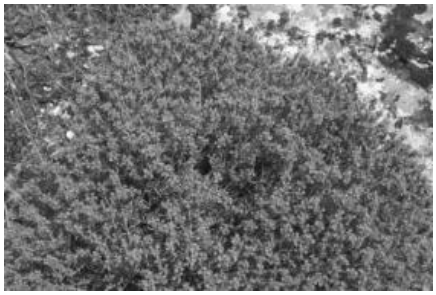
Πανεπιστήμιο Κρήτης
Τμήμα Βιολογίας

Χωρική διαφοροποίηση της παραγωγής αιθέριων ελαίων από φυτά υψηλού εθνοφαρμακολογικού ενδιαφέροντος της οικογένειας *Lamiaceae* σε σχέση με περιβαλλοντικούς παράγοντες της νήσου Κρήτης

Άρτεμις Κατσαδούρα

Μεταπτυχιακή Διατριβή



Ηράκλειο, 2018

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«Μοριακή Βιολογία & Βιοτεχνολογία Φυτών»

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

Στέργιος Πυρίντσος, Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας, Πανεπιστημίου Κρήτης

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Στέργιος Πυρίντσος, Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας, Παν/μίου Κρήτης

Κυριάκος Κοτζαμπάσης, Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας, Παν/μίου Κρήτης

Κρίτων Καλαντίδης, Αν. Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας, Παν/μίου Κρήτης

PlantEcoLab

Εργαστήριο Οικολογίας Φυτών & Διαχείρισης Χερσαίων Οικοσυστημάτων,
Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

POSTGRADUATE STUDIES PROGRAMME

«Plant Molecular Biology & Biotechnology»

POSTGRADUATE THESIS

«Spatial differentiation in essential oil production from plants of high ethnopharmacological interest of the family *Lamiaceae* in relation to environmental factors of the island of Crete»

Artemis Katsadoura

Heraklion 2018

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Οικολογίας Φυτών & Διαχείρισης Χερσαίων Οικοσυστημάτων του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, καθώς και στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιολογίας με τίτλο: «Μοριακή Βιολογία και Βιοτεχνολογία Φυτών».

Καταρχάς θέλω να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες προς τον Καθηγητή μου κ. Στέργιο Πυρίντσο, επιβλέποντα της μελέτης αυτής που μου εμπιστεύτηκε το συγκεκριμένο θέμα, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και τη δυνατότητα που μου χάρισε να ασχοληθώ με κάτι τόσο ενδιαφέρον. Η εν γένει επιστημονική του καθοδήγηση και η συνεχής συμβολή του καθ' όλη τη διάρκεια της διεξαγωγής της μελέτης αυτής είχαν καθοριστικό ρόλο στο τελικό αποτέλεσμα. Έπειτα θα πρέπει να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα κα Γεωργέσκου Λουτσιάνα καθώς και όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Οικολογίας Φυτών & Διαχείρισης Χερσαίων Οικοσυστημάτων του Τμήματος Βιολογίας, για την άριστη συνεργασία.

Επίσης οφείλω να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Κατερινόπουλο Χαράλαμπο, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας για τη συνεργασία και τη φιλοξενία στο εργαστήριο του, καθώς και το μεταδιδάκτορα κ. Μιχάλη Στεφανάκη για την πολύτιμη βοήθειά του και τις συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια της ανάλυσης των δειγμάτων.

Ευχαριστώ επίσης πολύ τον Καθηγητή κ. Κυριάκο Κοτζαμπάση και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Κρίτωνα Καλαντίδη για τη συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Τέλος ευχαριστώ βαθύτατα την οικογένεια μου και τον αρραβωνιαστικό μου Πέτρο για την ενθάρρυνση και τη συνεχή υποστήριξη.

Περιεχόμενα

Περίληψη....6

Abstract....7

Εισαγωγή....8

Υλικά και Μέθοδοι....10

Το βιολογικό υλικό....10

Πειραματικός σχεδιασμός και δειγματοληψίες....10

Παραλαβή αιθέριου ελαίου....11

Ποιοτική και Ποσοτική ανάλυση των αιθέριων ελαίων....14

Συσχέτιση Γεωγραφικών και Βιοχημικών Αποστάσεων....15

Συσχέτιση Αιθέριων Ελαίων και μεταβλητών Περιβάλλοντος....15

Αποτελέσματα – Συζήτηση....16

Χημικό αποτύπωμα του είδους *S. fruticosa* στην Κρήτη....16

Χημικό αποτύπωμα του *O. dictamnus* στην Κρήτη....19

Χημικό αποτύπωμα του είδους *T. capitata* στην Κρήτη....21

Συμπληρωματικότητα και συνέργια....23

Χωρική μεταβλητότητα της απόδοσης σε αιθέριο έλαιο....24

Χωρική μεταβλητότητα της περιεκτικότητας του αιθέριου ελαίου σε επιμέρους συστατικά....26

Σύσταση αιθέριου ελαίου σε καλλιεργούμενα φυτά....28

Σύνοψη....31

Βιβλιογραφία....32

Περίληψη

Η οικογένεια *Lamiaceae* περιλαμβάνει κυρίως ποώδη και ημι-θαμνώδη είδη που εξαπλώνονται σχεδόν σε όλο τον κόσμο, κυρίως σε ανοιχτές περιοχές, μεταξύ των οποίων και η Λεκάνη της Μεσογείου όπου εμφανίζει την μεγαλύτερη συγκέντρωση ειδών. Είναι η σημαντικότερη οικογένεια αρωματικών φυτών στην Ελλάδα καθώς τα περισσότερα μέλη της παράγουν αιθέρια έλαια, συμμετέχει σε όλους τους τύπους βλάστησης των διαφορετικών κλιματικών περιοχών και περιέχει πολλά ενδημικά είδη.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν είδη της οικογένειας *Lamiaceae (Labiatae)* και συγκεκριμένα τα είδη *Salvia fruticosa*, *Origanum dictamnus* («Κρητικός Δίκταμος») και *Coridothymus capitatus*. Τα τρία είδη επελέγησαν λόγω του υψηλού εθνο-φαρμακολογικού ενδιαφέροντος που έχουν, καθώς και λόγω της χρήσης τους στην φαρμακοβιομηχανία και βιομηχανία τροφίμων.

Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν αρκετές εργασίες στις οποίες παρέχονται στοιχεία των συστατικών των αιθέριων ελαίων για τα παραπάνω είδη, και παρά το γεγονός ότι σε κάποιες αναφέρεται γεωγραφική μεταβλητότητα της σύστασης του αιθέριου ελαίου, εξακολουθεί να απουσιάζει μια ολοκληρωμένη προσέγγιση του χημικού αποτυπώματος αυτών των ειδών η οποία θα βασίζεται στη βιολογική μεταβλητότητα σε χωρική κλίμακα, ούτως ώστε να μπορεί να τυποποιηθεί η παραγωγή προϊόντων φυτικής προέλευσης για τη φαρμακοβιομηχανία και τη βιομηχανία τροφίμων είτε από συλλογή είτε από καλλιέργεια φυτικού υλικού.

Είναι γνωστό όμως ότι η βιολογική μεταβλητότητα διαμορφώνεται από τη δράση γενετικών, περιβαλλοντικών και επιγενετικών παραγόντων, που στο τέλος διαμορφώνουν και τη χωρική μεταβλητότητα του χημικού αποτυπώματος, γεγονός που καθιστά αναγκαία την συντονισμένη μελέτη όλων των παραπάνω παραγόντων.

Στην παρούσα εργασία, που αποτελεί μέρος ενός ευρύτερου ερευνητικού σχεδίου που είναι σε εξέλιξη, από το σύνολο των παραπάνω παραγόντων (γενετικών, περιβαλλοντικών και επιγενετικών) εξετάστηκε η δράση των περιβαλλοντικών στο χημικό αποτύπωμα των υπό εξέταση ειδών και ετέθη ως σκοπός η μελέτη της χωρικής διαφοροποίησης των αποδόσεων σε αιθέριο έλαιο και του χημικού αποτυπώματος τους όπως διαμορφώνονται από τη δράση αυτών των παραγόντων.

Παρά το γεγονός ότι από τα αποτελέσματα προέκυψε πως οι αποδόσεις των ειδών σε παραγωγή αιθέριων ελαίων σε επίπεδο Κρήτης εμφανίζουν γενικότερη συμφωνία με τα έως τώρα βιβλιογραφικά δεδομένα, προκύπτει στατιστικά σημαντική χωρική διαφοροποίηση από τη δράση περιβαλλοντικών παραμέτρων, η οποία μπορεί να αποδοθεί χαρτογραφικά με τη χρήση Γενικευμένων Γραμμικών Μοντέλων, και η οποία μπορεί να αξιοποιηθεί στο σχεδιασμό παραγωγής πρώτης ύλης για τη φαρμακοβιομηχανία και τη βιομηχανία τροφίμων από συλλογή ή από καλλιέργεια φυτικού υλικού. Το ίδιο προέκυψε ότι ισχύει και για την παραγωγή συγκεκριμένων δευτερογενών μεταβολιτών που περιλαμβάνονται στο αιθέριο έλαιο των υπό εξέταση ειδών. Επίσης προέκυψε ότι η σύσταση αιθέριων ελαίων σε επιμέρους συστατικά από καλλιεργούμενα φυτά των υπό εξέταση ειδών φαίνεται να είναι αντίστοιχη με τη σύσταση που καταγράφεται στους γειτονικούς αυτοφυείς πληθυσμούς.

Όλα τα παραπάνω που προέκυψαν, δηλαδή η χωρική απόδοση της μεταβλητότητας ως προς τις αποδόσεις των φυτών και τη σύσταση των αιθέριων ελαίων των υπό εξέταση ειδών, όπως και η συγκριτική αξιολόγηση καλλιεργούμενων φυτών με αυτοφυείς πληθυσμούς αποτελούν βασικά εργαλεία για τη διασφάλιση της ποιότητας της πρώτης ύλης (quality assurance) και τον ποιοτικό έλεγχο (quality control) σε σκευάσματα φυτικής προέλευσης που παράγονται από τη φαρμακοβιομηχανία και τη βιομηχανία τροφίμων.

Abstract

Lamiaceae family includes mainly herbaceous and shrubby plant species spread almost all over the world, mainly in open areas, including the Mediterranean Basin where the highest concentration of species appears. It is the most important family of aromatic plants in Greece, since the majority of its members produce essential oils, this family participates in all types of flora in different climatic conditions and contains many endemic species.

