



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ & ΧΗΜΕΙΑΣ
ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

**ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΗ & ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ
ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ**

Elegia tectorum (L.f.) Moline & H.P. Linder - Restionaceae



Παναγιώτης Λυμπέρης
Βιοτεχνολόγος

Μεταπτυχιακή Διατριβή για το Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης:
Απομόνωση, Ανάπτυξη, Παραγωγή & Έλεγχος Βιοδραστικών Φυσικών
Προϊόντων

Αθήνα 2021

Πίνακας Περιεχομένων

A.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
A1.	Γεωγραφική - Συστηματική Ταξινόμηση.....	2
A2.	Βοτανική Περιγραφή.....	14
A3.	Δρογοετυμολογία - Δρογοϊστορία - Δρογοφαρμακολογία.....	17
A4.	Δρογοχημεία.....	21
A5.	Βιοπληροφορική.....	26
α.	Τι είναι η βιοπληροφορική.....	26
β.	Πού βρίσκει εφαρμογή η βιοπληροφορική.....	26
γ.	Εξόρυξη Γονιδιωμάτων.....	27
δ.	Περίπτωση μελέτης.....	28
B.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	29
B1.1.	Χρωματογραφικές Τεχνικές.....	30
α.	Χρωματογραφία επί λεπτής στιβάδας (TLC).....	30
β.	Χρωματογραφία στήλης (CC).....	30
γ.	Αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας.....	30
δ.	Χρωματογραφικά αντιδραστήρια.....	30
B1.2.	Φασματοσκοπικές Μέθοδοι.....	31
α.	Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR).....	31
B1.3.	Διαλύτες.....	31
B2.	Εκχύλιση Δρόγης.....	32
B3.	Χρωματογραφικός Διαχωρισμός Εκχυλισμάτων.....	32
α.	Χρωματογραφικός διαχωρισμός του ολικού αιθανολικού εκχυλίσματος (ETP).....	32
	Διάγραμμα Ροής Αιθανολικού Εκχυλίσματος (ETP).....	42
B4.	Βάσεις Δεδομένων.....	43
B5.	Βιοπληροφορικά Εργαλεία.....	46
	Διάγραμμα Ροής Βιοπληροφορικής Ανάλυσης.....	48
Γ.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	49
Γ1.	Στερόλες- Λιπαρά οξέα.....	50
Γ2.	Φαινολικά Παράγωγα & Πρόδρομες Ενώσεις.....	61
Γ3.	Φλαβονοειδή.....	73
Γ4.	Πολυ-υδροξυ Παράγωγα.....	89

Γ5.	Παράγωγα Χρωμανίου.....	93
Γ6.	Βιοπληροφορική Ανάλυση.....	97
α.	Φυλογενετική Μελέτη.....	97
β.	Κατασκευή Εκκινητών.....	114
Δ.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	117
Δ1.	Φυτοχημική Μελέτη	118
Δ2.	Βιοπληροφορική Ανάλυση.....	120
α.	Επόμενα Βήματα.....	121
β.	Προοπτικές.....	124
Ε.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	125
Ε1.	Ηλεκτρονικές Πηγές	133

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ ολόψυχα την επιβλέπουσα καθηγήτρια κα. Ελένη Σκαλτσά για την αμέριστη καθοδήγηση, στήριξη και συμπαράσταση, που μου παρείχε κατά την διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου και της εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

Ευχαριστώ την τριμελή εξεταστική επιτροπή Καθηγήτρια κα Ελένη Σκαλτσά, τον Αν. Καθηγητή κ. Μιχάλη Ράλλη και την Αν. Καθηγήτρια κα Αναστασία Καριώτη (Τομέας Φαρμακογνωσίας και Φαρμακολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΑΠΘ).

Ευχαριστώ θερμά την Επίκ. Καθηγήτρια. Στυλιανή Χωριανοπούλου (Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, ΓΠΑ) για την καθοριστική στήριξη και καθοδήγηση της για την ολοκλήρωση της βιοπληροφορικής μελέτης.

Ευχαριστώ όλους τους συναδέλφους που εργάστηκαν και δημιούργησαν παρέα μου όλες τις όμορφες στιγμές.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την στήριξη και για την πίστη τους σε μένα.

Περίληψη

Η οικογένεια Restionaceae περιέχει πάνω από 500 είδη και 60 γένη τα οποία εντοπίζονται στο Νότιο Ημισφαίριο. Τα Αφρικανικά είδη παίζουν καθοριστικό ρόλο στις βιολογικές και οικολογικές ισορροπίες των βιοτόπων τους. Για πολλούς αιώνες ορισμένα από αυτά χρησιμοποιούνται από τους τοπικούς πληθυσμούς ως δομικά υλικά. Ωστόσο, παρά την μεγάλη λαϊκή θεραπευτική παράδοση των Αφρικανικών λαών μόνο 4 είδη της οικογένειας Restionaceae έχουν καταγραφεί ότι χρησιμοποιούνται παραδοσιακά από τοπικούς θεραπευτές και η χρήση τους περιορίζεται μόνο στην κατασκευή εργαλείων, όπως βουρτσών, πινέλων και ξεσκονόπανων. Η προφανής, λοιπόν, απουσία ιστορικών στοιχείων και φαρμακολογικών μελετών ήταν ένα έναυσμα για την μελέτη του γένους *Elegia* L. το οποίο αποτελεί το δεύτερο μεγαλύτερο γένος της οικογένειας. Για το σκοπό αυτό στα πλαίσια της μεταπτυχιακής διατριβής πραγματοποιήθηκε η φυτοχημική ανάλυση του αιθανολικού εκχυλίσματος του είδους *Elegia tectorum* L., το οποίο έχει δείξει σημαντικά αποτελέσματα ως αντιρυτιδικός παράγοντας. Συνολικά απομονώθηκαν μέσω διαφορετικών αναλυτικών χρωματογραφικών και φασματοσκοπικών τεχνικών 10 φυσικά προϊόντα. Αναλυτικότερα, απομονώθηκαν 3 φλαβονοειδή, 3 φαινολικά παράγωγα, 1 πολυυδροξυ-παράγωγο, 1 φυτοστερόλη, 1 λιπαρό οξύ και 1 παράγωγο χρωμανίου. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε μια βιοπληροφορική μελέτη με σκοπό την ανάδειξη της ικανότητας και της πιθανής εφαρμογής των μοριακών και βιοπληροφοριακών εργαλείων στην εύρεση νέων βιοδραστικών προϊόντων και την ανάπτυξη νέων εφαρμογών στον τομέα της ανάλυσης μεγάλου αριθμού φυτών για την απομόνωση βιοδραστικών φυσικών προϊόντων.

Abstract

The Restionaceae family consists of plants found in the Southern Hemisphere and contains over 500 species and 60 genera. African species play a key role in the biological and ecological balances of their habitats and for many centuries some have been used by local populations as building materials. Despite the long history of the use of traditional herbs by the African people, only 4 species of the Restionaceae family have been recorded to be used traditionally by local healers and their use is limited to the manufacture of tools such as brushes and dusters. The apparent absence of historical data and pharmacological studies was therefore another trigger for the study of the genus *Elegia* L., which is the second largest genus in the family. For this purpose, the phytochemical analysis of the ethanolic extract of *Elegia tectorum* was carried out, which has shown in a recent study positive results as an anti-wrinkle agent. A total of 10 natural products were isolated by different analytical, chromatographic and spectroscopic techniques. Specifically, 3 glycosides of flavonoids, 3 phenolic derivatives, 1 poly-hydroxy derivative, 1 phytosterol, 1 lipid acid and 1 chromane derivative were isolated. Moreover, a bioinformatics study was conducted to highlight the ability and the potential application of molecular and bioinformatics tools in the research of new bioactive products and the development of new screening techniques.

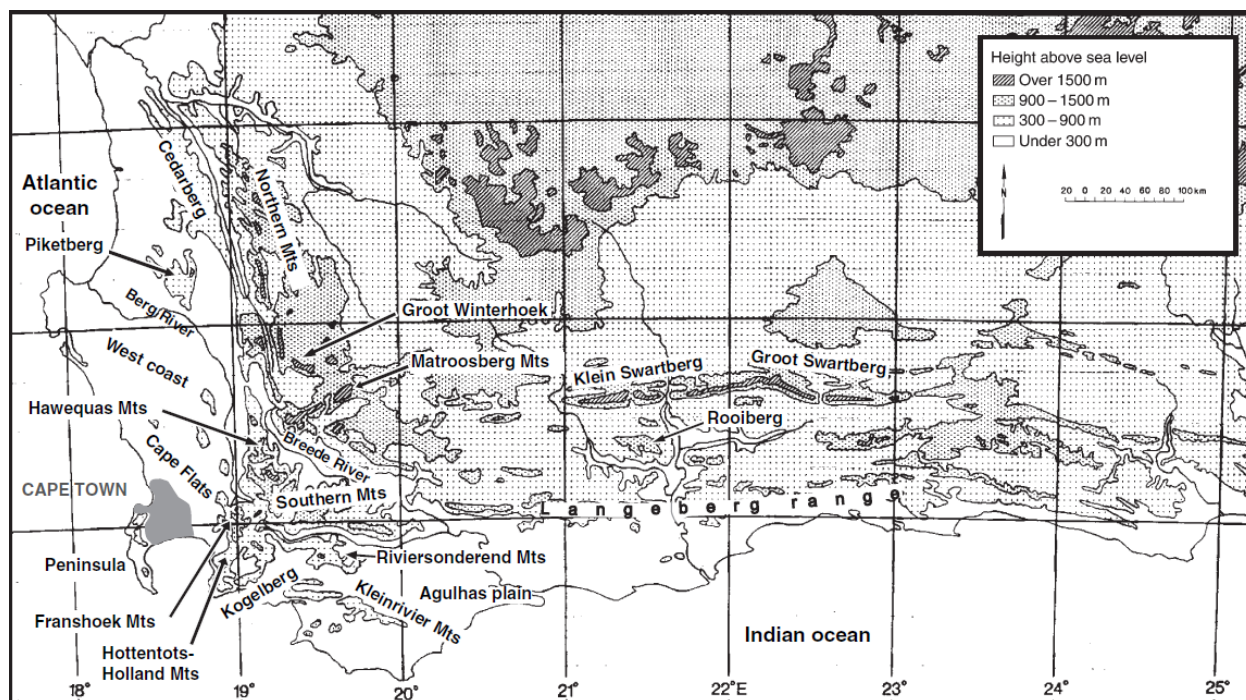
Α.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A1.Γεωγραφική - Συστηματική Ταξινόμηση

Η οικογένεια Restionaceae αποτελείται φυτά γνωστά ως “restios” που εντοπίζονται στο νότιο ημισφαίριο και περιέχει πάνω από 500 είδη και 60 γένη (Dorrat-Haaksma and Linder, 2012; Linder, 2011; Linder et al., 1998; Moline and Linder, 2005). Εντοπίζεται σε όλο το νότιο ημισφαίριο με περίπου 360 είδη στην Αφρική, 150 στην Αυστραλία, 4 στην Νέα Ζηλανδία, 1 στην νοτιοδυτική Ασία και 1 στην Νότια Αμερική (Εικόνα 1) (Dorrat-Haaksma and Linder, 2012; Linder et al., 1998). Οι πιο πλούσιες περιοχές σε αριθμό ειδών είναι η νοτιοδυτική Αυστραλία και η Νότια Αφρική. Στην πλειοψηφία τους τα φυτά της οικογένειας είναι δίοικα και όλα επικονιάζονται με την βοήθεια του ανέμου (ανεμογαμία). Τα αφρικανικά είδη φύονται σε ένα μεγάλο εύρος βιοτόπων, από αμμόλοφους μέχρι βάλτους με στάσιμα νερά. Η χλωρίδα της περιοχής “Cape Floristic Region” (Εικόνα 2) παρουσιάζει μοναδικότητα και ονομάζεται fynbos, δηλαδή ωραίος θάμνος (fine bush) (Εικόνα 3) (Aston Philander, 2011; Dorrat-Haaksma and Linder, 2012; Linder et al., 1998). Στα fynbos τα είδη της οικογένειας αποτελούν ένα τόσο μεγάλο κομμάτι της χλωρίδας που παίζουν καθοριστικό ρόλο στις βιολογικές και οικολογικές ισορροπίες των βιοτόπων αυτής της συγκεκριμένης βλάστησης. Ο τρόπος εξάπλωσης στο νότιο ημισφαίριο υποδηλώνει ότι η οικογένεια είναι αρχαία και χρονολογείται από το τέλος της Κρητιδικής περιόδου, πάνω από 60εκ. χρόνια πριν, όταν δηλαδή οι ήπειροι του νοτίου ημισφαιρίου ήταν ακόμα ενωμένες υπό την μορφή της υπερηπείρου Γκοντβάνα. Η υπόθεση αυτή βασίζεται σε ευρήματα απολιθωμένων κόκκων γύρης στην Νότια Αφρική. Πιο συγκεκριμένα, η οικογένεια πιθανών είχε εξαπλωθεί στο μεγαλύτερο μέρος της ηπείρου με αποτέλεσμα όταν αυτή διαχωρίστηκε η κάθε νέα ήπειρος διατήρησε μόνο το δικό της σύνολο που είχε την στιγμή που συνέβη ο διαχωρισμός. Ωστόσο, μια άλλη θεωρία υποστηρίζει ότι η οικογένεια διάσχισε τον Ειρηνικό ωκεανό πριν 30 εκατομμύρια χρόνια, το οποίο από εξελικτικής άποψης είναι αρκετά πρόσφατα και οδήγησε στην εμφάνιση του ενός είδους που βρίσκεται στη Νότια Αμερική, *Apodasmia chilensis*. Το είδος αυτό είναι εξελικτικά κοντά με ένα είδος που εντοπίζεται στην Νέα Ζηλανδία, το οποίο και αναπτύσσεται σε πολύ παρόμοιες περιβαλλοντικές συνθήκες, πράγμα που ενισχύει την υπόθεση αυτή (Dorrat-Haaksma and Linder, 2012).



Εικόνα 1. Παγκόσμια κατανομή της οικογένειας Restionaceae. Με πράσινο χρώμα φαίνονται τα σημεία όπου εντοπίζεται η συγκεκριμένη οικογένεια (Dorrat-Haaksma and Linder, 2012).



Εικόνα 2 Απεικόνιση της περιοχής που αναφέρεται ως "Cape Floristic Region" στην Νότια Αφρική (Moline and Linder, 2006)

THE FYNBOS REGION



Εικόνα 3 Η γεωγραφική θέση της αφρικανικής βλάστης "fynbos" στη Νότια Αφρική (Dorrat-Haaksma and Linder, 2012)

Η οικογένεια συγγενεύει με τα αγρωστώδη και τις κυπερίδες (Dorrat-Haaksma and Linder, 2012). Εξωτερικά, τα φυτά αυτών των κατηγοριών μοιάζουν ιδιαίτερα πολύ, και μάλιστα μελέτες έχουν φανερώσει στοιχεία που υποστηρίζουν την πολύ στενή συγγένεια που εμφανίζουν. Η οικογένεια έχει μελετηθεί φυλογενετικά για περισσότερα από 200 χρόνια (Linder, 2011) και χωρίζεται σε 4 υποοικογένειες: Restionioideae, Sporadanthoideae, Leptocarpoideae, Centrolepidoideae και Anarthriaceae (Πίνακας 1) (Dorrat-Haaksma and Linder, 2012).

Τα αφρικανικά είδη ανήκουν όλα στην υποοικογένεια Restionioideae (Πίνακας 2) που αποτελείται από περίπου 357 είδη και 16 γένη (Briggs and Linder, 2009; Dorrat-Haaksma and Linder, 2012; Linder, 2018, 2011). Η πλειοψηφία των ειδών αυτών εντοπίζεται στο δυτικό Κέιπ. Η υποοικογένεια Restionioideae χωρίζεται περαιτέρω σε 2 φυλές, Restioneae και Willdenowiae (Εικόνα 4) (Briggs and Linder, 2009; Dorrat-Haaksma and Linder, 2012). Η φυλή Willdenowiae περιέχει 8 γένη ενώ όλα τα υπόλοιπα ανήκουν στην Restioneae η οποία χωρίζεται εκ νέου σε ομάδες ανάλογα με το περιβάλλον ανάπτυξης των φυτών ή/και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους (Dorrat-Haaksma and Linder, 2012). Οι ομάδες αυτές είναι οι εξής: α) ομάδα Soroveta-

Platycaulos στην οποία ανήκουν τα γένη *Soroveta* και *Platycaulos*, β) ομάδα *Thamnochortus* στην οποία ανήκουν τα γένη *Thamnochortus*, *Staberoha* και *Rhodocoma*, γ) ομάδα *Elegia* στην οποία ανήκουν τα γένη *Elegia* και *Askidiosperma* (Moline and Linder, 2005) και δ) ομάδα *Restio* στην οποία ανήκει το γένος *Restio* (Dorrat-Haaksma and Linder, 2012). Γενικά, η φυλογενετική και ταξινομική μελέτη της οικογένειας έχει αποδεχθεί αρκετά απαιτητική και τροποποιείται μέχρι σήμερα ιδιαίτερα χάρις σε νέα γενετικά δεδομένα.

Πίνακας 1. Ταξινόμηση της οικογένειας Restionaceae (Briggs and Linder, 2009; Linder, 2011; Linder et al., 1998; Linder and Hardy, 2010; Moline and Linder, 2005)

www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=39216#null,

www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=14107&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock

Kingdom	Plantae
Subkingdom	Viridiplantae
Infrakingdom	Streptophyta
Superdivision	Embryophyta
Division	Tracheophyta
Subdivision	Spermatophyta
Class	Mangoliopsida
Superorder	Lilianae
Order	Poales
Family	Restionaceae
Subfamilies	Restionoideae, Sporadanthoideae, Leptocarpoideae, Centrolepidoideae, Anarthriaceae

Genera	<p><i>Acion</i> B.G. Briggs & L.A.S Johnson, <i>Alexgeorgea</i> Carlquist, <i>Anarthria</i> R. Br., <i>Anthochortus</i> Nees, <i>Aphelia</i> R. Br., <i>Apodasmia</i> B.G. Briggs & L.A.S Johnson, <i>Askidiosperma</i> Steud., <i>Baloskion</i> Raf., <i>Calopsis</i> Beauv., <i>Calorophus</i> Labill., <i>Cannomois</i> Beauv. Ex Desv., <i>Catacolea</i> B.G. Briggs & L.A.S. Johnson, <i>Centrolepis</i> Labill., <i>Ceratocaryum</i> Nees, <i>Chaetanthus</i> R. BR., <i>Chondropetalum</i> Rottb., <i>Chordifex</i> B.G. Briggs & L.A.S Johnson, <i>Coleocarya</i> S.T. Blake, <i>Cytogonidium</i> B.G. Briggs & L.A.S Johnson, <i>Dapsilanthus</i> B.G. Briggs & L.A.S Johnson., <i>Desmocladius</i> Nees, <i>Dielsia</i> Gilg, <i>Dovea</i> Kunth, <i>Elegia</i> L., <i>Empodisma</i> L.A.S. Johnson & D.F. Cutler, <i>Eurychorda</i> B.G. Briggs & L.A.S Johnson, <i>Gaimardia</i> Gaudich. <i>Guringalia</i> B.G. Briggs & L.A.S johnson, <i>Harperia</i> W. Fitzg., <i>Hopkinsia</i> W. Fitzg., <i>Hydrophilus</i> Linder, <i>Hypodiscus</i> Nees, <i>Hypolaena</i> R. Br., <i>Ischyrolepsis</i> Steud., <i>Kulinia</i> B.G. Briggs & L.A.S johnson, <i>Lepidobolus</i> Nees, <i>Leptocarpus</i> R. Br., <i>Lepyrodia</i> R. Br., <i>Loxocarya</i> R. Br., <i>Lyginia</i> R. Br., <i>Mastersiella</i> Gilg-Benedict, <i>Meeboldina</i> Suessenguth, <i>Melanostachya</i> B.G. Briggs & L.A.S Johnson, <i>Nevillea</i> Esterhuysen & Linder, <i>Onychosepalum</i> Steudel, <i>Platycaulos</i> Linder, <i>Platychora</i> B.G. Briggs & L.A.S Johnson, <i>Restio</i> Rottb., <i>Rhodocoma</i> Nees, <i>Saropsis</i> B.G. Briggs & L.A.S Johnson, <i>Soroveta</i> H.P.Linder & C.R. Hardy, <i>Sporadanthus</i> F. Muell., <i>Staberoha</i> Kunth, <i>Stenotalis</i> B.G. Briggs & L.A.S Johnson, <i>Taraxis</i> B.G. Briggs & L.A.S Johnson, <i>Thamnochortus</i> Berg., <i>Tremulina</i> B.G. Briggs & L.A.S Johnson, <i>Tyrbastes</i> B.G. Briggs & L.A.S Johnson, <i>Willdenowia</i> Thunb., <i>Winifredia</i> L.A.S Johnson & B.G. Briggs</p>
---------------	--

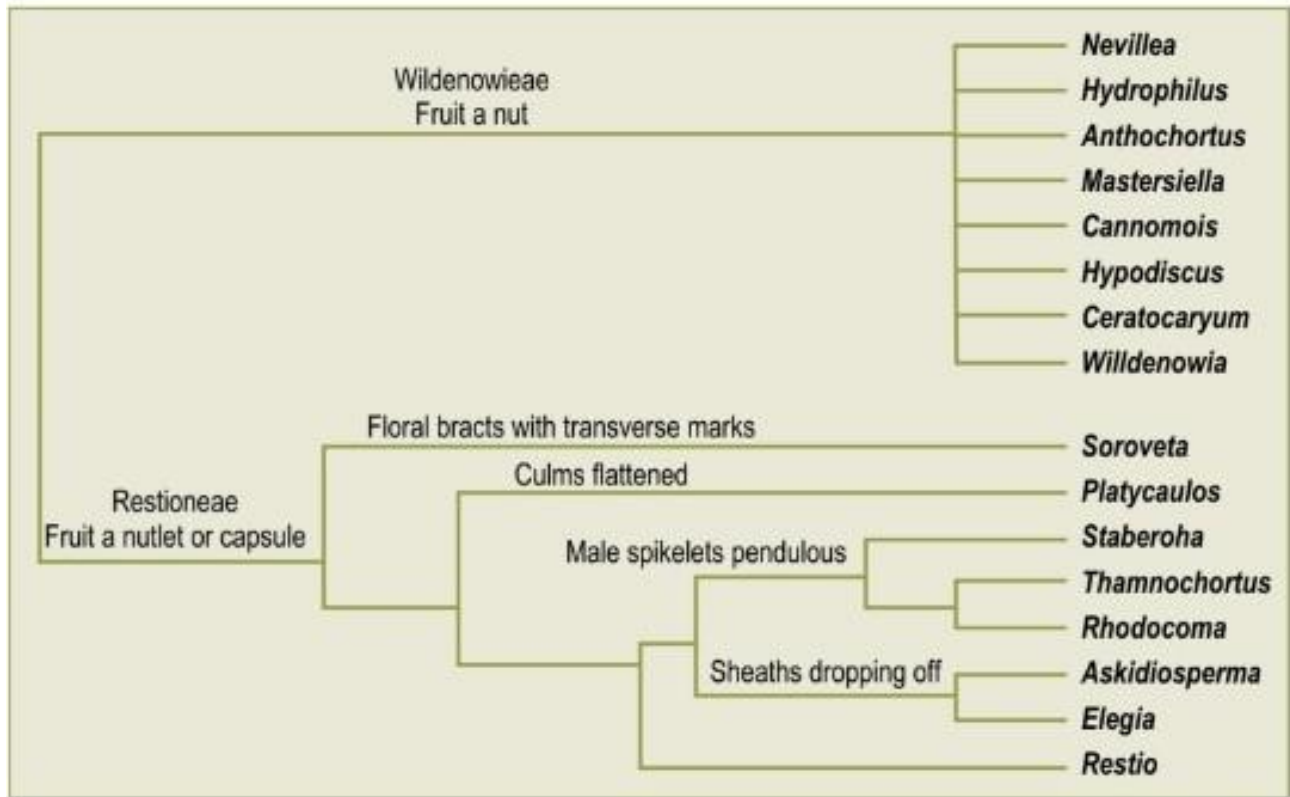
Πίνακας 2 Ταξινόμηση των αφρικανικών ειδών της οικογένειας Restionaceae (Briggs and Linder, 2009; Linder, 2011; Linder et al., 1998)

<https://www.systbot.uzh.ch/en/Bestimmungsschlüssel/Restionaceae.html>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=14107&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>

https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=39216#null

Kingdom	Plantae
Subkingdom	Viridiplantae
Infrakingdom	Streptophyta
Superdivision	Embryophyta
Division	Tracheophyta
Subdivision	Spermatophyta
Class	Mangoliopsida
Superorder	Lilianae
Order	Poales
Family	Restionaceae
Subfamily	Restionoideae
Tribes	Restioneae, Willdenowieae
Genera	<i>Anthochortus, Askiodiosperma, Cannomois, Ceratocaryum, Elegia, Hydrophilus, Hypodiscus, Mastersiella, Nevillea, Platycaulos, Restio, Rhodocoma, Soroveta, Staberoha, Thamnochortus, Willdenowia</i>



Εικόνα 4 Φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των ειδών της υποοικογένειας Restionoidae (Dorrat-Haaksma and Linder, 2012).

Το γένος *Elegia* L. αποτελεί το δεύτερο μεγαλύτερο της οικογένειας Restionaceae μετά το γένος *Restio*. Το γένος αυτό είναι ενδημικό της ευρύτερης νότιας και νοτιοδυτικής περιοχής του Κέιπ της Νοτίου Αφρικής (Εικόνα 5) (Linder et al., 1998). Ανήκει στην ομάδα *Elegia* και περιέχει 52 είδη (Πίνακας 3) (Linder, 2018; Linder and Hardy, 2010). Το πρώτο είδος που περιεγράφηκε είναι το *E. juncea* το οποίο ταξινομήθηκε από τον Κάρολο Λινναίο το 1771 (Moline and Linder, 2005). Ένας από τους πιο γνωστούς αντιπροσώπους του γένους είναι το είδος *E. tectorum* το οποίο φύεται κυρίως σε παράκτιες περιοχές και εντοπίζεται στο δυτικό και ανατολικό Κέιπ, στα βόρεια βουνά της προστατευμένης περιοχής με ονομασία “Cape Floristic Region”, στην δυτική ακτή της Νοτίου Αφρικής, στο ακρωτήριο του Κέιπ, στα νοτιοδυτικά βουνά της Νότιας Αφρικής και στην πεδιάδα “Bredasdorp”. Επίσης, είναι ευρέως διαδεδομένο από την περιοχή “Clanwilliam” έως την περιοχή “Port Elizabeth”(Εικόνα 6) (Dorrat-Haaksma and Linder, 2012; Linder, 2018; Linder et al., 1998). Η βοτανική κατάταξη του οποίου παρουσιάζεται στον Πίνακα 4.



Εικόνα 5. Γεωγραφική εξάπλωση του γένους *Elegia* L. στη Νότια Αφρική

www.ville-ge.ch/musinfo/bd/cjb/africa/details.php?langue=an&id=190455



Εικόνα 6. Γεωγραφική εξάπλωση του είδους *E. tectorum* στη Νότια Αφρική

www.ville-ge.ch/musinfo/bd/cjb/africa/details.php?langue=an&id=223929

Πίνακας 3. Ταξινόμηση των ειδών του γένους *Elegia* L.(Linder, 2011; Linder and Hardy, 2010; Linder and Helme, 2015; Moline and Linder, 2005)

www.systbot.uzh.ch/en/Bestimmungsschlüssel/Restionaceae;

www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?name=Anarthriaceae

Είδη του γένους <i>Elegia</i> L.	
Βοτανική ονομασία	Συνώνυμα
<i>E. acockii</i> (Pillans) Moline & H.P.Linder	<i>Chondropetalum acockii</i> Pillans
<i>E. aggregata</i> (Mast.) Moline & H.P.Linder	<i>Chondropetalum aggregatum</i> (Mast) Pillans <i>Dovea aggregata</i> Mast.
<i>E. altigena</i> Pillans	-
<i>E. amoena</i> Pillans	-
<i>E. asperiflora</i> (Nees) Kunth	<i>E. ciliate</i> Mast. <i>E. glauca</i> Mast. <i>E. lacerate</i> Pillans <i>Restio asperiflorus</i> Nees
<i>E. atratiflora</i> Esterh.	-
<i>E. caespitosa</i> Esterh.	-
<i>E. capensis</i> (Burm.f.) Schelpe	<i>E. verticillaris</i> (L.f.) Kunth <i>Equisetum capense</i> Burm <i>Restio verticillaris</i> L.f.
<i>E. coleura</i> Nees ex Mast.	<i>E. exilis</i> Mast.
<i>E. cuspidata</i> Mast.	-
<i>E. decipiens</i> (Esterh.) Moline & H.P.Linder	<i>Chondropetalum decipiens</i> Esterh.
<i>E. deusta</i> (Rottb.) Kunth	<i>Chondropetalum deustum</i> Rottb. <i>Restio chondropetalum</i> Nees
<i>E. dregeana</i> Kunth	-
<i>E. ebracteata</i> (Kunth) Moline & H.P.Linder	<i>Chondropetalum ebracteatum</i> (Kunth) Pillans <i>Dovea ebracteate</i> Kunth
<i>E. elephantina</i> H.P.Linder	-
<i>E. equisetacea</i> Mast.	<i>E. propinqua</i> (Nees) Kunth

<i>E. esterhuyseniae</i> Pillans	-
<i>E. extensa</i> Pillans	-
<i>E. fastigiata</i> Mast.	-
<i>E. fenestrata</i> Pillans	-
<i>E. filacea</i> Mast.	<i>E. gracilis</i> N.E.Br. <i>E. parviflora</i> Pillans, <i>E. rehmanni</i> Mast.
<i>E. fistulosa</i> Kunth	-
<i>E. fucata</i> Esterh.	-
<i>E. galpinii</i> N.E.Br.	-
<i>E. grandis</i> (Nees) Kunth	<i>Lamprocaulis grandis</i> (Nees) Mast. <i>Restio grandis</i> Spreng. Ex Nees
<i>E. grandispicata</i> H.P.Linder	-
<i>E. hookeriana</i> (Mast.) Moline & H.P.Linder	<i>Chondropetalum hookerianum</i> (Mast.) Pillans <i>Dovea bolusii</i> Mast. <i>Dovea hookeriana</i> Mast.
<i>E. hutchinsonii</i> Pillans	-
<i>E. intermedia</i> (Steud.) Pillans	<i>E. membranacea</i> (Nees) Kunth. <i>Restio intermedius</i> Steud. <i>Restio membranaceus</i> Nees
<i>E. juncea</i> L.	<i>E. propinqua</i> (Nees) Kunth <i>Restio elegia</i> Murray <i>Restio propinquus</i> Nees
<i>E. macrocarpa</i> (Kunth) Moline & H.P.Linder	<i>Chondropetalum macrocarpum</i> (Kunth) Kunth <i>Dovea macrocarpa</i> Kunth
<i>E. marlothii</i> (Pillans) Moline & H.P.Linder	<i>Chondropetalum marlothii</i> (Pillans) Pillans <i>Dovea marlothii</i> Pillans
<i>E. microcarpa</i> (Kunth) Moline & H.P.Linder	<i>Chondropetalum microcarpum</i> (Kunth) Pillans <i>Dovea rigens</i> Mast. <i>Dovea microcarpa</i> Kunth

<i>E. mucronata</i> (Nees) Kunth	<i>Chondropetalum mucronatum</i> (Nees) Pillans <i>Dovea mucronata</i> (Nees) Mast. <i>E. panicoides</i> Kunth <i>Restio mucronatus</i> Nees
<i>E. muirii</i> Pillans	-
<i>E. namaquense</i> H.P.Linder & Helme	-
<i>E. neesii</i> Mast.	<i>Lamprocaulis neesii</i> (Mast.) Mast. <i>Lamprocaulis schlechteri</i> Gilg-Ben.
<i>E. nuda</i> (Rottb.) Kunth	<i>Chondropetalum nudum</i> Rottb. <i>Cuculiera dura</i> Nees <i>E. elongata</i> Mast. <i>Restio acuminatus</i> Thunb. <i>Restio nudus</i> (Rottb.) Nees
<i>E. persistens</i> Mast.	-
<i>E. prominens</i> Pillans	-
<i>E. racemosa</i> (Poir.) Pers.	<i>E. bella</i> Pillans <i>E. fusca</i> N.E. Br. <i>Restio racemose</i> Poir.
<i>E. recta</i> (Mast.) Moline & H.P.Linder	<i>Dovea recta</i> Mast.
<i>E. rigida</i> Mast.	<i>E. obtusiflora</i> Mast. <i>E. parviflora</i> Pillans <i>E. spathacea</i> Mast.
<i>E. spathacea</i> Mast.	-
<i>E. squamosa</i> Mast.	<i>E. pectinata</i> Pillans
<i>E. stipularis</i> Mast.	-
<i>E. stokoei</i> Pillans	-
<i>E. tectorum</i> (L.f.) Moline & H.P.Linder	<i>Chondropetalum tectorum</i> (L.f.) Raf. <i>Dovea cylindrostachya</i> Mast. <i>Dovea tectorum</i> (L.f.) Mast. <i>E. tectorumi</i> (Mast.) Moline and H.P. Linder

	<i>Restio tectorum</i> L.f.
<i>E. thyrsoifera</i> (Roth.) Pers.	<i>E. acuminata</i> Mast. <i>Restio thyrsoifer</i> Rottb.
<i>E. thyrsoidea</i> (Mast.) Pillans	<i>Dovea thyrsoidea</i> Mast.
<i>E. vaginulata</i> Mast.	-
<i>E. verreauxii</i> Mast.	-

Πίνακας 4. Ταξινόμηση του είδους *E. tectorum* (Hardy et al., 2008; Linder and Hardy, 2010; Moline and Linder, 2005)

<https://www.systbot.uzh.ch/en/Bestimmungsschluessel/Restionaceae>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=311269&lvl=3&lin=f&k&eep=1&srchmode=1&unlock>

<http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/48fcf73435dfbda3673a6155dc54a975>

Kingdom	Plantae
Subkingdom	Viridiplantae
Infrakingdom	Streptophyta
Superdivision	Embryophyta
Division	Tracheophyta
Subdivision	Spermatophyta
Class	Mangoliopsida
Superorder	Lilianaes
Order	Poales
Family	Restionaceae
Subfamily	Restionoideae
Tribe	Restioneae
Genus	<i>Elegia</i>
Species	<i>E. tectorum</i> (L.f.) Moline & H.P. Linder

Α2.Βοτανική Περιγραφή

Τα φυτά του είδους *E. tectorum* είναι φουντωτά, με συμπαγή σχηματισμό που ευρύνεται από την βάση προς την κορυφή (Εικόνα 8). Η διάμετρος της βάσης



Εικόνα 7. Κολεός του *E. tectorum*

www.systbot.uzh.ch/de/Bestimmungsschluessel/Restionaceae

και της στεφάνης είναι 0.1-0.3m και 0.3-1m αντίστοιχα. Το ύψος τους κυμαίνεται από 0.5 έως 1m. Σε αντίθεση με την πλειοψηφία των ειδών του γένους δεν φέρουν ριζώματα ή στόλωνες (παραφυάδες). Από το ριζικό τους σύστημα που είναι πολύ μικρό, ξεπετάγονται οι βλαστοί (καλάμια) είτε διάσπαρτοι είτε συσσωρευμένοι στην βάση μερικώς διακλαδιζόμενοι ή χωρίς διακλαδώσεις. Οι βλαστοί με διάμετρο 3-4.5mm είναι ομοιόμορφα κατανεμημένοι σε απόσταση μεταξύ τους 5-40mm. Είναι το μόνο πράσινο τμήμα του φυτού και

για αυτό είναι το μοναδικό σημείο στο οποίο πραγματοποιείται η φωτοσύνθεση. Οι γόνιμοι βλαστοί είναι μη διακλαδιζόμενοι, στρογγυλοί συμπαγείς ή με μια μικρή κεντρική κοιλότητα, λείοι ή ρυτιδωμένοι πράσινοι ή φαιοπράσινοι, με ύψος 0.4-1m και διάμετρο στην βάση και στην κορυφή 0.7-3mm και 0.8-1.5mm αντίστοιχα. Απουσιάζουν τριχίδια από τις μασχάλες των βλαστών και συστάδες άγονων βλαστών στους κόμβους (γόνατα) των γόνιμων βλαστών.

Δεν φέρουν φύλλα και τα ελάσματα έχουν πέσει αφήνοντας μόνο τους κολεούς μήκους 13–25mm, οι οποίοι είναι κοκκινωποί έως βαθύ καφέ με λεπτά στίγματα και τόνους μαύρου και ελαφρώς γυαλιστεροί.



Εικόνα 8. *E. tectorum*

www.systbot.uzh.ch/de/Bestimmungsschluesse/Restionaceae

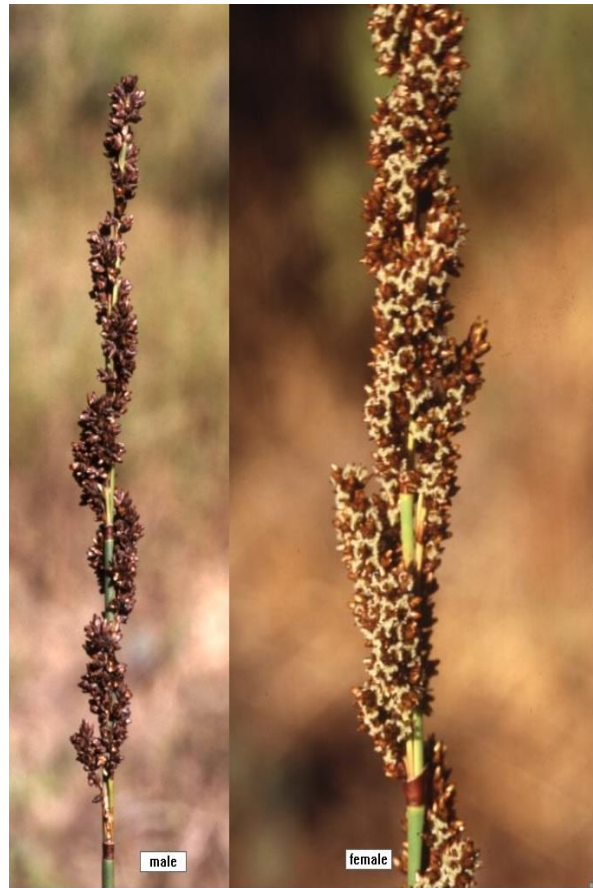
Η αρσενική ταξιανθία (Εικόνα 9) είναι στάχυς και συνήθως φέρει από 50 έως 300 σταχίδια. Έχουν μήκος 40-250mm και πλάτος 10-18mm. Τα σταχύδια έχουν μήκος 2-3mm και φέρουν 5-7 άνθη. Οι σπάθες είναι πεσμένες, μακρύτερες από τα σταχύδια, ενώ, τα βράκτια είναι μικρότερα των ανθών με μήκος 1.2-1.5mm, ωοειδή ή σφαιρικά, στρογγυλεμένα ή αμβλεία. Τα αρσενικά άνθη έχουν μήκος 1.5-2mm και φέρουν τέπαλα, σέπαλα και πέταλα ίδιας υφής και ωοειδούς σχήματος. Οι ανθήρες βρίσκονται εσωτερικά του άνθους και έχουν 0.4-0.6mm μήκος.

Η θηλυκή ταξιανθία (Εικόνα 9) είναι μικρότερη με μήκος 15-160mm και 15-25mm πλάτος και μπορεί να φέρει από 21 έως 500 σταχύδια. Παρόμοια, με την αρσενική ταξιανθία οι σπάθες είναι μακρύτερες από τα σταχύδια ενώ τα βράκτια είναι μικρότερα των άνθεων με μήκος 1-1.4mm και σχήμα ίδιο με αυτό των αρσενικών ταξιανθιών. Τα σταχύδια έχουν μήκος 2.2.-2.8mm με 3-5 άνθη. Τα θηλυκά άνθη έχουν μήκος 1.5-

2.3mm με έξι τέπαλα. Τα τέπαλα του περιάνθιου είναι βαθυκαστανόχροα έως μαύρα και ομοιόμορφα. Τα πέταλα είναι μακρύτερα από τα σέπαλα. Τα άνθη περιέχουν 3 λευκούς, τριχοειδείς στύλους και η ωοθήκη περιέχει 3 κοιλότητες. Η άνθιση λαμβάνει χώρα την άνοιξη από τον Απρίλιο μέχρι τον Ιούνιο.

