Weiss, J., 2006.** Inhibition and inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 colony biofilms by micellar-encapsulated eugenol and carvacrol. *J Food Prot* 69: 2947–2954.
- Plati, F., Papi, R., Paraskevopoulou, A., 2021.** Characterization of oregano essential oil (*Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum*) particles produced by the novel nano spray drying technique. *Foods* 10(12): 2923.
- Pokorný, J., 1991.** Natural antioxidants for food use. *Trends Food Sci Technol* 2: 223–227.
- Poulose, A.J., Croteau, R., 1978.** Biosynthesis of aromatic monoterpenes: conversion of γ -terpinene to *p*-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L. *Arch Biochem Biophys* 187: 307–314.
- Preuss, H.G., Echard, B., Dadgar, A., Talpur, N., Manohar, V., Enig, M., Bagchi, D., Ingram, C., 2005.** Effects of essential oils and monolaurin on *Staphylococcus aureus*: in vitro and in vivo studies. *Toxicol Mech Methods* 15: 279–285.

- Proestos, C., Boziaris, I.S., Nychas, G.J.E., Komaitis, M., 2006.** Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chem* **95**: 664–671.
- Putievsky, E., Ravid, U., Dudai, N., 1988.** Phenological and seasonal influences on essential oil of a cultivated clone of *Origanum vulgare* L. *J Sci Food Agric* **43**: 225–228.
- Rao, S.R., Trivedi, S., Emmanuel, D., Merita, K., Hynniewta, M., 2010.** DNA repetitive sequences-types, distribution and function: A review. a review. *J Cell Mol Biol.* **7**(2) & **8**(1): 1–11.
- Rattanachaikunsopon, P., Phumkhachorn, P., 2010.** Assessment of factors influencing antimicrobial activity of carvacrol and cymene against *Vibrio cholerae* in food. *J Biosci Bioeng* **110**: 614–619.
- Ravishankar, S., Zhu, L., Law, B., Joens, L., Friedman, M., 2008.** Plant-derived compounds inactivate antibiotic-resistant *Campylobacter jejuni* strains. *J Food Prot* **71**: 1145–1149.
- Ravishankar, S., Zhu, L., Reyna-Granados, J., Law, B., Joens, L., Friedman, M., 2010.** Carvacrol and cinnamaldehyde inactivate antibiotic-resistant *Salmonella enterica* in buffer and on celery and oysters. *J Food Prot* **73**: 234–240.
- Reinhard, E., 1972.** Die pharmakognostisch-chemische analyse. Untersuchungen und Wertbestimmung von Drogen und galenischen Präparaten. *Akadem. Verlagsgesellschaft - Arch Pharm* **305**(9): 714–715.
- Rivas, L., McDonnell, M.J., Burgess, C.M., O'Brien, M., Navarro-Villa, A., Fanning, S., Duffy, G., 2010.** Inhibition of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in model broth and rumen systems by carvacrol and thymol. *Int J Food Microbiol* **139**: 70–78.
- Rodriguez-Garcia, I., Silva-Espinoza, B.A., Ortega-Ramirez, L.A., Leyva, J.M., Siddiqui, M.W., Cruz-Valenzuela, M.R., Gonzalez-Aguilar, G.A., Ayala-Zavala, J.F., 2016.** Oregano essential oil as an antimicrobial and antioxidant additive in food products. *Crit Rev Food Sci Nutr* **56**: 1717–1727.

- Rúa, J., Del Valle, P., De Arriaga, D., Fernández-Álvarez, L., García-Armesto, M.R., 2019.** Combination of carvacrol and thymol: antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and antioxidant activity. *Foodborne Pathog Dis* **16**: 622–629.
- Russo, M., Galletti, G.C., Bocchini, P., Carnacini, A., 1998.** Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart): a preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. 1. Inflorescences. *J Agric Food Chem* **46**: 3741–3746.
- Sahare, P., 2013.** EcoRV digestion patterns in ITS region of medicinal plants. *Int J Sci Eng Res* **4**.
- Saitou, N., Nei, M., 1987.** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406–425.
- Saldaña-Mendoza, S.A., Chávez-González, M.L., Ramírez-Guzmán, N., Pacios-Michelena, S., Aguilar, C.N., 2022.** Technological trends in the extraction of essential oils. *Environmental Quality Management* **32**: 441–450.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001.** Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sarikurkcü, C., Zengin, G., Oskay, M., Uysal, S., Ceylan, R., Aktumsek, A., 2015.** Composition, antioxidant, antimicrobial and enzyme inhibition activities of two *Origanum vulgare* subspecies (subsp. *vulgare* and subsp. *hirtum*) essential oils. *Ind Crops Prod* **70**: 178–184.
- Sarrou, E., Tsivelika, N., Chatzopoulou, P., Tsakalidis, G., Menexes, G., Mavromatis, A., 2017.** Conventional breeding of Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) and development of improved cultivars for yield potential and essential oil quality. *Euphytica* **213**: 1–16.
- Scocco, P., Forte, C., Franciosini, M.P., Mercati, F., Casagrande-Proietti, P., Dall’Aglio, C., Acuti, G., Tardella, F.M., Trabalza-Marinucci, M., 2017.** Gut complex carbohydrates and intestinal microflora in broiler chickens fed with oregano (*Origanum vulgare* L.) aqueous extract and vitamin E. *J Anim Physiol Anim Nutr* **101**: 676–684.

- Semeniuc, C.A., Socaciu, M.I., Socaci, S.A., Muresan, V., Fogarasi, M., Rotar, A.M., 2018.** Chemometric comparison and classification of some essential oils extracted from plants belonging to Apiaceae and Lamiaceae families based on their chemical composition and biological activities. *Molecules* **23**(9): 2261.
- Semiz, G., Semiz, A., Mercan-Doğan, N., 2018.** Essential oil composition, total phenolic content, antioxidant and antibiofilm activities of four *Origanum* species from southeastern Turkey. *Int J Food Prop* **21**: 194–204.
- Shapiro, S., Guggenheim, B., 1995.** The action of thymol on oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol* **10**: 241–246.
- Simirgiotis, M.J., Burton, D., Parra, F., López, J., Muñoz, P., Escobar, H., Parra, C., 2020.** Antioxidant and antibacterial capacities of *Origanum vulgare* L. essential oil from the arid Andean region of Chile and its chemical characterization by GC-MS. *Metabolites* **10**(10): 414.
- Singletary, K., 2010.** Oregano: overview of the literature on health benefits. *Nutr Today* **45**(3): 129–138.
- Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S., Lanaras, T., Arsenakis, M., 1996.** Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. *J Agric Food Chem* **44**: 1202–1205.
- Skoula, M., Gotsiou, P., Naxakis, G., Johnson, C.B., 1999.** A chemosystematic investigation on the mono- and sesquiterpenoids in the genus *Origanum* (Labiatae). *Phytochemistry* **52**: 649–657.
- Skoula, M., Harborne, J., 2002.** The taxonomy and chemistry of *Origanum*, in: Kintzios, S.E. (Ed.), *Oregano: The Genera Origanum and Lippia*. Taylor & Francis, New Fetter Lane, London, 67–108.
- Smith, J.S.C., Smith, O.S., 1992.** Fingerprinting crop varieties. *Advances in Agronomy* **47**: 85–140.
- Sneath, P.H.A., Sokal, R.R., 1973.** Numerical Taxonomy: The principles and practice of numerical classification. WF Freeman & Co., San Francisco.