In this study we used species of the *Lamiaceae (Labiatae)* family, specifically *Salvia fruticosa, Origanum dictamnus* ("Cretan dittany") and *Coridothymus capitatus*. These three species were selected due to their high ethno-pharmacological interest as well as their use in the pharmaceutical and food industry.

Despite the fact that several existing articles provide data of the above species' essential oil components, and that the spatial variability of the essential oil composition is reported in some of them, an integrated approach based on spatial biological variability of the chemical profile of these species is still not accomplished; the importance of this is that the production of plant preparations used in the pharmaceutical and food industry can be standardized either in harvesting or cultivating plant material.

It is known, that biological variability is affected by genetic, environmental and epigenetic factors, which also affect the spatial variability of the chemical profile and this fact emphasizes the necessity to study all the above factors simultaneously.

In this study, which is part of a wider research project in progress, we examined the environmental impact to the chemical profile of the specific species, with the aim to study the spatial differentiation of their essential oil yields and their chemical profile as it is formulated by the impact of these factors.

Although the results showed that essential oil yields of the specific species at Crete island were in agreement with up to date bibliography, due to the impact of environmental factors statistically significant spatial variation appears, which can be mapped using Generalized Linear Models. It can be useful for the raw material production design for the pharmaceutical and food industry in harvesting or cutivating plant material. The same conclusion has been appeared as far as secondary metabolites, which are included in the essential oil of the above species, are concerned. It is also concluded that the components of the essential oil composition of these plants harvested by cultivation appears to be consistent with the composition recorded in the adjacent native populations.

All the above, the spatial variability of plant yields and the essential oil composition of the species under consideration, as well as the comparative assessment of cultivated plants with their indigenous populations are key tools for the raw material quality assurance and the quality control of herbal preparations produced by the pharmaceutical and food industry.

.

Εισαγωγή

Η οικογένεια *Lamiaceae* περιλαμβάνει κυρίως ποώδη και ημι-θαμνώδη είδη που εξαπλώνονται σχεδόν σε όλο τον κόσμο, κυρίως σε ανοιχτές περιοχές, μεταξύ των οποίων και η Λεκάνη της Μεσογείου όπου εμφανίζει την μεγαλύτερη συγκέντρωση ειδών. Ο βλαστός συνήθως έχει χαρακτηριστική τετράγωνη διατομή. Τα φύλλα είναι κυρίως απλά, αντίθετα και σταυροειδώς διατεταγμένα στον βλαστό και χωρίς παράφυλλα. Τα φυτά καλύπτονται από αδένες ή αδενώδεις τρίχες και έχουν έντονη αρωματική οσμή που οφείλεται στην ύπαρξη αιθέριων ελαίων. Τα άνθη είναι ισχυρά ζυγόμορφα, με δίχειλη στεφάνη, που φύονται πολλά μαζί στις μασχάλες των φύλλων κατά μονοχάσια ή διχάσια, που σχηματίζουν σπονδύλους ή σε ακραίους βότρεις. Τα άνθη των φυτών της οικογένειας είναι κυρίως ερμαφρόδιτα και ο κάλυκας είναι συσσέπαλος, 5μερής, δίχειλος και περιβάλλει τον επιμήκη σωλήνα της δίχειλης, 5μερούς στεφάνης.

Η οικογένεια *Lamiaceae* είναι η σημαντικότερη οικογένεια αρωματικών φυτών στην Ελλάδα καθώς τα περισσότερα μέλη της παράγουν αιθέρια έλαια, συμμετέχει σε όλους τους τύπους βλάστησης των διαφορετικών κλιματικών περιοχών και περιέχει πολλά ενδημικά είδη. Γνωστά φυτά που ανήκουν στην οικογένεια *Lamiaceae* είναι η ρίγανη (*Origanum vulgare*), το θυμάρι (*Thymus vulgaris*), το φασκόμηλο (*Salvia officinalis*), η μέντα (*Mentha piperita*), ο βασιλικός (*Ocimum basilicum*), η λεβάντα (*Lavandula stoechas*), η θύμπρα (*Satureja thymbra*), το δεντρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*), το τσάι του βουνού (*Sideritis syriaca*), το μελισσόχορτο (*Melissa officinalis*), ο δίκταμος (*Origanum dictamnus*), κλπ.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν είδη της οικογένειας *Lamiaceae (Labiatae)* και συγκεκριμένα τα είδη *Salvia fruticosa*, *Origanum dictamnus* («Κρητικός Δίκταμος») και *Coridothymus capitatus*. Τα είδη *Coridothymus capitatus, Origanum dictamnus* and *Salvia fruticosa* είναι γνωστά από την αρχαιότητα για τις φαρμακευτικές τους ιδιότητες (Karousou et al., 1998), και τα δύο πρώτα εξ' αυτών συμπεριλαμβάνονται στο έργο του Διοσκουρίδη *De Materia Medica*. Επίσης, το είδος *Origanum dictamnus* αναφέρεται μέσω των αιώνων από πολλούς θεραπευτές και φιλοσόφους όπως ο Ασκληπιός, ο Ευριπίδης, ο Αριστοτέλης, ο Ιπποκράτης, ο Θεόφραστος, ο Βιργίλιος και ο Γαληνός (Vrachnakis 2003), ενώ πρόσφατες εθνοβοτανικές ή/και εθνοφαρμακολογικές μελέτες στις οποίες αναφέρεται το είδος *Coridothymus capitatus* είναι οι Lardos & Heinrich (2013), Eissa et al. (2014) και Sargin (2015), το είδος *Salvia fruticosa* οι Alzweiri et al. (2011), Gürdal & Kültür (2013) και Jaradat et al. (2016) και το είδος *Origanum dictamnus* οι εργασίες Karousou and Deirmentzoglou (2011) και Martínez-Francés et al. (2015).

Τα τρία είδη επελέγησαν λόγω του υψηλού εθνο-φαρμακολογικού ενδιαφέροντος που έχουν, καθώς και λόγω της χρήσης τους στην φαρμακοβιομηχανία και βιομηχανία τροφίμων. Πολλά είδη του γένους *Salvia* φύονται στη Μεσόγειο και χρησιμοποιούνται στην παραδοσιακή ιατρική για την αντιμετώπιση αρκετών προβλημάτων (Lopresti, 2017). Η ανάλυση της σύνθεσης των αιθέριων ελαίων σε πολλά είδη του γένους *Salvia* υποδεικνύει ότι η ευκαλυπτόλη (1,8-Cineole) και η βορνεόλη (Borneol) είναι τα κύρια συστατικά τους. Αρκετοί συγγραφείς, ωστόσο, έχουν παρατηρήσει ιδιαίτερα σημαντικές διαφοροποιήσεις στην συγκέντρωση αυτών των συστατικών ή/και την παρουσία άλλων ουσιών σε υψηλές συγκεντρώσεις μεταξύ των αιθέριων ελαίων των διαφορετικών ειδών *Salvia*. Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, το αιθέριο έλαιο του *S. fruticosa* χαρακτηρίζεται από την παρουσία τεσσάρων βασικών συστατικών σε υψηλή περιεκτικότητα και συγκεκριμένα την ευκαλυπτόλη (22.7−64.2% του ολικού αιθέριου ελαίου), την α-θουγιόνη (1.0−19.2%), τη β-θουγιόνη (0.9−25.6%) και την καμφορά (0.8−30.3%) (Karousou et al., 1998).

Σε παλαιότερες μελέτες έχει παρατηρηθεί μεγάλη ποικιλομορφία στην ποσότητα και το περιεχόμενο των αιθέριων ελαίων στα είδη του γένους *Origanum*. Οι υψηλότερες τιμές είχαν καταγραφεί στο *O. vulgare subsp. hirtum* (7,4 ml / 100 g ξηρού βάρους) ακολουθούμενες από εκείνες του είδους *O. onites* (4,2%) ενώ οι χαμηλότερες τιμές είχαν παρατηρηθεί στα είδη *O. microphyllum* και *O. calcaratum* (0,4%). Όπως έχει παρατηρηθεί τα αιθέρια έλαια των ειδών *O. calcaratum*, *O. onites* και *O. vulgare* subsp. *hirtum* χαρακτηρίζονται από υψηλές ποσότητες συστατικών που εμπλέκονται στη φαινολική βιοσυνθετική οδό, τις φαινόλες θυμόλη και καρβακρόλη καθώς και τις πρόδρομες ουσίες τους γ-τερπινένιο και π-κυμένιο. Το σύνολο των τεσσάρων αυτών συστατικών αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος των αιθέριων ελαίων που κυμαίνεται από 64,5% στο *O. calcaratum*, έως 92,7% στο *O. vulgare subsp. hirtum*. Επίσης πλούσιο σε φαινολικά συστατικά είναι το αιθέριο έλαιο του *O. dictamnus*. Αντίθετα, τα αιθέρια έλαια του *O. microphyllum* χαρακτηρίζονται από την παρουσία των συστατικών trans- / cis-sabinene hydrate και

terpinene-4-ol, ενώ το άθροισμα των φαινολικών ενώσεων είναι πολύ χαμηλό (λιγότερο από 8,6%). Ο δίκταμος διατίθεται στο εμπόριο κυρίως για το αιθέριο έλαιό του. Στις περισσότερες περιπτώσεις η καρβακρόλη θεωρείται ότι είναι το κύριο συστατικό του αιθέριου ελαίου του δίκταμου (*O.dictamnus)*, ενώ το π-κυμένιο και γ-τερπινένιο ακολουθούν σε ποσότητες. Να σημειωθεί ότι το περιεχόμενό του αιθέριου ελαίου σε καρβακρόλη θεωρείται πολύ σημαντικό, καθώς αυτό το αρωματικό μονοτερπένιο έχει σημαντικό εμπορικό ενδιαφέρον (Argyropoulou et al., 2014a).

Το αρωματικό φυτό *Thymbra capitata* (L.) Cav. είναι πολύ κοινό μέλος της οικογένειας *Lamiaceae* (*Labiatae*) και κατανέμεται στην περιοχή της Μεσογείου κυρίως στην Τουρκία, την Ελλάδα και την Ισπανία και είναι γνωστό στο εμπόριο ως "Ισπανική ρίγανη". Τα είδη *Thymbra*, *Satureja*, *Origanum*, *Thymus* κλπ έχουν εμπορική σημασία τόσο στην Τουρκία όσο και παγκοσμίως.