Οι καρποί έχουν καφέ χρώμα και σχήμα κάψουλας με μήκος 0.66mm και διάμετρο 0.38mm. Αποτελούνται από 3 θαλάμους στους οποίους εντοπίζονται τα σπέρματα. Ο τρόπος διασποράς των σπόρων είναι ο άνεμος και τα φυτά είναι δίοικα.

Φύονται σε υψόμετρο 10-600m, σε έλη, κοιλάδες και στην χαρακτηριστική χλωρίδα της Νότιας Αφρικής που ονομάζεται “fynbos”. Ιδιαίτερα συχνό είδος σε εποχιακούς υγρούς βιότοπους με αμμώδη εδάφη. Στις πεδιάδες του “Bredasdorp” το είδος σχηματίζει εκτεταμένες ζώνες στις ρηχές



Εικόνα 9. Αρσενική και θηλυκή ταξιανθία του *E. tectorum*

www.systbot.uzh.ch/de/Bestimmungsschlüssel/Restionaceae

επίπεδες κοιλότητες που αφθονούν στην περιοχή, ενώ στις υπόλοιπες περιοχές είναι χαρακτηριστικό των τάφρων και των αμμωδών πεδιάδων, και συχνά πολλαπλασιάζεται στα χαντάκια των δρόμων.

Επιπρόσθετα, αναφέρεται ότι είναι συγγενές με το είδος *E. nuda* αλλά διαφέρει στα τέπαλα και στη διάμετρο του καλαμιού. Στη δυτική ακτή της Νοτίου Αφρικής έχει αντικατασταθεί από το *Chondropetalum elephantinum* από το οποίο διαφέρει ελάχιστα (Dorrat-Haaksma and Linder, 2012; Linder, 2018).

Αξίζει να σημειωθεί ότι η αντοχή στη φωτιά ή/και η εκμετάλλευσή της ως εργαλείο επιβίωσης και εξάπλωσης είναι ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό όλων των “restios”. Υπάρχουν 2 διαφορετικοί μηχανισμοί που παρατηρούνται και είναι α) είτε τα φυτά καταστρέφονται από την φωτιά και βλαστάνουν ξανά μέσω των σπερμάτων (Εικόνα 10), β) είτε επιβιώνουν ως ριζώματα που εντοπίζονται υπογείως και βλαστάνουν από αυτά (Dorrat-Haaksma and Linder, 2012; Linder et al., 1998). Επιπλέον, παρατηρείται μεγάλη διαφορά στην φυσιολογία και μορφολογία των φυτών ανάλογα τον μηχανισμό επιβίωσής τους. Φυτά που βλαστάνουν μέσω ριζωμάτων αποθηκεύουν σε αυτά μεγάλες ποσότητες φωτοσυνθετικών προϊόντων. Με αυτό τον τρόπο μπορούν να αναπτυχθούν πολύ γρήγορα και να επανέρθουν σε πλήρη φωτοσυνθετική ικανότητα μετά από φωτιά σε συντομότερο χρονικό διάστημα από άλλα είδη αποκτώντας έτσι ανταγωνιστικό και άρα εξελικτικό πλεονέκτημα. Ωστόσο λόγω της περιορισμένης αποθηκευτικής ικανότητας τα φυτά που αναπτύσσονται μετά από πυρκαγιά φέρουν μικρότερες ταξιανθίες με μικρότερα άνθη και μικρότερα σπέρματα σε σύγκριση με τα φυτά που έχουν υιοθετήσει τον δεύτερο μηχανισμό. Σε αντίθεση, τα φυτά που επιβιώνουν μέσω των σπόρων τους εμφανίζουν πιο αργούς ρυθμούς ανάπτυξης και μπορεί να περάσουν 2 ή 3 χρόνια μέχρι να δημιουργήσουν άνθη. Ωστόσο, μακροπρόθεσμα τα είδη αυτού του μηχανισμού γίνονται ψηλότερα, έχουν μεγαλύτερες ταξιανθίες και μεγαλύτερο αριθμό σπερμάτων. Τα φυτά με τα ριζώματα εντοπίζονται πιο διασκορπισμένα στο τοπίο, ενώ τα φυτά που βλαστάνουν εκ νέου με σπέρματα σχηματίζουν πυκνές ομάδες. Αυτό μάλλον συμβαίνει λόγω των πολλών φυτών που μπορούν να προκύψουν από ένα μόνο άτομο μέσω των σπόρων, ενώ από τα ριζώματα ενός φυτού μπορεί να προκύψει πάλι μόνο ένα. Βέβαια, τα φυτά με ριζώματα πλεονεκτούν σε περιπτώσεις, όπου το χρονικό διάστημα μεταξύ των πυρκαγιών είναι μικρότερο από το διάστημα που απαιτείται για να προλάβουν να αναπτυχθούν τα σπέρματα. Συχνά, εντοπίζονται περιοχές όπου υπάρχουν μόνο είδη με ριζώματα υποδηλώνοντας ότι κάποια περιστατικά πυρκαγιών σε μικρό χρονικό διάστημα μεταξύ τους οδήγησαν στην εξαφάνιση των

ειδών που βλαστάνουν εκ νέου μέσω σπερμάτων. Η ταξινόμηση των Restionaceae με βάση τον μηχανισμό επιβίωσης δεν έχει ολοκληρωθεί ακόμα ωστόσο οι μελέτες ως τώρα υποδεικνύουν μια ισοκατανομή, δηλαδή συνολικά τα είδη κατανέμονται ομοιόμορφα στις 2 ομάδες χωρίς να υπάρχει κάποια προτίμηση ή κάποιο εξελικτικό πλεονέκτημα που θα έδινε αριθμητικό προβάδισμα στον ένα μηχανισμό έναντι του άλλου (Dorrat-Haaksma and Linder, 2012).



Εικόνα 10. Νέοι βλαστοί από σπέρματα είδους της οικογένειας Restionaceae που επιβίωσαν μετά από πυρκαγιά. Το τοπίο είναι όλο κατεστραμμένο εκτός από τους πράσινους νέους βλαστούς που αναπτύσσονται με ραγδαίους ρυθμούς (Dorrat-Haaksma and Linder, 2012).

Α3. Δρογοετυμολογία - Δρογοϊστορία - Δρογοφαρμακολογία

Το όνομα του γένους *Elegia* έχει ελληνική προέλευση και προέρχεται από την αρχαιοελληνική λέξη «ελεγεία» που σημαίνει ωδή και έχει ρίζα την λέξη έλεγος που σήμαινε θρήνος, θρηνητικό, πένθιμο τραγούδι με την συνοδεία αυλού. Η λέξη αργότερα λατινοποιήθηκε και χρησιμοποιήθηκε από τον Πλίνιο για να περιγράψει ένα είδος αυλού (Linder and Hardy, 2010). Σήμερα η αγγλική λέξη “reed” αναφέρεται τόσο σε αυλό όσο και σε καλάμι. Η λέξη tectorum από το όνομα του είδους *E. tectorum* έχει λατινική προέλευση και σημαίνει «αυτό που χρησιμοποιείται για κάλυψη» (Linder, 2018).

Πολλά είδη της οικογένειας Restionaceae έβρισκαν εφαρμογή ως οικοδομικά υλικά στις περιοχές της Νότιας Αφρικής πιθανόν πολλούς αιώνες πριν τις πρώτες Ευρωπαϊκές αποικίες. Πολλά παραδείγματα από κατασκευές υπάρχουν μέχρι και σήμερα σε περιοχές όπου οι παραδοσιακοί οικισμοί συνεχίζονται να χτίζονται και να συντηρούνται με τους ίδιους τρόπους (Εικόνα 11). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται τα στελέχη των φυτών αυτών για την κατασκευή διαφόρων τμημάτων των οικισμών όπως τοίχους και σκεπές που θυμίζουν παραδοσιακές σκεπές (Dorrat-Haaksma and Linder, 2012; Linder et al., 1998). Κατά την διάρκεια της παρουσίας της “Dutch East India Company” στην περιοχή του Δυτικού Κέιπ το *E. tectorum* ήταν ένα από τα βασικά είδη που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των σκεπών (thatching). Μάλιστα, λόγω της έντονης παρουσίας του στην χλωρίδα της γύρω περιοχής, πιθανολογείται ότι ήταν το κύριο φυτό που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή των σκεπών του σημερινού Κέιπ Τάουν πριν αρκετούς αιώνες. Για το λόγο αυτό έχει κερδίσει την κοινή ονομασία Dak riet που σε ελεύθερη μετάφραση σημαίνει το καλάμι της σκεπής (roof reed) (Linder, 2018). Σήμερα, πωλείται ευρέως ως καλλωπιστικό φυτό για την διακόσμηση κήπων, ενώ η κατασκευή των σκεπών πραγματοποιείται κυρίως με το *Thamnochortus insignis* από το νότιο Κέιπ λόγω των μεγαλύτερων στελεχών που διαθέτει (Dorrat-Haaksma and Linder, 2012; Linder et al., 1998).



Εικόνα 11. Παραδείγματα σκεπών και ολόκληρων οικισμάτων κατασκευασμένα με την χρήση διαφόρων ειδών της οικογένειας Restionaceae (Dorrat-Haaksma and Linder, 2012).

Η χρήση παραδοσιακών συνταγών και βοτάνων είναι αναπόσπαστο κομμάτι της κουλτούρας και της θρησκευτικής ζωής των αφρικανικών πληθυσμών (Steenkamp, 2003). Πιθανολογείται ότι πάνω από το 80% του πληθυσμού της Νοτίου Αφρικής έχει συμβουλευτεί τουλάχιστον μια φορά τοπικούς θεραπευτές που χρησιμοποιούν παραδοσιακές μεθόδους και σκευάσματα που βασίζονται σε τμήματα φυτικών οργανισμών της τοπικής χλωρίδας (Kelmanson et al., 2000; Steenkamp, 2003). Η Νότια Αφρική έχει μια πληθώρα από φυλές, η καθεμία από τις οποίες χρησιμοποιεί τις δικές της παραδοσιακές συνταγές και χρησιμοποιεί τα δικά της φυτικά σκευάσματα χωρίς να λείπουν όμως οι ομοιότητες. Συγκεκριμένα, 1032 είδη έχουν χαρακτηριστεί ως θεραπευτικά φυτά των “Zulu”, 166 ως θεραπευτικά των “Xhosa” και 177 των “Khoisan”. Συνολικά, υπάρχουν πάνω από 3000 φαρμακευτικά είδη στην Νότια Αφρική και πιθανολογείται ότι 533 φαρμακευτικά είδη εντοπίζονται στην περιοχή του Κέιπ (Aston Philander, 2011). Παρά τον μεγάλο αριθμό φαρμακευτικών ειδών και της μεγάλης συμμετοχής των “restios” στην τοπική

γλωρίδα μόνο 4 είδη της οικογένειας Restionaceae έχουν καταγραφεί ότι χρησιμοποιούνται παραδοσιακά, αλλά η χρήση τους περιορίζεται μόνο στην κατασκευή εργαλείων όπως βουρτσών, πινέλων και ξεσκονόπανων (Aston Philander, 2011).

Η προφανής, λοιπόν, απουσία φαρμακολογικών μελετών ήταν ένα έναυσμα για την μελέτη του γένους *Elegia*. Ωστόσο, μια νέα μελέτη στην οποία μελετήθηκαν φαρμακολογικά διάφορα φυτικά είδη της Νότιας Αφρικής έδειξε ότι το *E. tectorum* έχει σημαντική αντιρυτιδική δράση. Συγκεκριμένα, διερευνήθηκαν είκοσι επτά αυτοφυή φυτά της Νότιας Αφρικής για τη θεραπεία της ακμής, της υπερμελάγχρωσης του δέρματος, των ρυτίδων, των περιοδοντικών παθήσεων, της φυματίωσης και του καρκίνου. Το αιθανολικό εκχύλισμα του *E. tectorum* μελετήθηκε για την αντιβακτηριδιακή του δράση έναντι των *Cutibacterium acnes*, *Prevotella intermedia*, *Streptococcus mutans*, *Mycobacterium tuberculosis* και *M. smegmatis*. Επιπλέον, το εκχύλισμα αιθανόλης διερευνήθηκε για ανασταλτική δράση έναντι της ελαστάσης και της τυροσινάσης, ένζυμα που σχετίζονται με το σχηματισμό ρυτίδων και της μελάγχρωσης, αντίστοιχα. Περαιτέρω, τα αιθανολικά εκχυλίσματα των φυτών δοκιμάστηκαν έναντι κυτταρικών σειρών HaCat, MEL-1, MCF-7 και HeLa για τον έλεγχο κυτταροτοξικότητας και αντικαρκινικής δράσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το *E. tectorum* δεν εμφανίζει αντιβακτηριακή/αντιμυκητιασική ή αντικαρκινική δράση. Ωστόσο, εμφάνισε μέτρια δράση κατά της τυροσινάσης με τιμή IC_{50} $65,26 \pm 8,38$ $\mu\text{g/mL}$ και ισχυρή δράση κατά της ελαστάσης με τιμή IC_{50} $13,5 \pm 1,5$ $\mu\text{g/mL}$. Ιδιαίτερα, η ανασταλτική δράση του έναντι της ελαστάσης ήταν συγκρίσιμη με του ουρσολικού οξέος, έναν γνωστό αναστολέα της ελαστάσης. Αξίζει να σημειωθεί ότι μετά από διαδοχική υγρή/υγρή εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα και βουτανόλη ελήφθησαν τρία κλάσματα. Μεταξύ αυτών, το εναπομένον υδατικό κλάσμα είχε την υψηλότερη δράση κατά της ελαστάσης, αλλά η τιμή IC_{50} του ήταν χαμηλότερη σε σύγκριση με το αρχικό εκχύλισμα αιθανόλης. Επιπλέον, το υδατικό κλάσμα υποβλήθηκε σε πρόσθετες χρωματογραφικές τεχνικές και έδωσε έξι υποκλάσματα τα οποία κανένα από αυτά δεν έδειξε δράση κατά της ελαστάσης. Έτσι, συμπεράναν ότι η ανασταλτική δράση πιθανώς σχετίζεται με δράση συνέργειας μεταξύ των διαφορετικών χημικών ουσιών του αιθανολικού εκχυλίσματος (Lall, 2020).

Σε μια κλινική μελέτη, η *E. tectorum* δοκιμάστηκε για ερεθισμό του δέρματος σε είκοσι άτομα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι έχει ήπια ερεθιστική δράση. Παρ' όλα αυτά, όταν μορφοποιήθηκε σε τελικό προϊόν τοπικής χρήσης και ελέγχθηκε τοπικά δεν εμφάνισε κάποιο ερεθισμό στο δέρμα. Επίσης, εξετάστηκε η αντιρυτιδική δράση της *E. tectorum* σε είκοσι έξι Καυκάσιες γυναίκες με

φωτότυπους δέρματος κατά Fitzpatrick I έως III. Αναφέρθηκε ότι το προϊόν δοκιμής, σε σύγκριση με εικονικό φάρμακο, ήταν αποτελεσματικό στη μείωση του βάθους των ρυτίδων μετά από 28 ημέρες χρήσης με ρυθμό εφαρμογής δύο φορές την ημέρα (Lall, 2020).

A4. Δρογοχημεία

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι φυτοχημικές μελέτες που έχουν γίνει σε φυτά της οικογένειας Restionaceae επικεντρώνονται στα φλαβονοειδή (Briggs and Linder, 2009). Στον Πίνακα 5 καταγράφονται τα φλαβονοειδή του γένους *Elegia* L., που έχουν ευρεθεί μέχρι σήμερα.

Τα είδη φέρουν μεγάλες διαφορές ανάλογα με την γεωγραφική προέλευση. Τα αφρικανικά είδη περιέχουν γνωστούς γλυκοσίδες φλαβονολών/ φλαβονών και C-γλυκοσίδες φλαβονών. Στα γένη *Chondropetalum* και *Elegia* εντοπίζονται γλυκοσίδες μυρικετίνης. Πιο συγκεκριμένα, φέρουν 3-O-γαλακτοσίδη μυρικετίνης, 3-μεθυλοαιθέρα της μυρικετίνης, την λαρισετίνη και τον 3',5'-διμεθυλαιθέρα της μυρικετίνης, την συριγγετίνη. Τα 2 αυτά γένη είναι παρόμοια ως προς την σύστασή τους σε φλαβονοειδή και διαφέρουν αρκετά από τα υπόλοιπα γένη που εντοπίζονται στην Αφρική. Επίσης, στην *E. parviflora* (Πίνακας. 5) εντοπίστηκαν σουλφιδικά φλαβονοειδή που είναι ιδιαίτερα σπάνια στην οικογένεια. Σε είδη της Αυστραλίας έχει βρεθεί 8-υδροξυφλαβονοειδή, ενώ τα περισσότερα στερούνται προανθοκυανιδινών, οι οποίες υπάρχουν σε όλα σχεδόν τα είδη της Αφρικής (Harborne, 1979).

Σε μελέτη όπου αναλύθηκαν 11 είδη του γένους *Chondropetalum* αποδείχθηκε ότι μέσα στο γένος υπάρχουν διαφορές στο χημικό προφίλ των φλαβονοειδών και πολλά είδη εμφάνιζαν παρόμοια χημική σύσταση με είδη του γένους *Elegia*. Μάλιστα, τα περισσότερα από τα εξεταζόμενα είδη σήμερα ανήκουν στο γένος *Elegia* και τα υπόλοιπα ανήκουν στο γένος *Askidiosperma*. Από τη συγκεκριμένη μελέτη εντοπίστηκαν δύο ομάδες όπου στην πρώτη ομάδα ανήκουν τα είδη που περιέχουν γλυκοσίδες μυρικετίνης, λαρισετίνης και συριγγετίνης, ενώ στη δεύτερη ομάδα περιλαμβάνονται τα είδη που περιέχουν καιμπερόλη, γκοσσυπετίνη, 7'-μεθυλαιθέρα της γκοσσυπετίνης και 4'-μεθυλαιθέρα της ερμπασετίνης. Επίσης, σε όλα τα είδη εντοπίστηκαν προανθοκυανιδίνες. Πιο συγκεκριμένα, στα είδη της πρώτης ομάδας βρέθηκε προκυανιδίνη και προδελφινιδίνη, ενώ στη δεύτερη ομάδα βρέθηκε μόνο προκυανιδίνη (Harborne et al., 1985).

Πίνακας 5. Δευτερογενείς μεταβολίτες του γένους *Elegia* L.

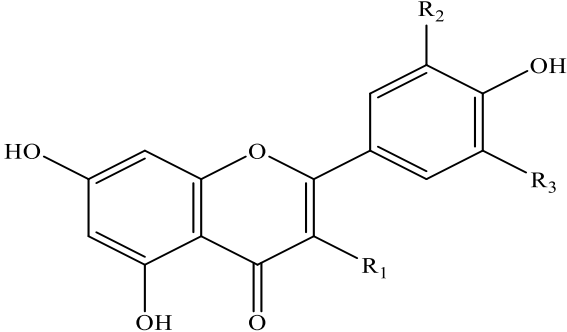
Είδος	Συνώνυμα	Συστατικά	Βιβλιογραφική Αναφορά/ες
<i>E. capensis</i> (Burm. F.) Schelpe	<i>Equisetum capense</i> Burm, <i>Restio verticillaris</i> L.f., <i>E. verticillaris</i> (L.f.) Kunth	Myricetin 3-galactoside My 3-arabinoside My 3-rhamnoside Quercetin 3-galactoside Procyanidin*	(Harborne, 1979)
<i>E. cuspidata</i> Mast.	-	Syringetin 3-galactoside Procyanidin*	(Harborne, 1979)
<i>E. deusta</i> (Rottb.) Kunth	<i>Chondropetalum deustum</i> Rottb., <i>Restio chondropetalum</i> Nees	My 3-galactoside My 3-rhamnoside Laricitrin 3-galactoside La 3-rhamnoside Sy 3-galactoside Sy 3-rhamnoside Procyanidin* Prodelphinidin*	(Harborne et al., 1985)
<i>E. filacea</i> Mast. <i>E. rigida</i> Mast.	<i>E. parviflora</i> Pillans, <i>E. gracilis</i> N.E.Br., <i>E. rehmanni</i> Mast. <i>E. parviflora</i> Pillans, <i>E. obtusiflora</i> Mast., <i>E. spathacea</i> Mast.	La 3-galactoside Sy 3-galactoside Procyanidin Sulphated flavonoids*	(Harborne, 1979)
<i>E. galpinii</i> N.E.Br.	-	My 3-galactoside Sy 3-galactoside La 3-galactoside La 3-diglycoside* Procyanidin*	(Harborne, 1979)

<i>E. hookeriana</i> (Mast.) Moline & H.P.Linder	<i>Dovea hookeriana</i> Mast., <i>Chondropetalum hookerianum</i> (Mast.) Pillans, <i>Dovea bolusii</i> Mast.	My 3-galactoside My 3-rhamnoside La 3-rhamnoside La 3-galactoside Sy 3-galactoside Sy 3-arabinoside Cyanidin 3-glycoside(anthocyanin)*	(Harborne, 1979; Harborne et al., 1985)
<i>E. macrocarpa</i> (Kunth) Moline & H.P.Linder	<i>Dovea macrocarpa</i> Kunth, <i>Chondropetalum macrocarpum</i> (Kunth) Kunth	Quercetin Kaempferol	(Harborne et al., 1985)
<i>E. microcarpa</i> (Kunth) Moline & H.P.Linder	<i>Dovea microcarpa</i> Kunth, <i>Chondropetalum microcarpum</i> (Kunth) Pillans, <i>Dovea rigens</i> Mast.	My 3-galactoside La 3-rhamnoside La 3-galactoside Sy 3-galactoside Sy 3-arabinoside Procyanidin* Prodelphinidin*	(Harborne et al., 1985)
<i>E. mucronata</i> (Nees) Kunth	<i>Restio mucronatus</i> Nees, <i>Dovea mucronate</i> (Nees) Mast., <i>Chondropetalum mucronatum</i> (Nees) Pillans, <i>E. panicoides</i> Kunth	My 3-galactoside Procyanidin* Prodelphinidin*	(Harborne, 1979; Harborne et al., 1985)
<i>E. nuda</i> (Rottb.) Kunth	<i>Chondropetalum nudum</i> Rottb., <i>Restio</i>	My 3-galactoside My 3-rhamnoside	(Harborne et al., 1985)

	<i>nudus</i> (Rottb.) Nees, <i>Restio acuminatus</i> Thunb., <i>Cuculiera</i> <i>dura</i> Nees, <i>E. elongata</i> Mast.	La 3-galactoside La 3-rhamnoside Sy 3-galactoside Procyanidin* Prodelphinidin*	
<i>E. persistens</i> Mast.	-	My 3-galactoside La 3-galactoside Sy 3-galactoside La 3-diglycoside* Procyanidin*	(Harborne, 1979)
<i>E. recta</i> (Mast.) Moline & H.P.Linder	<i>Dovea recta</i> Mast.	My 3-galactoside My 3-rhamnoside La 3-rhamnoside La 3-galactoside Sy 3-galactoside Sy 3-arabinoside Procyanidin* Prodelphinidin*	(Harborne et al., 1985)
<i>E. spathacea</i> Mast.	-	Sy 3-galactoside	(Harborne, 1979)
<i>E. tectorum</i> (L.f.) Moline & H.P.Linder	<i>Restio tectorum</i> L.f., <i>Dovea tectorum</i> (L.f.) Mast., <i>E. tectorumi</i> (Mast.) Moline and H.P. Linder, <i>Dovea</i> <i>cylindrostachya</i> Mast., <i>Chondropetalum</i> <i>tectorum</i> (L.f) Raf.	Sy 3-galactoside La 3-galactoside Procyanidin* Prodelphinidin*	(Harborne, 1979; Harborne et al., 1985)

My: Myricetin; Sy: Syringetin; La: Laricitrin; (*): Μη καθορισμένη χημική δομή

Πίνακας 6. Δομές φλαβονοειδών στο γένος *Elegia* L.

			
Χημική ονομασία	R ₁	R ₂	R ₃
Myricetin (1)	OH	OH	OH
Myricetin 3-galactoside (2)	O-gal	OH	OH
Myricetin 3-arabinoside (3)	O-ara	OH	OH
Myricetin 3-rhamnoside (4)	O-rha	OH	OH
Syringetin (5)	OH	OMe	OMe
Syringetin 3-galactoside (6)	O-gal	OMe	OMe
Syringetin 3-arabinoside (7)	O-ara	OMe	OMe
Syringetin 3-rhamnoside (8)	O-rha	OMe	OMe
Laricitrin (9)	OH	OMe	OH
Laricitrin 3-galactoside (10)	O-gal	OMe	OH
Lacitrin 3-arabinoside (11)	O-ara	OMe	OH
Laricitrin 3-rhamnoside (12)	O-rha	OMe	OH
Kaempferol (13)	OH	H	H
Quercetin (14)	OH	OH	H

gal: galactoside; rha: rhamnoside; ara: arabinoside

A5. Βιοπληροφορική

α. Τι είναι η βιοπληροφορική

Η βιοπληροφορική είναι ο τομέας της βιολογίας που χρησιμοποιεί υπολογιστικές μεθόδους για να μελετήσει και να χειριστεί τα βιολογικά δεδομένα που υπάρχουν διαθέσιμα ώστε να απαντήσει σε καίρια βιολογικά ερωτήματα (Baxevanis and Ouellette, 2001; Κοσσίδα, 2008). Περιγράφει τη δημιουργία και την πρόοδο των αλγόριθμων, των υπολογιστικών και στατιστικών και της θεωρίας για να επιλύσει τα πρακτικά προβλήματα που δημιουργούνται από την διαχείριση και την ανάλυση των βιολογικών δεδομένων (Κοσσίδα, 2008). Οπότε, η βιοπληροφορική παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των στατιστικών μεθόδων για την ανάλυση μεγάλων συνόλων δεδομένων και για την ανάπτυξη των μεθόδων διαχείρισης πληροφοριών για τους νέους τύπους δεδομένων που παράγονται (Κοσσίδα, 2008). Η βιοπληροφορική και η οπτική που δημιουργεί στην έρευνα ωθεί στην αλλαγή του θεμελιώδη τρόπου με τον οποίο γίνεται η έρευνα και βοηθάει στην δημιουργία πιο αποδοτικών πειραματικών μεθοδολογιών (Baxevanis and Ouellette, 2001).

β. Πού βρίσκει εφαρμογή η βιοπληροφορική

Οι τομείς τους οποίους βρίσκει χρήση η βιοπληροφορική είναι πολλοί και συνεχώς αυξάνονται, καθώς αυξάνονται και οι δυνατότητες και τα εργαλεία αυτής (Sharma and Sarkar, 2013; Κοσσίδα, 2008). Ένας σχετικά νέος τομέας είναι η μελέτη φυσικών προϊόντων. Οι παραδοσιακές μέθοδοι εύρεσης, ταυτοποίησης και απομόνωσης νέων ενώσεων συχνά είναι ιδιαίτερα χρονοβόρες, κοστοβόρες και αδυνατούν να συμβαδίσουν με την ραγδαία ανάπτυξη νέων αποδοτικότερων και συχνά πιο πράσινων τεχνολογιών. Οπότε, σε μια εποχή όπου η πληροφορία είναι τεράστια και χαοτική, η βιοπληροφορική μπορεί να έχει ένα πρωταγωνιστικό ρόλο στην μελέτη φαρμακευτικών φυτών και στην εύρεση νέων ενώσεων και φαρμάκων (Sharma and Sarkar, 2013). Μέχρι σήμερα έχει υπάρξει περιορισμένο ενδιαφέρον στην πιθανή εφαρμογή της βιοπληροφορικής στην αξιοποίηση των φυτικών ειδών στην χημεία των φυσικών προϊόντων (Sharma and Sarkar, 2013). Ωστόσο, ακόμα και αυτός ο περιορισμένος αριθμός μελετών έχει αποδείξει ότι η βιοπληροφορική μπορεί να παρέχει την δυνατότητα ταυτοποίησης γονιδίων, μονοπατιών και δικτύων που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση βιοδραστικών μεταβολιτών σε φαρμακευτικά φυτά (Sharma and Sarkar, 2013).

Ένας ακόμα πολύ σημαντικός λόγος για τον οποίο η βιοπληροφορική μπορεί να αποτελέσει σοβαρό εργαλείο της χημείας φυσικών προϊόντων είναι η αδυναμία των κλασσικών μεθόδων να αποκαλύψουν το σύνολο των βιοσυνθετικών προϊόντων. Αυτό συμβαίνει διότι η βιοσύνθεση επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από πολλούς αβιοτικούς και βιοτικούς παράγοντες οπότε το μεταβολομικό προφίλ ενός φυτικού είδους δεν αποτελεί πάντα το σύνολο του δευτερογενούς μεταβολισμού του, αλλά αντανακλά την κατάσταση στην οποία βρισκόταν το φυτό την στιγμή της συγκομιδής (Fazio et al., 2004). Οπότε, με την χρήση της βιοπληροφορικής σε συνδυασμό και άλλων μοριακών τεχνικών και με την στροφή του ενδιαφέροντος από το προϊόν στο γονίδιο που ευθύνεται για την παραγωγή του δίνεται η δυνατότητα μιας συστηματικής και ολοκληρωμένης μελέτης των φυσικών προϊόντων που παράγονται από ένα φυτό ανεξαρτήτως περιβαλλοντικών και μορφολογικών παραγόντων (Fazio et al., 2004).

γ. Εξόρυξη Γονιδιωμάτων

Η εξόρυξη γονιδιωμάτων (genome mining) αναφέρεται στην αναζήτηση γονιδίων που συμμετέχουν ή/και ελέγχουν την βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών. Η διαδικασία βασίζεται στην γνώση των βιοσυνθετικών μονοπατιών, στην φυλογενετική μελέτη και στη χρήση βιοπληροφορικών εργαλείων που μπορούν να υποδείξουν αν τα γονίδια συμμετέχουν στην έκφραση γνωστών ή/και μη φυσικών προϊόντων (Atanasov et al., 2021). Η εξόρυξη γονιδιωμάτων μπορεί να συνδυαστεί με την τεχνολογία της ετερόλογης έκφρασης και να οδηγήσει στην ανακάλυψη νέων ενζύμων, που συμμετέχουν στην βιοσύνθεση γνωστών ή/και μη δευτερογενών μεταβολιτών οι οποίοι θα μπορούν να απομονωθούν και να ταυτοποιηθούν με όλες τις σύγχρονες τεχνικές ταυτοποίησης μορίων (Fazio et al., 2004).

δ. Περίπτωση μελέτης

Με γνώμονα τις παραπάνω πληροφορίες στα πλαίσια της εργασίας μου επιχειρήθηκε να γίνει μια περίπτωση μελέτης που βασίστηκε στην βιοπληροφορική ανάλυση και προσπαθεί να ρίξει φως στο τι θα μπορούσε να γίνει αν αντί για τις κλασσικές μεθοδολογίες και πειραματικές πορείες χρησιμοποιούσαμε ως επίκεντρο της έρευνας όχι το προϊόν (μεταβολίτες), αλλά το DNA (γονίδια) της *E. tectorum*. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο στόχος η συνθάση των φλαβονολών και πραγματοποιήθηκε μια *in silico* μελέτη για την δημιουργία εκκινήτων για το γονίδιο αυτό με βάση συγγενικά είδη της *E. tectorum*. Η μελέτη αυτή αποτελεί το αρχικό και βασικό κομμάτι μιας θεωρητικής εργασίας με στόχο την διερεύνηση της ύπαρξης ή απουσίας γονιδίου που κωδικοποιεί μια συνθάση των φλαβονολών και αν εκφράζεται στο υπό μελέτη φυτό.

Β.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B1.1.Χρωματογραφικές Τεχνικές

α. Χρωματογραφία επί λεπτής στιβάδας (TLC)

Αναλυτική Χρωματογραφία

- Γέλη οξειδίου του πυριτίου χωρίς δείκτη φθορισμού σε φύλλα αλουμινίου 20x20 cm. Πάχος στιβάδας 0.1 mm (Merck, Art. 5554).
- Μικροκρυσταλλική κυτταρίνη χωρίς δείκτη φθορισμού σε φύλλα αλουμινίου 20x20 cm. Πάχος στιβάδος 0.1mm (Merck, Art. 5552).

Παρασκευαστική Χρωματογραφία

- Γέλη οξειδίου του πυριτίου χωρίς δείκτη φθορισμού σε γυάλινες πλάκες 20x20 cm (Merck, Art. 5721).

β. Χρωματογραφία στήλης (CC)

- Γέλη οξειδίου του πυριτίου 60, 230-400 mesh ASTM, για χρωματογραφία στήλης (SDS 2050044).
- Sephadex LH-10, γέλη υδροξυπροπυλιωμένης δεξτράνης (Pharmacia Fine Chemicals). Μέγεθος κόκκων: 25-100 μ . Πριν τη χρήση αφήνεται επί 24 ώρες με το διαλύτη έκλυσης ώστε να διογκωθεί.

γ. Αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας

Χρησιμοποιήθηκε σύστημα Hewlett Packard 5973-6890 και η μέθοδος παραγωγής ιόντων ήταν ιονισμός με ηλεκτρόνια (70 eV). Τα δείγματα αναλύθηκαν σε άπολη στήλη HP-5MS (30 m x 0.25 mm (i.d.), film thickness: 0.25 μ m). Θερμικό πρόγραμμα: από τους 60°C (5 min) μέχρι τους 280°C, με ρυθμό αύξησης της θερμοκρασίας 4°C/min. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το αδρανές αέριο ήλιο (1.0 mL/min).

δ. Χρωματογραφικά αντιδραστήρια

Αρχικά, πραγματοποιείται παρατήρηση των χρωματογραφημάτων στο υπεριώδες φως, συγκεκριμένα στα μήκη κύματος 254 nm και 366 nm. Έπειτα, γίνεται εμφάνισή τους με τα παρακάτω αντιδραστήρια ψεκασμού:

- Αντιδραστήριο βανιλίνης το οποίο αποτελείται από τα εξής διαλύματα:
Διάλυμα A: βανιλίνη (Merck, Art. No. S26047 841) 5% σε MeOH
Διάλυμα B: π. H₂SO₄ 5% σε MeOH (Stahl, 1969)
Το αντιδραστήριο προκύπτει έπειτα από ανάμιξη ίσων όγκων των διαλυμάτων A και B και το χρωματογράφημα θερμαίνεται για 5min στον 105°C.
- Αντιδραστήριο Neu: β-αμινο-αιθυλεστερας του δι-φαινυλο-βορικού οξέος, διάλυμα 1% σε MeOH (Neu,1957).

B1.2.Φασματοσκοπικές Μέθοδοι

α. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Η λήψη των φασμάτων Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού πραγματοποιήθηκε με τη χρήση φασματογράφου Bruker DRX 400 (399.95 MHz για ¹H-NMR και για ¹³C-NMR).

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την λήψη των φασμάτων είναι οι εξής:

- CDCl₃ χωρίς εσωτερικό πρότυπο με σήμα αναφοράς το σήμα του διαλύτη (7.24 ppm για ¹H-NMR και 77.0 ppm για ¹³C-NMR)
- CD₃OD (3.31 ppm για ¹H-NMR και 49.0 ppm για ¹³C-NMR).

Οι χημικές μετατοπίσεις εκφράζονται σε δ (ppm) και οι σταθερές σύζευξης (J) σε Hertz (Hz).

Χρησιμοποιήθηκαν, επίσης, οι ακόλουθες τεχνικές φασμάτων δύο διαστάσεων:

- COSY (Correlation Spectroscopy)
- HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation)
- HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)
- NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)
- DEPT (Distorsionless Enhancement by Polaritation Transfer)

B1.3.Διαλύτες

Όλοι οι διαλύτες, εκτός της μεθανόλης (MeOH, Panreac ref. 131091.0716), χρησιμοποιήθηκαν κατόπιν αποστάξεως.

Σε όλη την διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών, τα εκχυλίσματα και τα κλάσματα που ελήφθησαν από τις χρωματογραφικές στήλες εξατμίστηκαν σε χαμηλή θερμοκρασία (40°C) σε περιστροφική συσκευή αποστάξεως υπό κενό. Επίσης, όλες οι ουσίες και τα υπολείμματα που

απομονώθηκαν διατηρήθηκαν σε ξηραντήρα υπό κενό που περιείχε γέλη πυριτικού οξέος με δείκτη υγρασίας και πεντοξείδιο του φωσφόρου (P₂O₅, Merck, Art 540).

B2. Εκχύλιση Δρόγης

Το εκχύλισμα που χρησιμοποιήθηκε για τους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς ήταν το αιθανολικό (10.3857 g) το οποίο παραλήφθηκε από το πανεπιστήμιο της Πραιτόρια (University of Pretoria, Department of Plant and Soil Science). Ο διαλύτης εκχύλισης ήταν αιθανόλη (99%).

Το εκχύλισμα ονομάστηκε ETP.

B3. Χρωματογραφικός Διαχωρισμός Εκχυλισμάτων

α. Χρωματογραφικός διαχωρισμός του ολικού αιθανολικού εκχυλίσματος (ETP)

Μέρος (3.23 g) από το ολικό αιθανολικό εκχύλισμα υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υπό κενό (VLC) κανονικής φάσης με υλικό πληρώσεως γέλη οξειδίου του πυριτίου (8 cm x 9.5 cm). Η έκλουση ήταν βαθμιδωτή με μίγμα διαλυτών CyHex: DCM: H₂O αυξανόμενης πολικότητας. Ελήφθησαν συνολικά 10 κλάσματα (Πίνακας 7).

Πίνακας 7. Κλάσματα από VLC του αρχικού εκχυλίσματος

Κλάσματα	Σύστημα	Ποσότητα (mL)	Βάρος (mg)
ETP-A	CyHex 100%	800	7.2
ETP-B	CyHex 50%: DCM 50%	500	29.3
ETP-C	DCM 100%	1000	62.6
ETP-D	DCM 90%: MeOH 10%	1000	249.6
ETP-E	DCM 80%: MeOH 20%	1000	922.1
ETP-F	DCM 70%: MeOH 30%	1000	524.7
ETP-G	DCM 50%: MeOH 50%	500	58.9
ETP-H	MeOH 100%	500	52
ETP-I	MeOH 50%: H ₂ O 50%	500	93.6
ETP-J	H ₂ O 100%	500	125.6

Κλάσμα ETP-C

Πραγματοποιήθηκε παρασκευαστική χρωματογραφία επί λεπτής στιβάδας οξειδίου του πυριτίου με σύστημα ανάπτυξης το μίγμα διαλυτών CyHex: DCM (3:7), οπότε προέκυψαν 7 ζώνες (Πίνακας 8).

Πίνακας 8 Ζώνες από παρασκευαστική χρωματογραφία επί λεπτής στιβάδας του ETP-C.

Ζώνες	Βάρος (mg)	R_f
ETP-C1	1.1	0.77
ETP-C2	0.5	0.72
ETP-C3	0.9	0.66
ETP-C4	1.2	0.55
ETP-C5	1.0	0.50
ETP-C6	1.5	0.27
ETP-C7	0.8	0.11

Οι ζώνες υποβλήθηκαν σε αεριο-υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματογράφο μάζας (GC-MS), οπότε ταυτοποιήθηκαν και με φάσματα NMR οι παρακάτω ενώσεις:

ETP-C2 ως αιθυλεστέρας του παλμιτικού οξέος (ουσία **2**).

ETP-C4 ως α-τοκοφερόλη (ουσία **10**).

Κλάσμα ETP-D

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (9.5 cm x 2.5 cm) με υλικό πληρώσεως γέλη οξειδίου του πυριτίου και βαθμιδωτή έκλουση με μίγμα διαλυτών CyHex: DCM : MeOH αυξανόμενης πολικότητας. Ελήφθησαν 56 κλάσματα μέσο όγκου 15 mL (Πίνακας 9).

Πίνακας 9. Κλάσματα χρωματογραφίας στήλης του κλάσματος ETP-D

Κλάσματα	Σύστημα Διαλυτών CyHex: DCM: MeOH
1→3	50:50:0
4	40:60:0

5	30:70:0
6→9	20:80:0
10→27	10:90:0
28→30	0.5:95:0
31→33	0:99:1
34→44	0:95:5
45→48	0:93:7
49→51	0:90:10
52→54	0:85:15
55→56	0:80:20

Τα κλάσματα αναπτύχθηκαν σε αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας επί γέλης οξειδίου του πυριτίου με μίγμα διαλυτών CyHex: DCM: EtOAc: MeOH με συστήματα διαλυτών ανάπτυξης :

-1:1:0:0 για τα κλάσματα 1→7

-0:9:1:0 για τα κλάσματα 6→17

-0:9.5:0:0.5 για τα κλάσματα 18→52

-0:8.5:0:1.5 για τα κλάσματα 48→56

Πραγματοποιήθηκαν οι παρακάτω συνενώσεις:

ETP-DA (1→4), ETP-DB (5), ETP-DC (6), ETP-DD (7→8), ETP-DE (9→11), ETP-DF (12→14), ETP-DG (15→35), ETP-DH (36), ETP-DI (37→38), ETP-DJ (39→44), ETP-DK (45→56)

Πίνακας 10 Τελικά κλάσματα χρωματογραφίας στήλης του κλάσματος ETP-D.