- Soltis, D.E., Soltis, P.S., 1998.** Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis, in: *Molecular Systematics of Plants II*, 1–42.
- Spada, P., Perrino, P., 1997.** Conservation of oregano species in national and international collections: an assessment, in: Padulosi, S. (Ed.), *Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano* **14**(IV): 14-23.
- Spooner, D.M., van Treuren, R., de Vicente, M.C., 2005.** Molecular markers for genebank management. *IPGRI Technical Bulletin* **10**.
- Staub, J.E., Serquen, F.C., Gupta, M., 1996.** Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *HortScience* **31**: 729–741.
- Stefanakis, M.K., Papaioannou, C., Lianopoulou, V., Philotheou-Panou, E., Giannakoula, A.E., Lazari, D.M., 2022.** Seasonal variation of aromatic plants under cultivation conditions. *Plants* **11**(16): 2083.
- Stuber, C.W., Polacco, M., Senior, M.L., 1999.** Synergy of empirical breeding, marker-assisted selection, and genomics to increase crop yield potential, in: *Crop Science* **39**(6): 1571–1583.
- Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S., 2021.** MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol Biol Evol* **38**: 3022–3027.
- Terenina, M.B., Misharina, T.A., Krikunova, N.I., Alinkina, E.S., Fatkulina, L.D., Vorob'eva, A.K., 2011.** Oregano essential oil as an inhibitor of higher fatty acid oxidation. *Appl Biochem Microbiol* **47**: 445–449.
- Tsimidou, M., Papavergou, E., Boskou, D., 1995.** Evaluation of oregano antioxidant activity in mackerel oil. *Food Research International* **28**: 431–433.
- Tungmunthum, D., Thongboonyou, A., Pholboon, A., Yangsabai, A., 2018.** Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: an overview. *Medicines* **5**: 93.

- Ultee, A., Kets, E.P.W., Smid, E.J., 1999.** Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen. *Appl Environ Microbiol* **65**: 4606–4610.
- Vekiari, S.A., Oreopoulou, V., Tzia, C., Thomopoulos, C.D., 1993.** Oregano flavonoids as lipid antioxidants. *J Am Oil Chem Soc* **70**: 483–487.
- Vernet, P., Gouyon, P.H., Valdeyron, G., 1986.** Genetic control of the oil content in *Thymus vulgaris* L.: a case of polymorphism in a biosynthetic chain. *Genetica* **69**: 227–231.
- Vokou, D., Kokkini, S., Bessiere, J.-M., 1993.** Geographic variation of Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) essential oils. *Biochem Syst Ecol* **21**: 287–295.
- Voytas, D., 2001.** Agarose Gel Electrophoresis. *Current Protocols in Molecular Biology* **51**: 2.5A.1-2.5A.9.
- Węglarz, Z., Kosakowska, O., Przybył, Jarosław.L., Pióro-Jabrucka, E., Baczek, K., Bączek, K., 2020.** The quality of Greek oregano (*O. vulgare* L. subsp. *hirtum* (Link) Ietswaart) and common oregano (*O. vulgare* L. subsp. *vulgare*) cultivated in the temperate climate of Central Europe. *Foods* **9**: 1671.
- Werker, E., Putievsky, E., Ravid, U., 1985.** The essential oils and glandular hairs in different chemotypes of *Origanum vulgare* L. *Ann Bot* **55**: 793–801.
- White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S.B., Taylor, J.W., 1990.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics, in: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S. V., 1990.** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* **18**: 6531–6535.
- Wong, S.Y.Y., Grant, I.R., Friedman, M., Elliott, C.T., Situ, C., 2008.** Antibacterial activities of naturally occurring compounds against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Appl Environ Microbiol* **74**: 5986–5990.

Yan, F., Azizi, A., Janke, S., Schwarz, M., Zeller, S., Honermeier, B., 2016. Antioxidant capacity variation in the oregano (*Origanum vulgare* L.) collection of the German National Genebank. *Ind Crops Prod* **92**: 19–25.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βελόπουλος, Ι., 2022. Εφαρμογή των υπερήχων στην απόσταξη ελαίου ρίγανης. Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών: «Επιστήμη Τροφίμων και Διατροφή», Τμήμα Γεωπονίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

Βογιατζή-Καμβούκου, Ε., 2004. Επιλογή αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών. Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη.

Γαβαλάς, Ν., 2004. Πληθυσμοί ρίγανης (*Origanum vulgare* L.) στη Βόρεια και Κεντρική Ελλάδα: επίδραση αβιοτικών παραγόντων στα φαινοτυπικά γνωρίσματά τους. Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Γεωπονίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

Γαβριήλ, Ε., 2013. Φαινολογική και χημειοτυπική διαφοροποίηση των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών των ειδών *Origanum vulgare* spp. *hirtum* (Link) Ietswaart, *Coridothymus capitatus* (L.), *Origanum onites* (L.) και *Satureja thymbra* (L.) σε φυτεία τριών ετών. Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, Τμήμα Επιστήμης της Φυτικής Παραγωγής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Γκόλιαρης, Α., 1992. Η καλλιέργεια της ρίγανης. Γεωργία και ανάπτυξη **2**: 39-42.

Δόρδας, Χ., 2012. Αρωματικά και Φαρμακευτικά Φυτά. Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη.

Δόρδας, Χ., 2009. Συμπληρωματικές σημειώσεις για το μάθημα των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών. Τμήμα Γεωπονίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2022. Εκτελεστικός κανονισμός (ΕΕ) 2022/1248 της Επιτροπής της 19ης Ιουλίου 2022 σχετικά με τη χορήγηση άδειας για τη χρήση αιθέριου ελαίου από *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietsw. ως πρόσθετης ύλης ζωοτροφών για ορισμένα ζωικά είδη.

Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο, 2019. Ψήφισμα του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου της 19ης Σεπτεμβρίου 2019 σχετικά με τη δυνατότητα κατοχύρωσης φυτών και κατ' ουσία βιολογικών διεργασιών με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας (2019/2800(RSP)).

Θηραίου, Τ., 2012. Ακαδημαϊκά Μαθήματα Βιοπληροφορικής. Ενότητα 15: *Φυλογενετική Ανάλυση*. Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Κατσιώτης, Σ.Θ., 1997. *Αιθέρια έλαια*, in: Γαληνική Φαρμακευτική. Εκδόσεις Πήγασος, Θεσσαλονίκη.

Κοτίνη-Ζαμπάκα, Σ., 1983. *Συμβολή στη μελέτη του κλίματος της Ελλάδας. Κανονικός καιρός κατά μήνα*. Διδακτορική Διατριβή, Ακαδημία Αθηνών.

Λαγούρη, Β., 1998. *Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης και της χημικής σύστασης εκχυλισμάτων φυτών της οικογένειας Lamiaceae*. Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

Μαλούπα, Ε., Γρηγοριάδου, Κ., Λάζαρη, Α., Κρίγκας, Ν., 2013. *Καλλιέργεια, μεταποίηση και διασφάλιση ποιότητας των ελληνικών αρωματικών-φαρμακευτικών φυτών: βασικές αρχές καθετοποιημένης παραγωγής*. ΓΕΩΤ.Ε.Ε. Παράρτημα Ανατ. Μακεδονίας, Εκδ. Γ. Κ. Λουπέλης, Καβάλα.