Πιο συγκεκριμένα, συλλέγονται 8000 τόνοι φυτών ανά έτος, τα φύλλα των οποίων χρησιμοποιούνται ως μαγειρικό καρύκευμα. Τα αιθέρια έλαιά τους είναι επίσης σημαντικά για τις βιομηχανίες αρωμάτων, καλλυντικών, πρόσθετων τροφίμων και φαρμακευτικών προϊόντων. Αναλύσεις του αιθέριου ελαίου του είδους *T. capitata*, συλλεγμένο από παράλιες περιοχές της Τουρκίας, έδειξαν ότι αποτελείται από οξυγονωμένα μονοτερπένια σε ποσοστό 55,6% και μη οξυγονωμένα συστατικά σε ποσοστό 43,6%. Στο κλάσμα των μονοτερπενίων καταγράφηκαν η καρβακρόλη (35,6%), η θυμόλη (18,6%), το π-κυμένιο (21,0%), το γ-τερπινένιο (12,3%), το α-τερπινένιο (3,2%), το α-μυρκένιο (3,0%) και άλλες δευτερεύουσες ενώσεις. Συγκρίνοντας τα στοιχεία της βιβλιογραφίας της ανάλυσης του αιθέριου ελαίου του ελληνικού *T. capitata*, παρουσιάζεται μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε καρβακρόλη (81,5%) σε αντίθεση με αυτή του δείγματος από την Τουρκία (μόνο 35,6%).

Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν αρκετές εργασίες στις οποίες παρέχονται στοιχεία των συστατικών των αιθέριων ελαίων για τα παραπάνω είδη, και παρά το γεγονός ότι σε κάποιες αναφέρεται γεωγραφική μεταβλητότητα της σύστασης του αιθέριου ελαίου, εξακολουθεί να απουσιάζει μια ολοκληρωμένη προσέγγιση του χημικού αποτυπώματος αυτών των ειδών η οποία θα βασίζεται στη βιολογική μεταβλητότητα σε χωρική κλίμακα, ούτως ώστε να μπορεί να τυποποιηθεί η παραγωγή προϊόντων φυτικής προέλευσης για τη φαρμακοβιομηχανία και τη βιομηχανία τροφίμων είτε από συλλογή είτε από καλλιέργεια φυτικού υλικού.

Η βιολογική μεταβλητότητα διαμορφώνεται από τη δράση γενετικών, περιβαλλοντικών και επιγενετικών παραγόντων που στο τέλος διαμορφώνουν και τη χωρική μεταβλητότητα του χημικού αποτυπώματος και κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική καθώς η γνώση αυτής μπορεί να βοηθήσει στη διαχείρισή της ούτως ώστε να μπορεί να διασφαλιστούν τόσο η ποιότητα του προϊόντος (quality assurance) όσο και ο ποιοτικός έλεγχος (quality control).

Στην παρούσα εργασία από το σύνολο των παραπάνω παραγόντων (γενετικών, περιβαλλοντικών και επιγενετικών) εξετάζεται η δράση του περιβαλλοντικών στο χημικό αποτύπωμα των υπό εξέταση ειδών και τίθεται ως σκοπός η μελέτη της χωρικής διαφοροποίησης των αποδόσεων σε αιθέριο έλαιο και του χημικού αποτυπώματος τους όπως διαμορφώνονται από τη δράση αυτών των παραγόντων.

Υλικά και Μέθοδοι

Το βιολογικό υλικό

Το βιολογικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε στις αποστάξεις της συγκεκριμένης μελέτης περιλαμβάνει φυτά της οικογένειας *Lamiaceae (Labiatae)* και συγκεκριμένα τα είδη: *Salvia fruticosa* Mill. *Origanum dictamnus* L. και *Coridothymus capitatu* (L.) Reichenb.fil. (συνώνυμο του *Thymbra capitata* (L.) Cav.). Από τα υπέργεια τμήματα των φυτών που συλλέχθηκαν χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα φύλλα (έλασμα και μίσχος).

Η ταξινομική κατάταξη των ειδών που μελετήθηκαν έχει ως εξής:

Regnum – Plantae, Divisio – Tracheophyta, Subdivisio –Spermatophytina, Class – Magnoliopsida, Superordo – Asteranae, Ordo – Lamiales, Familia – LamiaceaeLindl., Genus – *Salvia* L., Species – *Salvia fruticosa* Mill.

Regnum – Plantae, Divisio – Tracheophyta, Subdivisio –Spermatophytina, Class – Magnoliopsida, Superordo – Asteranae, Ordo – Lamiales, Familia – LamiaceaeLindl., Genus – *Origanum* L., Species - *Origanumdictamnus*L.

Regnum – Plantae, Divisio – Tracheophyta, Subdivisio –Spermatophytina, Class – Magnoliopsida, Superordo – Asteranae, Ordo – Lamiales, Familia – LamiaceaeLindl., Genus – *Thymbra* L.., Species – *Thymbra capitata* (L.) Cav.

Αντίστοιχα τα ετεροτυπικά συνώνυμα των ειδών που μελετήθηκαν είναι τα παρακάτω:

Salvia baccifera Etl., *Salvia clusii* Jacq., *Salvia cypria* Unger &Kotschy, *Salvia incarnate* Etl., *Salvia libanotica* Boiss. & Gaill., *Salvia lobryana* Azn., *Salvia marrubioides* Vahl, *Salvia ovata* F. Dietr., *Salvia sipylea* Lam., *Salvia subtriloba* Schrank, *Salvia sypilea* Lam., *Salvia thomasii* Lacaita, *Salvia triloba* L. f., *Sclareatriloba* (L. f.) Raf.,*Salvia fruticosa* subsp. *cypria* (Unger & Kotschy) Holmboe, *Salvia fruticosa* subsp. *thomasii* (Lacaita) Brullo & al., *Salvia triloba* subsp. *calpeana* (Dautez & Debeaux) P. Silva, *Salvia triloba* subsp. *libanotica* (Boiss. & Gaill.) Holmboe, *Salvia triloba* var. *calpeana* Dautez & Debeaux

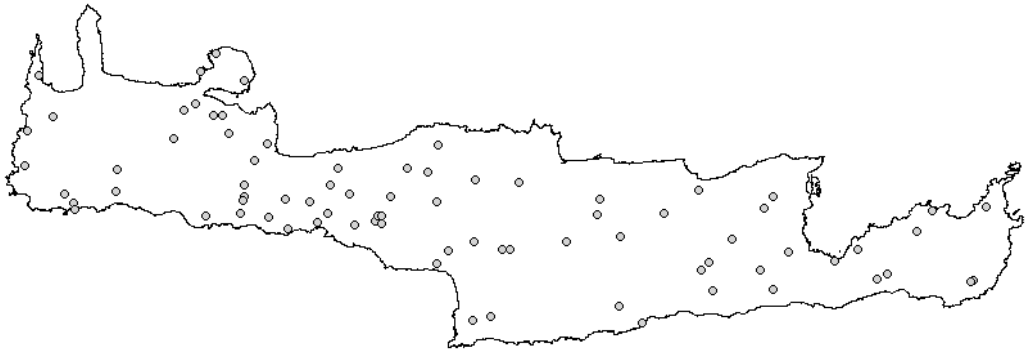
Amaracus dictamnus (L.) Benth., *Majorana dictamnus* (L.) Kostel., Heterotypic synonyms: *Amaracus tomentosus* Moench, *Origanum dictamnifolium* St.-Lag., *Origanum saxatile* Salisb.

Coridothymus capitatus (L.) Rchb. f., *Origanum capitatum* (L.) Kuntze, *Satureja capitata* L., *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. & Link

Πειραματικός σχεδιασμός και δειγματοληψίες

Ο πειραματικός σχεδιασμός περιελάμβανε αφενός την παραλαβή των αιθέριων ελαίων από το βιολογικό υλικό μέσω υδροαπόσταξης, εκτίμηση της απόδοσης του φυτικού υλικού σε αιθέριο έλαιο και αφετέρου την συγκριτική ανάλυση των αιθέριων ελαίων, με τη χρήση της αέριας χρωματογραφίας – φασματομετρίας μάζας (Gas Chromatorgraphy - Mass Spectrometry, GC-MS).

Οι δειγματοληψίες πεδίου (Εικόνα 1) πραγματοποιήθηκαν εντός του έτους 2016 και περιελάμβαναν συλλογή φυτικού υλικού των υπό μελέτη ειδών λίγο πριν την ανθοφορία από φυσικούς πληθυσμούς της Κρήτης.



Εικόνα 1 Θέσεις δειγματοληψίας φυτικού υλικού για τα τρία είδη που εξετάστηκαν.

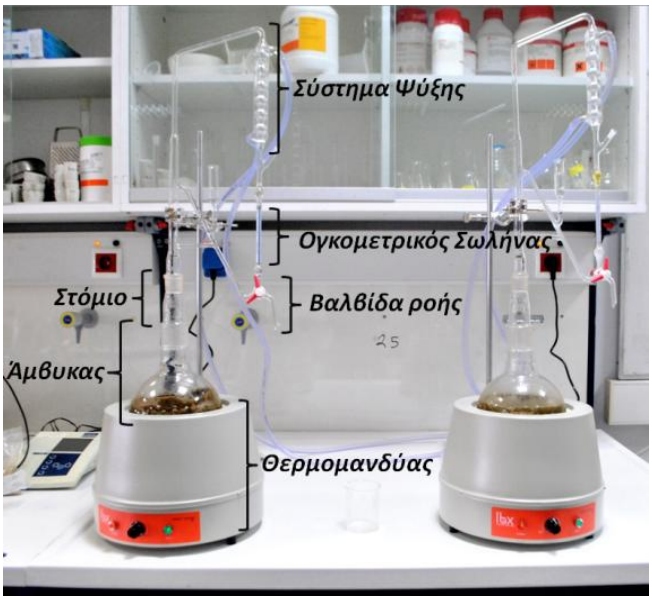
Για κάθε είδος πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες από 27 πληθυσμούς που είχαν καταγραφεί με γεωαναφορά ούτως ώστε να είναι δυνατή η μετέπειτα χωρική ανάλυση των δεδομένων. Οι θέσεις δειγματοληψίας για το σύνολο των ειδών παρουσιάζονται στο Σχήμα 2. Τη συλλογή του βιολογικού υλικού ακολουθούσε η ξήρανση του σε συνθήκες εργαστηρίου (air dry) απουσία φωτός για τουλάχιστον 10 ημέρες και κατόπιν αποθήκευση με χάρτινο περιτύλιγμα σε σκοτεινό χώρο έως τη στιγμή της απόσταξης.