Ομάδα	Κωδικός	Βάρος (mg)
1→4	ETP-DA	2.3
5	ETP-DB	0.5
6	ETP-DC	0.8
7→8	ETP-DD	1.8
9→11	ETP-DE	2.5
12→14	ETP-DF	1.9
15→35	ETP-DG	15.3

36	ETP-DH	1.4
37→38	ETP-DI	18.3
39→44	ETP-DJ	15.9
45→56	ETP-DK	13.4

Έπειτα από φασματοσκοπικό έλεγχο ταυτοποιήθηκε το κλάσμα ETP-DE ως στιγμαστερόλη (ουσία 1).

Κλάσμα ETP-E

Μέρος (794.1 mg) του κλάσματος ETP-E υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (19.5 cm x 3.5 cm) με υλικό πληρώσεως γέλη οξειδίου του πυριτίου και βαθμιδωτή έκλουση με μίγμα διαλυτών DCM : MeOH αυξανόμενης πολικότητας. Ελήφθησαν 122 κλάσματα μέσω όγκου 15 mL (Πίνακας 11).

Πίνακας 11 Κλάσματα χρωματογραφίας στήλης του κλάσματος ETP-E

Κλάσματα	Σύστημα Διαλυτών DCM: MeOH
1→6	96:4
7→10	94:6
11→15	92:8
16→22	90:10
23	88:12
24→26	86:14
27→28	84:16
29→31	82:18
32→36	80:20
37→47	78:22
48→58	76:24
59→68	74:26
69→74	70:30
75→80	64:36

81→87	62:38
88→94	50:50
95→98	40:60
99→103	30:70
104→111	20:80
112→122	10:90

Τα κλάσματα αναπτύχθηκαν σε αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας επί γέλης οξειδίου του πυριτίου με μίγμα διαλυτών DCM : MeOH με συστήματα διαλυτών ανάπτυξης:

- 9.8:0.2 για τα κλάσματα 1→9
- 9:1 για τα κλάσματα 10→22
- 8.5:1.5 για τα κλάσματα 21→36
- 8.2:1.8 για τα κλάσματα 24→64
- 7.6:2.4 για τα κλάσματα 64→122

Πραγματοποιήθηκαν οι παρακάτω συνενώσεις:

ETP-EA (1→8), ETP-EB (9→16), ETP-EC (17→19), ETP-ED (20→21), ETP-EE (22),
 ETP-EF (23→25), ETP-EG (26), ETP-EH (27), ETP-EI (28), ETP-EJ (29→30),
 ETP-EK (31→33), ETP-EL (34→36), ETP-EM (37→38), ETP-EN (39), ETP-EO (40→42),
 ETP-EP (43→47), ETP-EQ (48), ETP-ER (49→53), ETP-ES (54), ETP-ET (55→57),
 ETP-EU (58→61), ETP-EV (62→63), ETP-EW (64→66), ETP-EX (65), ETP-EY (67→68),
 ETP-EZ (69→70), ETP-Z₁(71→72), ETP-EZ₂ (73→79), ETP-EZ₃ (80→90),
 ETP-EZ₄ (91→94), ETP-EZ₅ (95→99), ETP-EZ₆ (100→110), ETP-EZ₇ (111→122)

Έπειτα από επιπλέον ανάπτυξη των τελικών κλασμάτων σε αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας επί γέλης οξειδίου του πυριτίου με συστήματα διαλυτών ανάπτυξης:

- DCM: MeOH (8.6:1.4) για τα κλάσματα ETP-EA→ETP-EP
- DCM: MeOH (8.2:1.8) για τα κλάσματα ETP-ER→ETP-Z₁
- DCM: MeOH (7.8:2.2) για τα κλάσματα ETP-Z₂→ETP-Z₇

πραγματοποιήθηκαν οι παρακάτω συνενώσεις:

ETP-EA' (ETP-EA→ETP-EB), ETP-EC' (ETP-EC→ETP-ED), ETP-EJ' (ETP-EJ→ETP-EK),

ETP-EL' (ETP-EL→ETP-EO), ETP-ER' (ETP-ER→ETP-EU), ETP-EV' (ETP-EV→ETP-EZ), ETP-EZ₁' (ETP-EZ₁→ETP-EZ₃), ETP-EZ₄' (ETP-EZ₄→ETP-EZ₇).

Πίνακας 12 Τελικά κλάσματα χρωματογραφίας στήλης του κλάσματος ETP-E.

Ομάδα	Κωδικός	Βάρος (mg)
1→16	ETP-EA'	13.4
17→21	ETP-EC'	2.7
22	ETP-EE	1.6
23→25	ETP-EF	4.3
26	ETP-EG	3.3
27	ETP-EH	2.5
28	ETP-EI	3.1
29→33	ETP-EJ'	15.1
34→42	ETP-EL'	30.3
39	ETP-EN	2.1
43→47	ETP-EP	17.0
48	ETP-EQ	10.3
49→61	ETP-ER'	46.1
54	ETP-ES	1.0
62→70	ETP-EV'	45
65	ETP-EX	2.3
71→90	ETP-EZ ₁ '	156.1
91→122	ETP-EZ ₄ '	44.4

Έπειτα από φασματοσκοπικό έλεγχο το κλάσμα ETP-EQ ταυτοποιήθηκε ως λαρισετινο-3-O-β-D-γαλακτοσίδης (ουσία 8) και τα κλάσματα ETP-EL', ETP-ES, και ETP-EX ταυτοποιήθηκαν ως συριγγετινο-3-O-β-D-γαλακτοσίδης (ουσία 7).

▪Κλάσμα ETP-ER'

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (8.5 cm x 1.2 cm) με υλικό πληρώσεως γέλη οξειδίου του πυριτίου και βαθμιδωτή έκλουση με μίγμα διαλυτών EtOAc: MeOH: H₂O αυξανόμενης πολικότητας. Ελήφθησαν 35 κλάσματα μέσο όγκου 5 mL (Πίνακας 13).

Πίνακας 13 Κλάσματα χρωματογραφίας στήλης του κλάσματος ETP-ER'

Κλάσματα	Σύστημα Διαλυτών EtOAc: MeOH: H₂O
1→4	9.8:0.2:0
5→9	9.6:0.4:0
10→14	9.4:0.6:0
15→18	9:1:0.1
19→23	8.8:1.2:0.12
24→27	8.6:1.4:0.14
28→31	8:2:0.2
32→35	7:3:0.3

Κατόπιν ελέγχου με αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας επί γέλης οξειδίου του πυριτίου, με σύστημα διαλυτών ανάπτυξης EtOAc: MeOH: H₂O (8.6:1.4:0.14) πραγματοποιήθηκαν οι παρακάτω συνενώσεις:

Πίνακας 14 Συνενώσεις κλασμάτων χρωματογραφίας στήλης του κλάσματος ETP-ER'

Ομάδα	Κλάσμα	Βάρος (mg)
1→5	ETP-ER'A	2.4
6→8	ETP-ER'B	3.2
9	ETP-ER'C	1.9
10	ETP-ER'D	1.7
11	ETP-ER'E	2.0
12→13	ETP-ER'F	4.3
14	ETP-ER'G	1.4
15	ETP-ER'H	1.5
16→17	ETP-ER'I	1.7
18→19	ETP-ER'J	6.6
20→35	ETP-ER'K	12.5

Έπειτα από φασματοσκοπικό έλεγχο το κλάσμα ETP-ER'D ταυτοποιήθηκε ως μίγμα λαρισετινο-3-O-β-D-γαλακτοσίδης και συριγγετινο-3-O-β-D-γαλακτοσίδης (ουσίες **8** & **7**), τα κλάσματα ETP-ER'E, ETP-ER'G και ETP-ER'F ταυτοποιήθηκαν ως συριγγετινο-3-O-β-D-γαλακτοσίδης (ουσία

7 και το κλάσμα ETP-ER'H ταυτοποιήθηκε ως μίγμα συριγγετινο-3-O-β-D-γαλακτοσίδης και πολυμποτρίνη (ουσίες 7 & 9).

▪Κλάσμα ETP-EP

Πραγματοποιήθηκε παρασκευαστική χρωματογραφία επί λεπτής στιβάδας οξειδίου του πυριτίου με σύστημα ανάπτυξης το μίγμα διαλυτών DCM: MeOH: H₂O (9:1:0.1), οπότε προέκυψαν 5 ζώνες.

Πίνακας 15 Ζώνες παρασκευαστικής χρωματογραφίας κλάσματος ETP-EP

Ζώνες	Βάρος (mg)	R_f
ETP-EP1	1.0	0.08
ETP-EP2	6.0	0.12
ETP-EP3	1.0	0.15
ETP-EP4	2.0	0.18
ETP-EP5	1.0	0.22

Έπειτα από φασματοσκοπικό έλεγχο η ζώνη ETP-EP4 ταυτοποιήθηκε ως συριγγετινο-3-O-α-L-ραμνοσίδης (ουσία 6), ενώ η ζώνη ETP-EP5 ταυτοποιήθηκε ως βενζοϊκό οξύ (ουσία 4).

▪Κλάσμα ETP-EZ'₁

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (16 cm x 2.5 cm) με υλικό πληρώσεως Sephadex LH 20 και ισοκρατική έκλουση με μίγμα διαλυτών MeOH: H₂O (7:3). Ελήφθησαν 16 κλάσματα μέσου όγκου 10 mL.

Δεν έγινε δυνατή η απομόνωση καθαρών ουσιών από τα παραπάνω κλάσματα.

Κλάσμα ETP-F

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (19.5 cm x 2.5 cm) με υλικό πληρώσεως Sephadex LH 20 και ισοκρατική έκλουση με μίγμα διαλυτών MeOH: H₂O (7:3). Ελήφθησαν 49 κλάσματα μέσου όγκου 5 mL.

Κατόπιν ελέγχου με αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας επί γέλης οξειδίου του πυριτίου, με σύστημα διαλυτών ανάπτυξης DCM: MeOH: H₂O (7:3:0.3) και επί κυτταρίνης με συστήματα

διαλυτών BuOH:AcOH:H₂O (7:0.6:2.4) και CH₃COOH 30%, πραγματοποιήθηκαν οι παρακάτω συνενώσεις:

Πίνακας 16 Συνενώσεις κλασμάτων χρωματογραφίας στήλης του κλάσματος ETP-F

Ομάδα	Κλάσμα	Βάρος (mg)
1→8	ETP-FA	3.7
9	ETP-FB	1.1
10→14	ETP-FC	14.0
15→29	ETP-FD	25.3
30	ETP-FE	0.3
31	ETP-FF	0.2
32	ETP-FG	0.6
33	ETP-FH	0.6
34	ETP-FI	0.6
35	ETP-FJ	1.0
36	ETP-FK	0.1
37	ETP-FL	0.4
38	ETP-FM	0.9
39	ETP-FN	0.1
40	ETP-FO	0.4
41	ETP-FP	0.3
42	ETP-FQ	0.2
43	ETP-FR	0.6
44→49	ETP-FS	5.0

Έπειτα από φασματοσκοπικό έλεγχο:

το κλάσμα ETP-FD ταυτοποιήθηκε ως σικιμικό οξύ (ουσία **3**),

τα κλάσματα ETP-FG και ETP-FH ταυτοποιήθηκαν ως πρωτοκατεχικό οξύ (ουσία **5**),

τα κλάσματα ETP-FJ και ETP-FK ταυτοποιήθηκαν ως λαρισετινο-3-O-β-D-γαλακτοσίδης (ουσία **8**) & τα κλάσματα ETP-FL και ETP-FN ταυτοποιήθηκαν ως συριγγετινο-3-O-β-D-γαλακτοσίδης (ουσία **7**).

▪Κλάσμα ETP-FD

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (19.5 cm x 2.5 cm) με υλικό πληρώσεως Sephadex LH 20 και ισοκρατική έκλυση με μίγμα διαλυτών EtOAc: MeOH: H₂O (7.0:3.0:1.0). Ελήφθησαν 46 κλάσματα μέσο όγκου 5 mL.

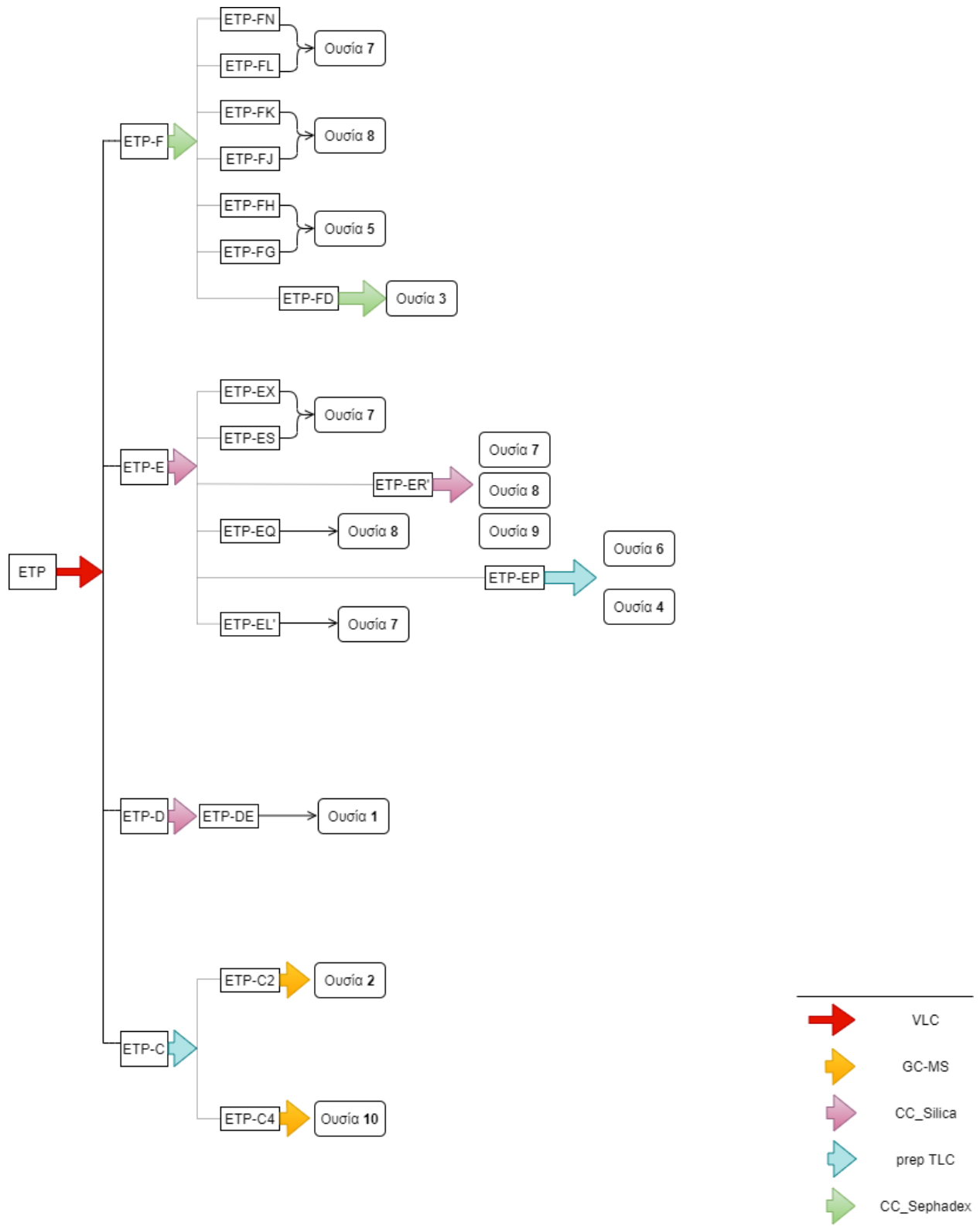
Κατόπιν ελέγχου με αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας επί γέλης οξειδίου του πυριτίου, με σύστημα διαλυτών ανάπτυξης DCM: MeOH: H₂O (7:3:0.3) πραγματοποιήθηκαν οι παρακάτω συνενώσεις:

Πίνακας 17 Συνενώσεις χρωματογραφίας στήλης ETP-FD

Ομάδα	Κλάσμα	Βάρος (mg)
1→24	ETP-FDA	1.9
25→26	ETP-FDB	2.1
27	ETP-FDC	0.2
28→30	ETP-FDD	2.9
31→32	ETP-FDE	15.5
33	ETP-FDF	1.9
34	ETP-FDG	12.2
35	ETP-FDH	12.9
36	ETP-FDI	1.6
37	ETP-FDJ	1.6
38	ETP-FDK	1.4
39→43	ETP-FDL	1.4
44	ETP-FDM	1.6
45	ETP-FDN	0.8
46	ETP-FDO	1.0

Έπειτα από φασματοσκοπικό έλεγχο τα κλάσματα ETP-FDD και ETP-FDE ταυτοποιήθηκαν ως σικιμικό οξύ (ουσία **3**).

Διάγραμμα Ροής Αιθανολικού Εκχυλίσματος (ETP)



B4. Βάσεις Δεδομένων

Οι βάσεις δεδομένων είναι οργανωμένες συλλογές δεδομένων, οι οποίες είναι αποθηκευμένες σε σύστημα υπολογιστή και διευκολύνουν την αποθήκευση, την επεξεργασία και το χειρισμό τους. Η βιολογική βάση δεδομένων είναι μία ηλεκτρονική βιβλιοθήκη βιολογικών πληροφοριών, που συλλέγονται από τα επιστημονικά πειράματα και τις αναλύσεις που πραγματοποιούνται στον ηλεκτρονικό υπολογιστή. Οι βάσεις δεδομένων είναι ένα εξαιρετικό εργαλείο για την εξήγηση βιολογικών φαινομένων, όπως η δομή βιομορίων και η κατανόηση της εξέλιξης των ειδών (Κοσσίδα, 2008). Χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω βάσεις δεδομένων:

- Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (**KEGG**) <https://www.genome.jp/kegg/>: Είναι μια «βιβλιοθήκη» που στεγάζει μια σειρά από βάσεις δεδομένων που έχουν ως σκοπό την συστηματική ανάλυση της λειτουργίας γονιδίων. Η KEGG δίνει την δυνατότητα της σύνδεσης του γονιδίου με μία συγκεκριμένη λειτουργία και άρα με ένα συγκεκριμένο βιοσυνθετικό μονοπάτι ή κάποιο άλλο δίκτυο μορίων. Αποτελείται από 3 βάσεις δεδομένων: τη “PATHWAY” που περιέχει όλα τα γνωστά έως σήμερα βιοσυνθετικά μονοπάτια και τα ένζυμα τα οποία τα ρυθμίζουν, την “GENES” στην οποία συλλέγονται όλα τα γονιδια που έχουν απομονωθεί από πλήρεις ή μη αλληλουχίσεις γονιδιωμάτων και την “LIGAND” που αποτελεί μια συλλογή από χημικές ενώσεις, ένζυμα και ενζυμικές αντιδράσεις (Kanehisa and Goto, 2000).

Εικόνα 12 Η αρχική σελίδα της βάσης δεδομένων KEGG.

- National Center of Biotechnology Information (NCBI) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>: Είναι μια «βιβλιοθήκη» που στεγάζει μια σειρά από βάσεις δεδομένων σχετικές με τη βιοτεχνολογία και τη βιοιατρική και παρέχει σημαντικά εργαλεία και υπηρεσίες βιοπληροφορικής. Περιέχει το πρόγραμμα “BLAST” (basic local alignment sequence tool) που παρέχει αποτελέσματα για στατιστικά σημαντικές ομοιότητες σε παρόμοιες αλληλουχίες και αποτελείται από μια οικογένεια προγραμμάτων που βασίζονται στις ίδιες αρχές. Το πρόγραμμα “BLASTp” είναι για στοίχιση μιας αμινοξικής αλληλουχίας έναντι βάσης δεδομένων αλληλουχιών πρωτεϊνών (Κοσσιδά, 2008).

The image shows the NCBI homepage with a navigation bar, search bar, and various informational banners and sections. The 'Welcome to NCBI' section is the central focus, providing links to various services and resources.

Εικόνα 13 Αρχική σελίδα της βάσης δεδομένων NCBI.

Μέσω της KEGG έγινε δυνατή η μελέτη του βιοσυνθετικού μονοπατιού των φλαβονοειδών και η επιλογή του γονιδίου στόχου, δηλαδή της συνθάσης των φλαβονολών. Επίσης, δημιουργήθηκε ένας πίνακας με όλα τα είδη που φέρουν τουλάχιστον ένα γονίδιο συνθάσης φλαβονολών και τους αντίστοιχους κωδικούς των γονιδίων αυτών χάρις στις πληροφορίες που υπήρχαν για αυτά στην KEGG. Στην NCBI εντοπίστηκε και επιλέχθηκε η πρωτεΐνη πάνω στην οποία βασίστηκε η πρώτη φυλογενετική μελέτη που ήταν απαραίτητη για την επιλογή των πιο συγγενικών ειδών προς το είδος *E. tectorum*. Επίσης, από την NCBI ελήφθησαν όλες οι απαραίτητες FASTA μορφές των αμινοξικών και των mRNA αλληλουχιών που χρειάστηκαν στην έρευνα.

B5.Βιοπληροφοριακά Εργαλεία

Στο διαδίκτυο παρέχεται μια μεγάλη γκάμα εργαλείων ελεύθερης πρόσβασης για τη διεξαγωγή βιοπληροφορικών αναλύσεων. Τα εργαλεία αυτά μπορούν να αναζητούν ομοιότητες ανάμεσα σε αμινοξικές ή νουκλεοτιδικές ακολουθίες, να σχεδιάζουν φυλογενετικά δένδρα, να δίνουν πληροφορίες για την τρισδιάστατη δομή βιομορίων, να εντοπίζουν τις συντηρημένες περιοχές ή διαμεμβρανικές περιοχές πρωτεϊνών και πάρα πολλές άλλες πληροφορίες. Για την ανάλυση που διεξήχθη στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα εξής εργαλεία:

- Basic local alignment sequence tool (**BLAST**): παρέχει αποτελέσματα για στατιστικά σημαντικές ομοιότητες σε παρόμοιες αλληλουχίες και αποτελείται από μια οικογένεια προγραμμάτων που βασίζονται στις ίδιες αρχές. Το πρόγραμμα “BLASTp” είναι για στοίχιση μια αμινοξικής αλληλουχίας έναντι βάσης δεδομένων αλληλουχιών πρωτεϊνών και είναι το μόνο είδος blast που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία (Κοσσίδα, 2008).
- Molecular Evolutionary Genetics Analysis (**MEGA**): Είναι ένα λογισμικό υπολογιστή που διεξάγει στατιστικές αναλύσεις της μοριακής εξέλιξης και σχεδιάζει το φυλογενετικό δένδρο (Κοσσίδα, 2008).
- Tree-based Consistency Objective Function for Alignment Evaluation (**T-Coffee**) <http://tcoffee.crg.cat/> : Είναι ένα λογισμικό πολλαπλής στοίχισης ακολουθιών. Δημιουργεί μία βιβλιοθήκη στοίχισεων των ακολουθιών κατά ζεύγη η οποία χρησιμοποιείται ως οδηγός της πολλαπλής στοίχισης (Κοσσίδα, 2008).
- NCBI Primer Designing Tool <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> : Είναι ένα εργαλείο της NCBI στο οποίο μπορούν να σχεδιαστούν εκκινητές και να επιλεγθούν συγκεκριμένες παράμετροι ανάλογα τις ανάγκες της έρευνας. Επίσης, δίνεται η δυνατότητα αυτόματης δημιουργίας εκκινητών με βάση μια νουκλεοτιδική αλληλουχία σε FASTA μορφή που δίνει ο ερευνητής και με την επιλογή συγκεκριμένων ειδών που επιλέγει ο ίδιος. Η αυτόματη δημιουργία εκκινητών βασίζεται στο πρόγραμμα BLAST (Ye et al., 2012).
- Reverse complement https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html: Είναι ένα εργαλείο που μετατρέπει μια νουκλεοτιδική αλληλουχία στην αντίστροφη της, στην συμπληρωματική της ή στην αντίστροφη-συμπληρωματική της.

Με τη χρήση του εργαλείου “BLASTp”, έγινε η αναζήτηση των πιθανών ομόλογων πρωτεϊνών στα μονοκοτυλήδονα είδη που φέρουν γονίδιο συνθάσης των φλαβονολών, με αντικείμενο αναζήτησης την αμινοξική ακολουθία της μεγάλης υπομονάδας του ενζύμου καρβοξυλάση/οξυγενάση της 1,5-διφωσφορικής ριβουλόζης (Rubisco) που βρίσκεται στους χλωροπλάστες της *E. tectorum*. Από τα αποτελέσματα της αναζήτησης δε λήφθηκαν υπ’ όψιν ακολουθίες οι οποίες εμφανίζονταν δεύτερη φορά ίδιες ή ήταν ελλιπείς. Με το T-Coffee έγιναν όλες οι πολλαπλές στοιχίσεις των ακολουθιών που συλλέχτηκαν από τις βάσεις δεδομένων. Μέσω του MEGA έγινε η κατασκευή των απαραίτητων φυλογενετικών δένδρων τόσο των αμινοξικών όσο και των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών για να μπορέσει να γίνει η φυλογενετική μελέτη και να επιλεγθούν οι κατάλληλες αλληλουχίες για την κατασκευή των εκκινητών και για να γίνουν κατανοητές και αντιληπτές οι εξελικτικές σχέσεις που υπάρχουν μεταξύ των ειδών που επιλέχθηκαν. Τα εργαλεία Primer Designing Tool και Reverse complement χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία των ζευγαριών των εκκινητών με βάση τις mRNA αλληλουχίες της συνθάσης φλαβονολών.

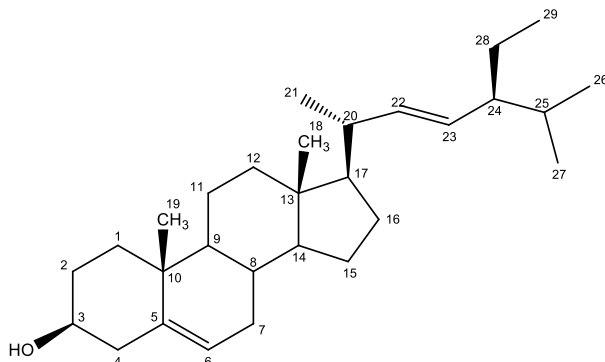
Διάγραμμα Ροής Βιοπληροφορικής Ανάλυσης



Γ.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γ1.Στερόλες- Λιπαρά οξέα

Ουσία 1: Στιγμαστερόλη (στιγμαστα-5,22-διεν-3β-όλη)



Η ουσία **1** απομονώθηκε ως άχρωμο υπόλειμμα και η ταυτοποίησή της έγινε με την λήψη φασμάτων $^1\text{H-NMR}$, COSY, HMBC, $^{13}\text{C-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR/DEPT}$, καθώς και με σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα (Forgo and Kónér, 2004; Noor et al., 2014; Singh et al., 2015; Ghani et al., 2021).

Απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1906 από το φυτό *Physostigma venenosum* Balf. Στο γένος *Elegia* L. δεν έχει απομονωθεί ξανά οπότε αυτή αποτελεί την πρώτη αναφορά για το γένος αυτό. Έχει μελετηθεί για αντιφλεγμονώδη, αντι-οστεοαρθριτική, κυτταροτοξική, αντιοξειδωτική, υπογλυκαιμική, αντι-μεταλλαξιγόνο και αντι-υπερχολιστερολαιμική δράση (Kaur et al., 2011).

Από το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ πήραμε τις εξής πληροφορίες:

- Σε δ_{H} 5.33 εμφανίζεται το ολεφινικό πρωτόνιο H-6 ως μια διπλή κορυφή.
- Σε δ_{H} 5.13 και δ_{H} 5.00 εμφανίζονται τα ολεφινικά πρωτόνια H-22 και H-23, αντίστοιχα, ως μια διπλώς διπλή κορυφή το καθένα.
- Σε δ_{H} 3.50 εμφανίζεται το H-3 ως μια πολλαπλή κορυφή.
- Τα μεθυλικά πρωτόνια CH_3 -18 και CH_3 -19 εμφανίζονται ως μια απλή κορυφή το καθένα σε δ_{H} 0.66 και δ_{H} 0.99, αντίστοιχα.
- Τα μεθυλικά πρωτόνια CH_3 -21, CH_3 -26 και CH_3 -27 εμφανίζονται ως μια διπλή κορυφή το καθένα σε δ_{H} 1.00, 0.82 και 0.79, αντίστοιχα.
- Σε δ_{H} 0.80 εμφανίζονται τα μεθυλικά πρωτόνια CH_3 -29 ως μια τριπλή κορυφή.

Από το φάσμα COSY παρατηρήθηκε ότι:

- Το πρωτόνιο H-6 (δ_{H} 5.33) συζεύγνυται με το γειτονικά του πρωτόνια H-7β (δ_{H} 1.94).
- Το πρωτόνιο H-22 (δ_{H} 5.13) συζεύγνυται με το γειτονικό του πρωτόνιο H-23 (δ_{H} 5.00).

- Το πρωτόνιο H-22 (δ_H 5.13) συζεύγνυται με το γειτονικό του πρωτόνιο H-20 (δ_H 2.00).
- Το πρωτόνιο H-23 (δ_H 5.00) συζεύγνυται με το γειτονικό του πρωτόνιο H-24 (δ_H 1.50).
- Το πρωτόνιο H-3 (δ_H 3.50) συζεύγνυται με τα H-2α (δ_H 1.83), H-2β (δ_H 1.48), H-4 (δ_H 2.26-2.24).
- Το πρωτόνιο H-20 (δ_H 2.00) συζεύγνυται με τα γειτονικά του μεθυλικά πρωτόνια CH₃-21 (δ_H 1.00).
- Το πρωτόνιο H-15α (δ_H 1.60) συζεύγνυται με το γειτονικό του πρωτόνιο H-15β (δ_H 1.06).
- Το πρωτόνιο H-7β (δ_H 1.49) συζεύγνυται με το γειτονικό του πρωτόνιο H-7α (δ_H 1.94).
- Το πρωτόνιο H-2α (δ_H 1.83) συζεύγνυται με το γειτονικό του πρωτόνιο H-2β (δ_H 1.48) και με το γειτονικό του πρωτόνιο H-1β (δ_H 1.09).
- Το πρωτόνιο H-1α (δ_H 1.81) συζεύγνυται με το γειτονικό του πρωτόνιο H-1β (δ_H 1.05) και με το πρωτόνιο H-2β (δ_H 1.48).
- Τα μεθυλικά πρωτόνια CH₃-27 συζεύγνυται με το γειτονικό του πρωτόνιο H-25 (δ_H 1.49).
- Τα μεθυλικά πρωτόνια CH₃-29 συζεύγνυται με το γειτονικό του πρωτόνιο H-28 (δ_H 1.65).
- Τα μεθυλικά πρωτόνια CH₃-26 συζεύγνυται με το γειτονικό του πρωτόνιο H-25 (δ_H 1.49).

Από τα φάσματα ¹³C-NMR και ¹³C-NMR/DEPT εντοπίστηκαν οι χημικές μετατοπίσεις των ανθράκων της ουσίας.

Από το φάσμα HMBC λάβαμε τα εξής σήματα:

- Το πρωτόνιο H-6 δίνει σήμα διασταύρωσης με τους άνθρακες σε δ_c 36.2, 42.5 και 138.2, που αντιστοιχούν στους C-10, C-4 και C-5, αντίστοιχα.
- Το πρωτόνιο H-22 δίνει σήμα διασταύρωσης με τους άνθρακες σε δ_c 20.4, 40.2, 51.0, 56.1 και 129.7, που αντιστοιχούν στους CH₃-21, C-20, C-24, C-17 και C-23, αντίστοιχα. Το σήμα διασταύρωσης με τον C-17 επιβεβαιώνει ότι σε δ_H 5.13 ppm εμφανίζεται το H-22.
- Το πρωτόνιο H-23 δίνει σήμα διασταύρωσης με τους άνθρακες σε δ_c 25.0, 31.1, 40.2, 51.0 και 136.5, που αντιστοιχούν στους C-28, C-25, C-20, C-24 και C-22.
- Τα πρωτόνια H-4 δίνουν σήμα διασταύρωσης με τους άνθρακες σε δ_c 31.4, 36.2, 71.9, 121.4 και 138.2, που αντιστοιχούν στους C-2, C-10, C-3, C-6 και C-5.
- Το πρωτόνιο H-7α δίνει σήμα διασταύρωσης με τους άνθρακες σε δ_c 50.2 και 56.7, που αντιστοιχούν στους C-9 και C-14.
- Τα πρωτόνια H-1α,β δίνουν σήμα διασταύρωσης με τους άνθρακες σε δ_c 31.4, 36.2, 71.9 και 138.2, που αντιστοιχούν στους C-2, C-10, C-3 και C-5.

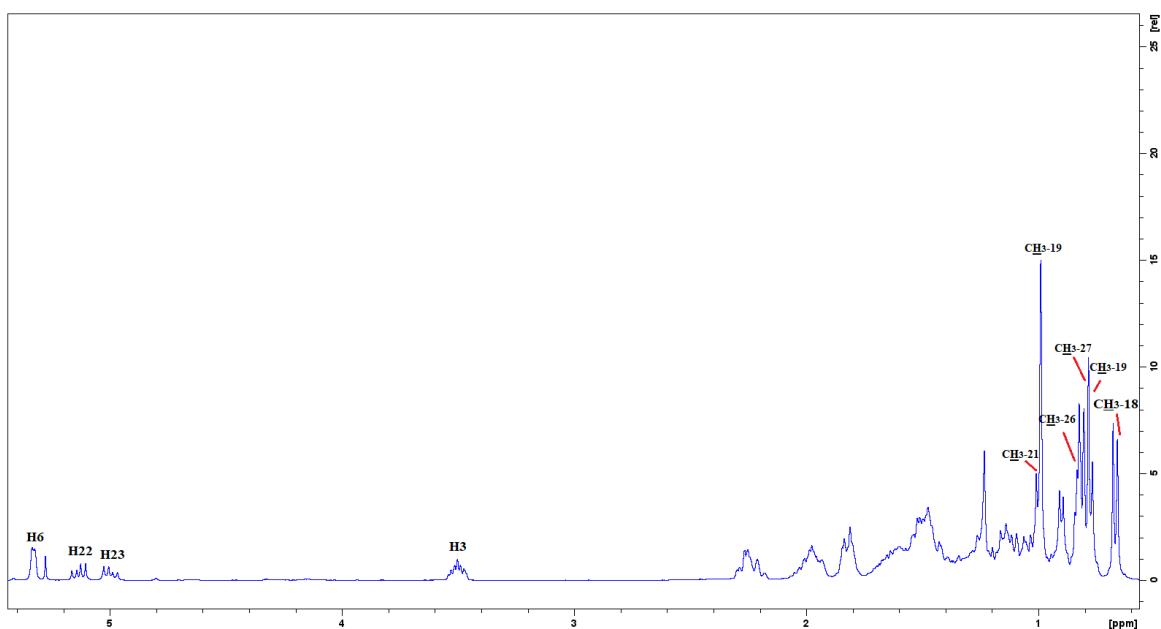
- Τα μεθυλικά πρωτόνια CH₃-21 δίνουν σήμα διασταύρωσης με τους άνθρακες σε δ_c 40.2, 56.1 και 136.5, που αντιστοιχούν στους C-20, C-17 και C-22.
- Τα μεθυλικά πρωτόνια CH₃-19 δίνουν σήμα διασταύρωσης με τους άνθρακες σε δ_c 36.2, 50.5 και 138.2, που αντιστοιχούν στους C-10, C-9 και C-5.
- Τα μεθυλικά πρωτόνια CH₃-26 δίνουν σήμα διασταύρωσης με τους άνθρακες σε δ_c 19.5, 31.1 και 51.0, που αντιστοιχούν στους C-27, C-25 και C-24.
- Τα μεθυλικά πρωτόνια CH₃-18 δίνουν σήμα διασταύρωσης με τους άνθρακες σε δ_c 40.9, και 55.8, που αντιστοιχούν στους C-12 και C-14.
- Τα μεθυλικά πρωτόνια CH₃-27 δίνουν σήμα διασταύρωσης με τους άνθρακες σε δ_c 19.5, και 31.1, που αντιστοιχούν στους C-27 και C-25.
- Τα μεθυλικά πρωτόνια CH₃-29 δίνουν σήμα διασταύρωσης με τους άνθρακες σε δ_c 25.0, και 51.0, που αντιστοιχούν στους C-28 και C-24.