Μπάγκος, Π., 2015. Κεφάλαιο 6: *Φυλογενετική Ανάλυση*, in: Βιοπληροφορική [Προπτυχιακό Εγχειρίδιο]. Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Νικολάου, Χ., Χουβαρδάς, Π., 2015. Κεφ.6: *Φυλογενετική Ανάλυση*, in: Υπολογιστική Βιολογία [Προπτυχιακό Εγχειρίδιο]. Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις. Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Ντζούφρας, Ι., 2007. Πανεπιστημιακές σημειώσεις μαθήματος: *Βιοστατιστική II*. Τμήμα Στατιστικής, Οικονομικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Παλαιολόγου, Α., 2015. *Ηλεκτροφόρηση DNA*, in: Παπανικολάου, Γ., Παλαιολόγου, Α., Κατσαρέλη, Ε., Κατσίλα, Θ., Τσαρουχά, Χ., Τζέτη, Μ., Λιλάκος, Κ., & Δούκισσας, Λ. (2015).

Εργαστηριακές ασκήσεις γενετικής του ανθρώπου [Εργαστηριακός Οδηγός]. Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις, 153–165.

Παλαιολόγου, Δ., Κατσαρέλη, Ε., Παπανικολάου, Γ., 2015a. *Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης*, in: Παπανικολάου, Γ., Παλαιολόγου, Δ., Κατσαρέλη, Ε., Κατσίλα, Θ., Τσαρουχά, Χ., Τζέτη, Μ., Λιλάκος, Κ., & Δούκισσας, Λ. (2015). Εργαστηριακές ασκήσεις γενετικής του ανθρώπου [Εργαστηριακός Οδηγός]. Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις, 129–152.

Παλαιολόγου, Δ., Κατσαρέλη, Ε., Παπανικολάου, Γ., 2015b. *Απομόνωση DNA*, in: Παπανικολάου, Γ., Παλαιολόγου, Δ., Κατσαρέλη, Ε., Κατσίλα, Θ., Τσαρουχά, Χ., Τζέτη, Μ., Λιλάκος, Κ., & Δούκισσας, Λ. (2015). Εργαστηριακές ασκήσεις γενετικής του ανθρώπου [Εργαστηριακός Οδηγός]. Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις, 103–115.

Παναγόπουλος, Γ., 2012. *Χημειοτυπικός προσδιορισμός, χωρική αποτύπωση και αξιολόγηση του παραγωγικού δυναμικού αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών των γενών *Origanum*, *Satureja* και *Coridothymus* της νήσου Ικαρίας*. Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Παυλίδης, Ι., 2019. *Νουκλεϊνικά οξέα: Τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA – PCR*. Προπτυχιακά μαθήματα, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Πιερρακέας, Α., 1971. *Πολύτιμα βιομηχανικά αρωματικά φυτά*. Αγροτικός Εκδοτικός Οίκος, Αθήνα.

Πολυσίου, Μ., 2002. Επενδυτικές δυνατότητες στον τομέα των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών στην Ελλάδα. Υπουργείο Εθνικής Οικονομίας – Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Σαρίκα-Χατζηνικολάου, Μ., 1998. *Μορφολογικά γνωρίσματα χρησιμοποιούμενα στην ταξινόμηση των φυτών. Ταξινομική αξία των διαφόρων μορφολογικών χαρακτήρων: ρίζα, βλαστός, φύλλα, άνθος, ταξιανθίες, καρποί*, in: Συστηματική Βοτανική Από Την Θεωρία Στην Πράξη. Ελληνική Εταιρεία Εθνοφαρμακολογίας, Αθήνα.

Σαρλής, Γ., 1994. *Αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά*. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Σκρουμπής, Γ.Β., 1985. *Αρωματικά φυτά και αιθέρια έλαια*. Εκδόσεις Αγρότυπος, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

- Σκρουμπής, Γ.Β., 1978.** *Η ρίγανη και η καλλιέργεια της*. Εκδόσεις Αγρότυπος, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Σταματόπουλος, Θ., 2006.** *Βιολογική καλλιέργεια ρίγανης (Origanum vulgare L.)*. Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, Τμήμα Τεχνολογίας Γεωργικών Προϊόντων, ΤΕΙ Πελοποννήσου.
- Στεφάνου, Π., Μπαλούτας, Δ., Κατσινίκας, Δ., Αβραάμ, Ε.Μ., Κυριαζόπουλος, Α.Π., Θράκης, Π., 2013.** *Η καλλιέργεια των αρωματικών φυτών στην Ελλάδα : παρούσα κατάσταση , δυνατότητες και προοπτικές*. Πρακτικά 8ου Πανελλήνιου Λιβαδοπονικού Συνεδρίου “Λιβάδια – Κτηνοτροφία: έρευνα και ανάπτυξη: Προοπτικές εργασίας για νέους.” Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
- Τζουραμάνη, Ε., Ναβρούζογλου, Π., Σιντόρη, Αλ., Λιοντάκης, Αγ., 2008.** *Αρωματικά Φυτά – Ρίγανη*. Δίκτυο Παροχής Συμβουλών Καινοτόμων Πρωτοβουλιών στον Αγροτικό Τομέα, Μέτρο 9, Καν.(ΕΚ) 2182/02Ι.Γ.Ε.Κ.Ε.- ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε.
- Τσαυτάρης, Α., Νιάνιου-Ομπεϊντάτ, Ε., Πολύδωρος, Α., 2012.** *Μοριακή βελτίωση φυτών*, in: Βελτίωση Φυτών. Σύγχρονη Παιδεία.
- Τσιγαρίδα, Ε., Αυγουλάς, Χ., Θεοδωροπούλου, Ε., Αποστολόπουλος, Κ., 2002.** *Διερεύνηση των προοπτικών της καλλιέργειας της ρίγανης και της παραλαβής και αξιοποίησης του ριγανελαίου μέσω της συμβολαιακής γεωργίας στην Ελλάδα*, in: Γιδάρáκου, Ι., Καζακόπουλος, Λ., Κουτσοϋρης, Α. (Eds.), Πρακτικά 7ου Πανελλήνιου Συνεδρίου Αγροτικής Οικονομίας. Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων.
- Τσούρα, Ε., 2016.** *Αξιολόγηση του παραγωγικού και χημειοτυπικού δυναμικού και μορφολογικός χαρακτηρισμός καλλιεργούμενων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών τύπου καρβακρόλης (Origanum vulgare subsp. hirtum, Origanum onites, Satureja thymbra)*. Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, Τμήμα Επιστήμης της Φυτικής Παραγωγής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Φανουράκης, Ν., 2010.** *Γενετική βελτίωση φυτών: βασικές αρχές*. Εκδόσεις ΙΩΝ.
- Φιλοθέου, Χ., Κουτίτα, Ο., Δόβας, Χ., Τερτιβανίδης, Κ., Πάνου-Φιλοθέου, Ε., Σκαράκης, Γ.Ν., 2006.** *Μελέτη παραλλακτικότητας ελληνικών οικότυπων ρίγανης*, in: 11ο Πανελλήνιο Συνέδριο:

“Γενετική Βελτίωση Φυτών & Αγροτική Ανάπτυξη”. Ελληνική Επιστημονική Εταιρεία Γενετικής Βελτίωσης Φυτών, Ορεστιάδα, 228–233.

Χατζόπουλος, Π., 2018. *Βιοτεχνολογία φυτών*, 3η έκδοση. Εκδόσεις Έμβρυο.