Παραλαβή αιθέριου ελαίου

Η υδροαπόσταξη που χρησιμοποιήθηκε πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας (2014). Για τη διαδικασία της υδροαπόσταξης χρησιμοποιήθηκε αποξηραμένη δρόγη ποσότητας 100g εμβαπτισμένη σε 1lt απιονισμένου νερού (dH_2O), με σκοπό την απομόνωση του αιθέριου ελαίου και την καταγραφή της απόδοσης του φυτικού υλικού σε αιθέριο έλαιο (ml/100gDW). Την απομόνωση του αιθέριου ελαίου ακολουθούσε πλήρης αφυδάτωσησσ με τη χρήση άνυδρου θειικού νατρίου (Na_2SO_4) και αποθήκευση στους 4^oC μέχρι την χρησιμοποίησή του στην ανάλυση με την τεχνική της Αέριας Χρωματογραφίας – Φασματομερίας Μάζας (GC-MS).

Στην υδροαπόσταξη, το προς απόσταξη φυτικό υλικό τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη με νερό, που συνδέεται με ψυκτήρα και με θερμαντική συσκευή. Το χαρακτηριστικό της μεθόδου αυτής είναι ότι το νερό και το φυτικό υλικό βρίσκονται σε άμεση επαφή. Στην υδροαπόσταξη το προς απόσταξη φυτικό υλικό τοποθετείται στον άμβυκα αποστάξεως που περιέχει νερό. Το υλικό ανάλογα με το ειδικό του βάρος ή επιπλέει ή βρίσκεται βυθισμένο στο νερό. Με αυτόν τον τρόπο η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται σε υλικά όπως τρίμματα αμυγδάλων, ροδοπέταλα, άνθη πορτοκαλιάς. Άλλα υλικά που σχηματίζουν συμπαγείς μάζες δεν μπορούν να αποσταχθούν διότι δεν μπορεί να διεισδύσει ο ατμός.

Στη συνέχεια το υλικό θερμαίνεται με φωτιά ή με ατμό που κυκλοφορεί στα τοιχώματα του άμβυκα με ειδικές σωληνώσεις. Η ταχύτητα της απόσταξης ρυθμίζεται από την ένταση της θέρμανσης ή την ποσότητα των ατμών που κυκλοφορούν στα τοιχώματα και στις σωνηλώσεις του άμβυκα. Στην υδροαπόσταξη πρέπει να αποφεύγεται η υπερθέρμανση του φυτικού υλικού για να αποφεύγεται η θερμική διάσπαση των συστατικών των αιθέριων ελαίων. Τα πλεονεκτήματα που συγκεντρώνει η μέθοδος αυτή είναι η απλότητα, η ευχρηστότητα, το χαμηλό κόστος και η ευκολία μεταφοράς. Επίσης, είναι κατάλληλη για απόσταξη τεμαχισμένων ή λειοτριβημένων καρπών, ριζών ή άλλων υλικών, τα οποία είναι δύσκολα να αποσταχθούν με άλλο τρόπο. Τα σημαντικότερα μειονεκτήματα της τεχνικής είναι ο μεγάλος χρόνος απόσταξης και η σχετικά μικρή απόδοση σε αιθέρια έλαια.



Εικόνα 2 Οι τροποποιημένες συσκευές τύπου Clevenger& οι θερμομανδύες (πηγή θέρμανσης) Ibx HMO1 series 21

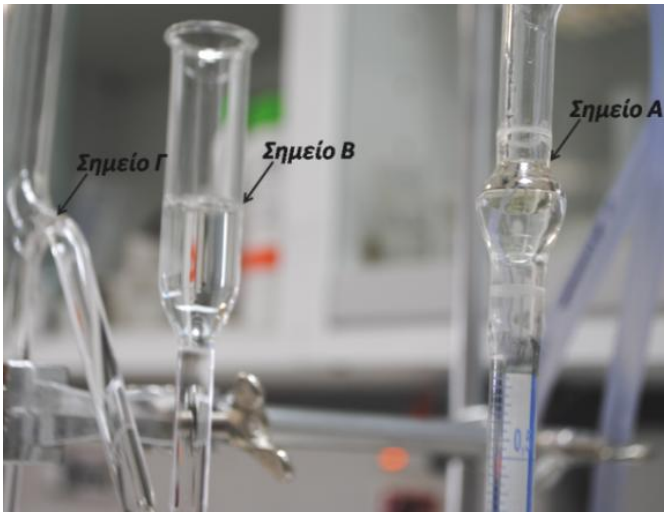
Οι αποστάξεις των αιθέριων ελαίων όλων των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν από το εργαστήριο Οικολογίας Φυτών & Διαχείρισης Χερσαίων Οικοσυστημάτων, (Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης) με τη μέθοδο της Υδροαπόσταξης (Hydrodistillation). Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν δύο

τροποποιημένες συσκευές τύπου Clevenger με πηγή θέρμανσης τους θεμομανδύες *Ibx (HMO 1 series 21),* όπως φαίνονται παρακάτω, στην Εικόνα 2.

Η κάθε συσκευή τύπου Clevenger αποτελείται από τα εξής μέρη: 1) τη βάση τοποθέτησης της δρόγης (άμβυκας), 2) τη στήλη ανόδου του αιθέριου ελαίου, το οποίο συμπαρασύρεται από τους υδρατμούς, 3) το σύστημα ψύξης, 4) τη στήλη συλλογής του αιθέριου ελαίου, 5) το σωλήνα ογκομέτρησης του αιθέριου ελαίου & 6) τη βαλβίδα ρύθμισης της ροής. Τέλος. ολόκληρη η διάταξη τοποθετείται πάνω στο θερμομανδύα, ο οποίος χρησιμοποιείται ως πηγή θέρμανσης κατά τη διαδικασία της απόσταξης ενώ το επάνω μέρος της συσκευής στηρίζεται σε ένα ρυθμιζόμενο βραχίονα.

Πιο αναλυτικά η διαδικασία της υδροαπόσταξης με τις τροποποιημένες συσκευές τύπου Clevenger που ακολουθήθηκε αποτελείται από τα εξής στάδια:

Αρχικά τοποθετείται στον άμβυκα η δρόγη (100g dw) και προστίθεται απιονισμένο νερό, dH_2O (1lt) με τέτοιο τρόπο ώστε να εμποτιστεί όλη η φυτική μάζα. Στη συνέχεια επανατοποθετείται ο άμβυκας και συναρμολογείται πλήρως η συσκευή. Προστίθεται απιονισμένο νερό από το σωλήνα πριν το δοχείο συλλογής του αιθέριου ελαίου μέχρι η στάθμη του νερού και στα τρία συγκοινωνούντα δοχεία να βρίσκεται στο ίδιο σημείο (Εικόνα 3). Με αυτόν τον τρόπο η υδροαπόσταξη που λαμβάνει χώρα είναι κλειστού τύπου, δηλαδή οι υδρατμοί που παράγονται, αφού συμπυκνωθούν από το σύστημα ψύξης επανεισάγονται μέσω των συγκοινωνούντων δοχείων στον άμβυκα.



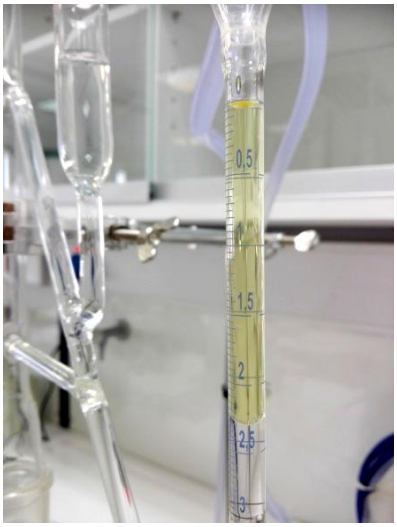
Εικόνα 3 Συγκοινωνούντα δοχεία με τη βοήθεια των οποίων πραγματοποιείται η υδροαπόσταξη κλειστού τύπου.

Το σύστημα ψύξης ξεκινά να λειτουργεί ταυτόχρονα με τη θέρμανση και παραμένει σε λειτουργία καθ' όλη τη διάρκεια της απόσταξης (2hr), με σκοπό τον περιορισμό των παραγόμενων παραπροϊόντων λόγω θέρμανσης. Μετά το πέρας των 2 ωρών που διαρκεί η απόσταξη, σταματάει η θέρμανση, με το σύστημα ψύξης σε λειτουργία για περίπου 30min επιπλέον, ώστε και τα τελευταία πτητικά συστατικά που θα βγουν να συμπυκνωθούν και να προστεθούν στο υπόλοιπο αιθέριο έλαιο.

Στη συνέχεια ογκομετρείται η ποσότητα (απόδοση) του αιθέριου ελαίου με τη βοήθεια του ογκομετρικού σωλήνα που βρίσκεται ενσωματωμένος στο τελικό δοχείο της συσκευής Clevenger (Εικόνα 4).

Να σημειωθεί ότι η απόδοση του εκάστοτε αιθέριου ελαίου σε αυτή την εργασία εκτιμάται σε ml ανά 100gr βάρους επί ξηρού (ml/100gr dw).

Κατόπιν το αιθέριο έλαιο φιλτράρεται με μικρή ποσότητα Sodium Sulfate Anhydrous (Na_2SO_4, SIGMA, United States Pharmacopeia, Reference Standard,), ώστε να αφαιρεθεί πλήρως η υγρασία από το αιθέριο έλαιο και ξεπλένεται με 2ml diethyl ether (60-29-7, 57648383 SIGMA).



Εικόνα 4 Ογκομέτρηση της ποσότητας (απόδοση) του αιθέριου ελαίου που παράχθηκε.

Τα αιθέρια έλαια που προκύπτουν τοποθετούνται σε σκουρόχρωμα υάλινα φιαλίδια (10ml ND20 Headspace Crimp Vial (amber), 46 x 22.5mm, rounded bottom, pk.100, BGB Analytik) τα οποία σφραγίζονται αεροστεγώς με πώματα τύπου Septum (ND20 Aluminum Crimp Cap (10mm hole) with Butyl/PTFE Septa , pk.100, BGB Analytik), με τη χρήση του χειροκίνητου μηχανήματος Crimper (Adjustable Manual Crimper, for 20mm Aluminum Caps) (Εικόνα 5) και διατηρούνται στους 4°C.

Εικόνα 5 Αριστερά: Τα σκουρόχρωμα υάλινα φιαλίδια (Headspace Vials), το χειροκίνητο μηχάνημα Crimper& τα πώματα τύπου Septum (Crimp Caps). Δεξιά: Τα αιθέρια έλαια τοποθετημένα στα αεροστεγώς σφραγισμένα φιαλίδια.