Πίνακας 18 Φασματοσκοπικά δεδομένα ουσίας **1** (CDCl₃, 400 MHz)

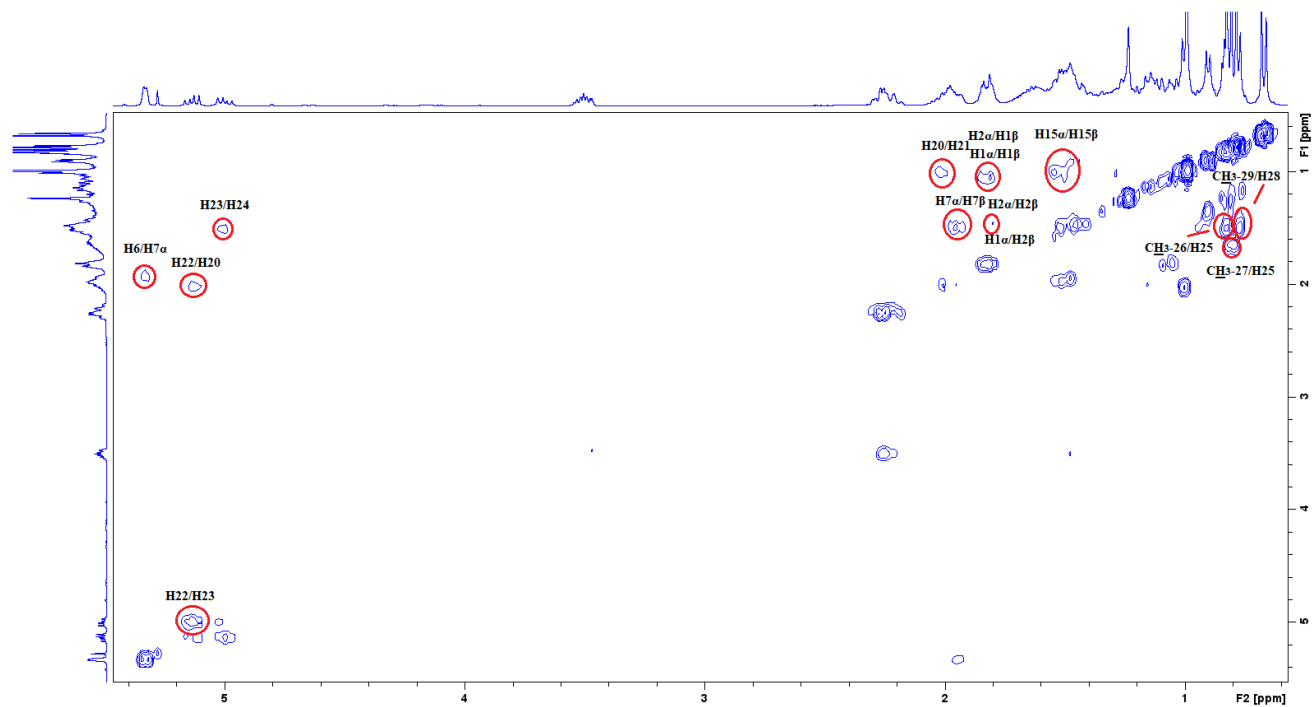
Θέση	H	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	Πολλαπλότητα J (Hz)	HMBC
1α	1		1.81	*	C-2, C-10, C-3, C-5
1β	1		1.05	#	C-2, C-10, C-3, C-5
2α	1	31.4	1.83	*	
2β	1	31.4	1.48	#	
3	1	71.9	3.50	m	
4α, β	2	42.5	2.24- 2.26	m	C-2, C-10, C-3, C-6, C-5
5	0	138.2			
6	1	121.4	5.33	d (4.6)	C-10, C-4, C-24, C-5
7α	1		1.94	*	C-9, C-14
7β	1		1.49	#	
9	1	50.5			
10	0	36.2			
11α	1				
11β	1				
12α	1	40.9			
12β	1	40.9			
14	1	55.8			
15α	1				
15β	1				
16α	1				
16β	1				
17	1	56.1			
20	1	40.2	2.00	*	
22	1	136.5	5.13	dd (15.1, 8.4)	CH ₃ -21, C-20, C-24, C-17, C- 23

23	1	129.7	5.00	dd (15.1, 8.4)	C-28, C-25, C-20, C-24, C-22
24	1	51.0	1.50	*	
25	1	31.1	1.49	*	
28	2	25.0	1.65	*	
CH₃-18	3		0.66	s	C-12, C-14
CH₃-19	3		0.99	s	C-10, C-9, C-5
CH₃-21	3	20.4	1.00	d (7.9)	C-20, C-17, C-22
CH₃-26	3		0.82	d (7.8)	C-27, C-24, C-25
CH₃-27	3	19.5	0.79	d (7.4)	C-27, C-25
CH₃-29	3		0.80	t (7.4)	C-28, C-24

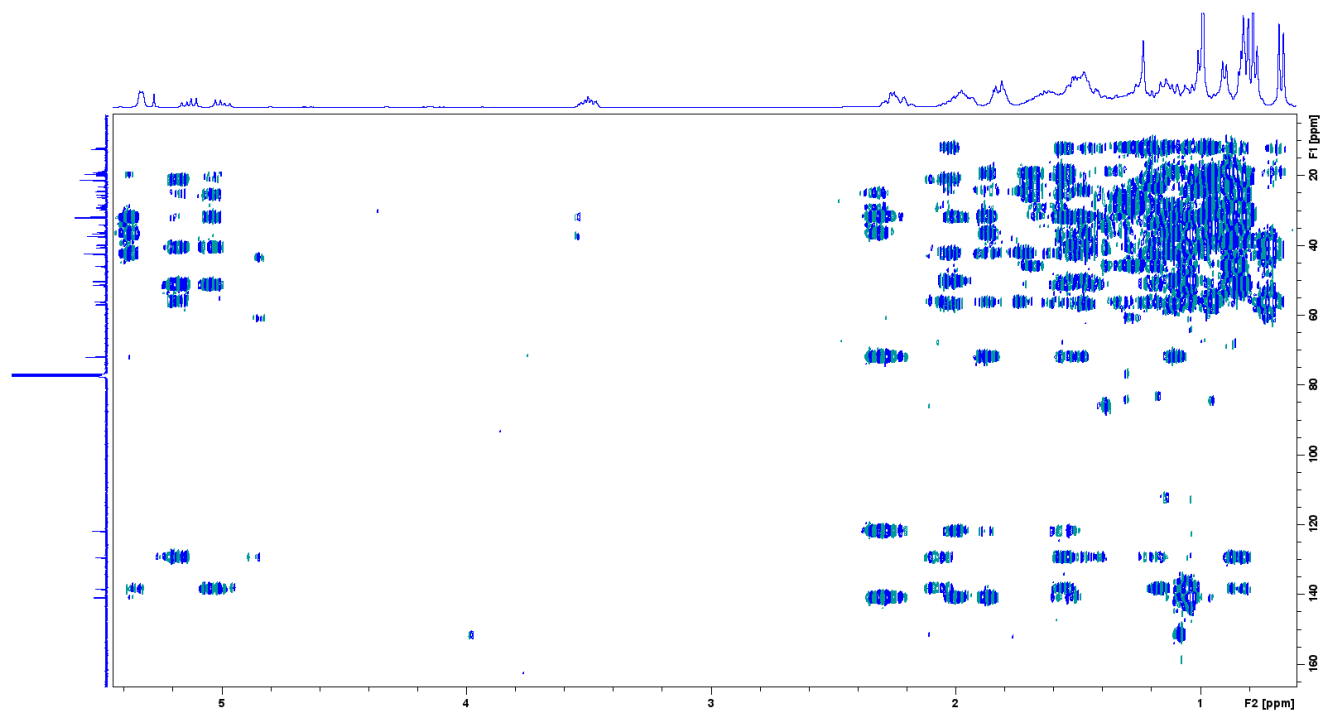
*Επικαλυπτόμενα σήματα, #Πιθανώς αντίστροφα



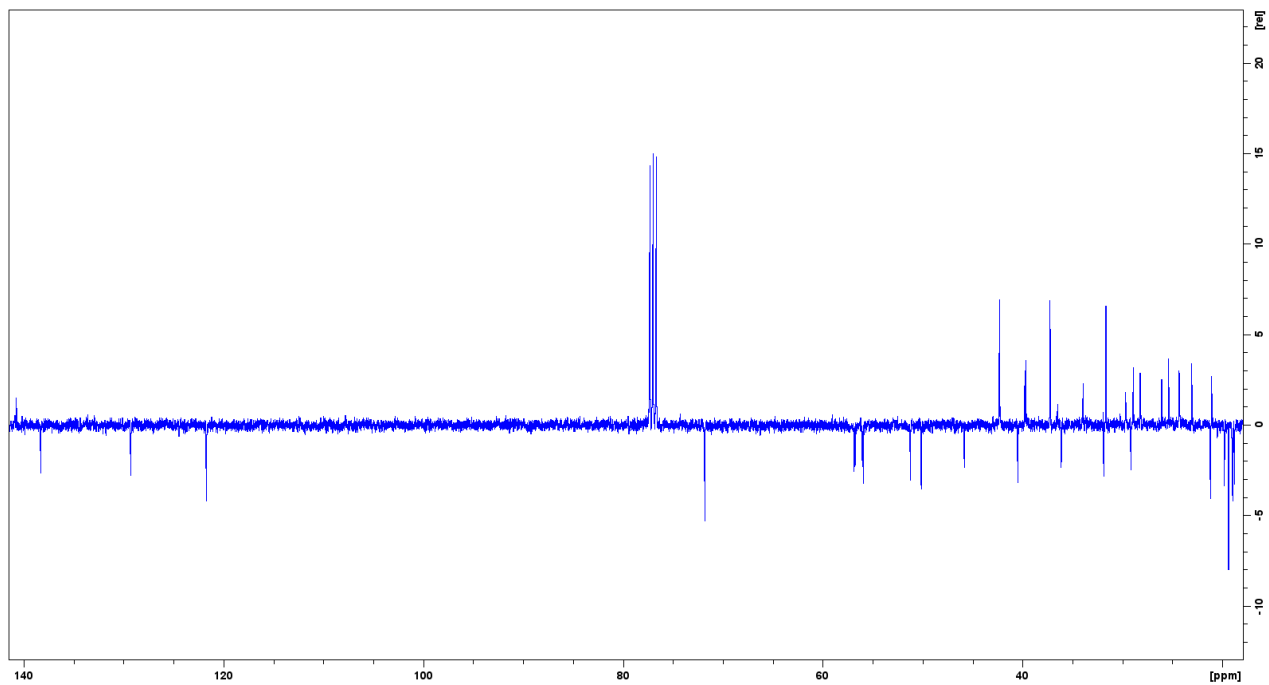
Εικόνα 14 Φάσμα ¹H-NMR της ουσίας **1** (CDCl₃, 400 MHz)



Εικόνα 15 Φάσμα COSY της ουσίας **1** (CDCl₃, 400 MHz)

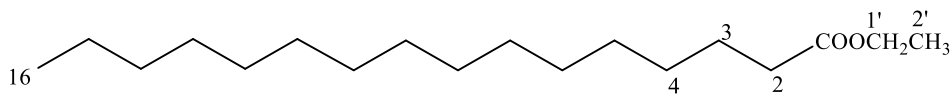


Εικόνα 16 Φάσμα HMBC της ουσίας **1** (CDCl₃, 400 MHz)



Εικόνα 17 Φάσμα ^{13}C -NMR/DEPT της ουσίας **1** (CDCl_3 , 100.3 MHz)

Ουσία 2: αιθυλεστέρας του παλμιτικού οξέος



Η ουσία **2** απομονώθηκε ως υπόλευκο άμορφο υπόλειμμα και ταυτοποιήθηκε ως αιθυλεστέρας του παλμιτικού οξέος, μέσω ανάλυσης σε αέριο χρωματογράφο συζευγμένο με φασματόμετρο μάζας (GC-MS) και μέσω του φάσματος $^1\text{H-NMR}$. Επιπλέον, έγινε και σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα (Mamidi and Manna, 2013; Nazeam et al., 2018;

<http://www.pherobase.com/ms-popup.html?methyl%20linolenate>;

<https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C628977&Mask=200#Mass-Spec>;

https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN_628-97-7_1HNMR.htm)

Η ουσία **2** δεν έχει αναφερθεί ξανά στο γένος *Elegia* L., οπότε είναι η πρώτη φορά που απομονώνεται από αυτό. Ο αιθυλεστέρας του παλμιτικού οξέος έχει ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες. Συγκεκριμένα έχει αντιοξειδωτική, αιμολυτική και υποχοληστερολαιμική δράση (Tyagi and Agarwal, 2016). Επίσης, έχει νηματωδοκτόνο και παρασιτοκτόνο δράση (Tyagi and Agarwal, 2016; Zeb et al., 2017).

Από την ανάλυση GC-MS, στο φάσμα μάζας που προέκυψε, διακρίνεται το μοριακό βάρος της ουσίας, που είναι $M.W. = 284 (M^+)$, καθώς και η βασική κορυφή σε m/z 88. Για την ταυτοποίηση της ουσίας συνέβαλε η σύγκριση του φάσματος μάζας με τα αντίστοιχα της βιβλιογραφίας, καθώς παρουσιάζουν παρόμοια εικόνα.

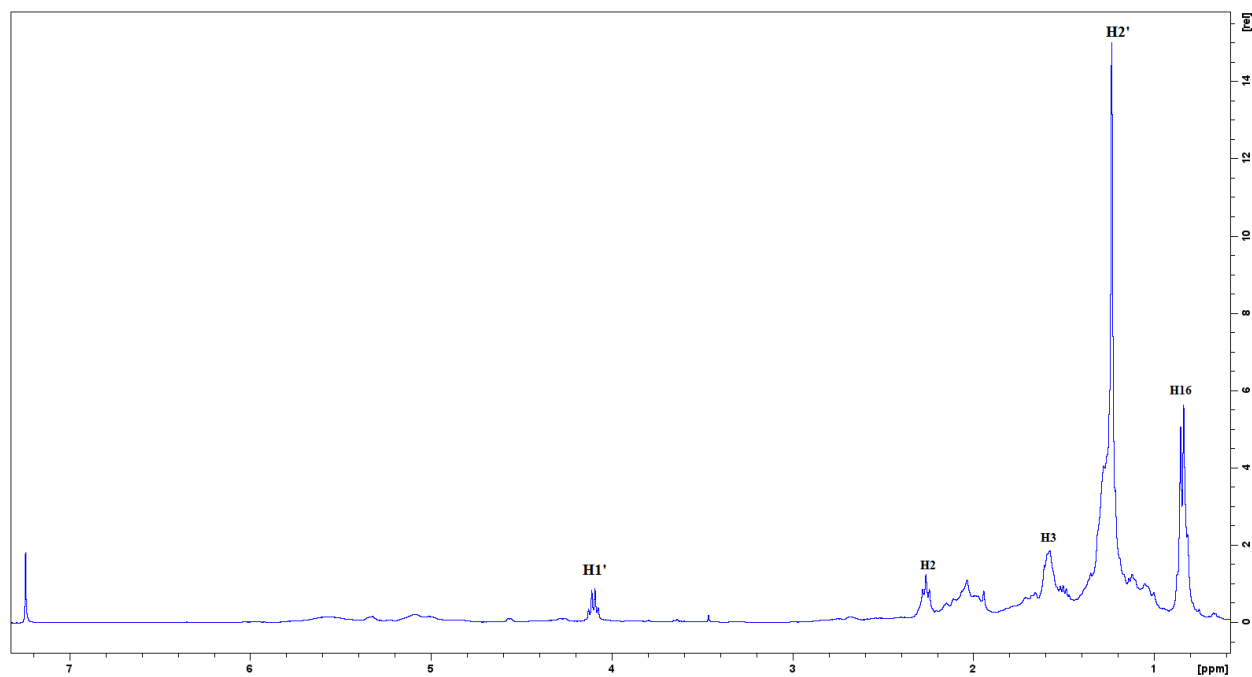
Από το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του ολικού κλάσματος ETP-C, προέκυψαν τα παρακάτω δεδομένα:

- Σε δ_{H} 4.10 παρατηρείται μια τετραπλή κορυφή, που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-1'
- Σε δ_{H} 2.26 παρατηρείται μια τριπλή κορυφή, που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-2
- Σε δ_{H} 1.59 παρατηρείται μια πολλαπλή κορυφή, που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-3
- Σε δ_{H} 1.23 παρατηρείται μια τριπλή κορυφή, που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-2'
- Σε δ_{H} 1.05-1.50 παρατηρούνται πολλές κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-4 έως H-15.
- Σε δ_{H} 0.84 παρατηρείται μια τριπλή κορυφή που αντιστοιχεί στο H-16.

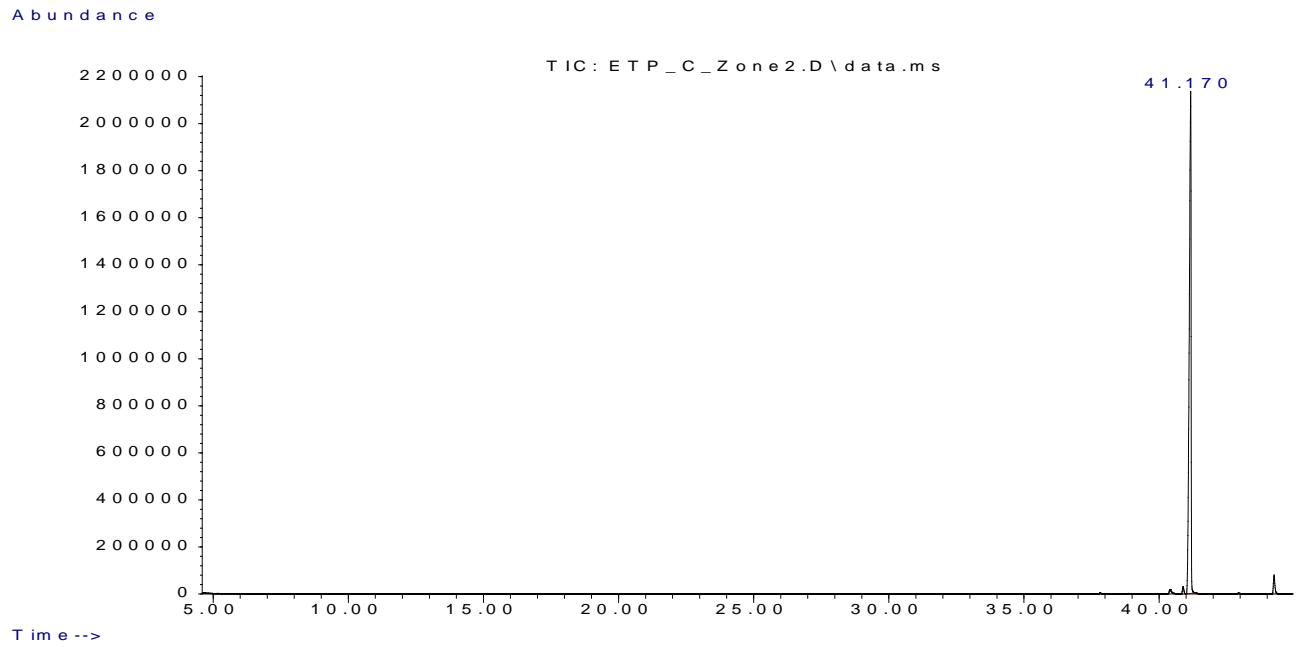
Πίνακας 19 Φασματοσκοπικά δεδομένα ουσίας **2** (CDCl₃, 400 MHz)

Θέση	H	δ _H (ppm)	Πολλαπλότητα J (Hz)
1'	2	4.10	q (7.3)
2'	3	1.23	t (7.3)
2	2	2.26	t (7.6)
3	2	1.59	m
4-15	24	1.05-1.50	*
16	3	0.84	t (6.8)

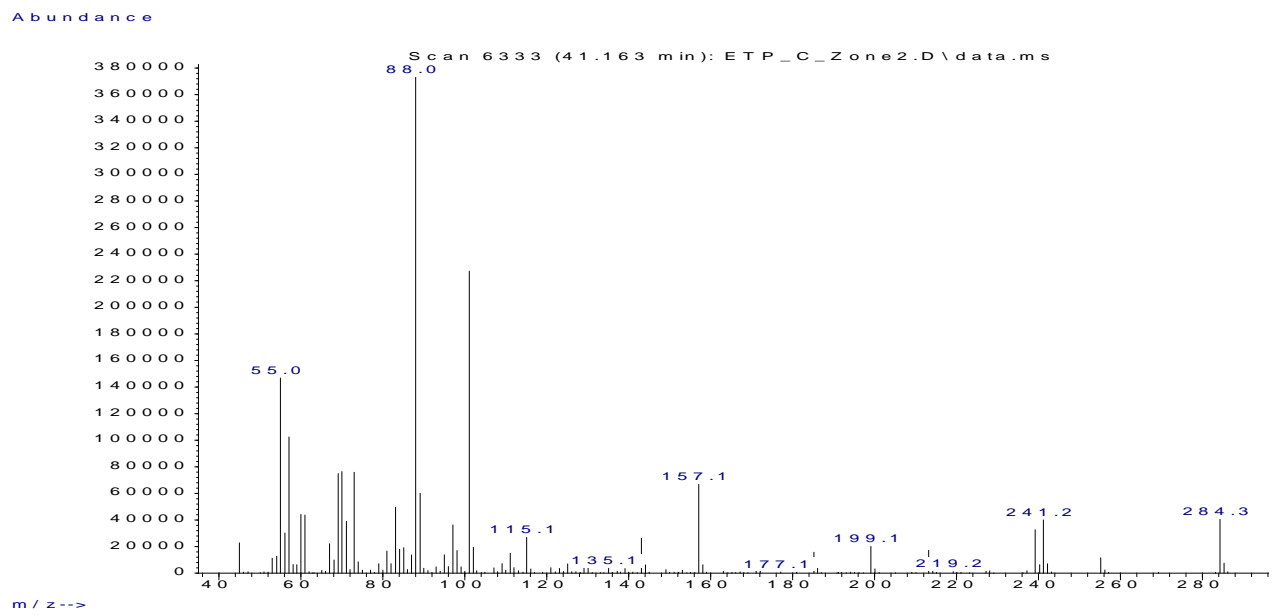
*επικαλυπτόμενα σήματα



Εικόνα 18 Φάσμα ¹H-NMR της ουσίας **2** (CDCl₃, 400 Hz)



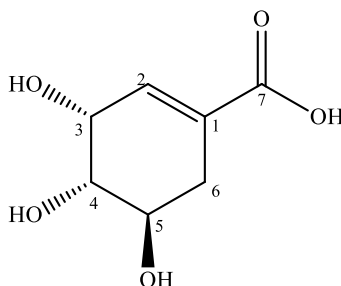
Εικόνα 19 Αέριος Χρωματογραφία ουσίας 2



Εικόνα 20 Φάσμα μάζας ουσίας 2

Γ2.Φαινολικά Παράγωγα & Πρόδρομες Ενώσεις

Ουσία 3: Σικιμικό οξύ [(3*R*,4*S*,5*R*)-3,4,5-τριυδροξυ-κυκλο-1-εξεν-1-καρβοξυλικό οξύ]



Η ουσία **3** απομονώθηκε ως άχρωμο υπόλειμμα και η ταυτοποίησή της πραγματοποιήθηκε μέσω φασμάτων $^1\text{H-NMR}$, COSY, NOESY και HSQC, καθώς και με σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα (Scognamiglio et al., 2014; Venditti et al., 2017).

Το σικιμικό οξύ δεν έχει αναφερθεί ξανά στο γένος *Elegia* L., οπότε είναι η πρώτη φορά που απομονώνεται από αυτό.

Το σικιμικό οξύ είναι ευρέως διαδεδομένο στους φυτικούς οργανισμούς, έχει ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες και αποτελεί σημαντικό πρόδρομο μόριο στην βιοσύνθεση των αρωματικών αμινοξέων και φαινολικών παραγώγων. Το σικιμικό οξύ έχει ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες. Ορισμένες από αυτές είναι αντιοξειδωτική, αντιπηκτική, αντιθρομβωτική, αντιβακτηριακή, αντιφλεγμονώδης, αναλγητική, νευροπροστατευτική και κατά της οστεοαρθρίτιδας (M. Estevez and J. Estevez, 2012; Rabelo et al., 2015; Guo et al., 2018).

Από το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ λάβαμε τις εξής πληροφορίες:

- Σε δ_{H} 6.73 παρατηρείται μια πολλαπλή κορυφή, που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-2
- Σε δ_{H} 4.37 παρατηρείται μια τριπλή κορυφή, που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-3
- Σε δ_{H} 3.95 παρατηρείται μια πολλαπλή κορυφή, που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-5
- Σε δ_{H} 3.62 παρατηρείται μια διπλώς διπλή κορυφή, που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-4
- Σε δ_{H} 2.70 παρατηρείται μια διπλώς διπλή κορυφή που αντιστοιχεί στο H-6a
- Σε δ_{H} 2.19 παρατηρείται μια διπλώς διπλή κορυφή που αντιστοιχεί στο H-6b

Από το φάσμα COSY παρατηρήσαμε τις εξής πληροφορίες:

- Το πρωτόνιο H-2 (δ_{H} 6.73) συζεύγνυται με το γειτονικό του πρωτόνιο H-3 (δ_{H} 4.37), καθώς επίσης και με τα μεθυλενικά πρωτόνια H-6a (δ_{H} 2.70) και H-6b (δ_{H} 2.19)

- Το πρωτόνιο H-3 (δ_H 4.37) συζεύγνυται με το γειτονικό του πρωτόνιο H-2 (δ_H 6.73), με το γειτονικό του πρωτόνιο H-4 (δ_H 3.62), καθώς επίσης και με τα μεθυλενικά πρωτόνια H-6a (δ_H 2.70) και H-6b (δ_H 2.19)
- Το πρωτόνιο H-5 (δ_H 3.95) συζεύγνυται με το γειτονικό του πρωτόνιο H-4 (δ_H 3.62), καθώς επίσης και με τα μεθυλενικά πρωτόνια H-6a (δ_H 2.70) και H-6b (δ_H 2.19)
- Το πρωτόνιο H-4 (δ_H 3.62) συζεύγνυται με το γειτονικό του πρωτόνιο H-3 (δ_H 4.37), με το γειτονικό του πρωτόνιο H-5 (δ_H 3.95), καθώς επίσης και με τα μεθυλενικά πρωτόνια H-6a (δ_H 2.70) και H-6b (δ_H 2.19)
- Το μεθυλενικό πρωτόνιο H-6a (δ_H 2.70) συζεύγνυται με το δίδυμό του H-6b (δ_H 2.19), με το γειτονικό του πρωτόνιο H-5 (δ_H 3.95), καθώς επίσης και με τα πρωτόνια H-3 (δ_H 4.37) και H-2 (δ_H 6.73).

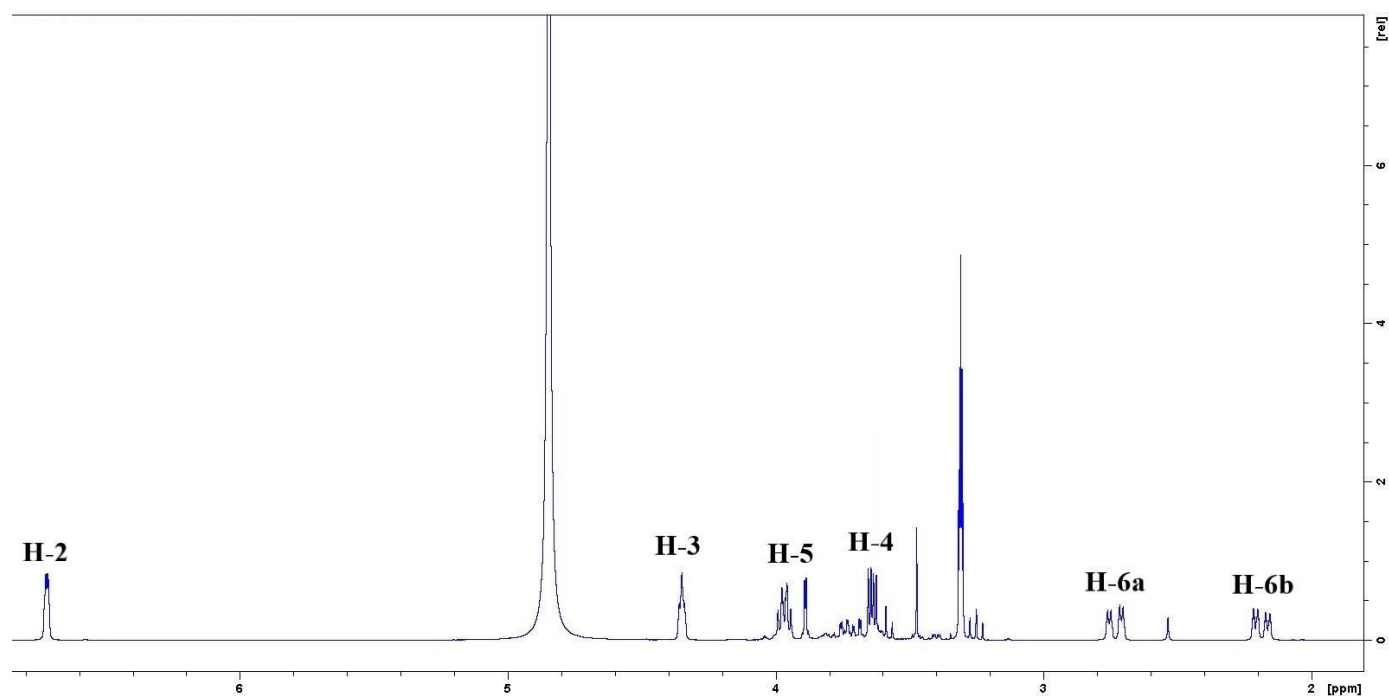
Από το φάσμα NOESY παρατηρήσαμε σήματα nOe μεταξύ των πρωτονίων H-3 (δ_H 4.37) και H-4 (δ_H 3.62), καθώς και μεταξύ των πρωτονίων H-4 (δ_H 3.62) και H-6b (δ_H 2.19).

Από το φάσμα HSQC λάβαμε τις εξής πληροφορίες:

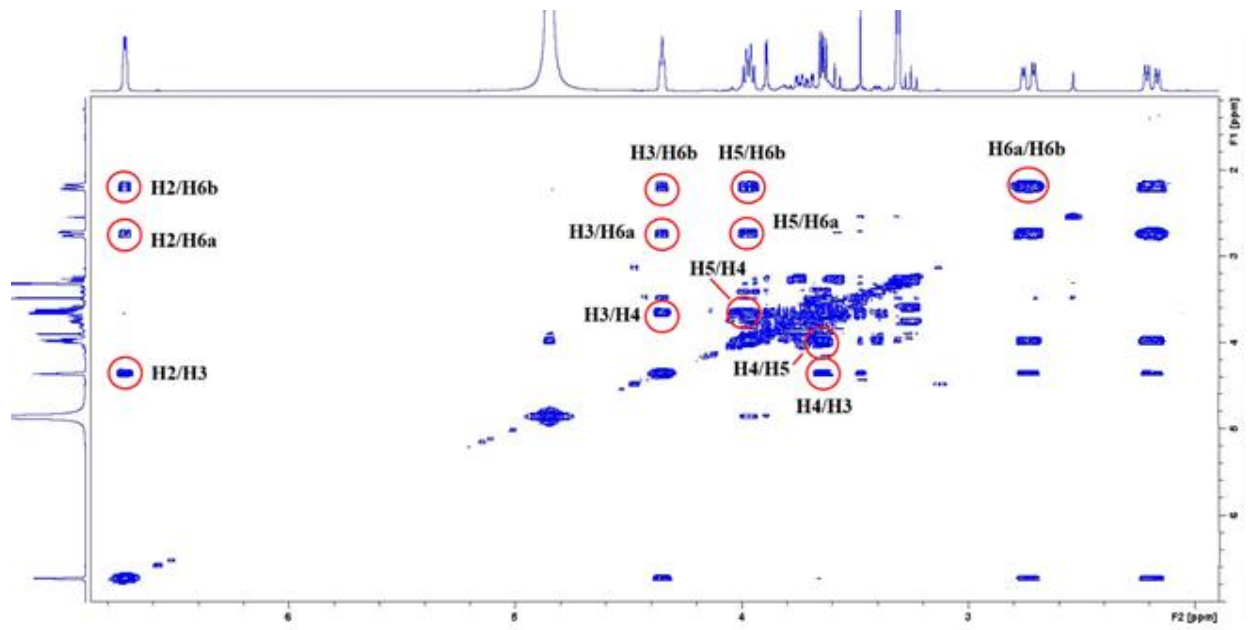
- Το πρωτόνιο H-2 (δ_H 6.73) αντιστοιχίζεται στον άνθρακα C-2 (δ_C 136.8)
- Το πρωτόνιο H-3 (δ_H 4.37) αντιστοιχίζεται στον άνθρακα C-3 (δ_C 67.1)
- Το πρωτόνιο H-5 (δ_H 3.95) αντιστοιχίζεται στον άνθρακα C-5 (δ_C 68.2)
- Το πρωτόνιο H-4 (δ_H 3.62) αντιστοιχίζεται στον άνθρακα C-4 (δ_C 72.7)
- Τα δίδυμα μεθυλενικά πρωτόνια H-6a (δ_H 2.70) και H-6b (δ_H 2.19) αντιστοιχίζονται στον μεθυλενικό άνθρακα C-6 (δ_C 32.3)

Πίνακας 20 Φασματοσκοπικά δεδομένα ουσίας **3** (CD₃OD, 400 MHz)

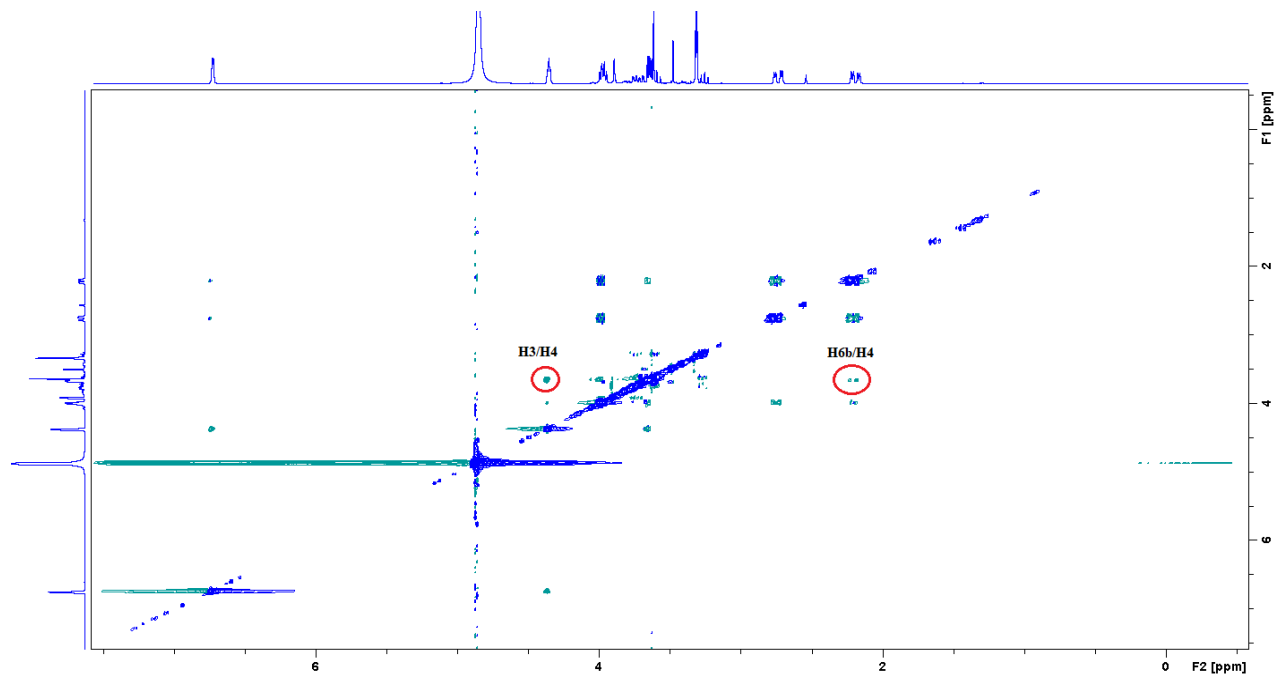
Θέση	H	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	Πολλαπλότητα J (Hz)
2	1	136.8	6.73	<i>m</i>
3	1	67.1	4.37	br <i>t</i> (4.2)
4	1	72.7	3.62	<i>dd</i> (7.9, 3.3)
5	1	68.2	3.95	<i>m</i>
6a	1	32.3	2.70	<i>dd</i> (18.0, 6.4)
6b	1		2.19	<i>dd</i> (18.0, 6.0)



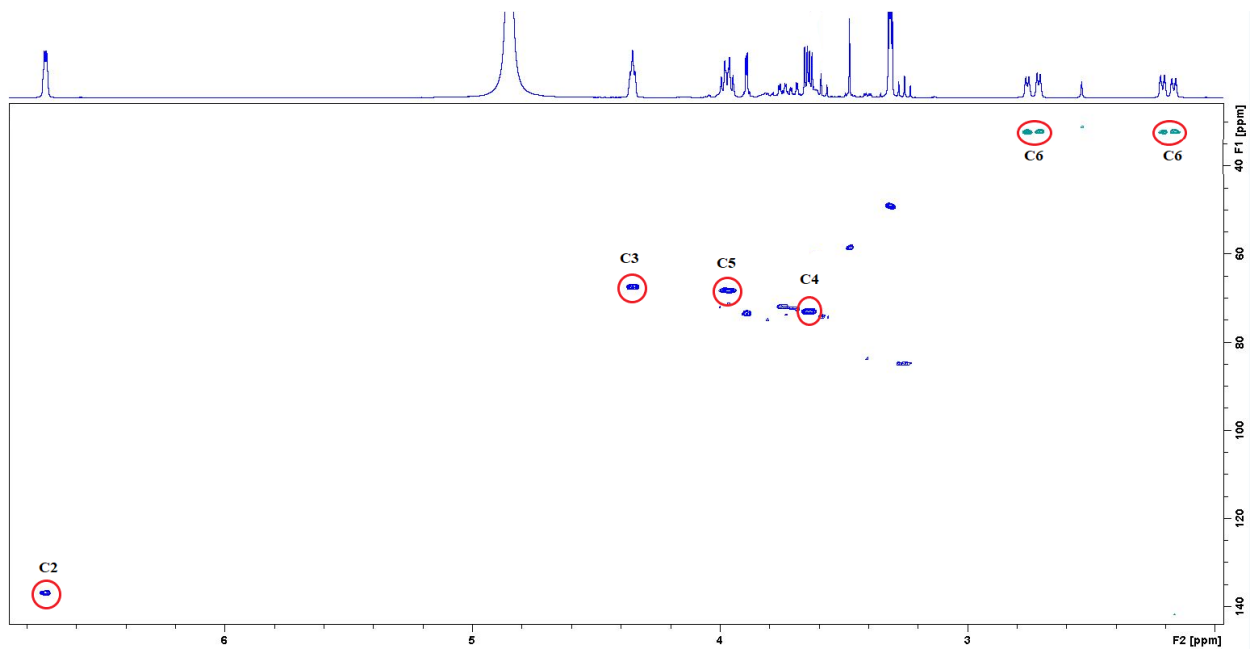
Εικόνα 21 Φάσμα ¹H-NMR της ουσίας **3** (CD₃OD, 400 MHz)



Εικόνα 22 Φάσμα COSY της ουσίας 3 (CD₃OD, 400 MHz)

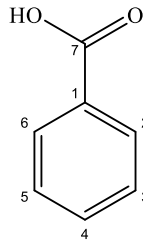


Εικόνα 23 Φάσμα NOESY της ουσίας 3 (CD₃OD, 400 MHz)



Εικόνα 24 Φάσμα HSQC της ουσίας **3** (CD₃OD, 400 MHz)

Ουσία 4: Βενζοϊκό Οξύ [βενζυλοκαρβοξυλικό οξύ]



Η ουσία **4** απομονώθηκε ως άχρωμη άμορφη κόνις και ταυτοποιήθηκε μέσω φασμάτων $^1\text{H-NMR}$, και COSY, καθώς και με τη σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα (Chen et al., 2008; Venkateswarlu et al., 2015).

Η ουσία **4** αποτελεί ένα φαινολικό οξύ το οποίο είναι ευρέως διαδεδομένο στους φυτικούς οργανισμούς και έχει απομονωθεί από διάφορα φυτικά είδη. Πολλά από αυτά έχουν υψηλή διατροφική αξία (π.χ. φασόλια, κακαόδεντρο, κ.α.) (Nair, 2001).

Το βενζοϊκό οξύ φαίνεται ότι παρουσιάζει σημαντική ανασταλτική δράση έναντι της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που προκαλείται από τη θρομβίνη, το αραχιδονικό οξύ, ή το κολλαγόνο. Με αποτέλεσμα, να εμφανίζει ανασταλτική δράση στην ενδοαγγειακή πήξη και στην αιμορραγία, καθώς και να δρα ως αντιφλεγμονώδης παράγοντας (Ding et al., 2000).

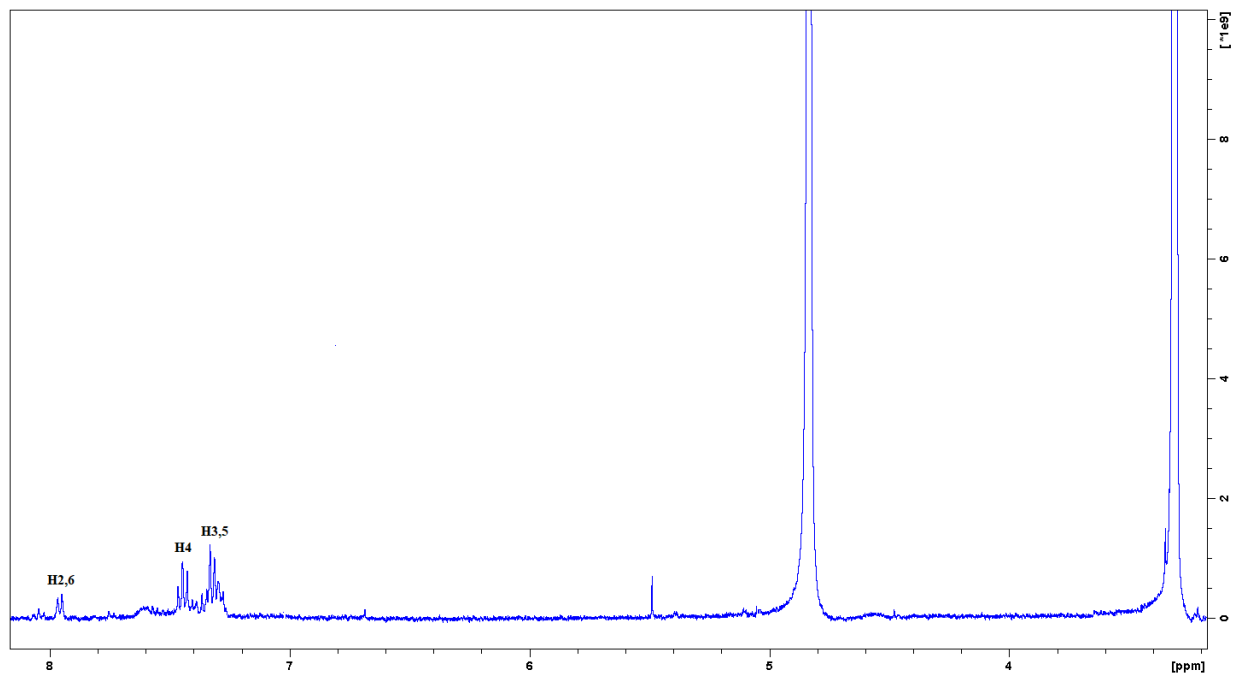
Από το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ λάβαμε τις εξής πληροφορίες:

- Σε δ_{H} 7.96 εντοπίζονται τα πρωτόνια H-2 και H-6 ως μια διπλώς διπλή κορυφή.
- Σε δ_{H} 7.45 εμφανίζεται το πρωτόνιο H-4 ως μια τριπλή κορυφή.
- Σε δ_{H} 7.33 εμφανίζονται τα πρωτόνια H-3 και H-5 ως μια τριπλώς διπλή κορυφή.