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ

<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:453395-1>

<https://www.ipni.org/?q=Origanum%20vulgare%20subsp.%20hirtum>

<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:60473145-2>

<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:77101344-1>

https://portal.cybertaxonomy.org/flora-greece/cdm_dataportal/taxon/d30fb488-64e6-4aaa-ad71-177cca5a0aa3

<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:77171469-1>

<https://pallano.altervista.org/origanum-vulgare-subsp-vulgare.html>

<https://echa.europa.eu/el/support/substance-identification/sector-specific-support-for-substance-identification/essential-oils>

<https://www.iso.org/committee/48956/x/catalogue/>

<http://www.flavornet.org/index.html>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι: ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΕΣ ΑΠΟ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

O. vulgare* subsp. *hirtum



1. Βήσσανη Ιωαννίνων (2017)



2. Σταυροσκιάδι Ιωαννίνων (2017)



3. Γρανίτσα Ιωαννίνων (2017)



4. Πετράλωνα Ιωαννίνων (2017)



5. Πρωτόπαππας Ιωαννίνων (2017)



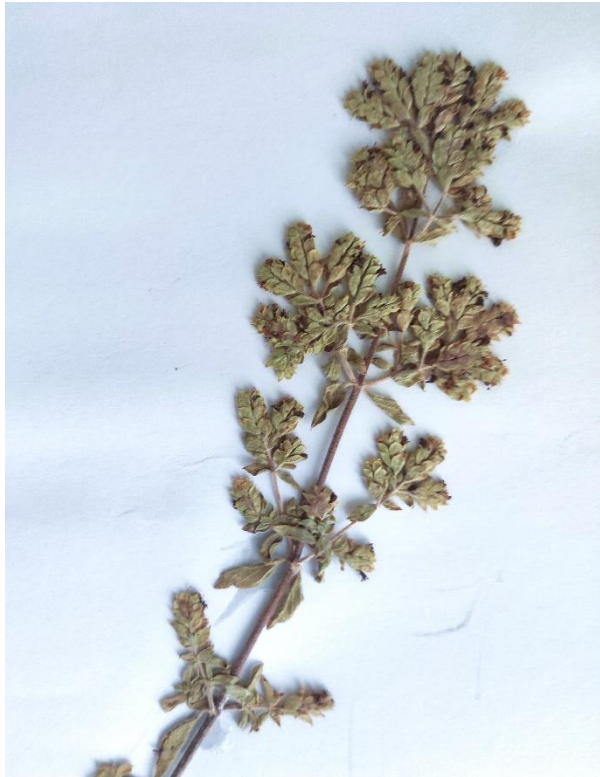
6. Λούρος Πρεβέζης (2017)



7. Ρωμιά Πρεβέζης (2017)



8. Ίσωμα Αχαΐας (2017)



9. Σμίλα Ηλείας (2017)



10. Βρόναινα Μαγνησίας (2017)



11. Σούρπη Μαγνησίας (2017)



12. Μύκκη Τρικάλων (2017)



13. Πολύρραχο Κοζάνης (2017)



14. Βελβεντό Κοζάνης (2017)



15. Αρετή Θεσ/κης (2017)

16. Σοχός Θεσ/κης (2017)



17. Φύσκα Κιλκίς (2017)



18. Μοσχοπόταμος Πιερίας (2017)



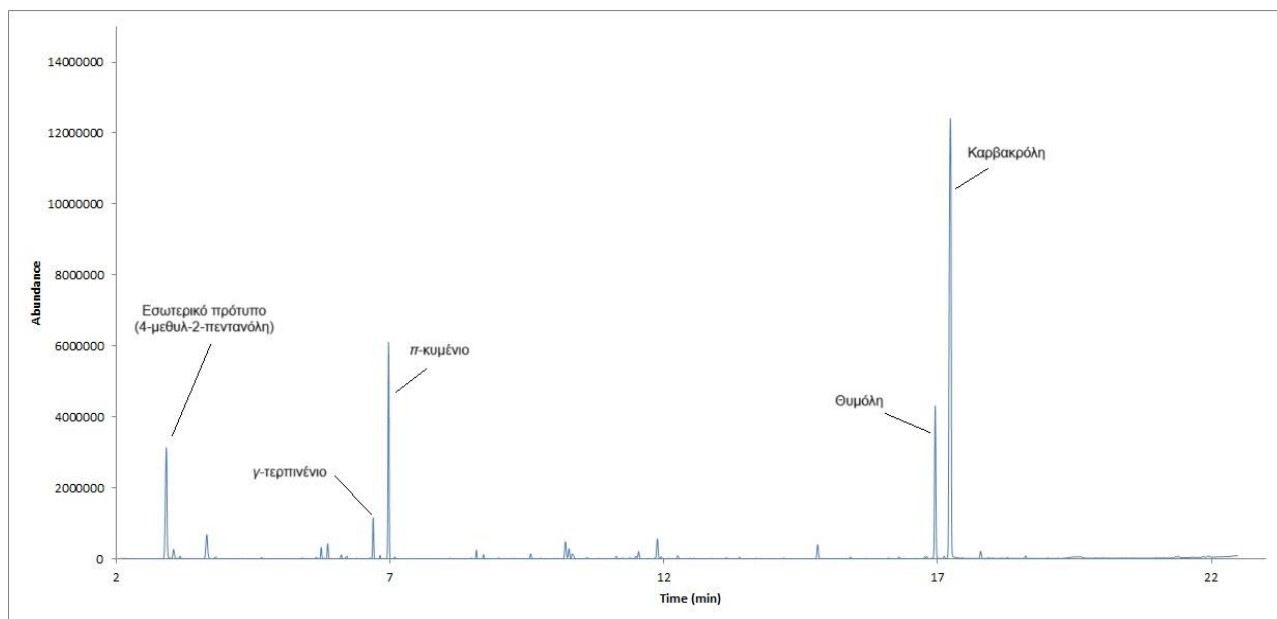
19. Κουσές Ηρακλείου (2017)



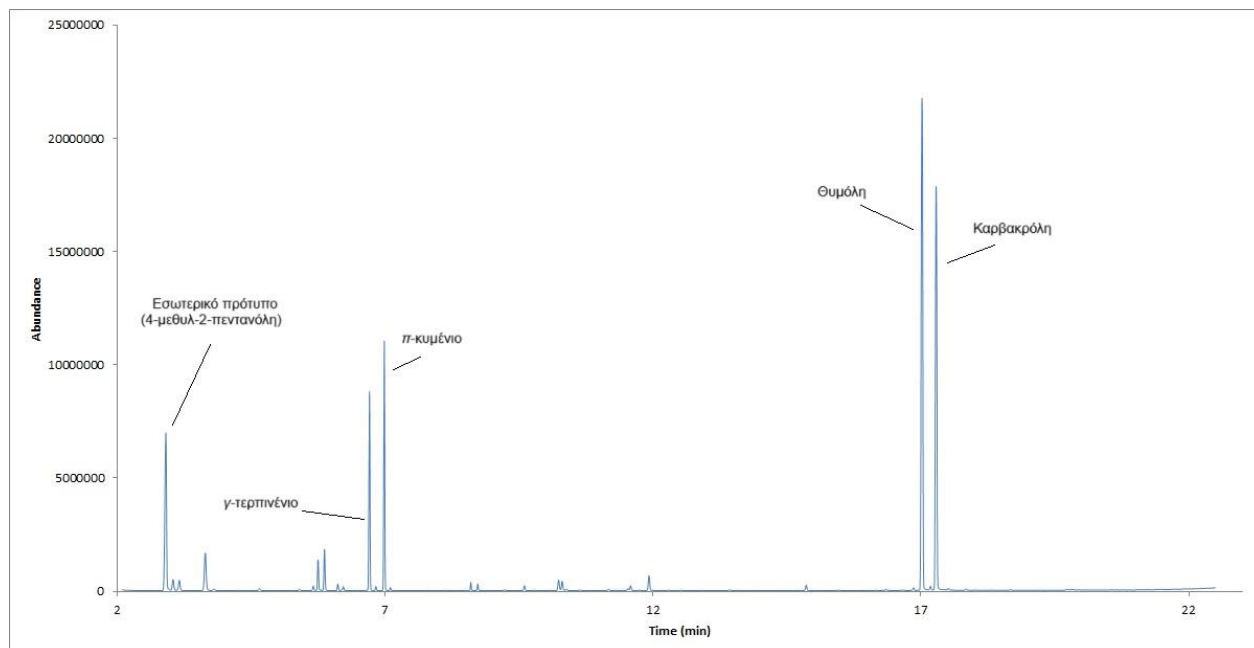
20. Θρόνος Ρεθύμνου (2017)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ: ΑΝΤΙΠΡΟΣΩΠΕΥΤΙΚΑ