Εκτός από τη μέθοδο της υδροαπόσταξης (Hydrodistillation / Water Distillation) επίσης ευρέως χρησιμοποιούμενες μέθοδοι για την παραλαβή των αιθέριων ελαίων από δρόγη είναι η απόσταξη με νερό και υδρατμούς (Water & Steam Distillation) και η εκχύλιση (Extraction), οι οποίες περιγράφονται συνοπτικά παρακάτω:

<u>Απόσταξη με νερό και υδρατμούς</u> (Water & Steam distillation). Κατά την απόσταξη με νερό και υδρατμούς το νερό δεν έρχεται σε άμεση επαφή με το φυτικό υλικό. Το φυτικό υλικό τοποθετείται σε πλέγμα που βρίσκεται λίγο πιο ψηλά από την επιφάνεια του νερού (Εικόνα 6). Η απόσταξη πραγματοποιείται με τους ατμούς του νερού, γεγονός που αποτελεί και το πλεονέκτημα της μεθόδου. Ο ατμός που διέρχεται από το φυτικό υλικό συμπαρασύρει τα πτητικά αιθέρια έλαια, ενώ είναι κορεσμένος (σε υγρασία) και χαμηλής πίεσης. Με αυτόν τον τρόπο, δεν είναι ποτέ υπερθερμασμένος και το φυτικό υλικό δεν έρχεται ποτέ σε επαφή με το νερό που βράζει. Κύρια μειονεκτήματα αυτής της μεθόδου αναφέρονται η σχετικά μεγάλη διάρκεια απόσταξης και η μικρότερη απόδοση σε αιθέριο έλαιο σε σχέση με τη μέθοδο με υδρατμούς και γι αυτό το λόγο δεν επελέγη για την παρούσα εργασία.

Εικόνα 6 Συσκευή απόσταξης των αιθέριων ελαίων με νερό και υδρατμούς (water & steam distillation).

Εκχύλιση (Extraction). Η διαδικασία της εκχύλισης προτιμάται στην περίπτωση που με τη μέθοδο της απόσταξης προκαλούνται αλλοιώσεις σε ορισμένα συστατικά ή διάσπαση ορισμένων χημικών ομάδων των συστατικών, με αποτέλεσμα το αιθέριο έλαιο να παραλαμβάνεται με υποδεέστερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Η μέθοδος έγκειται στη διαβροχή του φυτικού υλικού, με τα κατάλληλα εκχυλιστικά μέσα (διαλύτες κλπ). Στη συνέχεια από το εκχυλισμένο υλικό, το αιθέριο έλαιο επανακτάται με διάφορους τρόπους συμβατούς με τη φύση και τη σταθερότητα των εμπεριεχόμενων συστατικών και αποτελεί την «κονκρέτα». Ο συγκεκριμένος τρόπος δεν επελέγη στην παρούσα εργασία λόγω του ότι δεν προέκυψε η ανάγκη με δεδομένη τη φύση των ουσιών που μας ενδιέφεραν.

Ποιοτική και Ποσοτική ανάλυση των αιθέριων ελαίων

Για την ποιοτική & ποσοτική ανάλυση των επιμέρους συστατικών των αιθέριων ελαίων χρησιμοποιήθηκε αέριος χρωματογράφος συζευγμένος με φασματογράφο μάζας της εταιρείας SHIMADZU. Ο αέριος χρωματογράφος (GC-17AVer 3, SHIMADZU) περιελάμβανε μια τριχοειδή άπολη στήλη (MEGA-5/ Series 13259) διαστάσεων 25mx 0.25mm και πάχους 0.25um. Ο φασματογράφος μάζας (GCMS-QP5050A, SHIMADZU) διέθετε ως μέθοδο παραγωγής ηλεκτρονίων τον ηλεκτρονιακό ιονισμό (E.I) ενέργειας 70 eV, ενώ ο αναλυτής μαζών ήταν τετράπολος. Το φέρον αέριο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το αδρανές αέριο ήλιο (1.0 mL/min). Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της θερμοπρογραμματιζόμενης χρωματογραφίας. Η θερμοκρασία της στήλης ήταν προγραμματισμένη από τους 50°C έως τους 280°C. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε το θερμικό πρόγραμμα («Phyto 2018»), που αναλύεται παρακάτω:

Η αρχική θερμοκρασία ήταν 50°C (5 min), η οποία αυξανόταν με ρυθμό 5°C/ min μέχρι τους 150°C (10 min) και εν συνεχεία με ρυθμό 5°C/ min έφτανε τους 280°C (20 min). Ο συνολικός χρόνος της ανάλυσης ήταν 81 min. Οι συνθήκες του χρωματογράφου ήταν οι ακόλουθες: θερμοκρασία εισαγωγής δείγματος 230°C (Injector Temp.) και θερμοκρασία ανίχνευσης 250°C (Interface Temp.).

Τέλος για την ανίχνευση των ουσιών χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον ορισμένες βάσεις δεδομένων, όπως η NIST21 (21.250 διαφορετικά συστατικά) NIST107 (107.866) και PMW_TOX2 (4.367).

Η αέρια χρωματογραφία (GC) είναι ευρέως εφαρμοσμένη τεχνική σε πολλούς κλάδους της επιστήμης και της τεχνολογίας. Για περισσότερο από μισό αιώνα, η GC διαδραματίζει θεμελιώδη ρόλο στον προσδιορισμό του συνόλου των συστατικών που αποτελούν ένα μείγμα καθώς και στον προσδιορισμό της αναλογίας τους (Stashenko & Martinez, 2014).

Ο συνδυασμός αέριας χρωματογραφίας - φασματομετρίας μαζών ή GC-MS είναι το όργανο αναφοράς για τον προσδιορισμό πολλών πτητικών-ημιπτητικών ενώσεων. Η εφαρμογή GC-MS χαρακτηρίζεται από απλότητα, αμεσότητα, πολύ μικρό κόστος και ευκολία σε σύγκριση με άλλες συζευγμένες χρωματογραφικές τεχνικές. Η τεχνική GC-MS βρίσκει εκτεταμένη εφαρμογή στην ανάλυση οργανικών ενώσεων: αιθέριων ελαίων, πετρελαιοειδών, ζιζανιοκτόνων, φαρμάκων, ναρκωτικών ουσιών και γενικότερα σε μια μεγάλη σειρά χημικών ενώσεων. Πολύ συχνά θεωρείται απαραίτητη η ανάλυση με GC-MS για την απόλυτη ταυτοποίηση μιας ένωσης σε άγνωστα δείγματα (τοξικολογική ανάλυση, μέτρηση ρύπων σε περιβαλλοντικά δείγματα, ανάλυση τροφίμων κλπ) (Κακλαμάνος, 2009).

Εικόνα 7 Ένα τυπικό μοντέλο GC-MS με την κεντρική κεφαλή, της εταιρείας Shimadzu(Chauhanetal., 2014).

Η αέρια χρωματογραφία - φασματομετρία μάζας (GC-MS) αποτελεί μια ενοποιημένη αναλυτική τεχνική που συνδυάζει τις ιδιότητες διαχωρισμού της αέριας-υγρής χρωματογραφίας με την ιδιότητα ανίχνευσης της φασματομετρίας μάζας με σκοπό την ταυτοποίηση των διαφόρων ουσιών εντός ενός δείγματος (Εικόνα 7). Το GC χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των πτητικών και θερμικά σταθερών υποκαταστατών σε ένα δείγμα ενώ το GC-MS κατακερματίζει την αναλυόμενη ουσία ώστε να γίνει ο προσδιορισμός της με βάση τη μάζα της (Chauhan, et al., 2014).

Συσχέτιση Γεωγραφικών και Βιοχημικών Αποστάσεων

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν οι αποκλίσεις στην περιεκτικότητα των δειγμάτων σε αιθέρια έλαια συσχετίζονται με τη γεωγραφική θέση και απόσταση των ατόμων, πραγματοποιήθηκαν έλεγχοι Mantel (Legendre & Legendre, 2012). Σε αυτούς τους ελέγχους συγκρίναμε δύο μήτρες αποστάσεων (distance matrices) για κάθε είδος. Η πρώτη αφορούσε τις γεωγραφικές αποστάσεις μεταξύ των σημείων δειγματοληψίας. Η δεύτερη μήτρα προέκυψε υπολογίζοντας τις αποστάσεις των δειγμάτων με βάση τις ποσότητες των ενώσεων.

Συσχέτιση Αιθέριων Ελαίων και μεταβλητών Περιβάλλοντος

Προκειμένου να εξεταστεί ο ρόλος του περιβάλλοντος στην περιεκτικότητα των τριών ειδών σε αιθέρια έλαια, αναπτύχθηκαν μοντέλα συσχέτισης περιβαλλοντικών παραμέτρων τόσο με τη συνολική απόδοση σε αιθέρια έλαια, όσο και με την ποσότητα συγκεκριμένων ενώσεων.

Τα περιβαλλοντικά δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν αφορούν τοπογραφικά, βιοκλιματικά και εδαφικά χαρακτηριστικά, καθώς και χαρακτηριστικά βλάστησης. Τα τοπογραφικά δεδομένα προέκυψαν από το ψηφιακό υψομετρικό μοντέλο STRM 90M DEM (http://www.cgiar-csi.org). Τα βιοκλιματικά δεδομένα προέκυψαν από επεξεργασία παγκόσμιων κλιματικών δεδομένων (Fick et al., 2017, http://www.worldclim.org). Τα εδαφικά δεδομένα προέρχονται από την Παγκόσμια Εναρμονισμένη Βάση Εδαφικών Δεδομένων (Harmonized World Soil Data Base, http://webarchive.iiasa.ac.at/Research/LUC/External-World-soil-database). Τέλος, τα δεδομένα που αφορούν τη βλάστηση προέκυψαν από τον δορυφόρο Terra της NASA (http://glcf.umd.edu). Μετά από τη συλλογή και επεξεργασία των πρωτογενών δεδομένων, διατηρήθηκαν μόνο εκείνες οι μεταβλητές που είχαν μεταξύ τους συσχέτιση κάτω από 0.6. Με αυτόν τον τρόπο προέκυψε ένα σύνολο από 12 περιβαλλοντικές μεταβλητές, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στα μοντέλα.