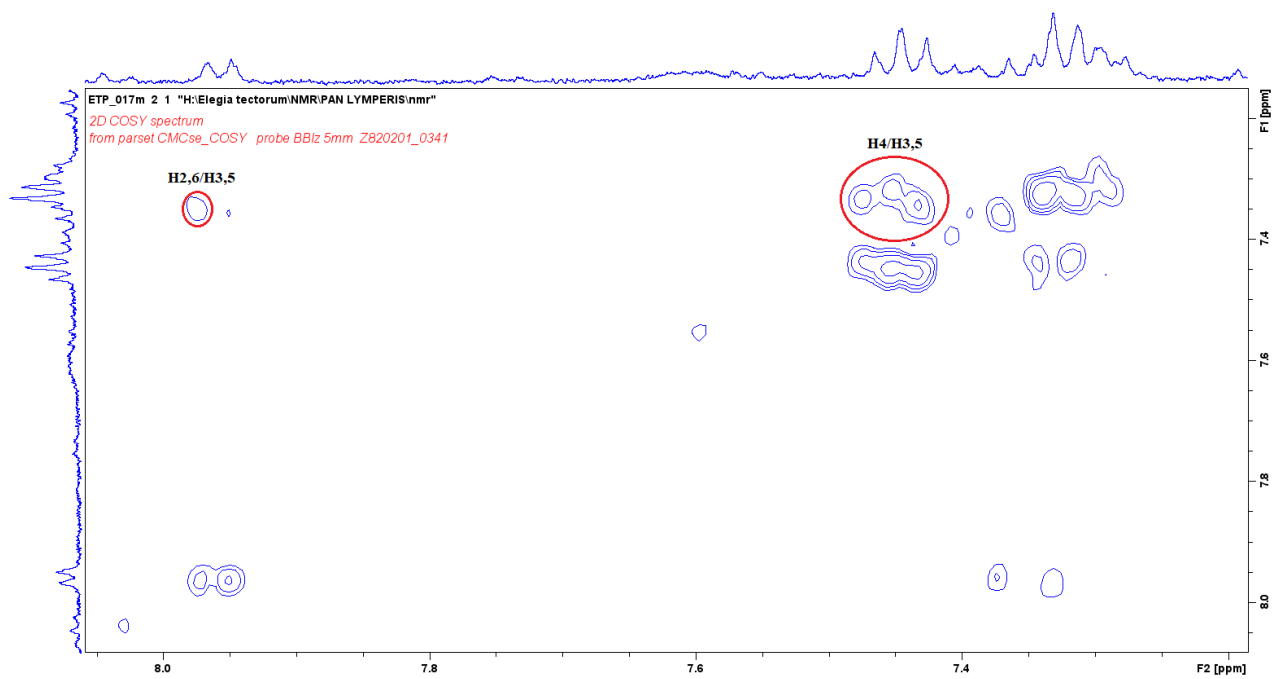
Από το φάσμα COSY παρατηρείται η σύζευξη μεταξύ των πρωτονίων H-2,6 με τα πρωτόνια H-3,5. Επίσης, παρατηρείται η σύζευξη μεταξύ των πρωτονίων H-3,5 και του πρωτονίου H-4.

Πίνακας 21 Φασματοσκοπικά δεδομένα ουσίας **4** (CD₃OD, 400 MHz)

Θέση	H	δ_H (ppm)	Πολλαπλότητα J (Hz)
2	1	7.96	<i>dd</i> (7.3, 1.8)
3	1	7.33	<i>td</i> (7.3, 1.8)
4	1	7.45	<i>t</i> (7.4)
5	1	7.33	<i>td</i> (7.3, 1.8)
6	1	7.96	<i>dd</i> (7.3, 1.8)

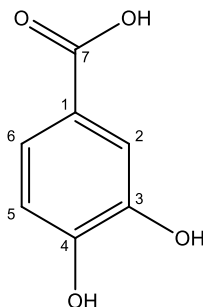


Εικόνα 25 Φάσμα ¹H-NMR της ουσίας **4** (CD₃OD, 400 MHz)



Εικόνα 26 Φάσμα COSY της ουσίας 4 (CD₃OD, 400 MHz)

Ουσία 5: Πρωτοκατεχικό οξύ [3,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ]



Η ουσία **5** απομονώθηκε ως βάθυ κίτρινο υπόλειμμα και η ταυτοποίηση της πραγματοποιήθηκε μέσω φασμάτων $^1\text{H-NMR}$, COSY και HSQC, καθώς και με σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα (Gutzeit et al., 2006; Masuoka et al., 2007; Yuan et al., 2017; Terfassi et al., 2021).

Η συγκεκριμένη ουσία αποτελεί ένα φαινολικό οξύ το οποίο είναι ευρέως διαδεδομένο στους φυτικούς οργανισμούς και έχει απομονωθεί σε περισσότερα από 500 φυτικά είδη (π.χ. ρύζι, κρεμμύδι κ.α.) (Kakkar and Bais, 2014).

Το πρωτοκατεχικό οξύ έχει μελετηθεί για την αντιοξειδωτική του δράση, η οποία αναφέρεται ότι είναι ισχυρότερη αυτής της α -τοκοφερόλης (Βιταμίνη Ε) (Masuoka et al., 2007). Επιπλέον, το πρωτοκατεχικό οξύ έχει μελετηθεί για αντιβακτηριακή, αντικαρκινική, αντι-ελκωτική, αντιδιαβητική, αντιγηραντική, αντιακνη, αντιφλεγμονώδη και αντιαθηροσκληρωτική δράση (Kakkar and Bais, 2014). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι έχει αναλγητική, καρδιαπροστατευτική, ηπατοπροστατευτική, νευρολογική και νεφροπροστατευτική δράση (Kakkar and Bais, 2014).

Από το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ λάβαμε τις εξής πληροφορίες:

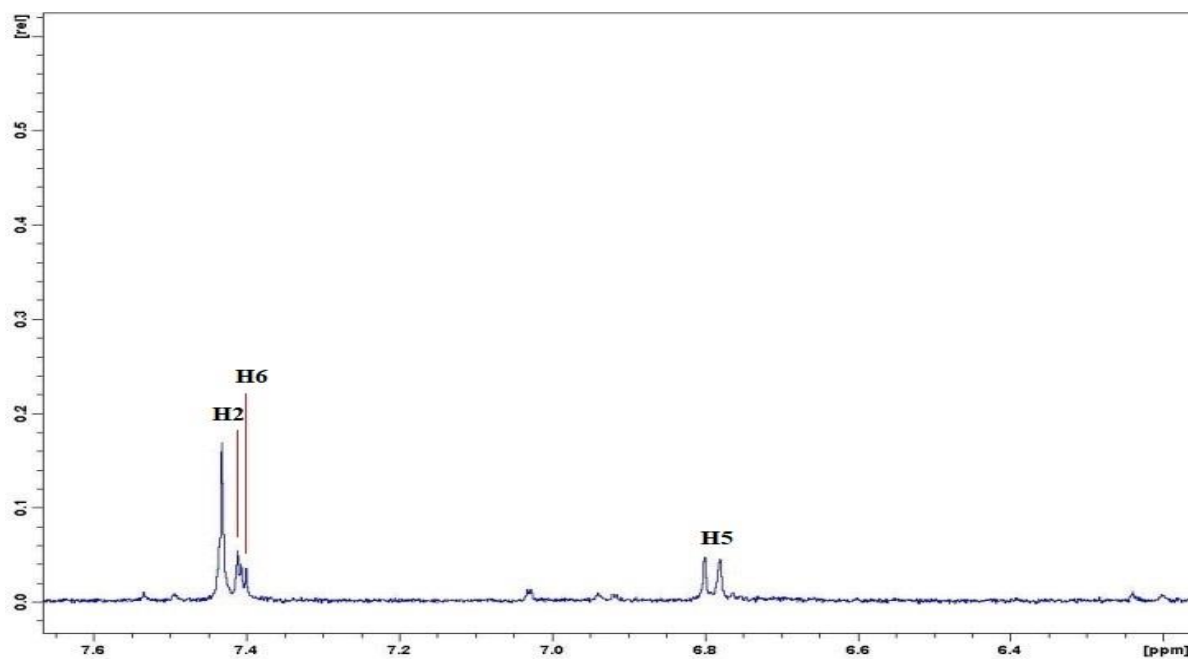
- Σε δ_H 7.43 παρατηρείται μια ευρεία απλή κορυφή που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-2, το οποίο εμφανίζει *μετα*-σύζευξη με το πρωτόνιο H-6
- Σε δ_H 7.41 παρατηρείται μια διπλώς διπλή κορυφή που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-6, το οποίο εμφανίζει *μετα*-σύζευξη με το H-2 και *ορθο*-σύζευξη με το H-5
- Σε δ_H 6.80 παρατηρείται μια διπλή κορυφή με μεγάλη σταθερά σύζευξης ($J= 8.0$) που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-5, το οποίο εμφανίζει *ορθο*-σύζευξη με το H-6.

Από το φάσμα COSY παρατηρείται η σύζευξη μεταξύ των γειτονικών πρωτονίων H-5 και H-6.

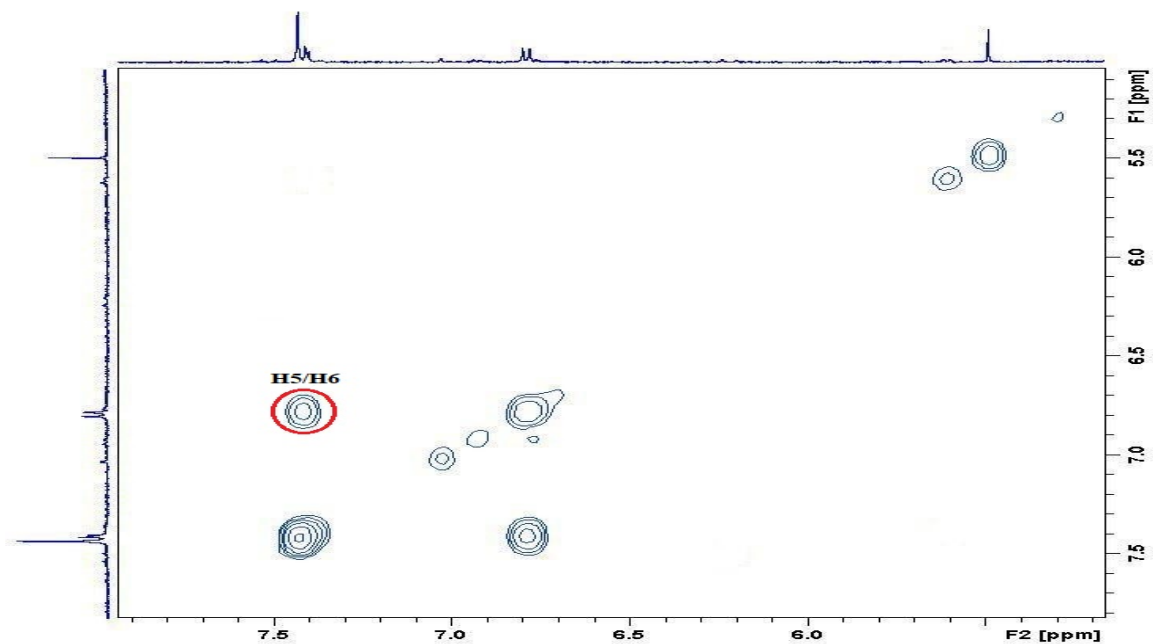
Με τη βοήθεια του φάσματος HSQC ταυτοποιήθηκαν οι πρωτονιωμένοι άνθρακες του σκελετού του μορίου.

Πίνακας 22 Φασματοσκοπικά δεδομένα ουσίας **5** (CD₃OD, 400 MHz)

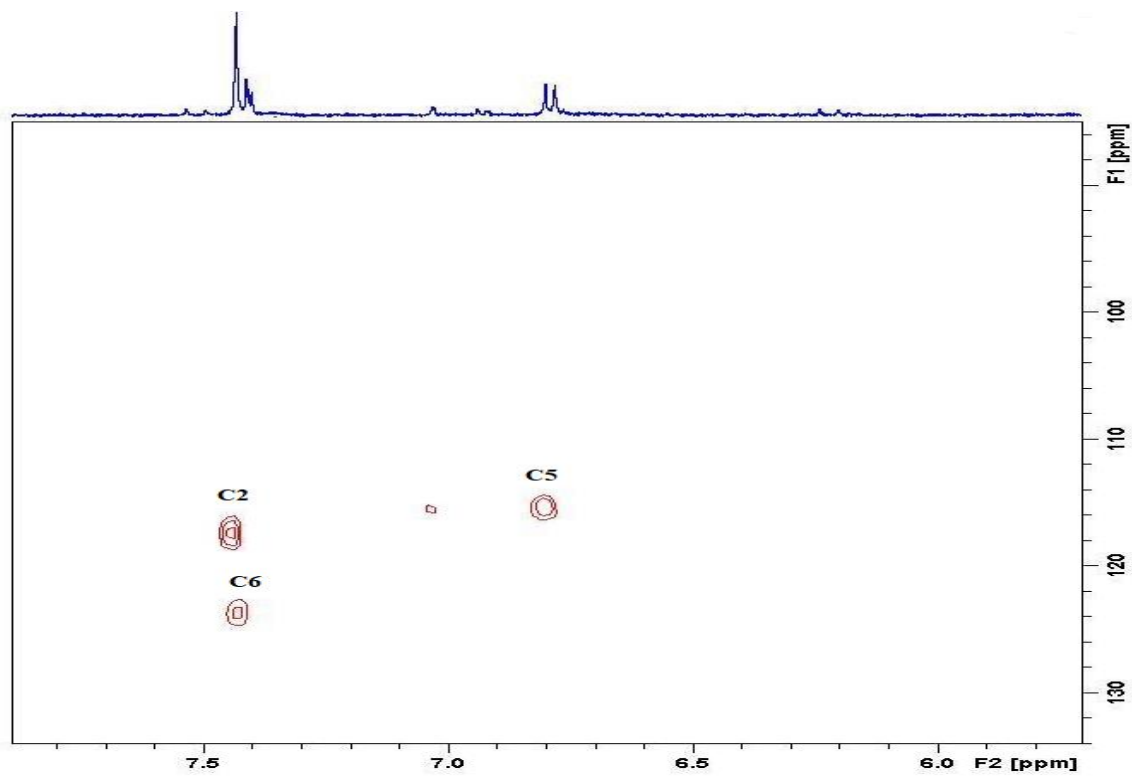
Θέση	H	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	Πολλαπλότητα J (Hz)
2	1	117.8	7.43	<i>d</i> (2.0)
5	1	115.4	6.78	<i>d</i> (8.0)
6	1	123.6	7.41	<i>dd</i> (8.0, 2.0)



Εικόνα 27 Φάσμα ¹H-NMR της ουσίας **5** (CD₃OD, 400 MHz)



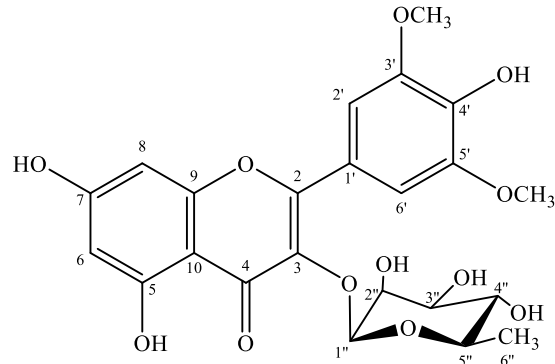
Εικόνα 28 Φάσμα COSY της ουσίας 5 (CD₃OD, 400 MHz)



Εικόνα 29 Φάσμα HSQC της ουσίας 5 (CD₃OD, 400 MHz)

Γ3.Φλαβονοειδή

Ουσία 6: Συριγγετινο-3-O- α -L-ραμνοσίδης



Η ουσία **6** απομονώθηκε ως άχρωμη άμορφη κόνις και ταυτοποιήθηκε μέσω φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ και COSY, καθώς και με τη σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα (Braca et al., 2001).

Ανήκει στην κατηγορία των 3-υδροξυ-φλαβονών (φλαβονολών). Στο γένος *Elegia* L. έχει απομονωθεί από το είδος *E. deusta*, οπότε στην παρούσα εργασία είναι η πρώτη αναφορά για απομόνωση του από το είδος *E. tectorum* (Harborne et al., 1985). Επίσης, έχει απομονωθεί από τα είδη *Lysimachia congestiflora* και *Licania densiflora*. (Jian Guo et al., 1998; Braca et al., 2001).

Από το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ λάβαμε τα ακόλουθα αποτελέσματα:

- Σε δ_{H} 7.16 εντοπίζονται τα πρωτόνια H-2' και H-6' ως μια απλή κορυφή που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια.
- Σε δ_{H} 6.20 εμφανίζεται το πρωτόνιο H-8 ως μια διπλή κορυφή με μικρή σταθερά σύζευξης ($J=2.0$ Hz, μετα-σύζευξη).
- Σε δ_{H} 6.48 εμφανίζεται το πρωτόνιο H-6 ως μια διπλή κορυφή με μικρή σταθερά σύζευξης ($J=2.0$ Hz, μετα-σύζευξη).
- Οι θέσεις 3' και 5' του B δακτυλίου είναι υποκατεστημένες με μία $-\text{OCH}_3$ ομάδα η καθεμία, τα πρωτόνια της οποίας εμφανίζονται σε δ_{H} 3.93 ως μία απλή κορυφή που ολοκληρώνει για έξι πρωτόνια.

Στη μεσαία περιοχή του φάσματος παρατηρείται ένα σήμα σε δ_{H} 5.36, το οποίο υποδεικνύει την ύπαρξη σακχάρου. Πιο συγκεκριμένα, εμφανίζεται ως μια διπλή κορυφή με μικρή σταθερά σύζευξης ($J=2.0$ Hz) που αντιστοιχεί στο ανωμερικό πρωτόνιο μίας ραμνόσης. Με τη βοήθεια του φάσματος COSY βρέθηκε η χημική μετατόπιση του πρωτονίου H-2'' (δ_{H} 4.18), καθώς

συζεύγνυται με το ανωμερικό πρωτόνιο H-1". Επίσης, το πρωτόνιο H-2" συζεύγνυται και με το γειτονικό του πρωτόνιο H-3" (δ_H 3.73), το οποίο συζεύγνυται ακολούθως με το γειτονικό του πρωτόνιο H-4" (δ_H 3.40). Τα μεθυλικά πρωτόνια της θέσεως 6" της ραμνόσης (δ_H 0.90), συζεύγνυται με το γειτονικό τους πρωτόνιο H-5" (δ_H 3.30).

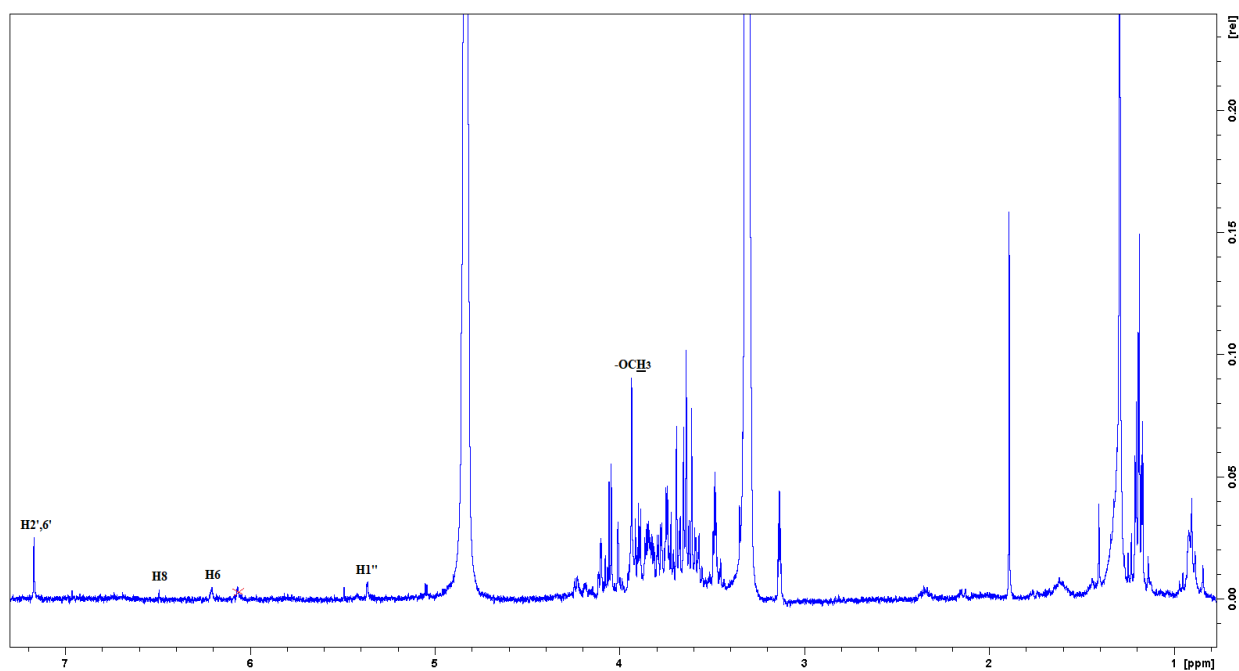
Αξίζει να σημειωθεί ότι το σάκχαρο του μορίου πρόκειται για ραμνόση καθώς το πρωτόνιο H-2" (δ_H 4.18) εμφανίζεται ως μια διπλώς διπλή κορυφή με μία equatorial-equatorial σύζευξη με το ανωμερικό πρωτόνιο H-1" ($J=2.0$ Hz) και axial-equatorial σύζευξη με το πρωτόνιο H-3" ($J=3.0$ Hz).

Πίνακας 23 Φασματοσκοπικά δεδομένα ουσίας **6** (CD₃OD, 400 MHz)

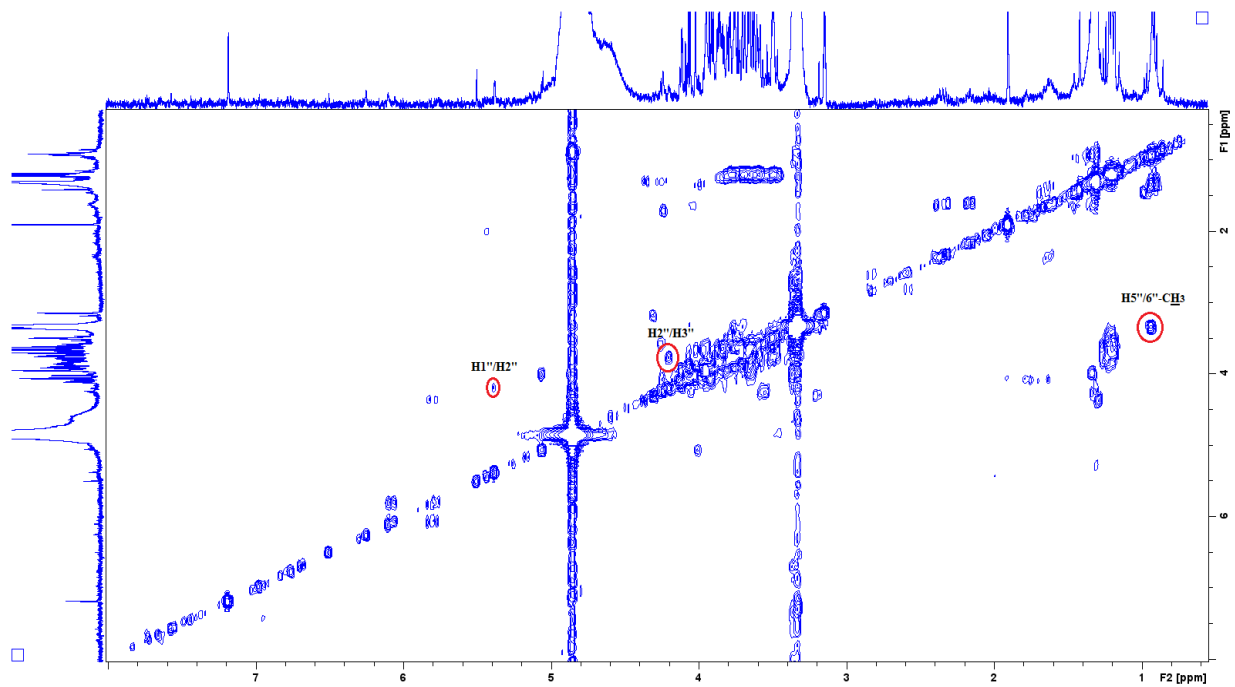
Θέση	H	δ_H (ppm)	Πολλαπλότητα J (Hz)
Άγλυκο			
2	-	-	
3	-	-	
4	-	-	
5	-	-	
6	1	6.20	d (2.0)
7	-	-	
8	1	6.48	d (2.0)
9	-	-	
10	-	-	
1'	-	-	
2'	1	7.16	br s
3'	-	-	
4'	-	-	
5'	-	-	
6'	1	7.16	br s
-OCH₃	3	3.93	s

Ραμνóση			
1''	1	5.36	d (2.0)
2''	1	4.18	dd (3.0, 2.0)
3''	1	3.73	dd (7.5, 3.0)
4''	1	3.40	*
5''	1	3.30 ^α	*
CH ₃ -6''	3	0.90	d (7.4)

*επικαλυπτόμενα σήματα, ^α σήμα επικαλυπτόμενο από την κορυφή του διαλύτη

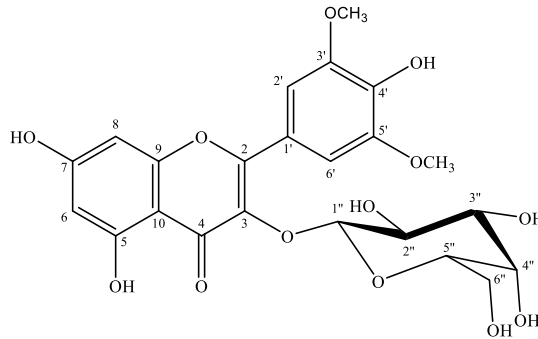


Εικόνα 30 Φάσμα ¹H-NMR της ουσίας 6 (CD₃OD, 400 MHz)



Εικόνα 31 Φάσμα COSY της ουσίας 6 (CD₃OD, 400 MHz)

Ουσία 7: Συριγγετινο-3-O-β-D-γαλακτοσίδης



Η ουσία **7** απομονώθηκε ως κίτρινο υπόλειμμα και ταυτοποιήθηκε μέσω φασμάτων $^1\text{H-NMR}$, COSY, NOESY, HSQC και HMBC, καθώς και με τη σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα (Adell et al., 1988; Masuoka et al., 2007).

Ανήκει στην κατηγορία των 3-υδροξυ-φλαβονών (φλαβονολών). Απομονώθηκε πρώτη φορά από το είδος *Philydrum lanugiosum* (Bohm and Collins, 1975). Έχει απομονωθεί από μερικά είδη του γένους *Elegia* L. τα οποία είναι τα *E. deusta*, *E. hookeriana*, *E. microcarpa*, *E. mucronata*, *E. nuda*, *E. recta* και *E. tectorum*, όπως επίσης και από τα *Anthyllis sericea* (Leguminosae), *Vitis vinifera* (Vitaceae), *Lysimachia vulgaris*, *L. nummularia* (Primulaceae) και *Vaccinium uliginosum* (Ericaceae) (Harborne, 1979; Harborne et al., 1985; Adell et al., 1988; Yasukawa and Takido, 1988; Yasukawa et al., 1990; Mattivi et al., 2006; Masuoka et al., 2007; Castillo-Muñoz et al., 2009).

Ο συριγγετινο-3-O-γαλακτοσίδης έχει μελετηθεί για την αντιοξειδωτική του ικανότητα και φαίνεται ότι η δράση του είναι ισχυρότερη από αυτής της α -τοκοφερόλης (Masuoka et al., 2007).

Από το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ λάβαμε τις ακόλουθες πληροφορίες:

- Σε δ_{H} 7.58 εντοπίζονται τα πρωτόνια H-2' και H-6' ως μια απλή κορυφή που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια.
- Σε δ_{H} 6.43 εμφανίζεται το πρωτόνιο H-8 ως μια διπλή κορυφή με μικρή σταθερά σύζευξης ($J=2.1$ Hz, μετα- σύζευξη).
- Σε δ_{H} 6.21 εμφανίζεται το πρωτόνιο H-6 ως μια διπλή κορυφή με μικρή σταθερά σύζευξης ($J=2.1$ Hz, μετα- σύζευξη).

- Σε δ_H 3.94 εμφανίζεται μια απλή κορυφή που ολοκληρώνει για έξι πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια των δύο μεθοξυ-ομάδων που υπάρχουν στις θέσεις 3' και 5' του Β δακτυλίου.

Από το φάσμα COSY εντοπίστηκε η σύζευξη των πρωτονίων H-8 και H-6.

Στη μεσαία περιοχή του φάσματος παρατηρείται ένα σήμα σε δ_H 5.41, το οποίο υποδεικνύει την ύπαρξη σακχάρου. Πιο συγκεκριμένα, εμφανίζεται ως μια διπλή κορυφή με μεγάλη σταθερά σύζευξης ($J=8.0$ Hz) που αντιστοιχεί στο ανωμερικό πρωτόνιο μιας γαλακτόσης. Με τη βοήθεια του φάσματος COSY βρέθηκε η χημική μετατόπιση του πρωτονίου H-2'' (δ_H 3.84), καθώς συζεύγνυται με το ανωμερικό πρωτόνιο H-1''. Επίσης, το πρωτόνιο H-2'' συζεύγνυται και με το γειτονικό του πρωτόνιο H-3'' (δ_H 3.58), το οποίο συζεύγνυται ακολούθως με το γειτονικό του πρωτόνιο H-4'' (δ_H 3.80). Τα μεθυλικά πρωτόνια της θέσεως 6'' συζεύγνυται μεταξύ τους με H-6''a (δ_H 3.60) και H-6''b (δ_H 3.66). Επιπλέον, το πρωτόνιο H-6''b συζεύγνυται και με το γειτονικό του πρωτόνιο H-5'' (δ_H 3.50).

Αξίζει να σημειωθεί ότι το σάκχαρο του μορίου πρόκειται για γαλακτόση καθώς το πρωτόνιο H-3'' (δ_H 3.58) εμφανίζεται ως μια διπλώς διπλή κορυφή με μία axial-axial σύζευξη με το πρωτόνιο H-2'' ($J=9.2$ Hz) και με μία axial-equatorial σύζευξη με το πρωτόνιο H-4'' ($J=3.4$ Hz). Αυτό συμβαίνει διότι το H-4'' βρίσκεται, σε αντίθεση με την γλυκόση, σε ισημερινή θέση και εμφανίζεται ως μια τριπλή κορυφή με μικρή σταθερά σύζευξης.

Στο φάσμα NOESY παρατηρούμε σήμα nOe μεταξύ των αρωματικών πρωτονίων H2', H6' και των πρωτονίων των δύο μεθοξυ-ομάδων (3'-OCH₃ και 5'-OCH₃).

Με τη βοήθεια του φάσματος HSQC εντοπίστηκαν οι πρωτονιωμένοι άνθρακες του σκελετού του μορίου.

Από το φάσμα HMBC εντοπίστηκαν και οι τεταρτοταγείς άνθρακες του σκελετού του μορίου, καθώς επίσης επιβεβαιώθηκε η δομή της συγκεκριμένης ουσίας (Πίνακας 24). Επίσης, λάβαμε τα εξής σήματα:

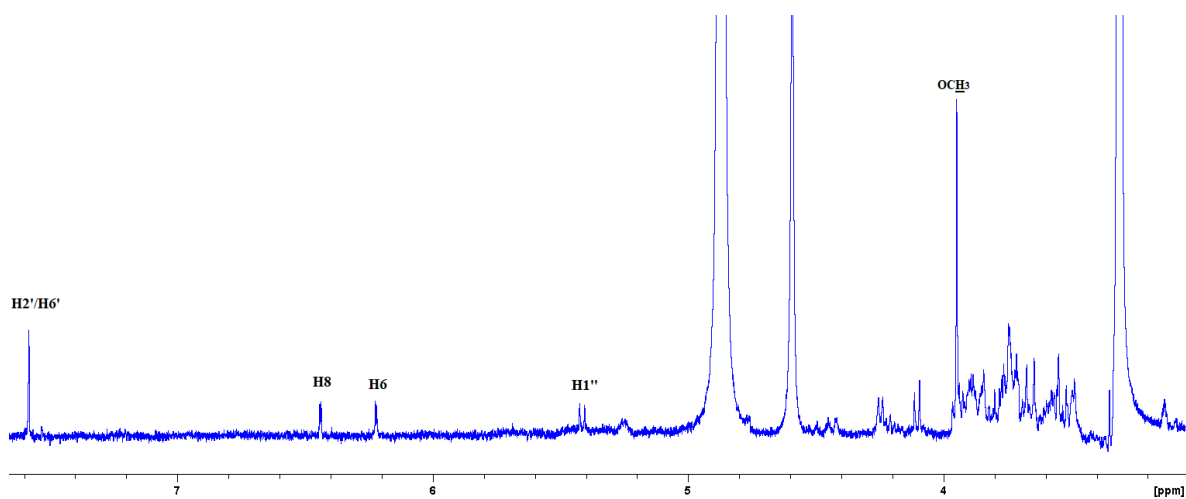
- Τα πρωτόνια H-2'/H-6' δίνουν σήμα διασταύρωσης με τους άνθρακες σε δ_C 107.2 που αντιστοιχούν στους C-2'/C-6', με τον άνθρακα σε δ_C 120.5 που αντιστοιχεί στον C-1', με τον άνθρακα σε δ_C 138.9 που αντιστοιχεί στον C-4', με τους άνθρακες σε δ_C 147.7 που αντιστοιχούν στους C-3'/C-5' και τέλος με τον άνθρακα σε δ_C 157.5 που αντιστοιχεί στον άνθρακα C-2.

- Το πρωτόνιο H-8 δίνει σήμα διασταύρωσης με τον άνθρακα σε δ_C 157.1 που αντιστοιχεί στον C-9.
- Το πρωτόνιο H-6 δίνει σήμα διασταύρωσης με τον άνθρακα σε δ_C 94.5 που αντιστοιχεί στον C-8.
- Τέλος, τα πρωτόνια των $-OCH_3$ ομάδων δίνουν σήματα διασταύρωσης με του C-3' και C-5' (δ_C 147.7) γεγονός που επιβεβαιώνει τις θέσεις των συγκεκριμένων ομάδων στον Β δακτύλιο.