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΑ



Χρωματογράφημα I. Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα δείγματος αιθέριου ελαίου *O. vulgare* subsp. *hirtum* όπου η καρβακρόλη είναι το κυρίαρχο συστατικό. Διακρίνονται οι κορυφές των τεσσάρων βασικών συστατικών και του εσωτερικού προτύπου (4-μεθυλ-2-πεντανόλη).



Χρωματογράφημα II. Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα δείγματος αιθέριου ελαίου *O. vulgare* subsp. *hirtum* όπου η θυμόλη είναι το κυρίαρχο συστατικό. Διακρίνονται οι κορυφές των τεσσάρων βασικών συστατικών και του εσωτερικού προτύπου (4-μεθυλ-2-πεντανόλη).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ITS ΠΕΡΙΟΧΗΣ

ΤΟΥ nrDNA

OR1 5'-3' (684bp)

CCAAGGGAACCGCCTGACTGGGGTCGCGGTCTGAAGATGGGGTGCAGTTACGCACCGACACCGTTGGGGTCATTTG
TGATTGTGCCCCTAATGACGACACAGCTGCACGACTACGAGAGAGATTGAGATGTTCAACCACCACTTGTCGTG
ACGCTAGTCGCCCCGGGGATCGCATTTGGGGCCAGCCGCACACCGAAGTACACGGGAGGCCAATGTCCGCCCCCTA
ACACCCGGCTTTGAGCGCGGGGAAGGGGGGCGACGCGATGCGTGACGCCCAGGCAGACGTGCCCTCAGCCTAAT
GGCTTCGGGCGCAACTTGCCTTCAAAGACTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCATTT
CGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGACATTTGATAGACGTTTCG
ATCCCCCAACACGCTCCGCGGACGGGATGCTGGGGGGAAACGCTTCGTTTAGTTTTCTTTGGCGCATTCGCGCG
CGGGGTTTCGTTAGCCCGCAAGACGTGACCCGAAGATACACGCCCGCAGGAGATGGGTACGGCAGAGGGTTGCC
CCCGCACCGTCCCCCATGATGTTAAACACGTGTTTCGCGGTCTACTTTTCAAGGTTTCGACAATGATCCTTCCGCA
GTCCCCCTAACCGGAAGG

OR2 5'-3' (688bp)

CAAAATGGAACCGCCTGACCTGAAGGGTCGCGGTCTGAAGATGGGGTGCAGTTACGCACCGACACCGTTGGG
TCATTTGTGATTGTGCCCCTAATGACGACACAGCTGCACGACTACGAGAGAGATTGAGATGTTCAACCAC
CACTTGTCTGTGACGCTATTCGCCCCGGGGATCGCATTTGGGGCCAGCCGCACACCGAAGTACACGGGAGGCC
AATGTCCGCCCCCTAACACCCGGCTTTGAGCGCGGGGAAGGGGGGCGACGCGATGCGTGACGCCCAGGCA
GACGTGCCCTCAGCCTAATGGCTTCGGGCGCAACTTGCCTTCAAAGACTCGATGGTTCACGGGATTCTGC
AATTCACACCAAGTATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGA
GTCGTTTTGACATTTGATAGACGTTTCGATCCCCCAACACGCTCCGCGGACGGGATGCTGGGGGGAAACGC
TTCGTTTAGTTTTCTTTGACGCATTCCGCGCCGGGGTTCGTTAGCCCGCAAGACGTGACCCGAAGATACA
CGCCCGCAGGAGATGGGTTACGGCAGAGGGTTGCCCGCGACCGTCCCCCATGATGTTAAACACGTGTTTC
GCGGTCTACTTTTTAAAGGTTTCGACAATGATCCTTCCGCAGCCCCCTACCGGAAAGGG

OR3 5'-3' (687 bp)

CCAAGGGAACCGCCTGACCTGGGGTCGCGGTCTGAAGATGGGGTGCAGTTACGCACCGACACCGTTGGGGTCATTT
GTGATTGTGCCCCTAAGGACGACACAGCTGCACGACTACGAGAGAGATTGAGATGTTCAACCACCACTTGTCGT
GACGCTAGTCGCCAGGGGATCGCATTTGGGGCCAGCCGCACACCGAAGTACACGGGAGGCCAATGTCCGCCCCCT
AACACCCGGCTTTGAGCGCGGGGAAGGGGGGCGACGCGATGCGTGACGCCCAGGCAGACGTGCCCTCAGCCTAA
TGGCTTCGGGCGCAACTTGCCTTCAAAGACTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCATTT
TCGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGACATTTGATAGACGTTTC
GATCCCCCAACATGCTCCGCGGACGGGATGCTGGGGGGAAACGCTTCGTTTAGTTTTCTTTGGCGCATTCGCGG
CCGGGGTTCGTTAGCCCGCAAGACGTGACCCGAAGATACACGCCCGCAGGAGATGGGTACGGCAGAGGGTTGC
CCCCGCACCGTCCCCCATGATGTTAAACACGTGTTTCGCGGTCTACTTTTCTAGGTTTCGACAATGATCCTTCCGC
AGTCCCCCTCCCGGAGAAGG

OR4 5'-3' (686 bp)

CAAGGGAACCGCCTGACCTGGGGTCGCGGTCTGAAGATGGGGTGCAGTTACGCACCGACACCGTTGGGGTCATTTG
TGATTGTGCCCCTAATGACGACACAGCTGCACGACTACGAGAGAGATTGAGATGTTCAACCACCACTTGTCGTG
ACGCTAGTCGCCCCGGGGATCGCATTTGGGGCCAGCCGCACACCGAAGTACACGGGAGGCCAATGTCCGCCCCCTA
ACACCCGGCTTTGAGCGCGGGGAAGGGGGGCGACGCGATGCGTGACGCCCAGGCAGACGTGCCCTCAGCCTAAT
GGCTTCGGGCGCAACTTGCCTTCAAAGACTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCATTT
CGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGACATTTGATAGACGTTTCG
ATCCCCCAACACGCTCCGCGGACGGGATGCTGGGGGGAAACGCTTCGTTTAGTTTTCTTTGGCGCATTCGCGCG
CGGGGTTTCGTTAGCCCGCAAGACGTGACCCGAAGATACACGCCCGCAGGAGATGGGTACGGCAGAGGGTTGCC
CCCGCACCGTCCCCCATGATGTTAAACACGTGTTTCGCGGTCTACTTTTCTAGGTTTCGACAATGATCCTTCCGCA
GCCCCCCCCCGGAGAAGGG

OR5 5'-3' (687 bp)