Για τη συσχέτιση της συνολικής απόδοσης με το περιβάλλον, αναπτύχθηκαν Γενικευμένα Γραμμικά Μοντέλα (Generalized Linear Models, GLMs), και συγκεκριμένα παλινδρόμηση κατανομής βήτα (beta regression, Ferrari & Cribari-Neto, 2004), για κάθε είδος ξεχωριστά. Ως εξαρτημένη μεταβλητή χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα που αφορούσαν τη συνολική απόδοση σε αιθέρια έλαια για τις 27 περιοχές συλλογής, ενώ ως προβλεπτικές μεταβλητές χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές των 12 περιβαλλοντικών μεταβλητών που αντιστοιχούσαν στις περιοχές συλλογής. Επιπλέον, για κάθε μία από τις 4 κυριότερες ενώσεις κάθε είδους, αναπτύχθηκαν επίσης μοντέλα, ακολουθώντας την ίδια μεθοδολογία.

Αποτελέσματα – Συζήτηση

Πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις σε αιθέρια έλαια των ειδών *S. fruticosa*, *O. dictamnus* και *T. capitata* από 27 διαφορετικές περιοχές της Κρήτης για το καθένα, τα αποτελέσματα των οποίων παρουσιάζονται παρακάτω. Αρχικά παρουσιάζεται το χημικό αποτύπωμα του εκάστοτε είδους στην Κρήτη και στη συνέχεια εμφανίζεται η χωρική διαφοροποίηση των αποδόσεων σε αιθέριο έλαιο καθώς και του χημικού αποτυπώματος σε επίπεδο νήσου.

Χημικό αποτύπωμα του είδους *S. fruticosa* στην Κρήτη

Το χημικό αποτύπωμα του είδους *S. fruticosa* στην Κρήτη παρουσιάζεται λεπτομερώς στον Πίνακα 3. Ανιχνεύθηκαν συνολικά 47 συστατικά στα αιθέρια έλαια του που αναλύθηκαν, τα οποία απομονώθηκαν από δείγματα συλλεγμένα από 27 διαφορετικές περιοχές της νήσου.

Τα οξυγονωμένα μονοτερπένια καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο ποσοστό (82.97% - 97.82%, επί του συνόλου) του αιθέριου ελαίου όλων των δειγμάτων του είδους *S. fruticosa*, στα οποία ανήκουν τα ανιχνευθέντα συστατικά: (E)-2-Octen-1-ol, Myrcene, δ-3-Carene, α-Terpinene, p-Cymene, 1,8-Cineole, γ-Terpinene, cis-Sabinenehydrate, Terpinolene, trans-Sabinenehydrate, α-Thujone, β-Thujone, Camphor, trans-Pinocamphenone, Borneol, cis-Ocimenol, cis-Pinocamphenone, Terpinene-4-ol, cis-Carveol, Linaloolacetate, Borneolacetate, trans-Sabinylacetate, δ-Terpinylacetate και Myrtenylacetate. Τα μονοτερπένια αποτελούν ποσοστό 1.89%-14.23%, στα δείγματα που αναλύθηκαν, με αντιπροσωπευτικές τις ουσίες: Tricyclene, a-Thujene, a-Pinene, Camphene, β-Pinene, (E)-2-Octen-1-ol, Myrcene, δ-3-Carene, α-Terpinene, p-Cymene, 1,8-Cineole, γ-Terpinene, cis-Sabinenehydrate και Terpinolene. Οι σεσκιτερπενικοί υδρογονάνθρακες καταγράφονται σε ποσοστό από 0.20% έως 6.78%, στο σύνολο των δειγμάτων, στους οποίους ανήκουν τα συστατικά: α-Copaene, α-Ylangene, β-Bourbounene, β-Cubebene, β-Caryophyellene, β-Cedrene, γ-Elemene, Aromandendrene, α-Hummulene, Alloaromadendrene, γ-Muurolene, γ-Curcumene και Germacrene-D. Τέλος τα οξυγονωμένα σεσκτερπένια αποτελούν το 0.04%-1.33% του αιθέριου ελαίου των δειγμάτων, στα οποία ανήκουν οι εξής ουσίες που καταγράφηκαν: Caryophylleneoxide, Viridiflorol και HumuleneepoxideII.

Κατά τη μελέτη των δειγμάτων που εξετάστηκαν εντοπίστηκαν τα εξής 17 συστατικά, τα οποία απαντούσαν σε όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν: a-Pinene, Camphene, β-Pinene, Myrcene, p-Cymene, 1,8-Cineole, α-Thujone , β-Thujone, Camphor, trans-Pinocamphenone, Borneol, cis-Pinocamphenone, Terpinene-4-ol, Borneolacetate, β-Caryophyellene, Caryophylleneoxide και Viridiflorol. Από αυτά το συστατικό 1,8-Cineole (ευκαλυπτόλη) είναι η κυρίαρχη ουσία του αιθέριου ελαίου σε όλες τις περιοχές που μελετήθηκαν. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται να συμφωνούν κατά μεγάλο ποσοστό με τα αντίστοιχα των (Cvetkovikjetal., 2015), κατά τη μελέτη τους για τη σύσταση του αιθέριου ελαίου του S. fruticosa των πληθυσμών της Βαλκανικής Χερσονήσου, όπου εντοπίζονται 13 συστατικά (α-Pinene, Camphene, β-Pinene, Myrcene, 1,8-Cineole, γ-terpinene, cis-Thujone, trans-Thujone, Camphor, Terpinene-4-ol, trans-(E)-Caryophyllene, Aromadendrene & α-Humulene) σε όλα τα δείγματά τους, με κύριο συστατικό, την ουσία 1,8-Cineole.

Με βάση τη μήτρα δεδομένων που εξήχθη από την ανάλυση των δειγμάτων που εξετάστηκαν παρατηρήθηκε ότι το αιθέριο έλαιο του είδους *S. fruticosa* παρουσιάζει έντονη μεταβλητότητα μεταξύ των 27 περιοχών της Κρήτης, τόσο στη σύστασή του όσο και στην περιεκτικότητα του ως προς τις 4 ουσίες (με ποσοστό >10% επί του συνόλου): 1,8-Cineole, Camphor, α-Thujone και β-Thujone. Το αιθέριο έλαιο από συγκεκριμένη περιοχή παρουσιάζει τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε 1,8-Cineole (84.47% επί του συνόλου του αιθέριου ελαίου), ενώ το αιθέριο έλαιο από άλλη περιοχή έχει τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε Camphor (22.64%). Επίσης η ουσία α-Thujone παρουσιάζεται να είναι σε μεγαλύτερο ποσοστό (7.98%) στο αιθέριο έλαιο διαφορετικής περιοχής και η β-Thujone στο δείγμα άλλης περιοχής στο αιθέριο έλαιο του οποίου καταλαμβάνει το 26.84%. Το άθροισμα των 4 αυτών κύριων συστατικών είναι μεγαλύτερο στο δείγμα μιας περιοχής το οποίο αποτελεί το 95.55% επί του συνολικού αιθέριου ελαίου.

Η εξαρτώμενη από τη γεωγραφική περιοχή μεταβλητότητα στη σύσταση και την περιεκτικότητα του αιθέριου ελαίου του *S.fruticosa*, που παρατηρούμε έχει αναφερθεί ξανά σε παλαιότερη εργασία στη βιβλιογραφία(Karousouetal., 1998).. Κατά την εργασία αυτή μελετήθηκε επίσης η περιεκτικότητα και η σύσταση του αιθέριου ελαίου των φυτών *Salvia fruticosa* που συλλέχθηκαν από 20 γεωγραφικές περιοχές

στο νησί της Κρήτης. Τα αποτελέσματα των αναλύσεών τους έδειξαν μια αισθητή διακύμανση στην απόδοση σε αιθέριο έλαιο (κυμαινόμενη από 1,1 έως 5,1%) και την ποσότητα των τεσσάρων βασικών συστατικών του ελαίου: 1,8-Cineole (22,7-64,2% του συνολικού ελαίου), α-Thujone (1,0-19,2%), β-Thujone (0,9-25,6%) και Camphor (0,8-30,3%). Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι το πρότυπο μεταβλητότητας της απόδοσης σε αιθέρια έλαια και της περιεκτικότητας στα τέσσερα βασικά συστατικά του αιθέριου ελαίου του φασκόμηλου σχετίζεται με τη γεωγραφική περιοχή, ακολουθώντας μια κατεύθυνση Δύση → Ανατολή. Τα φυτά που συλλέγονται στη Δυτική Κρήτη παρουσιάζουν χαμηλότερη απόδοση σε αιθέριο έλαιο και τα έλαιά τους χαρακτηρίζονται από την κυριαρχία του συστατικού 1,8-Cineole. Από την άλλη πλευρά, αυτά που συλλέγονται από περιοχές της Ανατολικής Κρήτης παρουσιάζουν υψηλότερες τιμές της απόδοσης σε αιθέρια έλαια και τα έλαιά τους, εκτός από το συστατικό 1,8-Cineole, είναι πλούσια επίσης σε α- και β-Thujone ή Camphor (Karousouetal., 1998). Οι διαφορές στη σύσταση του αιθέριου ελαίου του *S. fruticosa*, συλλεγμένου από τη δυτική και την ανατολική Κρήτη, ακολουθούνται και από μορφολογικές διαφορές των φυτών και θεωρείται ότι είναι αποτέλεσμα της απόκρισης σε διαφορετικές κλιματολογικές συνθήκες. Έχει παρατηρηθεί ότι σε πολλά ελληνικά είδη του γένους *Labiatae* η αύξηση του περιεχομένου τους σε αιθέρια έλαια συσχετίζεται με τις πιο ζεστές και άνυδρες περιοχές της χώρας (Souleles & Argyriadou, 1997).