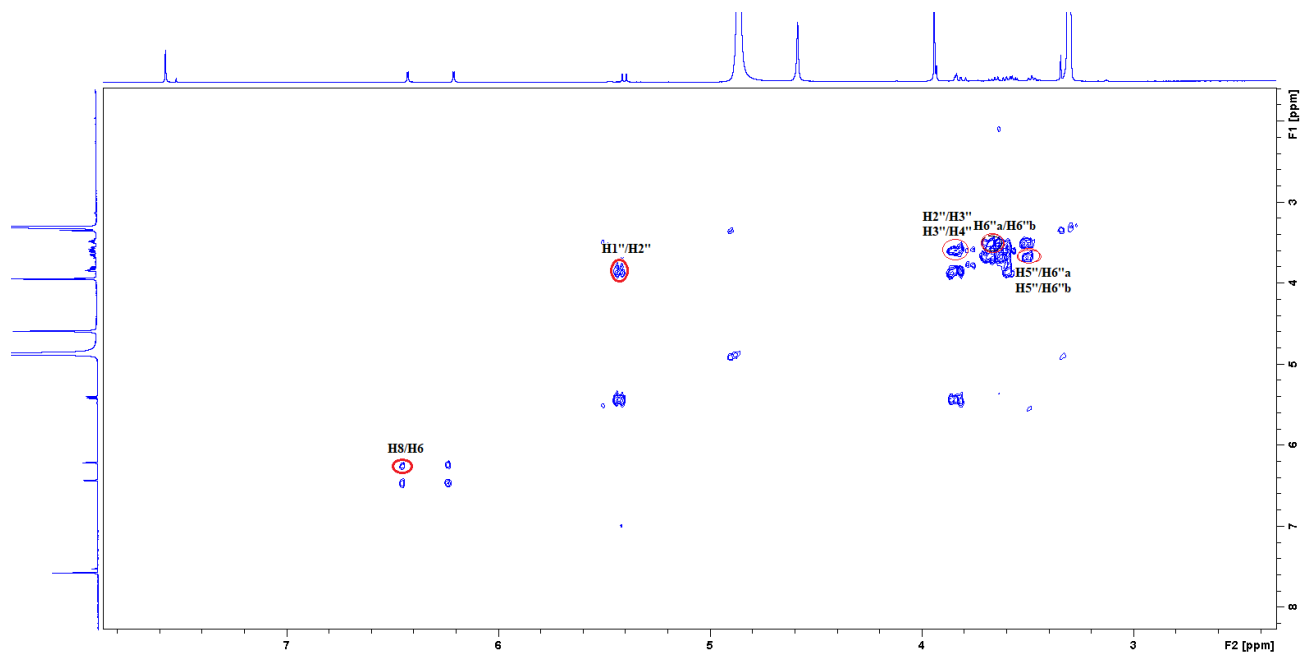
Πίνακας 24 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ουσίας **7** (CD_3OD , 400 MHz)

Θέση	H	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	Πολλαπλότητα J (Hz)	HMBC
Άγλυκο					
2	-	157.5	-	-	
3	-		-	-	
5	-		-	-	
6	1	99.8	6.21	d (2.1)	C-8
7	-				
8	1	94.5	6.43	d (2.1)	C-9
9	-	157.1	-	-	
10	-		-	-	
1'	-	120.5	-	-	
2'/6'	2	107.2	7.58	s	C-2', C-6', C-1', C-4', C-3', C-5', C-2
3'	-	147.7	-	-	
4'	-	138.9	-	-	
5'	-	147.7	-	-	
-OCH₃	6	57.1	3.94	s	C-3', C-5'
Γαλακτόση					
1''	1	104.0	5.41	d (8.0)	
2''	1	69.9	3.84	t (9.2)	

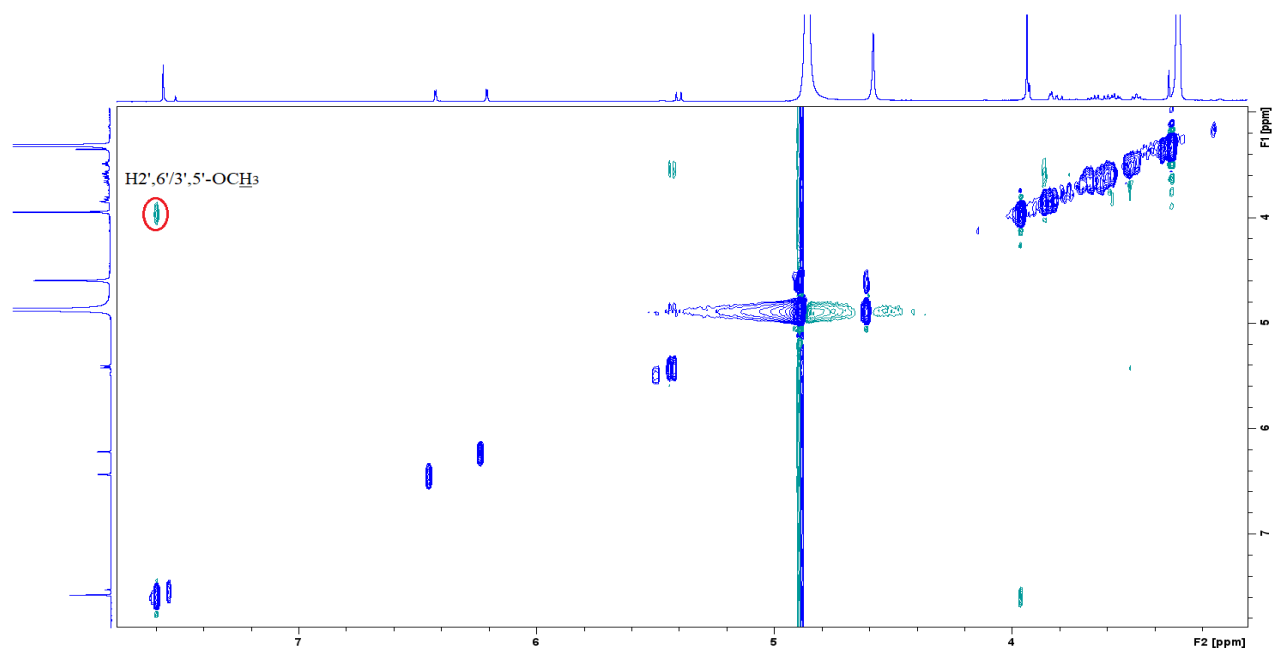
3''	1	74.8	3.58	dd (9.2,3.4)	
4''	1	73.4	3.80	t (3.4)	
5''	1	77.2	3.50	ddd (5.9, 3.6, 3.4)	
6''a	1	62.2	3.60	dd (10.8, 3.6)	
6''b	1	62.2	3.66	dd (10.8, 5.9)	



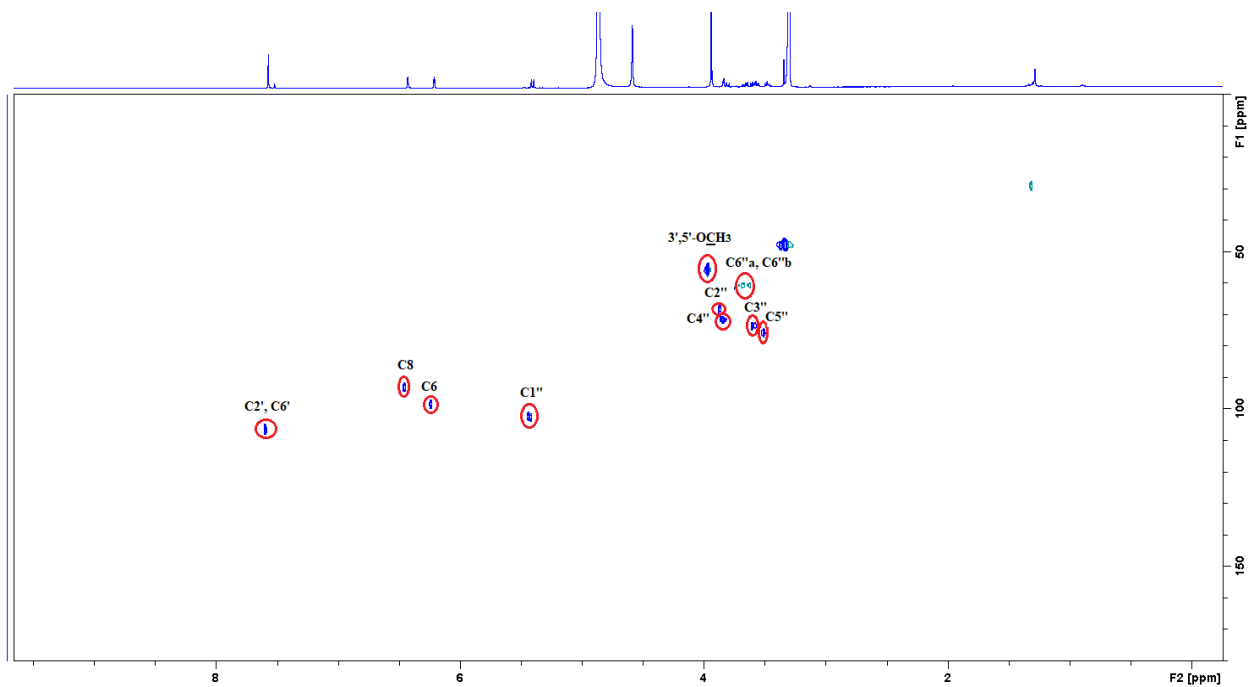
Εικόνα 32 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ουσίας **7** (CD_3OD , 400 MHz)



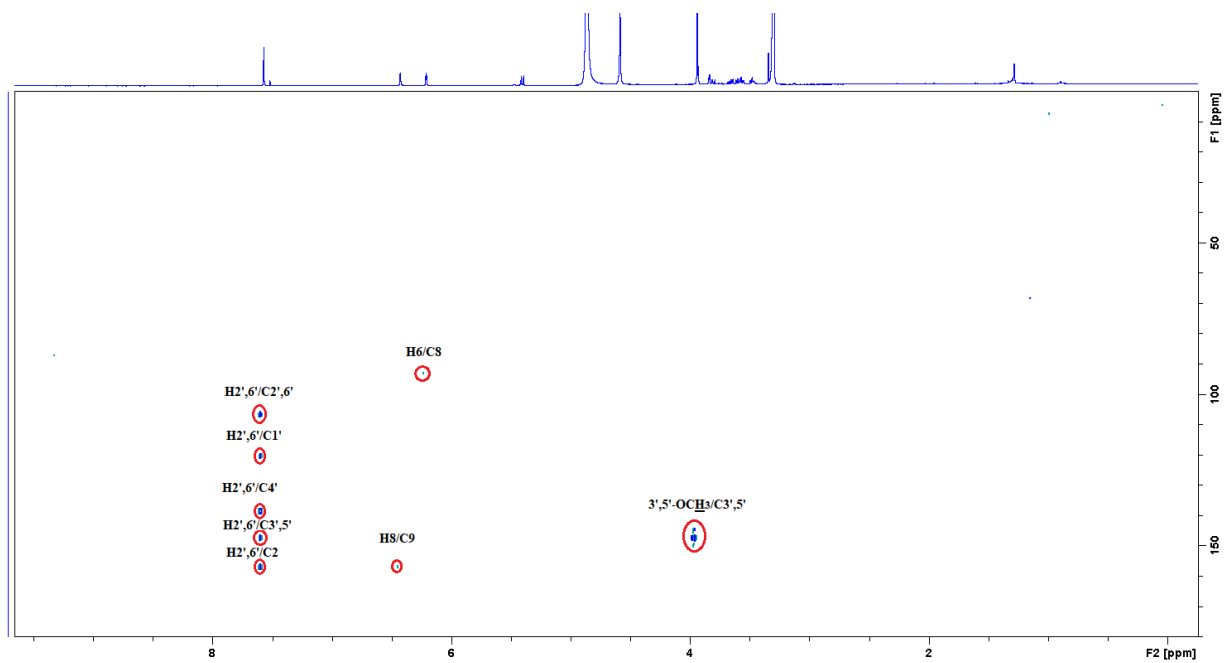
Εικόνα 33 Φάσμα COSY της ουσίας 7 (CD₃OD, 400 MHz)



Εικόνα 34 Φάσμα NOESY της ουσίας 7 (CD₃OD, 400 MHz)

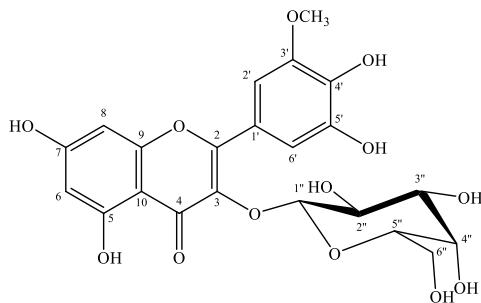


Εικόνα 35 Φάσμα HSQC της ουσίας **7** (CD₃OD, 400 MHz)



Εικόνα 36 Φάσμα HMBC της ουσίας **7** (CD₃OD, 400 MHz)

Ουσία 8: Λαρισετινο-3-O-β-D-γαλακτοσίδης



Η ουσία **8** απομονώθηκε ως κίτρινο υπόλειμμα και ταυτοποιήθηκε μέσω φασμάτων $^1\text{H-NMR}$, COSY, NOESY και HMBC, καθώς και με τη σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα (Braca et al., 2001; do Vale et al., 2005)

Ανήκει στην κατηγορία των 3-υδροξυ-φλαβονών (φλαβονολών). Απομονώθηκε πρώτη φορά από το είδος *Abies amabilis* (Parker et al., 1979). Στο γένος *Elegia* L. έχει απομονωθεί, πέρα από το *E. tectorum*, από τα είδη *E. hookeriana*, *E. galpinii*, *E. filacea*, *E. rigida*, *E. persistens*, *E. deusta*, *E. microcarpa*, *E. nuda* και *E. recta*, όπως επίσης και από τα *Vitis vinifera*, *Picea abies*, *Moldenhawera nutants* και *Vaccinium* spp. (Harborne, 1979; Harborne et al., 1985; Mattivi et al., 2006; Koronen et al., 2008; Castillo-Muñoz et al., 2009; Becker Pertuzatti et al., 2021).

Ο λαρισετινο-3-O-β-D-γαλακτοσίδης έχει μελετηθεί για την αντιοξειδωτική του δράση (do Vale et al., 2005).

Από το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ λάβαμε τις εξής πληροφορίες:

- Σε δ_{H} 7.58 εντοπίζεται το πρωτόνιο H-6' ως μια απλή κορυφή.
- Σε δ_{H} 7.53 εντοπίζεται το πρωτόνιο H-2' ως μια απλή κορυφή.
- Σε δ_{H} 6.44 εμφανίζεται το πρωτόνιο H-8 ως μια διπλή κορυφή με μικρή σταθερά σύζευξης ($J=2.0$ Hz, *μετα-* σύζευξη).
- Σε δ_{H} 6.22 εμφανίζεται το πρωτόνιο H-6 ως μια διπλή κορυφή με μικρή σταθερά σύζευξης ($J=2.0$ Hz, *μετα-* σύζευξη).
- Η θέση 3' του B δακτυλίου είναι υποκατεστημένη με μία $-\text{OCH}_3$ ομάδα, τα πρωτόνια της οποίας εμφανίζονται σε δ_{H} 3.95 ως μία απλή κορυφή που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια.

Από το φάσμα COSY παρατηρήθηκε η σύζευξη μεταξύ των πρωτονίων H-8 και H-6.

Στη μεσαία περιοχή του φάσματος παρατηρείται ένα σήμα σε δ_H 5.41, το οποίο υποδεικνύει την ύπαρξη σακχάρου. Πιο συγκεκριμένα, εμφανίζεται ως μια διπλή κορυφή με μεγάλη σταθερά σύζευξης ($J=7.5$ Hz) που αντιστοιχεί στο ανωμερικό πρωτόνιο μιας γαλακτόσης. Με τη βοήθεια του φάσματος COSY βρέθηκε η χημική μετατόπιση του πρωτονίου H-2'' (δ_H 3.82), καθώς συζεύγνυται με το ανωμερικό πρωτόνιο H-1''. Επίσης, το πρωτόνιο H-2'' συζεύγνυται και με το γειτονικό του πρωτόνιο H-3'' (δ_H 3.58), το οποίο συζεύγνυται ακολούθως με το γειτονικό του πρωτόνιο H-4'' (δ_H 3.88). Τα μεθυλενικά πρωτόνια της θέσεως 6'' συζεύγνυται μεταξύ τους, το H-6''a (δ_H 3.64) με το H-6''b (δ_H 3.55), επιπλέον το πρωτόνιο H-6''b συζεύγνυται με το γειτονικό του πρωτόνιο H-5'' (δ_H 3.50).

Στο φάσμα παρατηρούμε ένα σήμα nOe μεταξύ των πρωτονίων της 3'-OCH₃ ομάδας και του αρωματικού πρωτονίου H-2'.

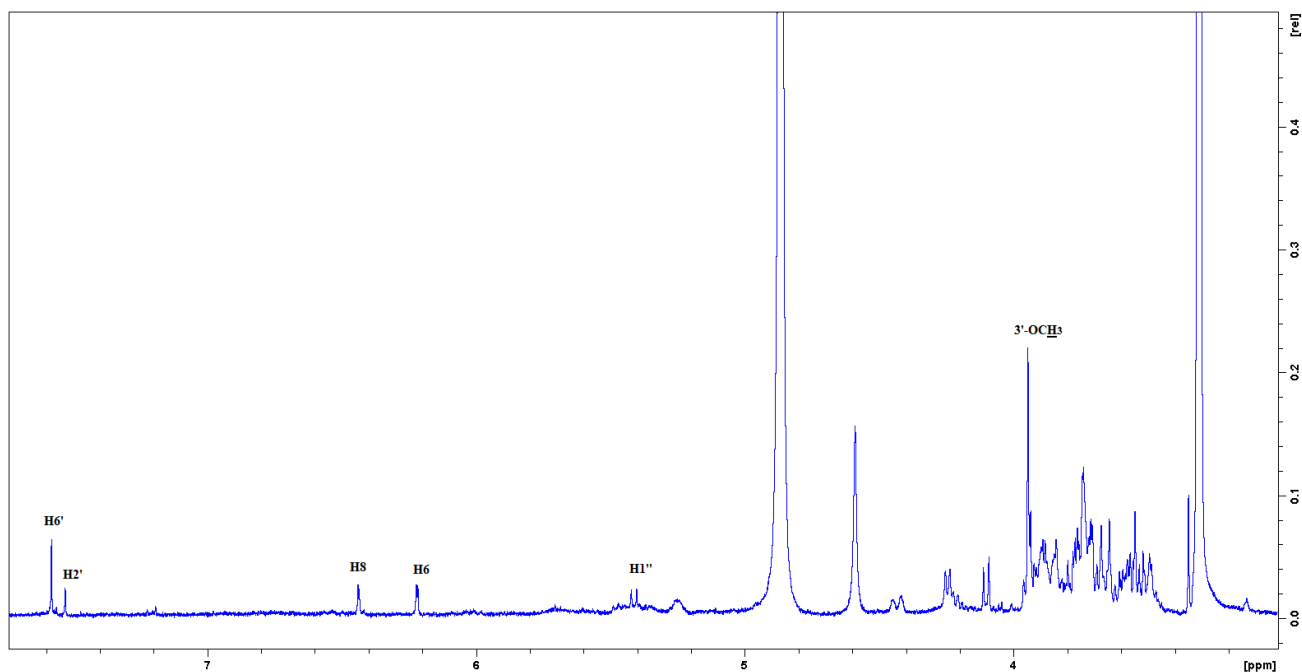
Από το φάσμα HMBC λάβαμε τις εξής πληροφορίες:

- Το πρωτόνιο H-2' δίνει σήματα διασταύρωσης με τους άνθρακες σε δ_C 157.2 και δ_C 120.2, που αντιστοιχούν στους άνθρακες C-4' και C-6', αντίστοιχα.
- Το πρωτόνιο H-6' δίνει σήμα διασταύρωσης με τους άνθρακες σε δ_C 121.1, δ_C 57.2 και δ_C 106.4, που αντιστοιχούν στους άνθρακες C-1', C-4' και C-5', αντίστοιχα.
- Το πρωτόνιο H-8 δίνει σήμα διασταύρωσης με τον άνθρακα σε δ_C 157.5, που αντιστοιχεί στον C-9 και με τον άνθρακα σε δ_C 98.8 που αντιστοιχεί στον άνθρακα C-6. Επίσης, δίνει σήμα διασταύρωσης με τους άνθρακες σε δ_C 164.7 και δ_C 104.5, που αντιστοιχούν στους άνθρακες C-7 και C-10, αντίστοιχα.
- Το πρωτόνιο H-6 δίνει σήμα διασταύρωσης με τον άνθρακα σε δ_C 93.6 που αντιστοιχεί στον άνθρακα C-8 και με τον άνθρακα σε δ_C 161.6 που αντιστοιχεί στον άνθρακα C-5. Επίσης, δίνει σήμα με τον άνθρακα σε δ_C 104.5 που αντιστοιχεί στον άνθρακα C-10.
- Το ανωμερικό πρωτόνιο H-1'' δίνει σήμα διασταύρωσης με τον άνθρακα σε δ_C 134.5 που αντιστοιχεί στον άνθρακα C-3, οπότε επιβεβαιώνεται η σύνδεση της γαλακτόσης με τον άνθρακα C-3.
- Τέλος, τα πρωτόνια της -OCH₃ ομάδας δίνουν σήμα διασταύρωσης με τον άνθρακα C-3' (δ_C 147.4) και τον άνθρακα C-2' (δ_C 104.0), οπότε επιβεβαιώνεται η σύνδεση της ομάδας αυτής στον Β δακτύλιο.

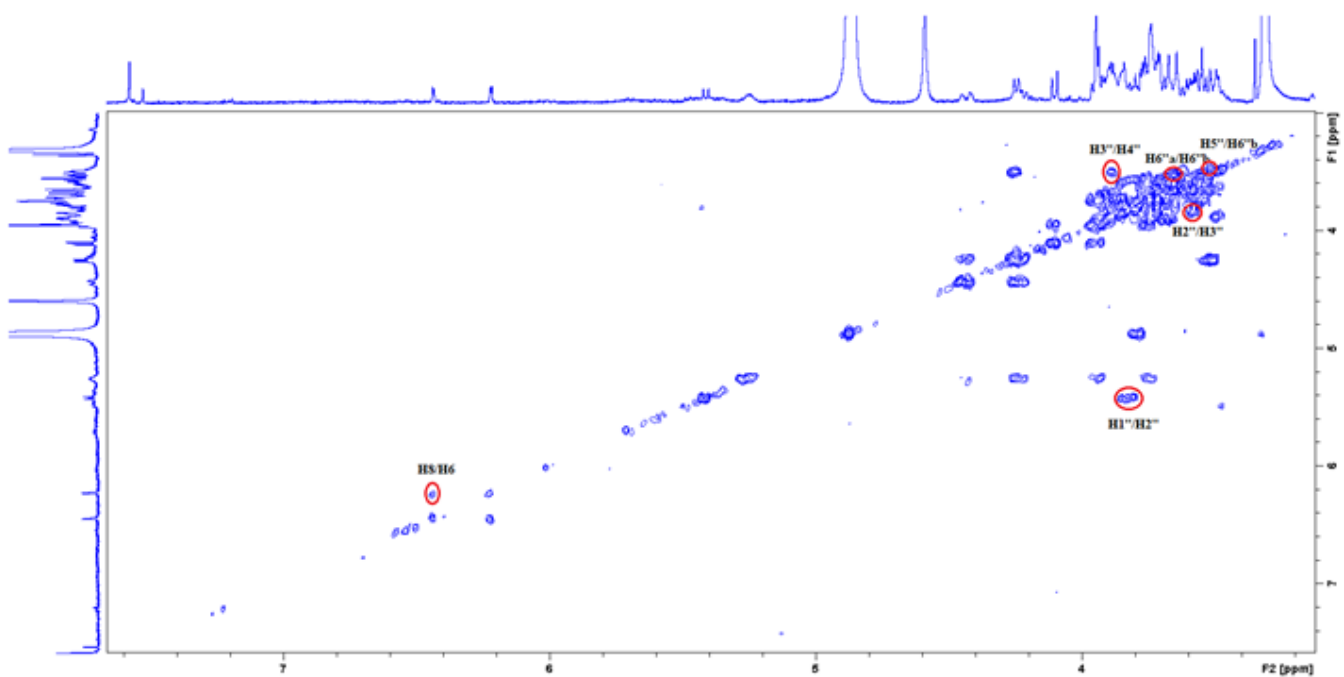
Πίνακας 25 Φασματοσκοπικά δεδομένα ουσίας **8** (CD₃OD, 400 MHz)

Θέση	H	δc (ppm)	δH (ppm)	Πολλαπλότητα J (Hz)	HMBC
Άγλυκο					
2	-		-	-	
3	-	134.5	-	-	
4	-		-	-	
5	-	161.6	-	-	
6	1	98.8	6.22	d (2.0)	C-8, C-10, C-5
7	-	164.7	-	-	
8	1	93.6	6.44	d (2.0)	C-6, C-10, C-9, C-7
9	-	157.5	-	-	
10	-	104.5	-	-	
1'	-	121.1	-	-	
2'	1	104.0	7.53	br s	C-4', C-6'
3'	-	147.4	-	-	
4'	-	157.2	-	-	
5'	-	106.4	-	-	
6'	1	120.2	7.58	br s	C-1', C-4', C-5'
-OCH₃	3		3.95	s	C-2', C-3'
Γαλακτόση					
1''	1		5.41	d (7.5)	C-3
2''	1		3.83	t (9.0)	
3''	1		3.58	dd (9.0, 3.3)	
4''	1		3.88	t (3.3)	
5''	1		3.50	*	
6''a	1		3.64	dd (11.0, *)	
6''b	1		3.55	dd (11.0, *)	

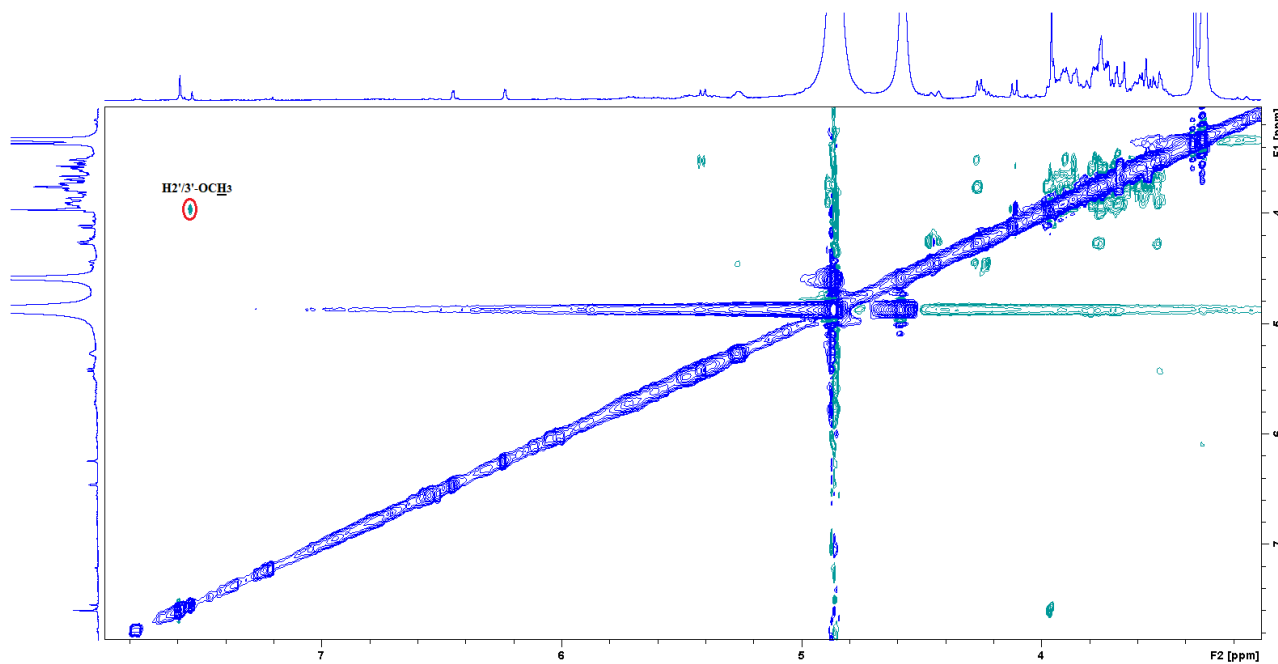
*επικαλυπτόμενα σήματα



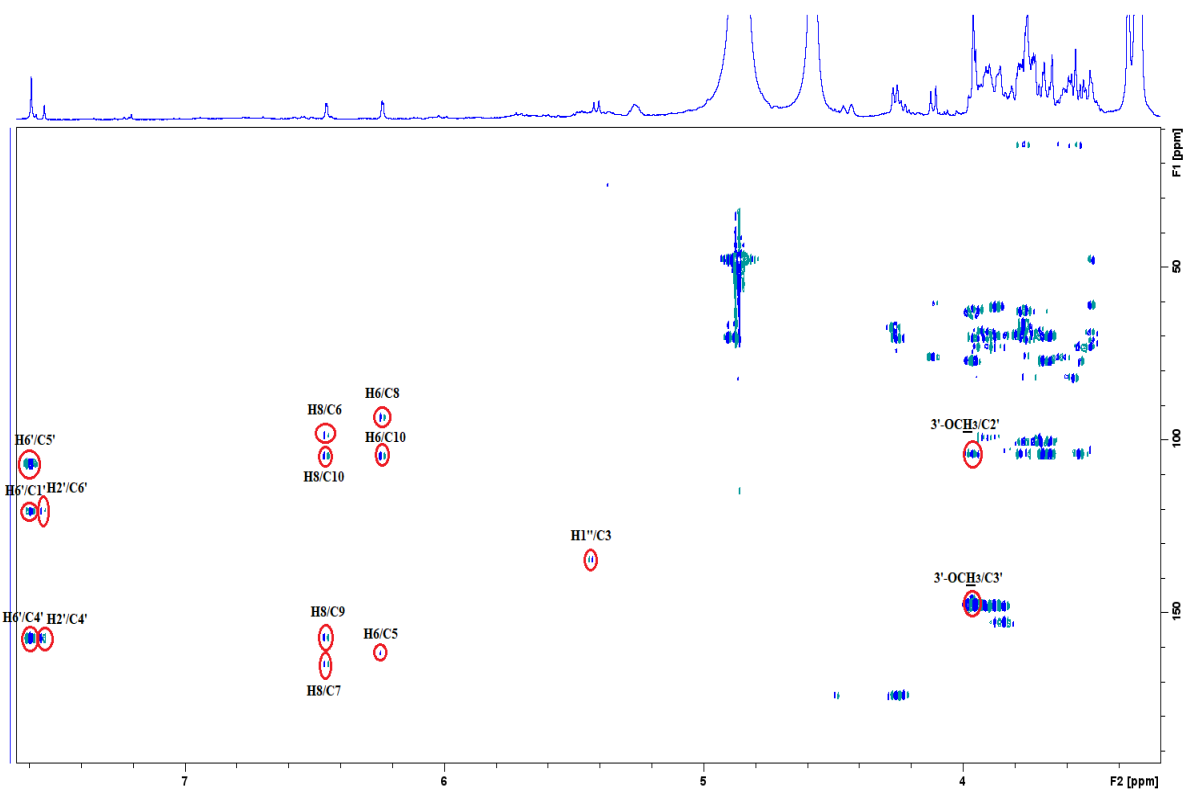
Εικόνα 37 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ουσίας **8** (CD_3OD , 400 MHz)



Εικόνα 38 Φάσμα COSY της ουσίας **8** (CD_3OD , 400 MHz)



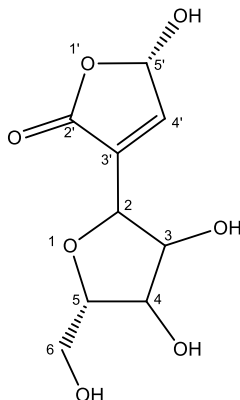
Εικόνα 39 Φάσμα NOESY της ουσίας 8 (CD₃OD, 400 MHz)



Εικόνα 40 Φάσμα HMBC της ουσίας 8 (CD₃OD, 400 MHz)

Γ4.Πολυ-υδροξυ Παράγωγα

Ουσία 9: Πολυμποτρίνη



Η ουσία **9** απομονώθηκε ως μίγμα με την ουσία **7** και ταυτοποιήθηκε μέσω φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ και COSY, καθώς και με τη σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα (Zou et al., 2007; Ramakrishna et al., 2017).

Απομονώθηκε για πρώτη φορά από το φυτό *Hedysarum polybotrys* και έχει απομονωθεί, επίσης από το *Kigelia pinnata* (Zou et al., 2007; Ramakrishna et al., 2017).

Δεν έχει αναφερθεί ξανά στο γένος *Elegia*, οπότε είναι η πρώτη φορά που απομονώνεται από αυτό.

Από το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ πήραμε τις εξής πληροφορίες:

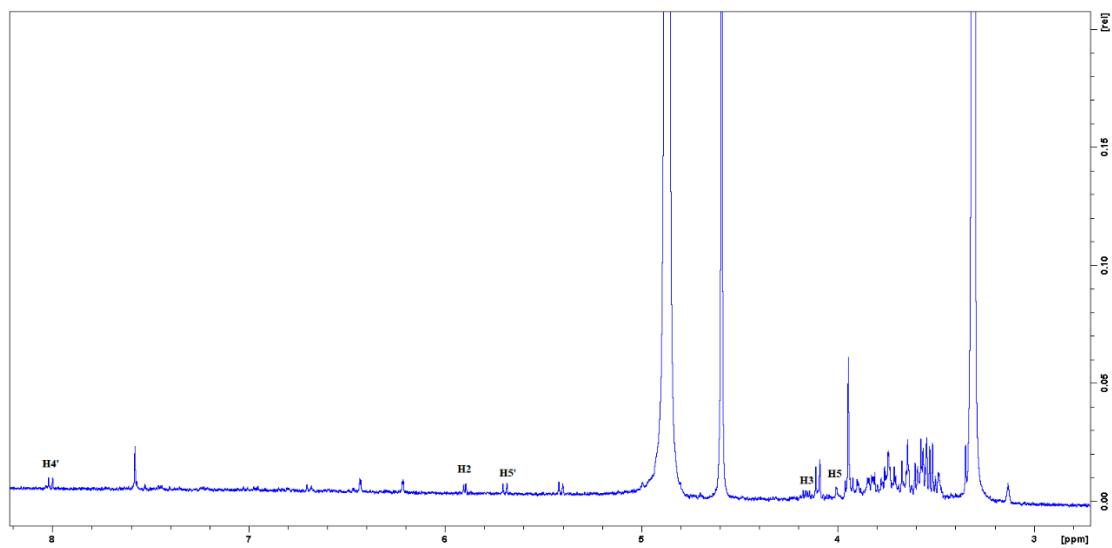
- Σε δ_{H} 8.00 εμφανίζεται το πρωτόνιο H-4' ως μια διπλή κορυφή με μεγάλη σταθερά σύζευξης ($J=8.1$ Hz).
- Σε δ_{H} 5.90 εμφανίζεται το πρωτόνιο H-2 ως μια διπλή κορυφή με μικρή σταθερά σύζευξης ($J=4.5$ Hz).
- Σε δ_{H} 5.69 εμφανίζεται το πρωτόνιο H-5' ως μια διπλή κορυφή με μεγάλη σταθερά σύζευξης ($J=8.1$ Hz).
- Σε δ_{H} 4.16 εμφανίζεται το πρωτόνιο H-3 ως μια διπλώς διπλή κορυφή ($J=8.7, 4.5$ Hz).
- Σε δ_{H} 4.00 εμφανίζεται το πρωτόνιο H-5 ως μια πολλαπλή κορυφή.

Από το φάσμα COSY επιβεβαιώθηκε η σύζευξη των γειτονικών πρωτονίων H-4'/ H-5', η σύζευξη του πρωτονίου H-2 (δ_{H} 5.90) με το γειτονικό του πρωτόνιο H-3 (δ_{H} 4.16), του πρωτονίου H-3 (δ_{H} 4.16) με το γειτονικό του πρωτόνιο H-4 (δ_{H} 4.13), καθώς και του πρωτονίου H-4 με το γειτονικό του πρωτόνιο H-5 (δ_{H} 4.00).

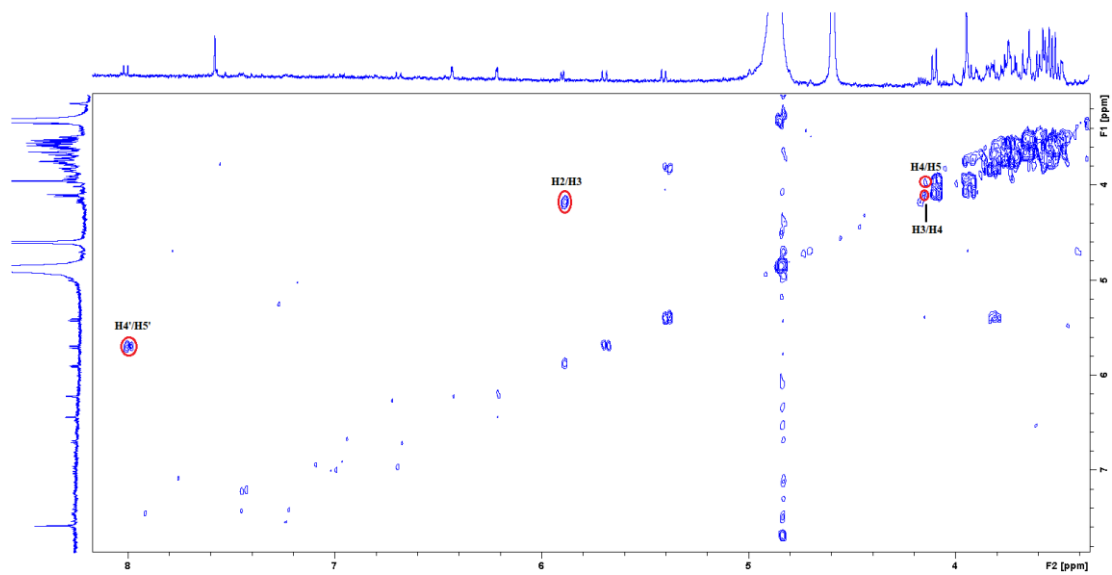
Πίνακας 26 Φασματοσκοπικά δεδομένα ουσίας **9** (CD₃OD, 400 MHz)

Θέση	H	δ _H (ppm)	Πολλαπλότητα J (Hz)
Άγλυκο			
2	1	5.90	d (4.5)
3	1	4.16	dd (8.7, 4.5)
4	1	4.13	*
5	1	4.00	m
6a	1	*	*
6b	1	*	*
4'	1	8.00	d (8.1)
5'	1	5.69	d (8.1)

*Επικαλυπτόμενα σήματα



Εικόνα 41 Φάσμα ¹H-NMR της ουσίας **9** (CD₃OD, 400 MHz)

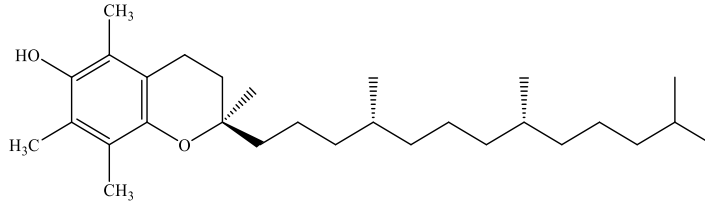


Εικόνα 42 Φάσμα COSY της ουσίας **9** (CD₃OD, 400 MHz)

Γ5. Παράγωγα Χρωμανίου

Ουσία 10: α-Τοκοφερόλη

[(2R)-2,5,7,8-τετραμεθυλο-2-[(4R,8R)-4,8,12-τριμθυλοτριδεκυλο]-3,4-διυδροχρωμεν-6-όλη]



Η ουσία **10** απομονώθηκε ως υπόλευκο άμορφο υπόλειμμα και ταυτοποιήθηκε ως α-τοκοφερόλη, μέσω ανάλυσης σε αέριο χρωματογράφο συζευγμένο με φασματόμετρο μάζας (GC-MS), καθώς και με σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα, διότι τόσο τα φάσματα μάζας, όσο και οι χρόνοι ανάλυσης διαφέρουν μεταξύ των 8 παραγώγων τοκοφερόλης και τοκοτριενόλης (Πίνακας 27) (dos Santos et al., 2014; Zhang et al., 2016).

Η ουσία **10** δεν έχει αναφερθεί ξανά στο γένος *Elegia* L., οπότε είναι η πρώτη φορά που απομονώνεται από αυτό.

Η α-τοκοφερόλη αποτελεί την κύρια μορφή της βιταμίνης E στον άνθρωπο και παρουσιάζει ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες (Azzi et al., 2002). Αποτελεί έναν καλώς μελετημένο αντιοξειδωτικό παράγοντα (Singh et al., 2015). Επιπλέον, εμφανίζει αντιφλεγμονώδη δράση και μελέτες υποστηρίζουν την πιθανή δράση της κατά της αθηροσκλήρωσης και της καρδιαγγειακής πάθησης (Kaul et al., 2001; Singh et al., 2015). Επίσης, η απουσία βιταμίνης E στον ανθρώπινο οργανισμό έχει συσχετιστεί με προβλήματα στην αναπαραγωγική λειτουργία που οδηγούν σε αποβολές εμβρύων (Niki and Traber, 2012).

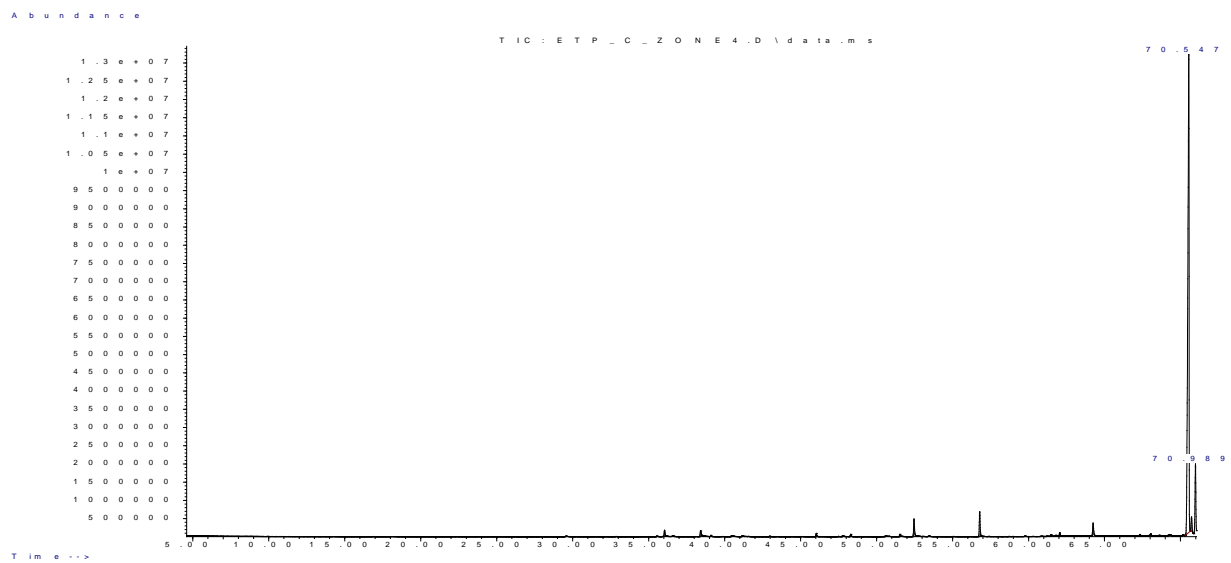
Από την ανάλυση GC-MS, στο φάσμα μάζας που προέκυψε, διακρίνεται το μοριακό βάρος της ουσίας, που είναι 430 (M^+), καθώς και η βασική κορυφή σε m/z 165. Για την ταυτοποίηση της ουσίας συνέβαλε η σύγκριση του φάσματος μάζας με τα αντίστοιχα της βιβλιογραφίας, καθώς παρουσιάζουν παρόμοια εικόνα (Zhang et al., 2016).

Η βιοσύνθεση των τοκοφερολών και τοκοτριενολών έχει μελετηθεί επαρκώς και έχει διαπιστωθεί ότι πραγματοποιείται μέσω σύζευξης του πυροφωσφορικού (διφωσφορικού) εστέρα της φυτόλης με το ομογεντισικό οξύ (2,5-διυδροξυ-φαινυλοξικό οξύ), που είναι προϊόν μεταβολισμού των αρωματικών αμινοξέων φαινυλαλανίνη και τυροσίνη, ενώ η φυτόλη (εικοσα-εν-όλη), αποτελεί προϊόν του μεταβολισμού της χλωροφύλλης, δεδομένου ότι είναι η ανηγμένη μορφή της γερανυλο-γερανιόλης και σχηματίζει την λιπόφιλη πλευρική αλυσίδα της χλωροφύλλης.

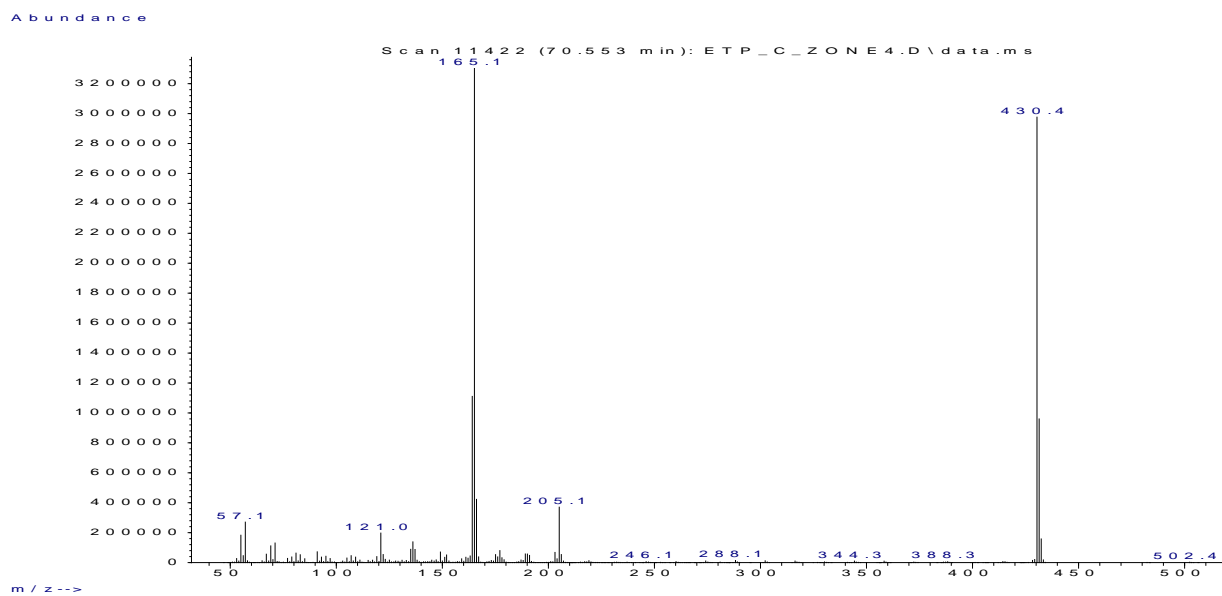
Οι οκτώ φυσικές τοκοφερόλες και τοκοτριενόλες διαφέρουν μεταξύ τους στον αριθμό και την θέση των μεθυλίων επί του αρωματικού δακτυλίου, αλλά η ισοπρενοειδής πλευρική αλυσίδα είναι ίδια σε καθεμία υπο-ομάδα (Dewick, 2002).