CCAAGGGAACCCGCCTGACCTGGGGTTCGCGGTCTGAAGATGGGGTGCAGTTACGCACCGACACCGTTGGGGTCAT
TAGTGATTGTGCCCCTAATGACGACACAGCTGCACGACTACGAGAGAGATTGAGATGTTCAACCACCACTTGTC
GTGACGCTAGTCGCCCCGGGGATCGCATTTGGGGCCAGCCGCACACCGAAGTACACGGGAGGCCAATGTCCGCCCC

CTAACACCCGGCTTTGAGCGCGGGGAAGGGGGGCGACGCGATGCGTGACGCCCAGGCAGACGTGCCCTCAGCCT
AATGGCTTCGGGCGCAACTTGCCTTCAAAGACTCGATGGTTACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCA
TTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGACATTTGATAGACGT
TCGATCCCCCAACACGCTCCGCGGACGGGATGCTGGGGGGAACGCTTCGTTTAGTTTTCTTTGACGCATTCCG
CGCCGGGGTTCGTTAGCCCGCAAGACGTGACCCGAAGATACACGCCCGCAGGAGATGGGTACGGCAGAGGGTT
GCCCCCGCACCGTCCCCCATGATGTTAAACACGTGTTTCGCGGTCTACTTTTAAAGGTTTCGACAATGATCCTTCC
GCAGGTTCCCCTACGGAAGGG

OR6 5'-3' (684bp)

CAAGGGAACCGCCTGACCTGGGGTTCGCGGTCTGAAGATGGGGTGCAGTTACGCACCGACACCGTTGGGGTCATTTG
TGATTGTGCCCGTAATGACGACACAGCTGCACGACTACGAGAGAGATTGAGATGTTCAACCACCACTTGTCGTG
ACGCTAGTCGCCCCGGGGATCGCATTTGGGCCAGCCGCACACCGAAGTACACGGGAGGCCAATGTCCGCCCCCTA
ACACCCGGCTTTGAGCGCGGGGAAGGGGGGCGACGCGATGCGTGACGCCCAGGCAGACGTGCCCTCAGCCTAAT
GGCTTCGGGCGCAACTTGCCTTCAAAGACTCGATGGTTACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCATTT
CGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGACATTTGATAGACGTTTCG
ATCCCCCAACAYGCTCCGCGGACGGGATGCTGGGGGGAACGCTTCGTTTAGTTTTCTTTGGCGCATTCGCGC
CGGGGTTCGTTAGCCCGCAAGACGTGACCCGAAGATACACGCCCGCAGGAGATGGGTACGGCAGAGGGTTGCC
CCCGCACCGTCCCCCATGATGTTAAACACGTGTTTCGCGGTCTACTTTTCTAGGTTTCGACAATGATCCTTCCGCA
GCCCCCCCCCGGAAAGGG

OR7 5'-3' (685 bp)

CCAAGGGAACCGCCTGACCTGGGGTTCGCGGTCTGAAGATGGGGTGCAGTTACGCACCGACACCGTTGGGGTCATTT
GTGATTGTGCCCGTAATGACGACACAGCTGCACGACTACGAGAGAGATTGAGATGTTCAACCACCACTTGTCGT
GACGCTAGTCGCCCCGGGGATCGCATTTGGGCCAGCCGCACACCGAAGTACACGGGAGGCCAATGTCCGCCCCCT
AACACCCGGCTTTGAGCGCGGGGAAGGGGGGCGACGCGATGCGTGACGCCCAGGCAGACGTGCCCTCAGCCTAA
TGGCTTCGGGCGCAACTTGCCTTCAAAGACTCGATGGTTACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCATTT
TCGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGACATTTGATAGACGTTTC
GATCCCCCAACACGCTCCGCGGACGGGATGCTGGGGGGAACGCTTCGTTTAGTTTTCTTTGGCGCATTCGCGC
CCGGGGTTCGTTAGCCCGCAAGACGTGACCCGAAGATACACGCCCGCAGGAGATGGGTACGGCAGAGGGTTGC
CCCCGCACCGTCCCCCATGATGTTAAACACGTGTTTCGCGGTCTACTTTTCTAGGTTTCGACAATGATCCTTCCGC
AGGTTCCCCTACGGAAGGG

OR8 5'-3' (684bp)

CCCTGTATCCGCCTGACTGGGGTTCGCGGTCTGAAGATGGGGTGCAGTTACGCACCGACACCGTTGGGGTCATTTGT
GATTGTGCCCGTAATGACGACACAGCTGCACGACTACGAGAGAGATTGAGATGTTCAACCACCACTTGTCGTGA
CGCTAGTCGCCCCGGGGATCGCATTTGGGCCAGCCGCACACCGAAGTACACGGGAGGCCAATGTCCGCCCCCTAA
CACCCGGCTTTGAGCGCGGGGAAGGGGGGCGACGCGATGCGTGACGCCCAGGCAGACGTGCCCTCAGCCTAATG
GCTTCGGGCGCAACTTGCCTTCAAAGACTCGATGGTTACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCATTTTC
GCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGACATTTGATAGACGTTTCGA
TCCCCCAACACGCTCCGCGGACGGGATGCTGGGGGGAACGCTTCGTTTAGTTTTCTTTGACGCATTCCGCGCC
GGGGTTCGTTAGCCCGCAAGACGTGACCCGAAGATACACGCCCGCAGGAGATGGGTACGGCAGAGGGTTGCC
CCGCACCGTCCCCCATGATGTTAAACACGTGTTTCGCGGTCTACTTTTCAAGGTTTCGACAATGATCCTTCCGCAG
GTCCCCTTACCGAAAGGG

OR9 5'-3' (684bp)

ACCGGAACCGCCTGACCTGGGGTTCGCGGTCTGAAGATGGGGTGCAGTTACGCACCGACACCGTTGGGGTCATTTGT
GATTGTGCCCGTAAGGACGACACAGCTGCACGACTACGAGAGAGATTGAGATGTTCAACCACCACTTGTCGTGA
CGCTAGTCGCCCCGGGGATCGCATTTGGGCCAGCCGCACACCGAAGTACACGGGAGGCCAATGTCCGCCCCCTAA
CACCCGGCTTTGAGCGCGGGGAAGGGGGGCGACGCGATGCGTGACGCCCAGGCAGACGTGCCCTCAGCCTAATG
GCTTCGGGCGCAACTTGCCTTCAAAGACTCGATGGTTACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCATTTTC
GCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGACATTTGATAGACGTTTCGA
TCCCCCAACATGCTCCGCGGACGGGATGCTGGGGGGAACGCTTCGTTTAGTTTTCTTTGACGCATTCCGCGCC
GGGGTTCGTTAGCCCGCAAGACGTGACCCGRAGATACACGCCCGCAGGAGATGGGTACGGCAGAGGGTTGCC
GGGGTTCGTTAGCCCGCAAGACGTGACCCGRAGATACACGCCCGCAGGAGATGGGTACGGCAGAGGGTTGCC

CCGCACCGTCCCCCATGATGTTAAACACGTGTTTCGCGGTCTACTTTTCTAGGTTTCGACAATGATCCTTCCGCAG
CCCCCCCCCGGGAAAGGG

OR10 5'-3' (688bp)