Πίνακας 1 Το σύνολο των συστατικών (χημικό προφίλ) του αιθέριου ελαίου του φασκόμηλου που απομονώθηκαν από φυσικούς πληθυσμούς 27 περιοχών της Κρήτης. Ret. Time = Χρόνος κατακράτησης, R.I.b = Δείκτης κατακράτησης από (Adams 2007) και R.I.α = Πειραματικός δείκτης κατακράτησης

Salvia fruticosa					
No	Ret. Time	Chemical Compounds	Chemical formula	R.I.b	R.I.a
1	7.574	Tricyclene	$C_{10}H_{16}$	926	917
2	7.827	a-Thujene	$C_{10}H_{16}$	930	924
3	8.044	a-Pinene	$C_{10}H_{16}$	939	930
4	8.555	Camphene	$C_{10}H_{16}$	954	944
5	9.621	β-Pinene	$C_{10}H_{16}$	979	974
6	10.178	(E)-2-Octen-1-ol	$C_8H_{16}O$	986	991
7	10.270	Myrcene	$C_{10}H_{16}$	990	992
8	11.153	δ-3-Carene	$C_{10}H_{16}$	1002	1017
9	11.167	α-Terpinene	$C_{10}H_{16}$	1017	1018
10	11.558	p-Cymene	$C_{10}H_{14}$	1024	1029
11	11.860	1,8-Cineole	$C_{10}H_{18}O$	1031	1037
12	12.734	γ-Terpinene	$C_{10}H_{16}$	1059	1062
13	13.075	cis-Sabinene hydrate	$C_{10}H_{18}O$	1070	1071
14	13.822	Terpinolene	$C_{10}H_{16}$	1088	1092
15	14.250	trans-Sabinene hydrate	$C_{10}H_{18}O$	1098	1104
16	14.373	α-Thujone	$C_{10}H_{16}O$	1102	1108
17	14.724	β-Thujone	$C_{10}H_{16}O$	1114	1117
18	15.642	Camphor	$C_{10}H_{16}O$	1146	1143
19	16.166	trans-Pinocamphenone	$C_{10}H_{16}O$	1162	1158
20	16.361	Borneol	$C_{10}H_{18}O$	1169	1163
21	16.448	cis-Ocimenol	$C_{10}H_{18}O$	1174	1166
22	16.766	cis-Pinocamphenone	$C_{10}H_{16}O$	1175	1175
23	17.242	Terpinene-4-ol	$C_{10}H_{18}O$	1177	1188
24	17.406	cis-Carveol	$C_{10}H_{16}O$	1229	1193
25	19.197	Linalool acetate	$C_{12}H_{20}O_2$	1257	1259
26	20.088	Borneol acetate	$C_{12}H_{20}O_2$	1288	1289
27	20.331	trans-Sabinyl acetate	$C_{12}H_{18}O_2$	1290	1297
28	21.033	δ-Terpinyl acetate	$C_{12}H_{20}O_2$	1317	1320
29	21.334	Myrtenyl acetate	$C_{12}H_{18}O_2$	1326	1330
30	21.958	α-Terpinyl acetate	$C_{12}H_{20}O_2$	1333	1350
31	22.615	α-Cubebene	$C_{15}H_{24}$	1348	1405
32	22.698	α-Copaene	$C_{15}H_{24}$	1374	1407
33	22.721	α-Ylangene	$C_{15}H_{24}$	1375	1408
34	22.959	β-Bourbounene	$C_{15}H_{24}$	1388	1415
35	23.668	β-Cubebene	$C_{15}H_{24}$	1388	1435
36	23.918	β-Caryophyellene	$C_{15}H_{24}$	1419	1442
37	24.176	β-Cedrene	$C_{15}H_{24}$	1420	1449
38	24.366	γ-Elemene	$C_{15}H_{24}$	1436	1454
39	24.461	Aromandendrene	$C_{15}H_{24}$	1441	1457
40	24.848	α-Hummulene	$C_{15}H_{24}$	1454	1468
41	25.505	Alloaromadendrene	$C_{15}H_{24}$	1460	1486
42	25.513	γ-Muurolene	$C_{15}H_{24}$	1479	1486
43	26.674	γ-Curcumene	$C_{15}H_{22}$	1480	1519
44	26.900	Germacrene-D	$C_{15}H_{24}$	1485	1525
45	29.141	Caryophyllene oxide	$C_{15}H_{24}O$	1583	1588
46	29.548	Viridiflorol	$C_{15}H_{26}O$	1583	1599
47	30.280	Humulene epoxide II	$C_{15}H_{24}O$	1608	1620

Χημικό αποτύπωμα του *O. dictamnus* στην Κρήτη

Το χημικό αποτύπωμα του *O. dictamnus* στην Κρήτη παρουσιάζεται εκτενώς στον ***Πίνακα 4.*** Ανιχνεύθηκαν συνολικά 42 συστατικά στα 27 αιθέρια έλαια του δίκταμου που αναλύθηκαν, τα οποία απομονώθηκαν από δείγματα συλλεγμένα από 27 διαφορετικές περιοχές της Κρήτης.

Το αιθέριο έλαιο του δίκταμου από τις 27 διαφορετικές περιοχές της Κρήτης παρουσιάζει επίσης μεταβλητότητα ως προς το τερπενικό περιεχόμενο. Τα οξυγονωμένα μονοτερπένια καταλαμβάνουν επίσης το μεγαλύτερο ποσοστό (62.15% - 95.38%, επί του συνόλου) του αιθέριου ελαίου του δίκταμου όλων των δειγμάτων, στα οποία ανήκουν τα ανιχνευθέντα συστατικά: (E)-2-Octen-1-ol, Myrcene, δ-3-Carene, α-Terpinene, p-Cymene, 1,8-Cineole, γ-Terpinene, cis-Sabinenehydrate, Terpinolene, trans-Sabinenehydrate, α-Thujone, β-Thujone, Camphor, trans-Pinocamphenone, Borneol, cis-Ocimenol, cis-Pinocamphenone, Terpinene-4-ol, cis-Carveol, Linaloolacetate, Borneolacetate, trans-Sabinylacetate, δ-Terpinylacetate, Myrtenylacetate, και α-Terpinylacetate.

Τα μονοτερπένια αποτελούν ποσοστό 0.19% - 31.37% στα 27 αιθέρια έλαια του δίκταμου που αναλύθηκαν, με αντιπροσωπευτικές τις ουσίες: Tricyclene, a-Thujene, a-Pinene, Camphene, Sabinene, β-pinene, 1-Octen-3-ol, Myrcene, 3-Carene, α-Terpinene, p-Cymene, Sylvestrene, γ-Terpinene, cis-Sabinenehydrate και Terpinolene. Οι σεσκιτερπενικοί υδρογονάνθρακες καταγράφονται σε ποσοστό από 1.34% έως 4.76%, στο σύνολο των δειγμάτων, στους οποίους ανήκουν τα συστατικά: α-Cubebene, Copaene, β-Cubebene, β-Caryophyllene, α-Humulene, Germacrene-D, α-Muurolene, β-Bisabolene, Germacrene-A, γ-Cadinene, trans-Calamenene, δ-Cadinene και α-Cadinene, τα οποία ανιχνεύθηκαν στα 27 αιθέρια έλαια του δίκταμου. Τέλος τα οξυγονωμένα σεσκιτερπένια αποτελούν το 0.38%- 5.32% του αιθέριου ελαίου του δίκταμου των 27 δειγμάτων, στα οποία ανήκουν οι εξής ουσίες που καταγράφηκαν: Thymohydroquinone, Caryophylleneoxide, 1-epi-Cubenol, α-Muurolol και cis-14-nor-Muurol-5-en-4-one.

Τα συστατικά: Myrcene, p-Cymene, Borneol, Terpinene-4-ol, Thymol, Carvacrol, α-Cubebene, Copaene, α-Humulene, Caryophylleneoxide, εντοπίζονται στο αιθέριο έλαιο του δίκταμου όλων των δειγμάτων της παρούσας μελέτης. Η κύρια ουσία του αιθέριου ελαίου του δίκταμου είναι η Carvacrol (καρβακρόλη), η οποία ανιχνεύεται στα αιθέρια έλαια των συγκεκριμένων δειγμάτων σε υψηλό ποσοστό.

Συνεπώς βάση της παρούσης εργασίας φαίνεται ότι το αιθέριο έλαιο του δίκταμου χαρακτηρίζεται από τις ουσίες Carvacrol, p-Cymene και Thymoquinone, οι οποίες με αυτή τη σειρά ανιχνεύονται σε μεγάλα ποσοστά επί του συνόλου του ελαίου, στην πλειοψηφία των δειγμάτων. Το συμπέρασμα αυτό συνάδει με άλλες αντίστοιχες μελέτες στη βιβλιογραφία όπως αυτή των (Skoula, et. al., 1999), όμως ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι στη βιβλιογραφία σε ορισμένες περιπτώσεις όπως η εργασία των (Argyropoulouetal., 2014b) το αιθέριο έλαιο του δίκταμου μπορεί να αναφέρεται ότι χαρακτηρίζεται από τις ουσίες Carvacrol, p-Cymene και γ-Terpinene αντί της ουσίας Thymoquinone.

Οι παρατηρήσεις που εξάγονται από τις τιμές του συνόλου των συστατικών των 27 αιθέριων ελαίων του δίκταμου οδηγούν στο ότι τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε Carvacrol (84.37% επί του συνόλου του αιθέριου ελαίου) την εμφανίζει συγκεκριμένη περιοχή, ενώ τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα, σε p-Cymene (26.37%) άλλη περιοχή. Επίσης η ουσία Thymoquinone ανιχνεύεται σε μεγαλύτερο ποσοστό (37.25%) στο αιθέριο έλαιο συγκεκριμένης περιοχής και το συστατικό Thymol methyl ether στο δείγμα άλλης περιοχής, στο αιθέριο έλαιο του οποίου καταλαμβάνει το 15.08%. Το άθροισμα των 4 αυτών συστατικών είναι μεγαλύτερο σε δείγμα όπου αποτελεί το 94.31% επί του συνολικού αιθέριου ελαίου.

Βιβλιογραφικά αναφέρεται ότι στις περισσότερες περιπτώσεις, το συστατικό Carvacrol ανιχνεύεται ως το κύριο συστατικό των αιθέριων ελαίων του *O. dictamnus*, με το p-Cymene, το α-Terpinene και μερικές φορές τη Thymoquinone να ακολουθούν σε ποσότητες. Σε μία μόνο περίπτωση καλλιεργούμενου *O. dictamnus*, καταγράφηκε η Thymol (ισομερές της Carvacrol), ως κυρίαρχο συστατικό του αιθέριου ελαίου του, ενώ το συστατικό Carvacrol ήταν εντελώς απών. Μολαταύτα η σύνθεση των αιθέριων ελαίων του *O. dictamnus* μπορεί να διαφέρει μεταξύ διαφορετικών περιόδων συγκομιδής και μεταξύ διαφορετικών γεωγραφικών περιοχών (Liolios etal., 2010). Όμως, δεν έχει περιγραφεί μέχρι στιγμής κάποιο σαφές πρότυπο μεταβλητότητας της σύνθεσης του αιθέριου ελαίου του δίκταμου συναρτήσει της γεωγραφικής θέσης του πληθυσμού στην Κρήτη, όπως και στην παραπάνω περίπτωση για το είδος *S. fruticosa*.