Πίνακας 27 Χαρακτηριστικά των τοκοφερολών & τοκοτριενολών σε GC-MS ανάλυση (Zhang et al., 2016)

Ένωση	Επιλεγμένα διαγνωστικά ιόντα
δ-τοκοφερόλη	137, 177, 402
β-τοκοφερόλη	151, 191, 416
γ-τοκοφερόλη	151, 191, 416
δ-τοκοτριενόλη	137, 177, 396
α-τοκοφερόλη	165, 205, 430
β-τοκοτριενόλη	151, 191, 410
γ-τοκοτριενόλη	151, 191, 410
α-τοκοτριενόλη	165, 205, 424



Εικόνα 43 Αέριος Χρωματογραφία ουσίας **10**



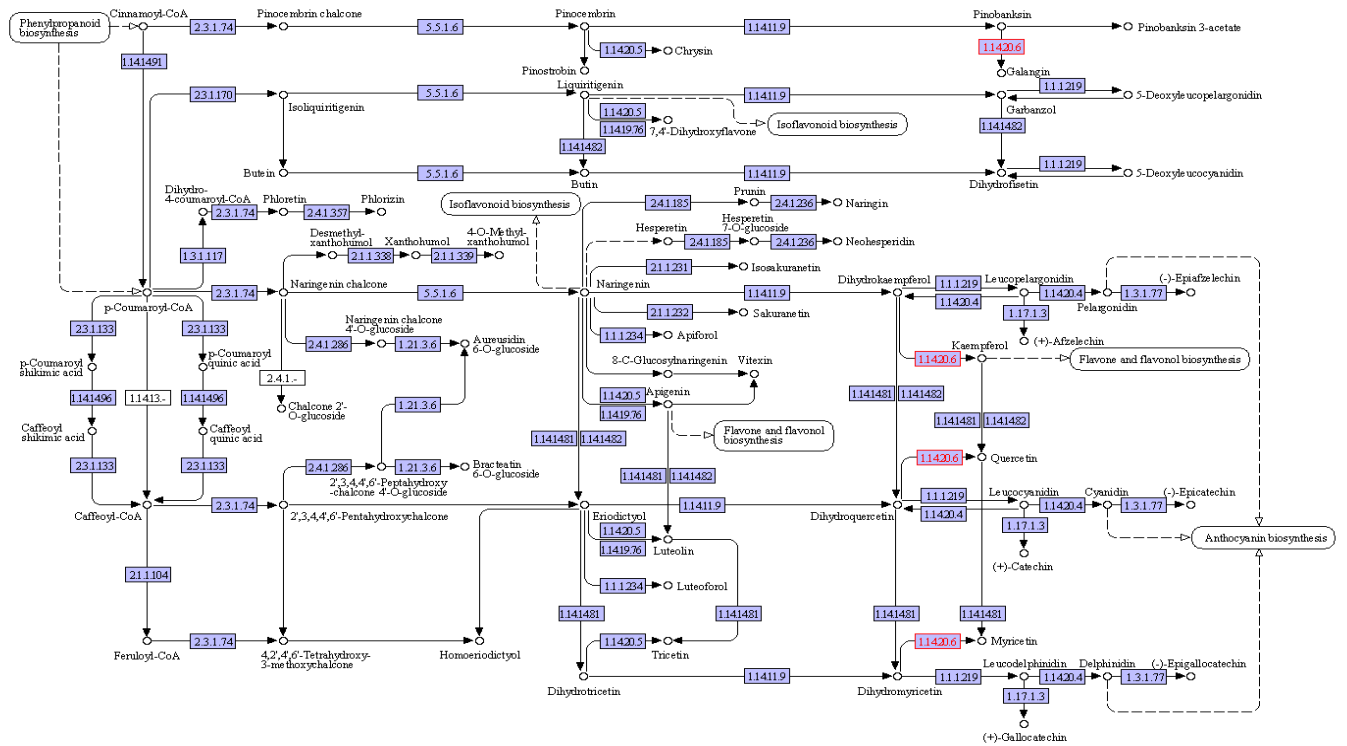
Εικόνα 44 Φάσμα μάζας ουσίας **10**

Γ6.Βιοπληροφορική Ανάλυση

α. Φυλογενετική Μελέτη

Αρχικά μέσω της KEGG εντοπίστηκε το βιοσυνθετικό μονοπάτι των φλαβονοειδών και αφού αναλύθηκαν και εξετάστηκαν τα επιμέρους τμήματα επιλέχθηκε το ένζυμο της συνθάσης των φλαβονολών ως ένζυμο-γονίδιο στόχος (Εικόνα 45-Πίνακας 28). Αν και το μονοπάτι των φλαβονοειδών είναι ένα ιδιαίτερα σημαντικό βιοσυνθετικό μονοπάτι, τα ένζυμα τα οποία ελέγχουν τα επιμέρους βήματα, *in vitro*, εμφανίζουν ένα ιδιαίτερα μικρό βαθμό ειδικότητας. Συγκεκριμένα, παρατηρείται ότι ένα ένζυμο είναι υπεύθυνο για την σύνθεση περισσότερων του ενός μορίου και συνήθως ελέγχει την σύνθεση μιας ολόκληρης χημικής ομάδας (Turnbull et al., 2004; Wellmann et al., 2002). Το χαρακτηριστικό αυτό είναι ένας παράγοντας που κάνει την επιλογή του ενζύμου στόχου αρκετά δύσκολη διότι προτιμώνται ένζυμα με μεγάλη ειδικότητα αφού παρέχουν μεγαλύτερο ποσοστό ακριβείας στις υποθέσεις. Με άλλα λόγια όσο πιο συγκεκριμένη και μελετημένη είναι η λειτουργία ενός ενζύμου τόσο πιο συγκεκριμένο είναι και το προϊόν της αντίδρασης και άρα η πιθανότητα αν εντοπίζεται το γονίδιο στον οργανισμό να υπάρχει και το προϊόν είναι στατιστικά σημαντική. Λόγω των παραπάνω επιλέχθηκε η συνθάση των φλαβονολών διότι ελέγχει την σύνθεση των 3 φλαβονολών και αφού μέσω της φυτοχημικής μελέτης έχουμε ήδη αποδείξει την ύπαρξη της συριγγετίνης και της λαρισετίνης που έχουν-ως πρόδρομο μόριο την μυρικετίνη. Η απόδειξη της ύπαρξης του γονιδίου της συνθάσης της μυρικετίνης θα ήταν ένα επιπλέον στοιχείο για την ύπαρξη της μυρικετίνης στο *E. tectorum*. Επίσης, η συνθάση των φλαβονολών ελέγχει την σύνθεση 3 μορίων που συγκριτικά με τα υπόλοιπα ένζυμα του βιοσυνθετικού μονοπατιού είναι ένας μικρός αριθμός άρα το ένζυμο φέρει ένα μεγάλο βαθμό εξειδίκευσης συγκριτικά με τα υπόλοιπα ένζυμα.

FLAVONOID BIOSYNTHESIS



00941 6/21/19
© Kanehisa Laboratories

Εικόνα 45 Το βιοσυνθετικό μονοπάτι των φλαβονοειδών όπως αποικονίζεται στην KEGG. Με κόκκινο χρώμα και με τον κωδικό 11420.6 απεικονίζεται το ένζυμο της συνθάσης των φλαβονολών.

Πίνακας 28 Οι πληροφορίες για την συνθάση των φλαβονολών όπως αυτές συνοψίζονται στην KEGG.

Κωδικός (entry)	EC 1.14.20.6
Όνομα	Συνθάση φλαβονολών (Flavonol synthase; dihydroflavonol,2-oxoglutarate:oxygen oxidoreductase; FLS (gene name))
Κατηγορία (Class)	Οξειδοαναγωγή (Oxidoreductase)
Αντίδραση (IUBMB)	a dihydroflavonol + 2-oxoglutarate + O ₂ = a flavonol + succinate + CO ₂ + H ₂ O [RN: R07368]
<p>The diagram illustrates the enzymatic conversion of dihydroflavonol (C15570) to flavonol (C01495). A red double-headed arrow connects the two flavonol structures. Below this arrow, four red arrows point to the products of the reaction: succinate (C00026), succinyl-CoA (C00042), CO₂ (C00007), and H₂O (C00001). The chemical structures for each molecule are shown with their respective KEGG IDs.</p>	

Στην συνέχεια από την KEGG συλλέχθηκαν οι κωδικοί από όλα τα γονίδια συνθασών των φλαβονολών που έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα. Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται τα 108 φυτικά είδη που έχουν ταυτοποιηθεί ότι φέρουν τουλάχιστον ένα γονίδιο συνθάσης των φλαβονολών και ταξινομούνται ανά οικογένεια και χωρίζονται σε 2 μεγάλες υποκατηγορίες: μονοκοτυλήδονα και δικοτυλήδονα (Πίνακας 29).

Πίνακας 29 Το σύνολο των γονιδίων που κωδικοποιούν για συνθάση φλαβονολών χωρισμένα ανά είδος, όπως εμφανίζονται στην KEGG.

Species	Genes (Kegg)
Eudicots	
<u>Mustard family</u>	
1. Ath - <i>Arabidopsis thaliana</i> (thale cress)	AT5G08640(FLS1), AT5G63580(FLS2), AT5G63590(FLS3), AT5G63595(FLS4), AT5G63600(FLS5), AT5G43935(FLS6)
2. Aly – <i>A. lyrata</i> (lyrate rockcress)	9300932, 9300933, 9300934, 9301468, 9302635, 9309443, 9316690, 9317565
3. CRB - <i>Capsella rubella</i>	9300932, 9300933, 9300934, 9301468, 9302635, 9309443, 9316690, 9317565
4. CSAT - <i>Camelina sativa</i> (false flax)	104708215, 104725029, 104726949, 104726979, 104726980, 104726983, 104726984, 104726985, 104726986, 104727463, 104729053, 104734897, 104741256, 104741513, 104741522, 104741531, 104741542, 104741553, 104741561, 104741572, 104741592, 104741603, 104762497, 104762498, 104762499, 104762501, 104762503, 104769085, 104778112, 104784343, 109124872
5. EUS - <i>Eutrema salsugineum</i>	EUTSA_v10004662mg, EUTSA_v10004668mg, EUTSA_v10005710mg, EUTSA_v10014054mg, EUTSA_v10028827mg, EUTSA_v10029534mg

6. BRP - <i>Brassica rapa</i> (field mustard)	103837496, 103847177, 103855056, 103855057, 103873165, 103873769, 103873770
7. BNA – <i>B. napus</i> (rape)	106348278, 106348289, 106348297, 106351881, 106351882, 106364152, 106382906, 106397936, 106405224, 106409586, 106419433, 106444537, 111201386
8. BOE – <i>B. oleracea</i> (wild cabbage)	106313418, 106316306, 106320382, 106328324, 106332816, 106341567
9. RSZ - <i>Raphanus sativus</i> (radish)	108806153, 108812047, 108814290, 108825420, 108856337, 108856338, 108859840, 108861252
<u>Caper family</u>	
. THJ - <i>Tarenaya hassleriana</i> (spider flower)	104819356
<u>Papaya family</u>	
11. CPAP - <i>Carica papaya</i> (papaya)	110816514
<u>Rue family</u>	
12. CIT - <i>Citrus sinensis</i> (Valencia orange)	102618406, 102626432, 102629970
13. CIC – <i>C. clementina</i> (mandarin orange)	CICLE_v10003741mg, CICLE_v10015856mg, CICLE_v10026028mg
<u>Sumac family</u>	
14. PVY - <i>Pistacia vera</i> (pistachio)	116110546, 116110548, 116110558, 116133801, 116145683
<u>Mallow family</u>	
15. TCC - <i>Theobroma cacao</i> (cacao)	18592290, 18592292, 18599277
16. GRA - <i>Gossypium raimondii</i>	105770783, 105780413, 105780414
17. GHI – <i>G. hirsutum</i> (upland cotton)	107904987, 107923058, 107940452, 107940456, 107959505, 107959507

18. GAB – <i>G. arboreum</i>	108452122, 108457975, 108459765
19. DZI - <i>Durio zibethinus</i> (durian)	111275455, 111314969
<u>Myrtle family</u>	
20. EGR - <i>Eucalyptus grandis</i> (rose gum)	104428803, 104444489, 104450481, 104450482
<u>Pea family</u>	
21. GMX - <i>Glycine max</i> (soybean)	100810937, 100816829, 778157(FLS1)
22. GSJ – <i>G. soja</i> (wild soybean)	114380973, 114412340, 114414096
23. PVU - <i>Phaseolus vulgaris</i> (common bean)	PHAVU_004G052400g, PHAVU_008G1660000
24. VRA - <i>Vigna radiata</i> (mung bean)	106763888, 106769199
25. VAR – <i>V. angularis</i> (adzuki bean)	108337532, 108345477
26. VUN – <i>V. unguiculata</i> (cowpea)	114180972, 114193841
27. CCAJ - <i>Cajanus cajan</i> (pigeon pea)	109804443, 109808020, 109816831
28. APRC - <i>Abrus precatorius</i> (Indian licorice)	113848076, 113848139, 113853130
29. MTR - <i>Medicago truncatula</i> (barrel medic)	MTR_3g072810, MTR_3g072820, MTR_5g059130, MTR_5g059140
30. CAM - <i>Cicer arietinum</i> (chickpea)	101504604, 101509377
31. LJA - <i>Lotus japonicus</i>	Lj1g3v0705350.1(Lj1g3v0705350.1), Lj1g3v0775780.1(Lj1g3v0775780.1), Lj1g3v1380920.1(Lj1g3v1380920.1), Lj5g3v1865700.1(Lj5g3v1865700.1)
32. ADU - <i>Arachis duranensis</i>	107458261, 107465302
33. AIP – <i>A. ipaensis</i>	107609791, 107617070
34. AHF – <i>A. hypogaea</i> (peanut)	112702733, 112712950, 112766372, 112777054
35. LANG - <i>Lupinus angustifolius</i> (narrow-leaved blue lupine)	109326685, 109356468, 109357523, 109360027
<u>Rose family</u>	

36. FVE - <i>Fragaria vesca</i> (woodland strawberry)	101295969, 101296827
37. RCN - <i>Rosa chinensis</i> (China rose)	112170431, 112173037
38. PPER - <i>Prunus persica</i> (peach)	18788166, 18788410, 18789071, 18792331
39. PMUM – <i>P. mume</i> (Japanese apricot)	103326444, 103332906, 103332909, 103332910
40. PAVI – <i>P. avium</i> (sweet cherry)	110753589, 110753698, 110754141
41. PDUL – <i>P. dulcis</i> (almond)	117613713, 117613942, 117628886, 117628896
42. MDM - <i>Malus domestica</i> (apple)	103413102(FLS), 103441195, 114821553, 114821784
43. PXB - <i>Pyrus x bretschneideri</i> (Chinese white pear)	103933697, 103956721
<u>Buckthorn family</u>	
44. ZJU - <i>Ziziphus jujuba</i> (Chinese jujube)	107415994, 107421006
<u>Mulberry family</u>	
45. MNT - <i>Morus notabilis</i>	21396296, 21403067, 21406496, 21406497, 21406498
<u>Cucumber family</u>	
46. CSV - <i>Cucumis sativus</i> (cucumber)	101219245
47. CMO – <i>C. melo</i> (muskmelon)	103488630
48. BHJ - <i>Benincasa hispida</i> (wax gourd)	120075949
49. MCHA - <i>Momordica charantia</i> (bitter melon)	111011799
50. CMAX - <i>Cucurbita maxima</i> (winter squash)	111486888, 111489355
51. CMOS – <i>C. moschata</i> (crookneck pumpkin)	111444648, 111464499
52. CPEP – <i>C. pepo subsp. pepo</i> (vegetable marrow)	111780272, 111809053

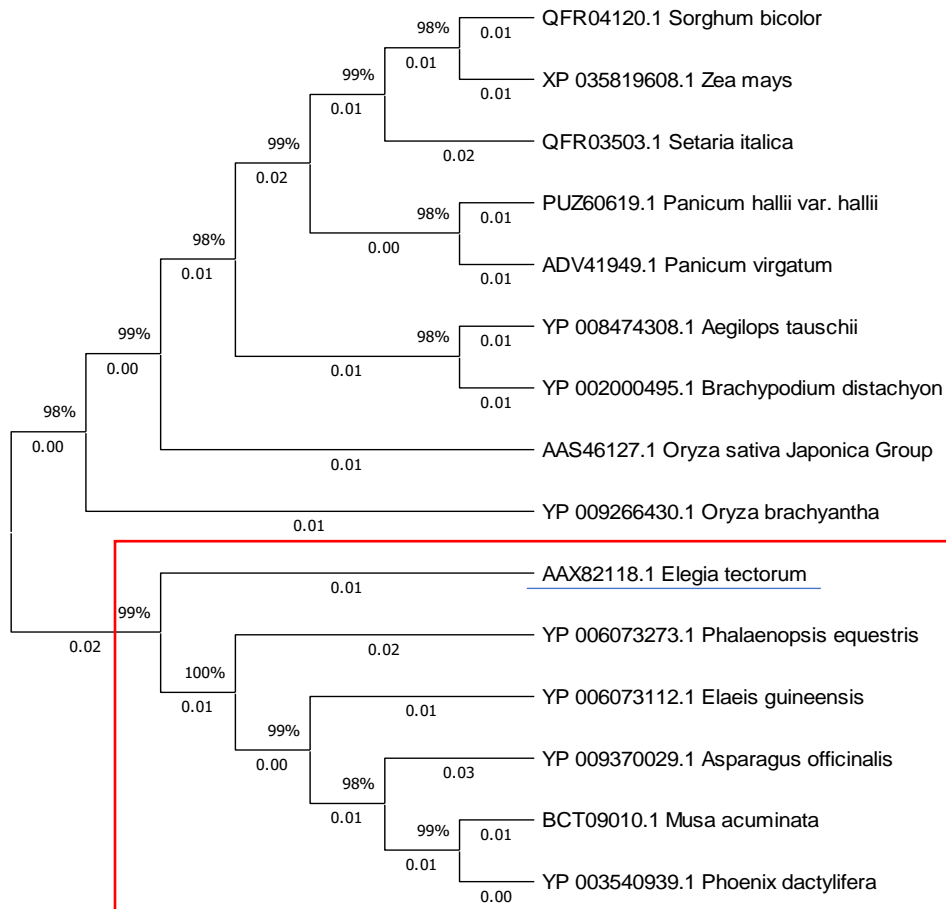
<u>Spurge family</u>	
53. RCU - <i>Ricinus communis</i> (castor bean)	8274085, 8274087, 8275129
54. JCU - <i>Jatropha curcas</i>	105639310
55. HBR - <i>Hevea brasiliensis</i> (rubber tree)	110654972, 110655043, 110665573
56. MESC - <i>Manihot esculenta</i> (cassava)	110606120, 110607889, 110609989
<u>Willow family</u>	
57. POP - <i>Populus trichocarpa</i> (black cottonwood)	18097775, 18097776, 18109811, 7458869, 7495105
58. PEU - <i>P. euphratica</i> (Euphrates poplar)	105108614, 105114941, 105116982, 105127840
59. PALZ - <i>P. alba</i> (white poplar)	118041763, 118050782, 118050795, 118051939, 118058366
<u>Walnut family</u>	
60. JRE - <i>Juglans regia</i> (English walnut)	108981974, 108982002, 108988364, 108991214 109012769, 118349241
<u>Beech family</u>	
61. QSU - <i>Quercus suber</i> (cork oak)	112003934, 112004171, 112033039
62. QLO - <i>Q. lobata</i> (valley oak)	115959418, 115963835, 115973387, 115993005
<u>Bittersweet family</u>	
63. TWL - <i>Tripterygium wilfordii</i>	120003005, 120010136
<u>Grape family</u>	
64. VVI - <i>Vitis vinifera</i> (wine grape)	100232938(FLS1), 100232939(FLS1), 100243852(FLS2), 100249002(FLS3), 100267819(FLS5)
65. VRI - <i>V. riparia</i> (riverbank grape)	117905961, 117906026, 117906419, 117907623
<u>Nightshade family</u>	
66. SLY - <i>Solanum lycopersicum</i> (tomato) spen	101249699

67. SPEN – <i>S. pennellii</i>	107004995
68. SOT – <i>S. tuberosum</i> (potato)	102577717(FLS)
69. CANN - <i>Capsicum annuum</i>	107843086, 107869735
70. NTA - <i>Nicotiana tabacum</i> (common tobacco)	107794305(FLS1), 107814657(NtFLS)
71. NSY – <i>N. sylvestris</i>	104236078
72. NTO – <i>N. tomentosiformis</i>	104101386
73. NAU – <i>N. attenuata</i>	109237082
<u>Morning-glory family</u>	
74. JINI - <i>Ipomoea nil</i> (Japanese morning glory)	109175998
75. ITR – <i>I. triloba</i> (trilobed morning glory)	116002506
<u>Sesame family</u>	
76. SIND - <i>Sesamum indicum</i> (sesame)	105155397, 105176681
<u>Olive family</u>	
77. OEU - <i>Olea europaea</i> var. <i>sylvestris</i> (wild olive)	111397470, 111409089
<u>Lopseed family</u>	
78. EGT - <i>Erythranthe guttata</i> (spotted monkey flower)	105974437
<u>Daisy family</u>	
79. HAN - <i>Helianthus annuus</i> (common sunflower)	110878613 110878615
80. LSV - <i>Lactuca sativa</i> (garden lettuce)	111900153
81. CCAV - <i>Cynara cardunculus</i> var. <i>scolymus</i> (artichoke)	112515207, 112515212
<u>Parsley family</u>	
82. DCR - <i>Daucus carota</i> (carrot)	108203535, 108221899
<u>Tea family</u>	
83. CSIN - <i>Camellia sinensis</i>	114257498, 114257531, 114283320, 114314253

<u>Amaranth family</u>	
84. BVG - <i>Beta vulgaris</i> (sugar beet)	104883093, 104901038
85. SOE - <i>Spinacia oleracea</i> (spinach)	110778214, 110795044
86. CQI - <i>Chenopodium quinoa</i> (quinoa)	110693494, 110714529, 110725334
<u>Lotus family</u>	
87. MNU - <i>Nelumbo nucifera</i> (sacred lotus)	104596714, 104608517, 104609672, 104609673
<u>Protea family</u>	
88. MING - <i>Macadamia integrifolia</i> (macadamia nut)	122068147, 122072145, 122075321, 122076036, 122076177
<u>Poppy family</u>	
89. PSOM - <i>Papaver somniferum</i> (opium poppy)	113346311, 113346474, 113346476, 113356202, 113356203, 113361278
<u>Water-lily family</u>	
90. NCOL - <i>Nymphaea colorata</i>	116259344, 116261229
Monocots	
<u>Grass family</u>	
91. OSA - <i>Oryza sativa japonica</i> (Japanese rice) (RefSeq)	4330843
92. DOSA - <i>O. sativa japonica</i> (Japanese rice) (RAPDB)	Os02t0767300-01(Os02g0767300)
93. OBR - <i>O. brachyantha</i> (malo sina)	102712047
94. BDI - <i>Brachypodium distachyon</i>	100831956
95. ATS - <i>Aegilops tauschii</i> (wheat D)	109764595, 109768154, 109784747
96. TDC - <i>Triticum dicoccoides</i> (wild emmer wheat)	119294168, 119304118, 119318079, 119321892
97. SBI - <i>Sorghum bicolor</i> (sorghum)	8078926
98. ZMA - <i>Zea mays</i> (maize)	100272992, 103627785
99. SITA - <i>Setaria italica</i> (foxtail millet)	101780580
100. PVIR - <i>Panicum virgatum</i> (switchgrass)	120642963, 120653872

101.PHAI – <i>P. hallii</i>	112882371
<u>Palm family</u>	
102.PDA - <i>Phoenix dactylifera</i> (date palm)	103712517
3.EGU - <i>Elaeis guineensis</i> (African oil palm)	105058232
<u>Banana family</u>	
04.MUS - <i>Musa acuminata</i> (wild Malaysian banana)	103969181, 103969182, 103977541, 103995223
<u>Orchid family</u>	
105.PEQ - <i>Phalaenopsis equestris</i>	110019794
<u>Asparagus family</u>	
106.AOF - <i>Asparagus officinalis</i> (garden asparagus)	109820207
Basal Mangoliophyta	
<u>Amborella family</u>	
107.ATR - <i>Amborella trichopoda</i>	18425268, 18425281, 18426066

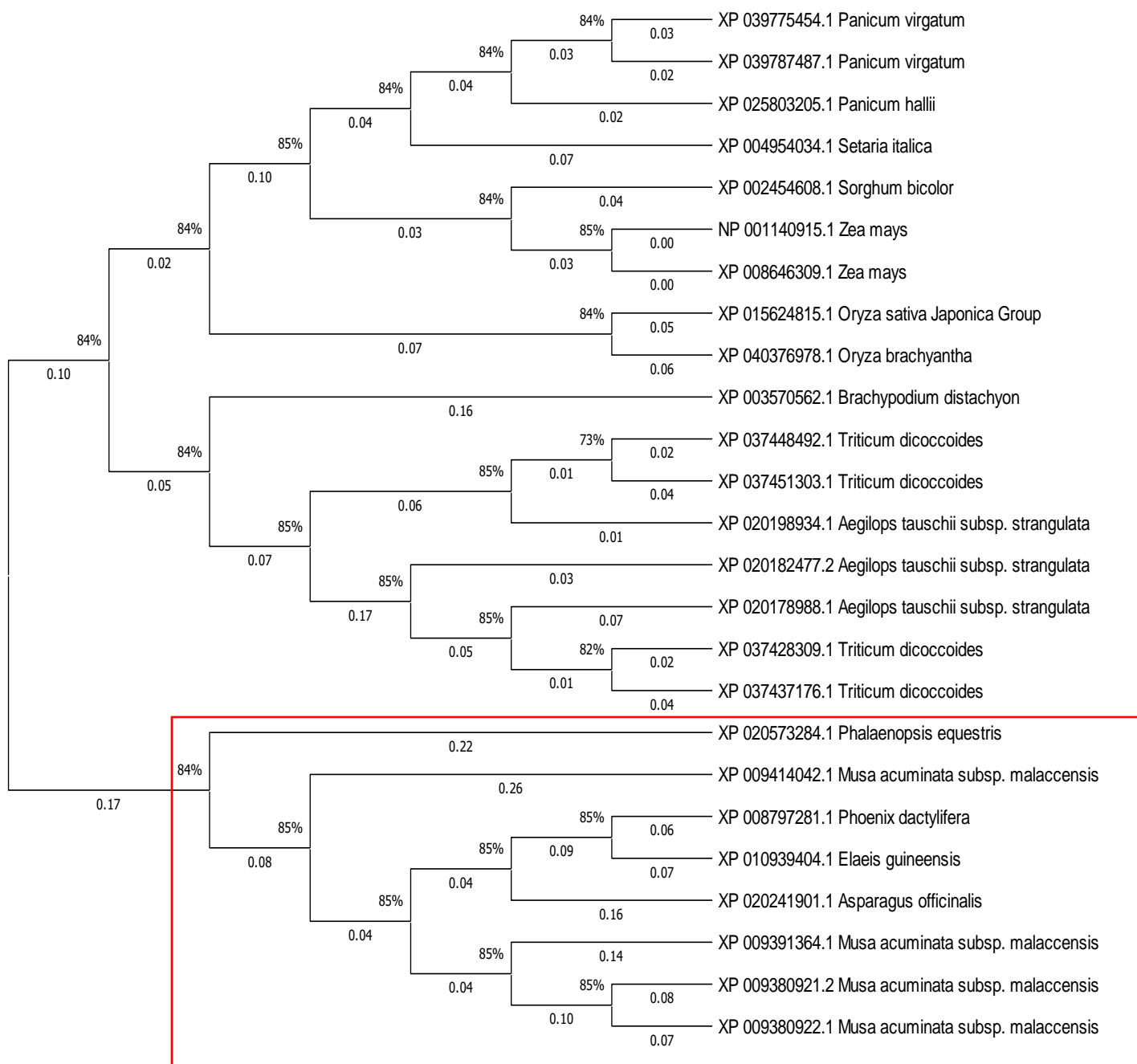
Επειδή ο αριθμός των παραπάνω ειδών είναι αρκετά μεγάλος (108 είδη) στα πλαίσια την παρούσας εργασίας επιλέχθηκαν μόνο τα μονοκοτυλήδονα (16) αφού το είδος *E. tectorum* ανήκει σε αυτή την κατηγορία και άρα εξελικτικά είναι τα πιο συγγενικά του είδη. Ωστόσο επειδή ο αριθμός των ειδών παρέμεινε μεγάλος αναζητήθηκε στην NCBI κάποια αμινοξική αλληλουχία του *E. tectorum* που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως βάση για να πραγματοποιηθεί μια φυλογενετική μελέτη για να επιλεχθούν τα είδη που εξελικτικά είναι πολύ κοντά σε αυτό. Επιλέχθηκε η μεγάλη υπομονάδα του ενζύμου καρβοξυλάση/οξυγενάση της 1,5-διφωσφορικής ριβουλόζης (Rubisco) που βρίσκεται στους χλωροπλάστες. Έπειτα, με το εργαλείο blastp έγινε αναζήτηση των ομόλογων πρωτεϊνών σε όλα τα μονοκοτυλήδονα του Πίνακα 28. Οι αμινοξικές αλληλουχίες που εντοπίστηκαν στοιχηθήκαν με το εργαλείο T-Coffee και στην συνέχεια με το εργαλείο MEGA δημιουργηθεί το παρακάτω φυλογενετικό δέντρο από το οποίο εξαιρέθηκε το *Triticum dicoccoides* διότι η αλληλουχία του ήταν ελλιπής.



Εικόνα 46 Φυλογενετικό δέντρο που δείχνει τις εξελικτικές σχέσεις όλων των μονοκοτυλήδων με βάση τη αμινοξική αλληλουχία της μεγάλης υπομονάδας του ενζύμου καρβοξυλάση/οξυγενάση της 1,5-διφωσφορικής ριβουλόζης (Rubisco) που βρίσκεται στους χλωροπλάστες. Με το κόκκινο περίγραμμα υποδεικνύεται η ομάδα στην οποία ανήκει το *E. tectorum*.

Από το φυλογενετικό δέντρο παρατηρούμε ότι δημιουργούνται 2 ξεχωριστές ομάδες. Το *E. tectorum* κατηγοριοποιείται με τα *Elaeis guineensis*, *Phalaenopsis equestris*, *Asparagus officinalis*, *Musa acuminata* και *Phoenix dactylifera*.

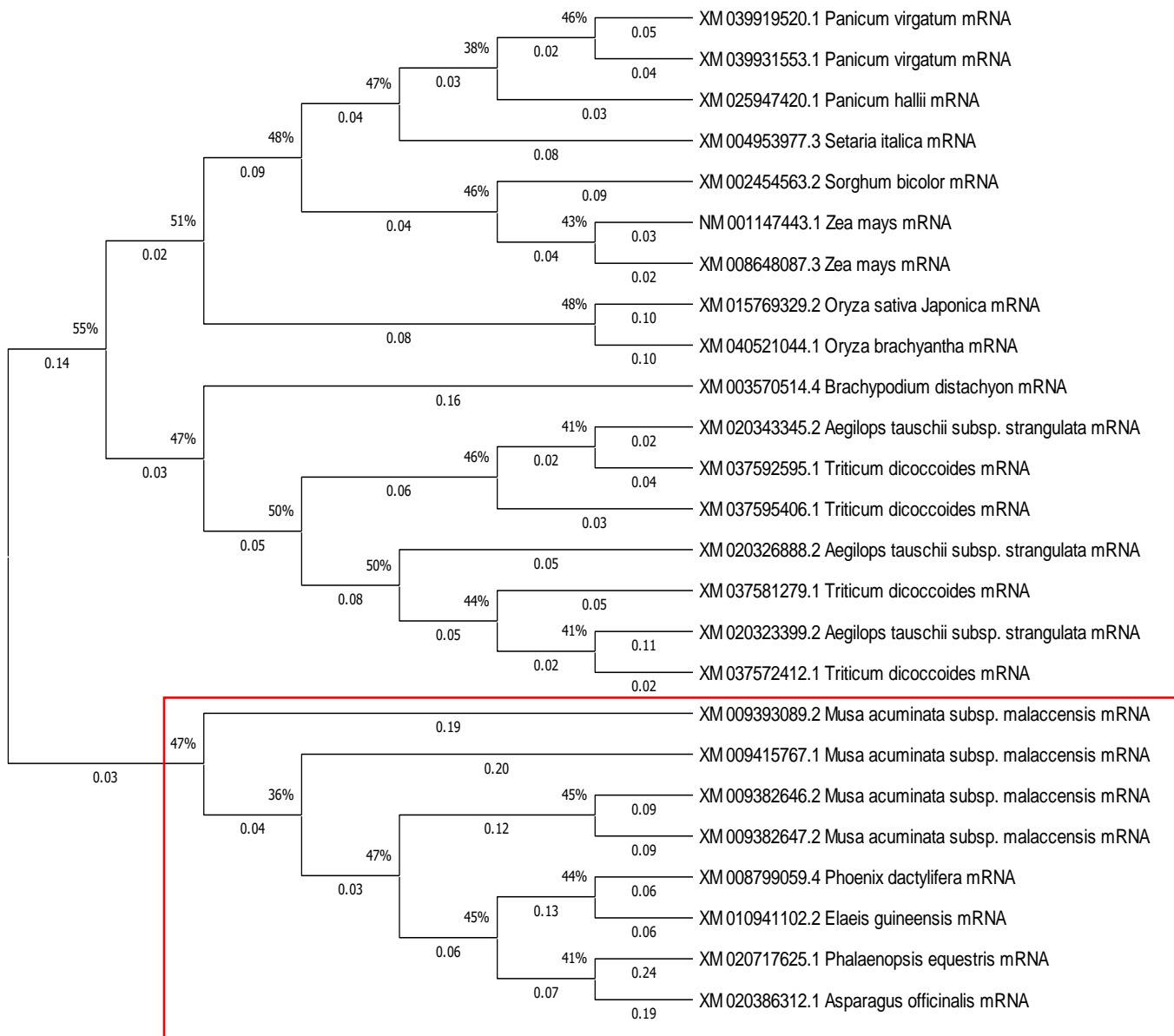
Στην συνέχεια έγινε στοίχιση όλων των ομόλογων αλληλουχιών της συνθάσης των φλαβονολών από όλα τα μονοκοτυλήδονα και δημιουργήθηκε το παρακάτω φυλογενετικό δέντρο.



Εικόνα 47 Φυλογενετικό δέντρο που δείχνει τις εξελικτικές σχέσεις μεταξύ των αμινοξικών αλληλουχιών της συνθάσης των φλαβονολών σε όλα τα μονοκοτυλήδωνα. Με το κόκκινο περίγραμμα υποδεικνύεται η ομάδα στην οποία ανήκουν μόνο τα 5 συγγενικά είδη του *E. tectorum*.

Παρατηρείται ότι τα 5 είδη που διαχωρίζονται από τα υπόλοιπα μονοκοτυλήδονα σύμφωνα με το πρώτο φυλογενετικό δέντρο παραμένουν μια ξεχωριστή ομάδα και σε αυτή την περίπτωση όπου η υπό εξέταση πρωτεΐνη είναι η συνθάση των φλαβονολών.

Η ίδια μεθοδολογία επαναλήφθηκε και με τις mRNA αλληλουχίες της συνθάσης των φλαβονολών σε όλα τα μονοκοτυλήδονα και φάνηκε ότι και σε επίπεδο mRNA τα 5 συγγενικά είδη του *E. tectorum* διαχωρίζονται από τα υπόλοιπα μονοκοτυλήδονα δημιουργώντας μια δικιά τους ομάδα (Εικόνα 48).



Εικόνα 48 Φυλογενετικό δέντρο που δείχνει τις εξελικτικές σχέσεις μεταξύ των mRNA αλληλουχιών της συνθάσης των φλαβονολών σε όλα τα μονοκοτυλήδωνα. Με το κόκκινο περίγραμμα υποδεικνύεται η ομάδα στην οποία ανήκουν μόνο τα 5 συγγενικά είδη του *E. tectorum*.

Λόγω αυτής της ξεκάθαρης και μεγάλης διαφοροποίησης που εμφανίζουν τα 5 αυτά είδη (Πίνακας 30) με τα υπόλοιπα μονοκοτυλήδωνα αποφασίστηκε η κατασκευή των εκκινήτων να βασιστεί σε αυτά.

Πίνακας 30 Τα 5 τελικά είδη (εκτός τους *E.tectorum*) που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη με τους αντίστοιχους κωδικούς των νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών από την KEGG και την NCBI.

Species	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit protein sequence ID (NCBI)	Flavonol synthase protein ID (Kegg)	Flavonol synthase protein ID (NCBI)	Flavonol synthase gene ID (NCBI)
<i>Elegia tectorum</i>	AAX82118.1	-	-	-
<i>Asparagus officinalis</i>	YP_009370029.1	109820207	XP_020241901	109820207
<i>Musa acuminata</i>	BCT09010.1	103969181	XP_009380921	103969181
		103969182	XP_009380922	103969182
		103977541	XP_009391364	103977541
		103995223	XP_009414042	103995223
<i>Phoenix dactylifera</i>	YP_003540939.1	103712517	XP_008797281	103712517
<i>Elaeis guineensis</i>	YP_006073112.1	105058232	XP_010939404	105058232
<i>Phalaenopsis equestris</i>	YP_006073273.1	110019794	XP_020573284	110019794

β. Κατασκευή Εκκινητών

Ο στόχος της δημιουργίας εκκινητών ήταν να κατασκευαστεί ένα ζευγάρι εκκινητών που ιδανικά θα μπορεί να χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα τα 8 γονίδια των συνθασών των φλαβονολών και από τα 5 είδη δίνοντας μόνο ένα προϊόν και έχοντας συγκεκριμένα χαρακτηριστικά που συνοψίζονται στην δημοσίευση “Eleven Golden Rules of Quantitative RT-PCR” (Udvardi et al., 2008). Ένα ζευγάρι που θα μπορεί να χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα και τα 8 γονίδια είναι ιδανικό διότι δεν υπάρχει δυνατότητα να μελετηθεί το γονιδίωμα του *E. tectorum* βιοπληροφοριακά και δεν υπάρχει καμία πληροφορία για κάποιο πιθανό γονίδιο συνθάσης φλαβονολών σε αυτόν τον οργανισμό. Οπότε ένα ζευγάρι εκκινητών με αυτό το χαρακτηριστικό θα έχει περισσότερες πιθανότητες να συνδεθεί με το πιθανό γονίδιο συνθάσης των φλαβονολών ενώ ένα ζευγάρι που θα συνδέεται μόνο με κάποιο από τα γονίδια θα έχει μάλλον μικρότερες πιθανότητες.

Αρχικά η κατασκευή επιχειρήθηκε να γίνει αυτόματα με την χρήση του εργαλείου “Primer Designing Tool” της NCBI. Οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα ήταν τα mRNA του *Elaeis guineensis* και του *Phalaenopsis equestris*. Τα αυτόματα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά διότι κανένα ζευγάρι εκκινητών δεν είχε την ικανότητα να χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα και τα 8 γονίδια. Το καλύτερο αποτέλεσμα ήταν ένα ζευγάρι εκκινητών το οποίο ήταν κατάλληλο για 3 από τα 5 είδη δίνοντας μόνο ένα προϊόν το οποίο ήταν το γονίδιο της συνθάσης των φλαβονολών στο *Elaeis guineensis*, *Phoenix dactylifera* και *Phalaenopsis equestris* (Πίνακας 31).