ACAGGGGAACCCGCTGACCTGGGGTCGCGGTCTGAAGATGGGGTGCAGTTACGCACCGACACCGTTGGGGTCATT
TGTGATTGTGCCCGTAATGACGACACAGCTGCACGACTACGAGAGAGATTGAGATGTTCAACCACCACTTGTCTG
TGACGCTAGTCGCCCCGGGGATCGCATTTGGGCCAGCCGCACACCGAAGTACACGGGAGGCCAATGTCCGCCCCC
TAACACCCGGCTTTGAGCGCGGGGAAGGGGGGCGACGCGATGCGTGACGCCAGGCAGACGTGCCCTCAGCCTA
ATGGCTTCGGGCGCAACTTGCCTTCAAAGACTCGATGGTTTACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCAT
TTCGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGACATTTGATAGACGTT
CGATCCCCAACACGCTCCGCGGACGGGATGCTGGGGGAAACGCTTCGTTTAGTTTTCTTGACGCATTCCGC
GCCGGGGTTCGTTAGCCCGCAAGACGTGACCCGAAGATACACGCCCGCAGGAGATGGGTTACGGCAGAGGGTTG
CCCCCGCACCGTCCCCCATGATGTTAAACACGTGTTTCGCGGTCTACTTTTAAAGGTTTCGACAATGATCCTTCCG
CAGTCCCCCAACGGAAAGGG

OR11 5'-3' (687bp)

ACAAGGGAACCCGCTGACCTGGGGTCGCGGTCTGAAGATGGGGTGCAGTTACGCACCGACACCGTTGGGGTCATTT
GTGATTGTGCCCGTAATGACGACACAGCTGCACGACTACGAGAGAGATTGAGATGTTCAACCACCACTTGTCTG
GACGCTAGTCGCCCCGGGGATCGCATTTGGGCCAGCCGCACACCGAAGTACACGGGAGGCCAATGTCCGCCCCCT
AACACCCGGCTTTGAGCGCGGGGAAGGGGGGCGACGCGATGCGTGACGCCAGGCAGACGTGCCCTCAGCCTAA
TGGCTTCGGGCGCAACTTGCCTTCAAAGACTCGATGGTTTACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCAT
TCGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGACATTTGATAGACGTTT
GATCCCCAACACGCTCCGCGGACGGGATGCTGGGGGAAACGCTTCGTTTAGTTTTCTTGCGCATTCGCG
CCGGGGTTCGTTAGCCCGCAAGACGTGACCCGAAGATACACGCCCGCAGGAGATGGGTCACGGCAGAGGGTTGC
CCCCCGCACCGTCCCCCATGATGTTAAACACGTGTTTCGCGGTCTACTTTTCTAGGTTTCGACAATGATCCTTCCGA
GCCCCCCCCCAGGAGAAAGGG

OR12 5'-3' (687bp)

AACTGGAACCCGCTGACCTGGGGTCGCGGTCTGAAGATGGGGTGCAGTTACGCACCGACACCGTTGGGGTCATTTG
TGATTGTGCCCGTAATGACGACACAGCTGCACGACTACGAGAGAGATTGAGATGTTCAACCACCACTTGTCTG
ACGCTAGTCGCCCCGGGGATCGCATTTGGGCCAGCCGCACACCGAAGTACACGGGAGGCCAATGTCCGCCCCCTA
ACACCCGGCTTTGAGCGCGGGGAAGGGGGGCGACGCGATGCGTGACGCCAGGCAGACGTGCCCTCAGCCTAAT
GGCTTCGGGCGCAACTTGCCTTCAAAGACTCGATGGTTTACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCATTT
CGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGACATTTGATAGACGTTT
ATCCCCAACACGCTCCGCGGACGGGATGCTGGGGGAAACGCTTCGTTTAGTTTTCTTGCGCATTCGCGC
CGGGGTTTCGTTAGCCCGCAAGACGTGACCCGAAGATACACGCCCGCAGGAGATGGGTTACGGCAGAGGGTTGCC
CCCGCACCGTCCCCCATGATGTTAAACACGTGTTTCGCGGTCTACTTTTCAAGGTTTCGACAATGATCCTTCCGA
GCCCCCCCCCTGGGAGAAAGGG

OR13 5'-3' (687bp)

ACAAGGGAACCCGCTGACCTGGGGTCGCGGTCTGAAGATGGGGTGCAGTTACGCACCGACACCGTTGGGGTCATTT
GTGATTGTGCCCGTAATGACGACACAGCTGCACGACTACGAGAGAGATTGAGATGTTCAACCACCACTTGTCTG
GACGCTAGTCGCCCCGGGGATCGCATTTGGGCCAGCCGCACACCGAAGTACACGGGAGGCCAATGTCCGCCCCCT
AACACCCGGCTTTGAGCGCGGGGAAGGGGGGCGACGCGATGCGTGACGCCAGGCAGACGTGCCCTCAGCCTAA
TGGCTTCGGGCGCAACTTGCCTTCAAAGACTCGATGGTTTACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCAT
TCGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGACATTTGATAGACGTTT
GATCCCCAACACGCTCCGCGGACGGGATGCTGGGGGAAACGCTTCGTTTAGTTTTCTTGCGCATTCGCGC
CCGGGGTTCGTTAGCCCGCAAGACGTGACCCGAAGATACACGCCCGCAGGAGATGGGTTACGGCAGAGGGTTGC
CCCCCGCACCGTCCCCCATGATGTTAAACACGTGTTTCGCGGTCTACTTTTCAAGGTTTCGACAATGATCCTTCCG
AGCCCCCCCCCAAGAAAGGG

OR14 5'-3' (692bp)

ACAAGGGGAATCCCGCCTGAACCTGGGGGTCGCGGTCTGAAGATGGGGTGCAGTTACGCACCGACACCGTTGGGT
CATTTGTGATTGTGCCCCGTAATGACGACACAGCTGCACGACTACGAGAGAGATTGAGATGTTCAACCACCACTT
GTCGTGACGCTAGTCGCCCCGGGGATCGCATTTGGGCCAGCCGCACACCGAAGTACACGGGAGGCCAATGTCCGC
CCCCAACACCCGGCTTTGAGCGCGGGGAAGGGGGGCGACGCGATGCGTGACGCCAGGCAGACGTGCCCTCAG
CCTAATGGCTTCGGGCGCAACTTTCGCTTCAAAGACTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATC
GCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGACATTTGATAGA
CGTTTCGATCCCCAACACGCTCCGCGGACGGGATGCTGGGGGAAACGCTTCGTTTAGTTTTCTTGGCGCATT
CCGCGCCGGGGTTCGTTAGCCCGCAAGACGTGACCCGAAGATACACGCCCGCAGGAGATGGGTACGGCAGAGG
GTTGCCCCCGCACCGTCCCCCATGATGTTAAACACGTGTTTCGCGGTCTACTTTTCAAGGTTTCGACAATGATCCT
TCCGAGGTCACCCCTTTAGGAAGAG

OR15 5'-3' (685bp)

CAAGGGATCCGCTGACCTGGGGTTCGCGGTCTGAAGATGGGGTGCAGTTACGCACCGACACCGTTGGGTCA
TTTGTGATTGTGCCCCGTAATGACGACACAGCTGCACGACTACGAGAGAGATTGAGATGTTCAACCACCAC
TTGTGCTGACGCTAGTCGCCCCGGGGATCGCATTTGGGCCAGCCGCACACCGAAGTACACGGGAGGCCAAT
GTCCGCCCCCTAACACCCGGCTTTGAGCGCGGGGAAGGGGGGCGACGCGATGCGTGACGCCAGGCAGAC
GTGCCCTCAGCCTAATGGCTTCGGGCGCAACTTTCGCTTCAAAGACTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAAT
TCACACCAAGTATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTC
GTTTTGACATTTGATAGACGTTTCGATCCCCAACACGCTCCGCGGACGGGATGCTGGGGGAAACGCTTC
GTTTAGTTTTCTTTCGACGATTCCGCGCCGGGGTTCGTTAGCCCGCAAGACGTGACCCGAAGATACACGC
CCGAGGAGATGGGTTACGGCAGAGGGTTGCCCCCGCACCGTCCCCCATGATGTTAAACACGTGTTTCGCG
GTCTACTTTTAAAGGTTTCGACAATGATCCTTCCGCAGTCCCCCCCCGGGAAAGG

OR16 5'-3' (686bp)

ACCCTTACGCTGAACCTGGGGTTCGCGGTCTGAAGATGGGGTGCAGTTACGCACCGACACCGTTGGGTCA
GATTGTGCCCCGTAATGACGACACAGCTGCACGACTACGAGAGAGATTGAGATGTTCAACCACCACTTGTGCTGA
CGCTAGTCGCCCCGGGGATCGCATTTGGGCCAGCCGCACACCGAAGTACACGGGAGGCCAATGTCCGCCCCCTAA
CACCCGGCTTTGAGCGCGGGGAAGGGGGGCGACGCGATGCGTGACGCCAGGCAGACGTGCCCTCAGCCTAATG
GCTTCGGGCGCAACTTTCGCTTCAAAGACTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCATTTTC
GCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGACATTTGATAGACGTTTCGA
TCCCCAACACGCTCCGCGGACGGGATGCTGGGGGAAACGCTTCGTTTAGTTTTCTTTCGACGATTCCGCGCC
GGGGTTCGTTAGCCCGCAAGACGTGACCCGAAGATACACGCCCGCAGGAGATGGGTACGGCAGAGGGTTGCC
CCGCACCGTCCCCCATGATGTTAAACACGTGTTTCGCGGTCTACTTTTCAAGGTTTCGACAATGATCCTTCCGCA
CCCCCCCCCGGGAAGG

OR17 5'-3' (687 bp)

ACAAGGGAACCGCCTGACCTGGGGTTCGCGGTCTGAAGATGGGGTGCAGTTACGCACCGACACCGTTGGGTCA
GTGATTGTGCCCCGTAATGACGACACAGCTGCACGACTACGAGAGAGATTGAGATGTTCAACCACCACTTGTGCT
GACGCTAGTCGCCCCGGGGATCGCATTTGGGCCAGCCGCACACCGAAGTACACGGGAGGCCAATGTCCGCCCCCT
AACACCCGGCTTTGAGCGCGGGGAAGGGGGGCGACGCGATGCGTGACGCCAGGCAGACGTGCCCTCAGCCTAATG
TGGCTTCGGGCGCAACTTTCGCTTCAAAGACTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCATTT
TCGCTACGTTCTTCATCGAGCGAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGACATTTGATAGACGTTTCG
ATCCCCAACACGCTCCGCGGACGGGATGCTGGGGGAAACGCTTCGTTTAGTTTTCTTTCGACGATTCCGCGC
CGGGGTTTCGTTAGCCCGCAAGACGTGACCCGAAGATACACGCCCGCAGGAGATGGGTTACGGCAGAGGGTTGCC
CCCGCACCGTCCCCCATGATGTTAAACACGTGTTTCGCGGTCTACTTTTAAAGGTTTCGACAATGATCCTTCCGCA
GGTTCACCCCTTAACGAAAGG

OR18 5'-3' (686bp)

CAAGGGAACCGCCTGACCTGGGGTTCGCGGTCTGAAGATGGGGTGCAGTTACGCACCGACACCGTTGGGTCA
GTGATTGTGCCCCGTAATGACGACACAGCTGCACGACTACGAGAGAGATTGAGATGTTCAACCACCACTTGTGCT
GACGCTAGTCGCCCCGGGGATCGCATTTGGGCCAGCCGCACACCGAAGTACACGGGAGGCCAATGTCCGCCCCCT
AACACCCGGCTTTGAGCGCGGGGAAGGGGGGCGACGCGATGCGTGACGCCAGGCAGACGTGCCCTCAGCCTAAT

TGGCTTCGGGCGCAACTTGC GTTCAAAGACTCGATGGTTACAGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCATT
TCGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGACATTTGATAGACGTTT
GATCCCCCAACACGCTCCGCGGACGGGATGCTGGGGGGAAACGCTTCGTTTAGTTTTCTTTGGCGCATTCCGCG
CCGGGGTTCGTTAGCCCGCAAGACGTGACCCGAAGATACACGCCCCGAGGAGATGGGTAACGGCAGAGGGTTGC
CCCCGCACCGTCCCCCATGATGTTAAACACGTGTTTCGCGGTCTACTTTTCAAGGTTTCGACAATGATCCTTCCGC
AGTCCCCCTTCGGGAAAGGG

OR19 5'-3' (686bp)

CAAGGGAACCGCCTGACCTGGGGTCGCGGTCTGAAGATGGGGTGCAGTTACGCACCGACACCGTTGGGGTCATTTG
TGATTGTGCCCGTAATGACGACACAGCTGCACGACTACGAGAGAGATTGAGATGTTCAACCACCACTTGTCGTG
ACGCTAGTCGCCCCGGGATCGCATTTGGGCCAGCCGCACACCGAAGTACACGGGAGGCCAATGTCCGCCCCCTA
ACACCCGGCTTTGAGCGCGGGGAAGGGGGCGACGCGATGCGTGACGCCCAGGCAGACGTGCCCTCAGCCTAAT
GGCTTCGGGCGCAACTTGC GTTCAAAGACTCGATGGTTACAGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCATT
CGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGACATTTGATAGACGTTTCG
ATCCCCCAACACGCTCCGCGGACGGGATGCTGGGGGGAAACGCTTCGTTTAGTTTTCTTTGACGCATTCCGCGC
CGGGGTTCGTTAGCCCGCAAGACGTGACCCGAGATACACGCCCCGAGGAGATGGGTTACGGCAGAGGGTTGCC
CCCGCACCGTCCCCCATGATGTTAAACACGTGTTTCGCGGTCTACTTTTAAAGGTTTCGACAATGATCCTTCCGCA
GGTCCCCCTAACGGAAAGGG

OR20 5'-3' (686bp)

CAAGGGAACCGCCTGACCTGGGGTCGCGGTCTGAAGATGGGGTGCAGTTACGCACCGACACCGTTGGGGTCATTAG
TGATTGTGCCCGTAATGACGACACAGCTGCACGACTACGAGAGAGATTGAGATGTTCAACCACCACTTGTCGTG
ACGCTAGTCGCCCCGGGATCGCATTTGGGCCAGCCGCACACCGAAGTACACGGGAGGCCAATGTCCGCCCCCTA
ACACCCGGCTTTGAGCGCGGGGAAGGGGGCGACGCGATGCGTGACGCCCAGGCAGACGTGCCCTCAGCCTAAT
GGCTTCGGGCGCAACTTGC GTTCAAAGACTCGATGGTTACAGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCATT
CGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGACATTTGATAGACGTTTCG
ATCCCCCAACACGCTCCGCGGACGGGATGCTGGGGGGAAACGCTTCGTTTAGTTTTCTTTGACGCATTCCGCGC
CGGGGTTCGTTAGCCCGCAAGACGTGACCCGAAGATACACGCCCCGAGGAGATGGGTTACGGCAGAGGGTTGCC
CCCGCACCGTCCCCCATGATGTTAAACACGTGTTTCGCGGTCTACTTTTCAAGGTTTCGACAATGATCCTTCCGCA
GCCCCCCCCCGGAAAAGGG