Πίνακας 31 Το ζευγάρι των εκκινητών με τα χαρακτηριστικά του όπως δημιουργήθηκε από το Primer Designing Tool.

	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GGGTTGTGGCCCATACTGAT	Plus	20	721	740	59.74	55.00	5.00	2.00
Reverse primer	CACTTGCAGACCAGGGACTT	Minus	20	791	772	59.89	55.00	4.00	2.00
Product length	71								

Το επόμενο βήμα ήταν η προσπάθεια δημιουργίας εκκινητών χειροκίνητα. Για το σκοπό αυτό έγινε στοίχιση των 8 mRNA αλληλουχιών και επιλέχθηκαν μικρές περιοχές οι οποίες ήταν όσο το δυνατόν όμοιες μεταξύ τους. Με βάση αυτές τις περιοχές δημιουργήθηκαν υποθετικοί εκκινητές με τη βοήθεια του εργαλείου “Reverse Complement” και ελέγχθηκε η ικανότητα τους μέσω του εργαλείου “Primer Designing Tool”. Δοκιμάστηκαν διάφορες αλληλουχίες ωστόσο κανένα ζευγάρι δεν μπορούσε να χρησιμοποιήσει ως υπόστρωμα και τα 8 γονίδια. Το καλύτερο αποτέλεσμα ήταν ένα ζευγάρι το οποίο έδινε μόνο ένα προϊόν, την συνθάση των φλαβονολών σε όλα τα είδη εκτός από το *Musa acuminata* (Πίνακας 32).

Πίνακας 32 Το ζευγάρι των εκκινητών που δημιουργήθηκε χειροκίνητα και συνδέεται σε τα γονίδια όλων των ειδών εκτός από το *Musa acuminata*.

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TAAGCAATGGAAAATACAAAAGTG	24	54.62	29.17	3.00	0.00
Reverse primer	TCTTCTCCTTGTTACAGTTGTTTC	24	59.12	41.67	4.00	0.00
Product length	57					

Έπειτα από στοίχιση και έλεγχο των 4 mRNA αλληλουχιών του *Musa acuminata* πραγματοποιήθηκε η ίδια χειροκίνητη μεθοδολογία και κατασκευάστηκε το παρακάτω ζευγάρι εκκινητών που χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα και τα 4 γονίδια συνθάσης φλαβονολών της *Musa acuminata*.

Πίνακας 33 Το ζευγάρι των εκκινητών που δημιουργήθηκε χειροκίνητα και συνδέεται στα 4 γονίδια του *Musa acuminata*.

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AAGATCAACTACTACCCGCCGTG	23	62.29	52.17	4.00	3.00
Reverse primer	AATCTGATCGCCAATGTGGATGA	23	60.43	43.48	5.00	5.00
Product length	189					

Αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθούν 2 ζευγάρια εκκινητών επειδή αφενός δεν ήταν εφικτή η κατασκευή ενός ζευγαριού που θα έχει ως υπόστρωμα και τα 8 γονίδια και αφετέρου αυξάνονται οι πιθανότητες να εντοπιστεί και να απομονωθεί το ή τα γονίδια συνθάσης των φλαβονολών από την *E. tectorum*.

Δ.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

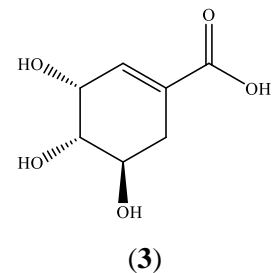
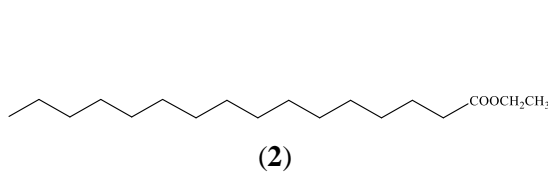
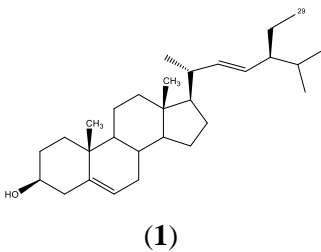
Δ1. Φυτοχημική Μελέτη

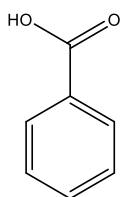
Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε το αιθανολικό εκχύλισμα του *Elegia tectorum* της οικογένειας Restionaceae.

Συνολικά απομονώθηκαν 10 φυσικά προϊόντα (Πίνακας 34).

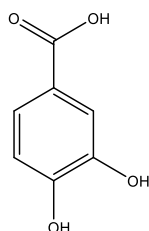
Πίνακας 34 Φυσικά προϊόντα που απομονώθηκαν από το αιθανολικό εκχύλισμα τους *E. tectorum*.

Στερόλες- Λιπαρά οξέα	Φαινολικά Παράγωγα & Πρόδρομες Ενώσεις	Φλαβονοειδή	Πολυ-υδροξύ Παράγωγα	Παράγωγα χρωμανίου
Στιγμαστερόλη (1)	Σικιμικό οξύ (3)	Συριγγετινο-3-O- α-L-ραμνοσίδης (6)	Πολυμποτρίνη (9)	α-Τοκοφερόλη (10)
Αιθυλεστεράς του παλμιτικού οξέος (2)	Βενζοϊκό οξύ (4)	Συριγγετινο-3-O- β-D-γαλακτοσίδης (7)		
	Πρωτοκατεχικό οξύ (5)	Λαρισετινο-3-O- β-D-γαλακτοσίδης (8)		

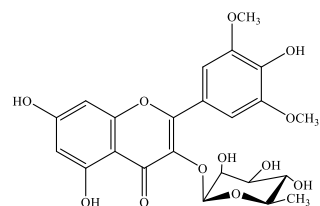




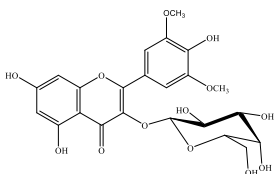
(4)



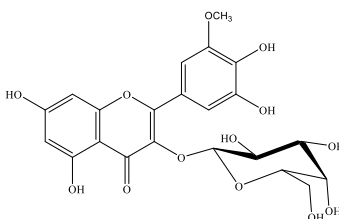
(5)



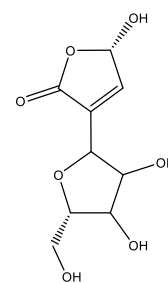
(6)



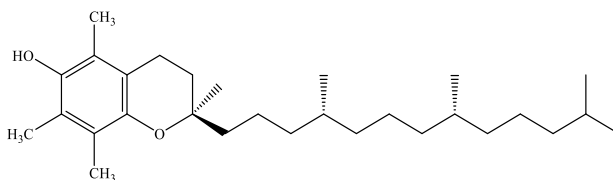
(7)



(8)



(9)



(10)

Οι ουσίες **1-5, 9 & 10** είναι η πρώτη φορά που απομονώνονται στην οικογένεια *Restionaceae* και συγκεκριμένα στο *E. tectorum*.

Η ουσία **6** είναι η πρώτη φορά που απομονώνεται στο *E. tectorum*, ωστόσο έχει απομονωθεί ξανά σε άλλο είδος του γένους, το *E. deusta* (Harborne et al., 1985).

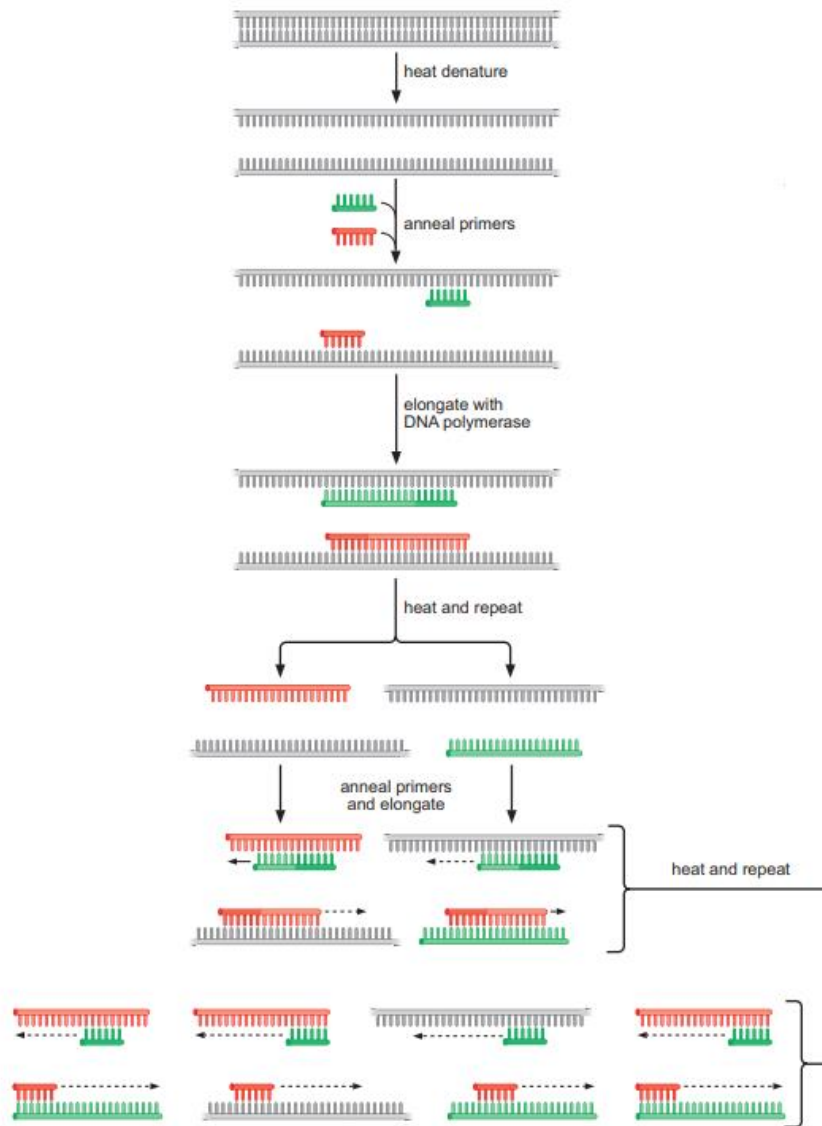
Οι ουσίες **7** και **8** έχουν απομονωθεί ξανά από το *E. tectorum* (Harborne et al., 1985).

Δ2.Βιοπληροφορική Ανάλυση

Η *in silico* μελέτη που πραγματοποιήθηκε είχε ως αποτέλεσμα την δημιουργία 2 ζευγαριών εκκινητών. Αυτό αποτελεί το πρώτο βήμα και μια περίπτωση μελέτης για την αναζήτηση και την απομόνωση του ή των γονιδίων της συνθάσης των φλαβονολών με την μεθοδολογία της εξόρυξης γονιδιωμάτων. Η διαδικασία βασίστηκε σε επιμέρους κομμάτια που αποτελούν συνηθισμένες βιοπληροφορικές διεργασίες. Ωστόσο, οι ελάχιστες πληροφορίες που υπήρχαν στις βιολογικές βάσεις δεδομένων για το γονιδίωμα της *E. tectorum* και η απουσία δημοσιευμένων προσπαθειών αλληλούχησης γενικά για τα φυτά της οικογένειας Restionaceae δημιούργησε κάποιες δυσκολίες. Οι δυσκολίες αυτές αντικατοπτρίζονται στα αποτελέσματα μέσα από την κατασκευή 2 ζευγαριών εκκινητών αντί για ένα. Η αδυναμία κατασκευής ενός ζευγαριού εκκινητών αρχικά οφείλεται στην απουσία του γονιδιώματος του *E. tectorum* οπότε δεν μπορούσε να γίνει αναζήτηση ομόλογης περιοχής των γονιδίων της συνθάσης των φλαβονολών από τα υπόλοιπα συγγενικά είδη. Επιπλέον, άλλοι 2 πιθανοί λόγοι είναι είτε εξελικτικές διαφορές μεταξύ των γονιδίων που οδηγούν στην αδυναμία εύρεσης κοινής αποδεκτής περιοχής κατασκευής εκκινητών, είτε κακής αλληλούχησης. Η υπόθεση της μεγάλης διαφοράς στις αλληλουχίες πηγάζει από την παρατήρηση ότι τόσο σε επίπεδο νουκλεοτιδίων όσο και σε επίπεδο αμινοξέων οι υπό εξέταση αλληλουχίες ενώ φέραν πολλές κοινές περιοχές αυτές διακόπτονταν συχνά από μικρές διαφορές συνήθως της τάξεως της μίας βάσεως. Η υπόθεση της κακής αλληλούχησης βασίζεται στο γεγονός ότι στα 5 συγγενικά είδη της *E. tectorum* η συναρμολόγηση του γονιδιώματος έχει πραγματοποιηθεί μόνο λίγες φορές. Συγκεκριμένα, από τα 5 είδη σε 2 η συναρμολόγηση έχει γίνει 2 φορές, σε 2 έχει γίνει 4 φορές και στο *Asparagus officinalis* η συναρμολόγηση ακόμα βρίσκεται στο στάδιο των χρωμοσωμάτων. Σε αντίθεση, το γονιδίωμα του *Zea mays*, που είναι ένα από τα πιο καλά μελετημένα μονοκοτυλήδονα, η συναρμολόγηση έχει πραγματοποιηθεί 50 φορές. Όσο αυξάνει ο αριθμός των συναρμολογήσεων τόσο μειώνονται τα λάθη στις αλληλουχίες των γονιδίων και άρα των πρωτεϊνών και τόσο πιο στατιστικά σημαντικές είναι οι διαφορές που εντοπίζονται μεταξύ ομόλογων γονιδίων και πρωτεϊνών.

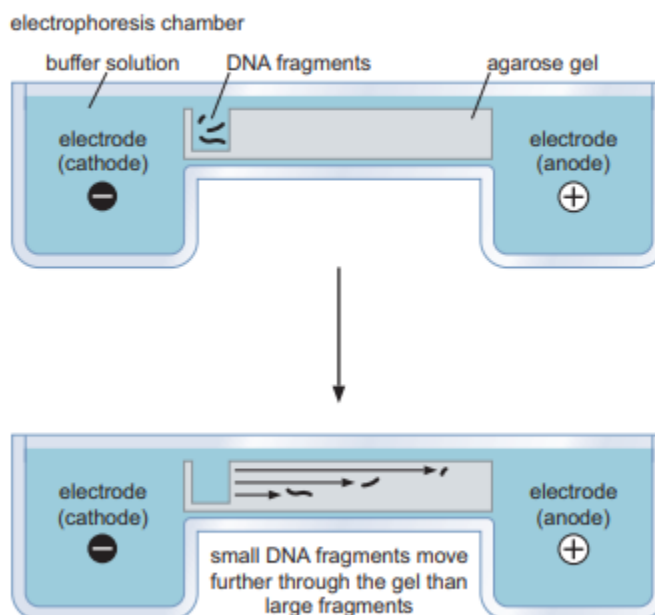
α. Επόμενα Βήματα

Η *in silico* μελέτη αποτελεί το πρώτο τμήμα της πειραματικής πορείας. Το επόμενο βήμα είναι η εκχύλιση DNA και RNA. Στην συνέχεια πρέπει να δημιουργηθεί μια βιβλιοθήκη cDNA με βάση το RNA. Έπειτα, με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) με την βοήθεια των εκκινητών που κατασκευάστηκαν στην *in silico* μελέτη θα εξετασθεί αν το DNA και το cDNA δίνουν κάποιο ή κάποια προϊόντα (Εικόνα 50). Τα προϊόντα που θα δημιουργηθούν θα εξεταστούν μέσω ηλεκτροφόρησης για να προσδιοριστεί το μέγεθος τους (Εικόνα 51). Γνωρίζοντας ήδη το ακριβές μέγεθος του προϊόντος που δίνουν οι επιλεγμένοι εκκινητές όταν χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα τα γονίδια της συνθάσης των φλαβονολών θα γίνει σύγκριση με τα τελικά προϊόντα και έτσι θα γνωρίζουμε αν κάποιο από τα προϊόντα είναι το πιθανό γονίδιο συνθάσης φλαβονολών. Από το προϊόν του DNA θα γνωρίζουμε ότι υπάρχει ένα γονίδιο που δυνητικά κωδικοποιεί για μια πιθανή συνθάση των φλαβονολών. Από το cDNA θα γνωρίζουμε ότι υπάρχει γονίδιο το οποίο είναι λειτουργικό και όντως εκφράζεται.



Εικόνα 50 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Στο πρώτο βήμα της PCR, το υπόστρωμα DNA μετουσιώνεται με θέρμανση. Στην συνέχεια συνδέεται με συνθετικούς ολιγονουκλεοτίδιο εκκινητές (σκούρο πορτοκαλί και σκούρο πράσινο). Η DNA πολυμεράση στη συνέχεια χρησιμοποιείται για την αντιγραφή του μονόκλωνου DNA υποστρώματος κατ' επέκταση από τους εκκινητές (ανοιχτό πορτοκαλί και ανοιχτό πράσινο). Στο επόμενο βήμα, το DNA για άλλη μια φορά μετουσιώνεται, συγκολλάται με εκκινητές και χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για νέο γύρο σύνθεσης DNA. Σε αυτόν τον δεύτερο κύκλο αντιγραφής, οι εκκινητές μπορούν να συνδεθούν με τους πρόσφατα συντιθέμενους κλώνους DNA καθώς και με το αρχικό κλώνο DNA. Όταν η DNA πολυμεράση επεκτείνει τον πράσινο εκκινητή που έχει συνδεθεί στον νέο κλώνο που συντέθηκε (με πορτοκαλί χρώμα) από τον προηγούμενο γύρο σύνθεσης DNA

(ή τον πορτοκαλί εκκινητή με τον κλώνο με πράσινο χρώμα), η πολυμεράση προχωρά μέχρι το τέλος του κλώνου και στη συνέχεια πέφτει. Έτσι, σε αυτόν τον δεύτερο κύκλο, θα έχει συντεθεί DNA που θα καλύπτει με ακρίβεια την αλληλουχία DNA που πρέπει να ενισχυθεί. Στη συνέχεια, περαιτέρω γύροι μετουσίωσης και σύνθεσης DNA θα δημιουργήσουν DNA που αντιστοιχούν στο διάστημα αλληλουχίας που ορίζεται από τους δύο εκκινητές. Αυτή η αλληλουχία θα αυξάνεται γεωμετρικά σε ποσότητα με κάθε επόμενο κύκλο της αλυσιδωτής αντίδρασης (Watson, 2014).



Εικόνα 51 Διαχωρισμός DNA με ηλεκτροφόρηση. Το σχήμα δείχνει ένα τζελ από το πλάι σε διατομή. Το πηγάδι στο οποίο έχει φορτωθεί το μίγμα DNA υποδεικνύεται στα αριστερά, στην κορυφή της γέλης. Αυτό είναι επίσης το άκρο στο οποίο η κάθοδος του ηλεκτρικού πεδίου βρίσκεται, η άνοδος βρίσκεται στο το κάτω μέρος του τζελ. Ως αποτέλεσμα, θραύσματα του DNA, τα οποία είναι αρνητικά φορτισμένα, μετακινούνται μέσω της γέλης από την κορυφή προς την κάτω μέρος. Η απόσταση που διανύει κάθε DNA είναι αντιστρόφως σε σχέση με το μέγεθος του θραύσματος DNA. Δηλαδή τα μικρότερα θραύσματα καλύπτουν μεγαλύτερη απόσταση σε σχέση με τα μεγαλύτερα θραύσματα (Watson, 2014).

β. Προοπτικές

Η μεθοδολογία της εξόρυξης γονιδιωμάτων και η βιοπληροφορική γενικά μπορούν να είναι ένα χρήσιμο και αξιόπιστο εργαλείο της Χημείας Φυσικών Προϊόντων και της Φαρμακογνωσίας. Η διαδικασία που περιεγράφηκε στην παρούσα εργασία μπορεί να έχει πολλές εφαρμογές. Αρχικά, δίνεται η δυνατότητα επιβεβαίωσης βιοσύνθεσης συγκεκριμένων μεταβολιτών. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτόχρονη μελέτη πολλών δρογών για την αναζήτηση της ύπαρξης ή/και της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων. Ανάλογα τα γονίδια που αναζητούνται η διαδικασία της εξόρυξης γονιδιωμάτων μπορεί να είναι ένα νέο εργαλείο για την αναζήτηση συγκεκριμένων μεταβολιτών ή ομάδα μεταβολιτών. Μάλιστα υπάρχει η δυνατότητα για ταυτόχρονη αναζήτηση πολλών γονιδίων. Οπότε, θα μπορούσε να αξιοποιηθεί για το “screening” μεγάλου αριθμού φυτών ταυτόχρονα για διάφορες ομάδες μεταβολιτών ανεξαρτήτως πολικότητας ή χημικών χαρακτηριστικών. Επίσης, με αυτή την μεθοδολογία δίνεται η δυνατότητα εξοικονόμησης διαλυτών και αποτελεί μια πράσινη μέθοδο. Μπορεί να δώσει την δυνατότητα επιβεβαίωσης βιοσύνθεσης μεταβολιτών που λόγω χημικών χαρακτηριστικών αποτελούν δύσκολο στόχο για τις κλασσικές μεθόδους απομόνωσης και ταυτοποίησης. Επίσης, με την μελέτη του DNA εξαλείφονται προβλήματα όπως χρόνος, τόπος, συνθήκες συλλογής και τμήμα του οργανισμού που συλλέγεται και εξετάζεται κάθε φορά. Διότι, το DNA περιέχει όλη την πληροφορία αποθηκευμένη και αποτελεί το μόνο στοιχείο που δείχνει το πλήρες εύρος των δυνατοτήτων ενός οργανισμού (Watson, 2014). Ενώ μέσω της μελέτης των μεταβολιτών μπορούμε να έχουμε άποψη μόνο για την στιγμή που έγινε η συλλογή της δρόγης (Fazio et al., 2004). Επιπλέον, με την απομόνωση των γονιδίων και την πλήρη κατανόηση των βιοσυνθετικών μονοπατιών και των ενζύμων που τα ρυθμίζουν μπορεί να γίνει δυνατή η πλήρης σύνθεσης σημαντικών δευτερογενών μεταβολιτών σε ετερόλογα συστήματα. Με αυτό τον τρόπο θα γίνει δυνατή η απομόνωση ενώσεων με σημαντική βιολογική δράση σε μεγάλες ποσότητες αποτελεσματικά και οικονομικά χωρίς να επιδράμε στο οικοσύστημα και χωρίς να επηρεάζουμε οργανισμούς που μπορεί να βρίσκονται στα όρια της εξαφάνισης.

Ε.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adell, J., Barbera, O., Alberto Marco, J., 1988. Flavonoid glycosides from *Anthyllis sericea*. *Phytochemistry* 27, 2967–2970. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)80698-8](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)80698-8)
- Aston Philander, L., 2011. An ethnobotany of Western Cape Rasta bush medicine. *J. Ethnopharmacol.* 138, 578–594. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.10.004>
- Atanasov, A.G., the International Natural Product Sciences Taskforce, Zotchev, S.B., Dirsch, V.M., Supuran, C.T., 2021. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* 20, 200–216. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>
- Azzi, A., Ricciarelli, R., Zingg, J.-M., 2002. Non-antioxidant molecular functions of α -tocopherol (vitamin E). *FEBS Letters* 519, 8-10
- Baxevanis, A., Ouellette, B.F.F., 2001. *Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*, Second Edition 495.
- Becker Pertuzatti, P., Teixeira Barcia, M., Gómez-Alonso, S., Teixeira Godoy, H., Hermosin-Gutierrez, I., 2021. Phenolics profiling by HPLC-DAD-ESI-MSn aided by principal component analysis to classify Rabbiteye and Highbush blueberries. *Food Chem.* 340, 127958. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127958>
- Bohm, B.A., Collins, F.W., 1975. Flavonoids of *Philydrum lanuginosum*. *Phytochemistry* 14, 315–316. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(75\)85079-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(75)85079-5)
- Braca, A., Bilia, A.R., Mendez, J., Morelli, I., 2001. Myricetin glycosides from *Licania densiflora*. *Fitoterapia* 72, 182–185. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(00\)00257-4](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(00)00257-4)
- Briggs, B., Linder, P., 2009. A new subfamilial and tribal classification of Restionaceae (Poales). *Telopea* 12, 333–345. <https://doi.org/10.7751/telopea20095822>
- Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Gómez, M.V., Velders, A.H., Hermosín-Gutiérrez, I., 2009. Flavonol 3- O -Glycosides Series of *Vitis vinifera* Cv. Petit Verdot Red Wine Grapes. *J. Agric. Food Chem.* 57, 209–219. <https://doi.org/10.1021/jf802863g>
- Chen, Y.-H., Chang, F.-R., Lu, M.-C., Hsieh, P.-W., Wu, M.-J., Du, Y.-C., Wu, Y.-C., 2008. New Benzoyl Glucosides and Cytotoxic Pterisin Sesquiterpenes from *Pteris ensiformis* Burm. *Molecules* 13, 255–266. <https://doi.org/10.3390/molecules13020255>
- Dewick, P.M., 2002. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*, 2nd ed. ed. Wiley, Chichester, West Sussex, England; New York, NY, USA.

- Ding, H.-Y., Lin, H.-C., Teng, C.-M., Wu, Y.-C., 2000. Phytochemical and Pharmacological Studies on Chinese *Paeonia* Species. *J. Chin. Chem. Soc.* 47, 381–388. <https://doi.org/10.1002/jccs.200000051>
- do Vale, A.E., David, J.M., Brandão, H.N., David, J.P., 2005. A New Flavonol Glycoside Derivative from Leaves of *Moldenhawera nutans*. *Z. Für Naturforschung C* 60, 45–49. <https://doi.org/10.1515/znc-2005-1-209>
- Dorrat-Haaksma, E., Linder, H.P., 2012. Restios of the Fynbos, 2nd ed. Struik Nature, Wembley Square, First Floor, Solan Road, Gardens, Cape Town, 8001, PO Box 1144, Cape Town, 8000 South Africa.
- dos Santos, M.A.Z., Alicieo, T.V.R., Pereira, C.M.P., Ramis-Ramos, G., Mendonça, C.R.B., 2014. Profile of Bioactive Compounds in Avocado Pulp Oil: Influence of the Drying Processes and Extraction Methods. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 91, 19–27. <https://doi.org/10.1007/s11746-013-2289-x>
- Fazio, G.C., Xu, R., Matsuda, S.P.T., 2004. Genome Mining To Identify New Plant Triterpenoids. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 5678–5679. <https://doi.org/10.1021/ja0318784>
- Forgo, P., Kövér, K.E., 2004. Gradient enhanced selective experiments in the ¹H NMR chemical shift assignment of the skeleton and side-chain resonances of stigmasterol, a phytosterol derivative. *Steroids* 69, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2003.09.012>
- Ghani, E.M.A., Sayed, A.M.E., Tadros, S.H., Soliman, F.M., 2021. Chemical and biological analysis of the bioactive fractions of the leaves of *scaevola taccada* (gaertn.) Roxb. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 35–41. <https://doi.org/10.22159/ijpps.2021v13i3.40257>
- Guo, X., Wang, L., Xu, M., Bai, J., Shen, J., Yu, B., Liu, Y., Sun, H., Hao, Y., Geng, D., 2018. Shikimic acid prevents cartilage matrix destruction in human chondrocytes. *Int. Immunopharmacol.* 63, 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.07.021>
- Gutzeit, D., Wray, V., Winterhalter, P., Jerz, G., 2006. Preparative Isolation and Purification of Flavonoids and Protocatechuic Acid from Sea Buckthorn Juice Concentrate (*Hippophaë rhamnoides* L. ssp. *rhamnoides*) by High-Speed Counter-Current Chromatography. *Chromatographia* 65, 1–7. <https://doi.org/10.1365/s10337-006-0105-6>
- Harborne, J.B., 1979. Correlations between flavonoid chemistry, anatomy and geography in the Restionaceae. *Phytochemistry* 18, 1323–1327. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(79\)83015-0](https://doi.org/10.1016/0031-9422(79)83015-0)

- Harborne, J.B., Boardley, M., Linder, P., 1985. Variations in flavonoid patterns within the genus *Chondropetalum* (Restionaceae). *Phytochemistry* 24, 6.
- Hardy, C.R., Moline, P., Linder, H.P., 2008. A Phylogeny for the African Restionaceae and New Perspectives on Morphology's Role in Generating Complete Species Phylogenies for Large Clades. *Int. J. Plant Sci.* 169, 377–390. <https://doi.org/10.1086/526467>
- Jian Guo, Dong-Lei Yu, Lizhen Xu, Min Zhu, Shi-Lin Yang, 1998. Flavonol glycosides from *Lysimachia congestiflora*. *Phytochemistry* 48, 1445–1447. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)01025-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)01025-X)
- Kakkar, S., Bais, S., 2014. A Review on Protocatechuic Acid and Its Pharmacological Potential. *ISRN Pharmacol.* 2014, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2014/952943>
- Kanehisa, M., Goto, S., 2000. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* 28, 4.
- Kaul, N., Devaraj, S., Jialal, I., 2001. α -Tocopherol and Atherosclerosis. *Exp. Biol. Med.* 226, 5–12. <https://doi.org/10.1177/153537020122600102>
- Kaur, N., Chaudhary, J., Jain, A., Kishore, L., 2011. STIGMASTEROL: A COMPREHENSIVE REVIEW 2, 8.
- Kelmanson, J.E., Jäger, A.K., van Staden, J., 2000. Zulu medicinal plants with antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol.* 69, 241–246. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00147-6](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00147-6)
- Koponen, J.M., Happonen, A.M., Auriola, S., Kontkanen, H., Buchert, J., Poutanen, K.S., Törrönen, A.R., 2008. Characterization and Fate of Black Currant and Bilberry Flavonols in Enzyme-Aided Processing. *J. Agric. Food Chem.* 56, 3136–3144. <https://doi.org/10.1021/jf703676m>
- Lall, N., 2020. Natural Cosmetics from South African Wetland Plants (No. TT 817/20). Water Research Commission, Private Bag X03 GEZINA, 0031.
- Linder, H.P., 2018. The Taxonomy of the African Restionaceae Available in Intkey Format. [WWW Document]. *Dep. Syst. Evol. Bot.-Univ. Zurich*. URL <http://www.systbot.uzh.ch/en/Bestimmungsschluesel/Restionaceae> (accessed 10.13.21).
- Linder, H.P., 2011. New species and combinations in the African Restionaceae. *South Afr. J. Bot.* 77, 415–424. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.10.008>

- Linder, H.P., Briggs, B.G., Johnson, L.A.S., 1998. The Families and Genera of Vascular Plants, 1st ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York.
- Linder, H.P., Hardy, C.R., 2010. A generic classification of the Restioneae (Restionaceae), southern Africa. *Bothalia* 40, 1–36. <https://doi.org/10.4102/abc.v40i1.178>
- Linder, H.P., Helme, N.A., 2015. *Elegia namaquense* (Restionaceae), a new species from the Namaqualand coastal plain, Northern Cape, South Africa. *South Afr. J. Bot.* 99, 17–20. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.02.014>
- M. Estevez, A., J. Estevez, R., 2012. A Short Overview on the Medicinal Chemistry of (—)-Shikimic Acid. *Mini-Rev. Med. Chem.* 12, 1443–1454. <https://doi.org/10.2174/138955712803832735>
- Mamidi, N., Manna, D., 2013. Zn(OTf)₂-Promoted Chemoselective Esterification of Hydroxyl Group Bearing Carboxylic Acids. *J. Org. Chem.* 78, 2386–2396. <https://doi.org/10.1021/jo302502r>
- Masuoka, C., Yokoi, K., Komatsu, H., Kinjo, J., Nohara, T., Ono, M., 2007. Two Novel Antioxidant Ortho-Benzoyloxyphenyl Acetic Acid Derivatives from the Fruit of *Vaccinium uliginosum*. *Food Sci. Technol. Res.* 13, 215–220. <https://doi.org/10.3136/fstr.13.215>
- Mattivi, F., Guzzon, R., Vrhovsek, U., Stefanini, M., Velasco, R., 2006. Metabolite Profiling of Grape: Flavonols and Anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 54, 7692–7702. <https://doi.org/10.1021/jf061538c>
- Moline, P.M., Linder, H.P., 2006. Input data, analytical methods and biogeography of *Elegia* (Restionaceae). *J. Biogeogr.* 33, 47–62. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2005.01369.x>
- Moline, P.M., Linder, H.P., 2005. Molecular Phylogeny and Generic Delimitation in the *Elegia* Group (Restionaceae, South Africa) Based on a Complete Taxon Sampling and Four Chloroplast DNA Regions. *Syst. Bot.* 30, 759–772. <https://doi.org/10.1600/036364405775097842>
- Nair, B., 2001. Final Report on the Safety Assessment of Benzyl Alcohol, Benzoic Acid, and Sodium Benzoate. *Int. J. Toxicol.* 20, 23–50. <https://doi.org/10.1080/10915810152630729>
- Nazeam, J.A., El-Hefnawy, H.M., Omran, G., Singab, A.-N., 2018. Chemical profile and antihyperlipidemic effect of *Portulaca oleracea* L. seeds in streptozotocin-induced diabetic rats. *Nat. Prod. Res.* 32, 1484–1488. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1353507>

- Niki, E., Traber, M.G., 2012. A History of Vitamin E. *Ann. Nutr. Metab.* 61, 207–212. <https://doi.org/10.1159/000343106>
- Noor, S., Prodhan, A., Zohora, F.T., Tareq, F.S., Ahsan, M., Hasan, C.M., Islam, S.N., 2014. Phytochemical, Antioxidant, Antimicrobial, Thrombolytic as well as Cytotoxic Studies on the Stem Bark of *Manilkara zapota* (Sapotaceae). *Asian J. Chem.* 26, 6138–6142. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2014.16872>
- Parker, W.H., Maze, J., McLachlan, D.G., 1979. Flavonoids of *Abies amabilis* needles. *Phytochemistry* 18, 508–510. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)81906-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)81906-8)
- Rabelo, T.K., Zeidán-Chuliá, F., Caregnato, F.F., Schnorr, C.E., Gasparotto, J., Serafini, M.R., de Souza Araújo, A.A., Quintans-Junior, L.J., Moreira, J.C.F., Gelain, D.P., 2015. In Vitro Neuroprotective Effect of Shikimic Acid Against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress. *J. Mol. Neurosci.* 56, 956–965. <https://doi.org/10.1007/s12031-015-0559-9>
- Ramakrishna, E., Dev, K., Kothari, P., Tripathi, A.K., Trivedi, R., Maurya, R., 2017. Phytochemical investigation of *Kigelia pinnata* leaves and identification of osteogenic agents. *Med. Chem. Res.* 26, 940–946. <https://doi.org/10.1007/s00044-017-1807-z>
- Scognamiglio, M., Fiumano, V., D’Abrosca, B., Esposito, A., Choi, Y.H., Verpoorte, R., Fiorentino, A., 2014. Chemical interactions between plants in Mediterranean vegetation: The influence of selected plant extracts on *Aegilops geniculata* metabolome. *Phytochemistry* 106, 69–85. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.07.006>
- Sharma, V., Sarkar, I.N., 2013. Bioinformatics opportunities for identification and study of medicinal plants. *Brief. Bioinform.* 14, 238–250. <https://doi.org/10.1093/bib/bbs021>
- Singh, K.S., Sawant, S.G., Devi, P., Kaminsky, W., 2015. Stigmasterol from *Eichhornia crassipes* (Water Hyacinth): Isolation, Characterization and X-ray Structure. *Asian J. Chem.* 27, 3028–3030. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2015.18832>
- Steenkamp, V., 2003. Traditional herbal remedies used by South African women for gynaecological complaints. *J. Ethnopharmacol.* 86, 97–108. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00053-9](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00053-9)
- Terfassi, S., Dauvergne, X., Cérantola, S., Lemoine, C., Bensouici, C., Fadila, B., Christian, M., Marchioni, E., Benayache, S., 2021. First report on phytochemical investigation, antioxidant and antidiabetic activities of *Helianthemum getulum*. *Nat. Prod. Res.* 1–8. <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1928664>

- Turnbull, J.J., Nakajima, J., Welford, R.W.D., Yamazaki, M., Saito, K., Schofield, C.J., 2004. Mechanistic Studies on Three 2-Oxoglutarate-dependent Oxygenases of Flavonoid Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 279, 1206–1216. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309228200>
- Tyagi, T., Agarwal, M., 2016. Phytochemical screening and GC-MS analysis of bioactive constituents in the ethanolic extract of *Pistia stratiotes* L. and *Eichhornia crassipes* (Mart.) solms 13.
- Udvardi, M.K., Czechowski, T., Scheible, W.-R., 2008. Eleven Golden Rules of Quantitative RT-PCR. *Plant Cell* 20, 1736–1737. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.061143>
- Venditti, A., Frezza, C., Sciubba, F., Foddai, S., Serafini, M., Bianco, A., 2017. Terpenoids and More Polar Compounds from the Male Cones of *Wollemia nobilis*. *Chem. Biodivers.* 14, e1600332. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201600332>
- Venkateswarlu, V., Aravinda Kumar, K.A., Gupta, S., Singh, D., Vishwakarma, R.A., Sawant, S.D., 2015. DMSO/I₂ mediated C–C bond cleavage of α -ketoaldehydes followed by C–O bond formation: a metal-free approach for one-pot esterification. *Org. Biomol. Chem.* 13, 7973–7978. <https://doi.org/10.1039/C5OB01015B>
- Watson, J.D. (Ed.), 2014. *Molecular biology of the gene*, Seventh edition. ed. Pearson, Boston.
- Wellmann, F., Lukačín, R., Moriguchi, T., Britsch, L., Schiltz, E., Matern, U., 2002. Functional expression and mutational analysis of flavonol synthase from *Citrus unshiu*: Flavonol synthase. *Eur. J. Biochem.* 269, 4134–4142. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03108.x>
- Yasukawa, K., Ogawa, H., Takido, M., 1990. Two flavonol glycosides from *Lysimachia nummularia*. *Phytochemistry* 29, 1707–1708. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)80155-A](https://doi.org/10.1016/0031-9422(90)80155-A)
- Yasukawa, K., Takido, M., 1988. Quercetin 3-rhamnosyl (1 → 2) galactoside from *Lysimachia vulgaris* var. *davurica*. *Phytochemistry* 27, 3017–3018. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)80719-2](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)80719-2)
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T.L., 2012. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13, 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>

- Yuan, X., Wen, H., Cui, Y., Fan, M., Liu, Z., Mei, L., Shao, Y., Wang, Y., Tao, Y., 2017. Phenolics from *Lagotis breviflora* Maxim. Nat. Prod. Res. 31, 362–366. <https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1239090>
- Zeb, A., Ullah, F., Ayaz, M., Ahmad, S., Sadiq, A., 2017. Demonstration of biological activities of extracts from *Isodon rugosus* Wall. Ex Benth: Separation and identification of bioactive phytoconstituents by GC-MS analysis in the ethyl acetate extract. BMC Complement. Altern. Med. 17, 284. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1798-9>
- Zhang, R., Shen, W., Wei, X., Zhang, F., Shen, C., Wu, B., Zhao, Z., Liu, H., Deng, X., 2016. Simultaneous determination of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils by GC-MS. Anal. Methods 8, 7341–7346. <https://doi.org/10.1039/C6AY01745B>
- Zou, K., Komatsu, K., Zhu, S., 2007. A novel compound from *Hedysarum polybotrys*. J. Asian Nat. Prod. Res. 9, 699–703. <https://doi.org/10.1080/10286020600604385>
- Κοσσίδα, Σ., 2008. Βιοπληροφορική–Δυνατότητες και Προοπτικές. Εκδόσεις Κοσσίδα Σοφία
Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Της Ακαδημίας Αθηνών Αθήνα.

E1. Ηλεκτρονικές Πηγές

www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=39216#null

www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=14107&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock

<https://www.systbot.uzh.ch/en/Bestimmungsschlüssel/Restionaceae.html>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=14107&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>

www.ville-ge.ch/musinfo/bd/cjb/africa/details.php?langue=en&id=190455

www.ville-ge.ch/musinfo/bd/cjb/africa/details.php?langue=en&id=223929

<https://www.genome.jp/kegg/>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

<http://tcoffee.crg.cat/>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html

<http://www.pherobase.com/ms-popup.html?methyl%20linolenate>

<https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C628977&Mask=200#Mass-Spec>

https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN_628-97-7_1HNMR.htm