Πίνακας 2 Το σύνολο των συστατικών (χημικό προφίλ) του αιθέριου ελαίου του δίκταμου που απομονώθηκαν από φυσικούς πληθυσμούς 27 περιοχών της Κρήτης. Ret. Time = Χρόνος κατακράτησης, R.I.b = Δείκτης κατακράτησης από (Adams 2007) και R.I.α = Πειραματικός δείκτης κατακράτησης

Origanum dictamnus					
No	**Ret. Time**	**Chemical Compounds**	**Chemical formula**	**R.I.b**	**R.I.a**
1	7.560	Tricyclene	$C_{10}H_{16}$	926	916
2	7.813	a-Thujene	$C_{10}H_{16}$	930	924
3	8.007	a-Pinene	$C_{10}H_{16}$	939	929
4	8.532	Camphene	$C_{10}H_{16}$	954	944
5	9.512	Sabinene	$C_{10}H_{16}$	975	971
6	9.567	β-pinene	$C_{10}H_{16}$	979	973
7	10.101	1-Octen-3-ol	$C_8H_{16}O$	979	989
8	10.263	Myrcene	$C_{10}H_{16}$	990	992
9	10.851	3-Carene	$C_{10}H_{16}$	1002	1009
10	11.124	α-Terpinene	$C_{10}H_{16}$	1017	1016
11	11.572	p-Cymene	$C_{10}H_{14}$	1024	1029
12	11.632	Sylvestrene	$C_{10}H_{16}$	1030	1031
13	12.679	γ-Terpinene	$C_{10}H_{16}$	1059	1060
14	12.993	cis-Sabinene hydrate	$C_{10}H_{18}O$	1070	1069
15	13.802	Terpinolene	$C_{10}H_{16}$	1088	1092
16	14.131	trans-Sabinene hydrate	$C_{10}H_{18}O$	1095	1101
17	14.284	Linalool	$C_{10}H_{18}O$	1096	1105
18	16.407	Borneol	$C_{10}H_{18}O$	1169	1165
19	16.761	Terpinene-4-ol	$C_{10}H_{18}O$	1177	1175
20	17.427	α-Terpineol	$C_{10}H_{18}O$	1188	1193
21	18.800	Thymol. methyl ether	$C_{11}H_{16}O$	1235	1243
22	19.230	Thymoquinone	C10H12O2	1252	1244
23	20.531	Thymol	$C_{10}H_{14}O$	1290	1280
24	21.004	Carvacrol	$C_{10}H_{14}O$	1299	1294
25	21.932	α-Cubebene	$C_{15}H_{24}$	1348	1386
26	22.696	Copaene	$C_{15}H_{24}$	1374	1407
27	23.091	β-Cubebene	$C_{15}H_{24}$	1388	1418
28	23.915	β-Caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	1419	1441
29	24.854	α-Humulene	$C_{15}H_{24}$	1454	1468
30	25.108	Germacrene-D	$C_{15}H_{24}$	1485	1475
31	26.066	α-Muurolene	$C_{15}H_{24}$	1500	1502
32	26.418	β-Bisabolene	$C_{15}H_{24}$	1505	1512
33	26.518	Germacrene-A	$C_{15}H_{24}$	1509	1514
34	26.701	γ-Cadinene	$C_{15}H_{24}$	1513	1519
35	26.885	trans-Calamenene	$C_{15}H_{22}$	1522	1525
36	27.387	δ-Cadinene	$C_{15}H_{24}$	1523	1539
37	27.983	α-Cadinene	$C_{15}H_{24}$	1538	1555
38	28.404	Thymohydroquinone	$C_{12}H_{18}O2$	1555	1567
39	29.145	Caryophyllene oxide	$C_{15}H_{24}O$	1583	1588
40	30.461	1-epi-Cubenol	$C_{15}H_{26}O$	1628	1625
41	32.443	α-Muurolol	$C_{15}H_{26}O$	1646	1680
42	34.457	cis-14-nor-Muurol-5-en-4-one	$C_{14}H_{22}O$	1689	1737

Χημικό αποτύπωμα του είδους *T. capitata* στην Κρήτη

Το χημικό αποτύπωμα του είδους *T. capitata* στην Κρήτη παρουσιάζεται στον παρακάτω ***Πίνακα 5***. Ανιχνεύθηκαν συνολικά 26 συστατικά στα 27 αιθέρια έλαια που αναλύθηκαν, τα οποία απομονώθηκαν από δείγματα συλλεγμένα από 27 διαφορετικές περιοχές της νήσου.

Επίσης τα ποσοστά του τερπενικού περιεχομένου στο αιθέριο έλαιο του είδους *T. capitata* των 27 διαφορετικών περιοχών της Κρήτης διαμορφώνονται ως εξής. Τα οξυγονωμένα μονοτερπένια καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο ποσοστό (59.19% - 88.64%, επί του συνόλου) του αιθέριου ελαίου όλων των δειγμάτων, στα οποία ανήκουν τα ανιχνευθέντα συστατικά: 1-Octen-3-ol, Myrcene, α-Phelladrene, δ-3-Carene, α-Terpinene, p-Cymene, Limonene, γ-Terpinene, Terpinolene, Linalool, Borneol, Terpinene-4-ol, α-Terpineol, Thymolmethylether, Carvacrolmethylether, Thymol και Carvacrol. Τα μονοτερπένια αποτελούν ποσοστό 6.08% - 39.59%, στα 27 αιθέρια έλαια που αναλύθηκαν, με αντιπροσωπευτικές τις ουσίες: Tricyclene, α-Thujene, α-Pinene, Camphene, β-Pinene, 1-Octen-3-ol, Myrcene, α-Phelladrene, δ-3-Carene, α-Terpinene, p-Cymene, Limonene, γ-Terpinene και Terpinolene. Οι σεσκιτερπενικοί υδρογονάνθρακες καταγράφονται σε ποσοστό από 0.78% έως 4.22%, στο σύνολο των δειγμάτων, στους οποίους ανήκουν τα συστατικά: β-Caryophyllene, α-Humulene και Germacrene-D, τα οποία ανιχνεύθηκαν στα 27 αιθέρια έλαια του είδους στην Κρήτη. Τέλος, τα οξυγονωμένα σεσκτερπένια αποτελούν το 0.35% - 3.84% του αιθέριου ελαίου των δειγμάτων που εξετάστηκανμε μοναδικό συστατικό που ανιχνεύθηκε και ανήκει σε αυτή την τερπενική ομάδα το Caryophylleneoxide.

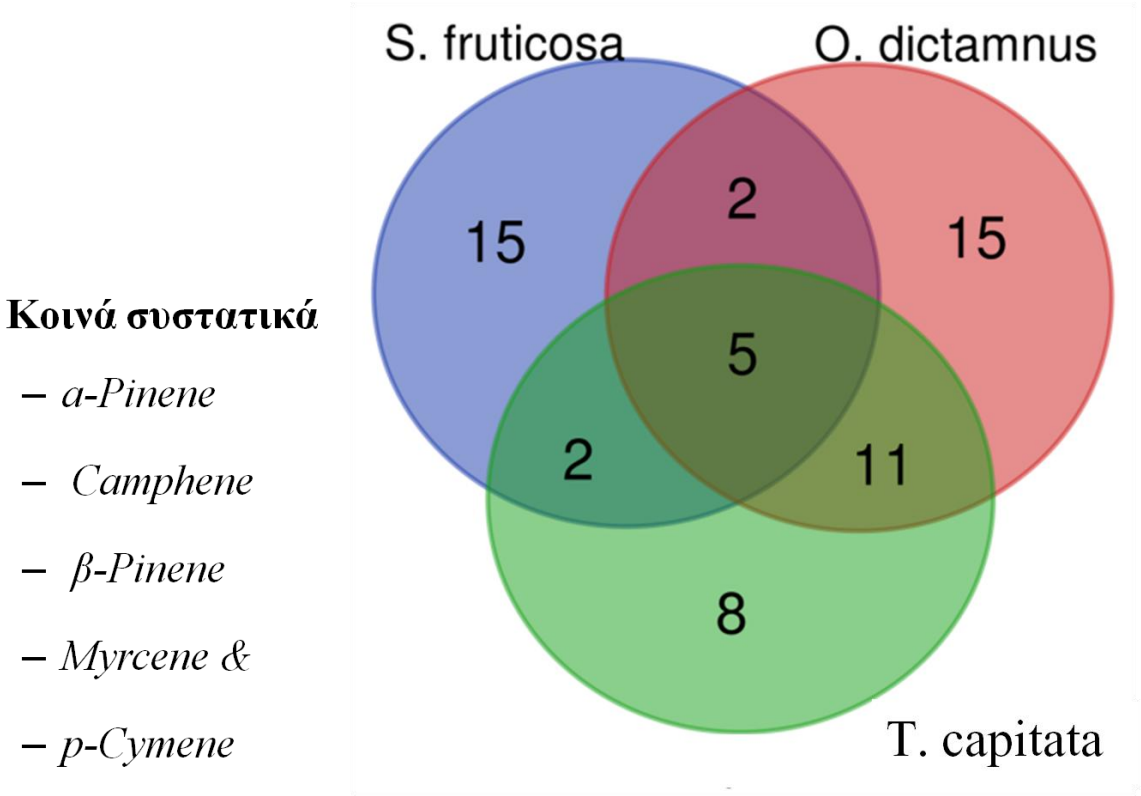
Στο αιθέριο έλαιο όλων των δειγμάτων του είδους ανιχνεύθηκαν οι ουσίες: Myrcene, p-Cymene, Limonene, γ-Terpinene, Linalool, Borneol, Terpinene-4-ol, α-Terpineol, Thymol, Carvacrol, β-Caryophyllene, α-Humulene και Caryophylleneoxide. Όπως και στο δίκταμο, η κυρίαρχη ουσία, με το μεγαλύτερο ποσοστό σε όλα τα αιθέρια έλαια που αναλύθηκαν είναι επίσης, η Carvacrol. Η ουσία Thymol ανιχνεύεται επίσης σε υψηλό ποσοστό στο αιθέριο έλαιο του είδους στο 50% των δειγμάτων. Το άθροισμα των φαινολικών συστατικών (Carvacrol και Thymol) μεταβάλλεται με τιμές από 54.15% έως 86.87%, ενώ το άθροισμα των πρόδρομων μορίων τους (p-Cymene και γ-Terpinene) από 0.11% έως 31.53%. Οι παραπάνω τέσσερις ουσίες (Carvacrol, Thymol, p-Cymene και γ-Terpinene) είναι αυτές οι οποίες χαρακτηρίζουν το αιθέριο έλαιο του είδους *T.capitata* στην Ελλάδα όπως αναφέρεται και βιβλιογραφικά από πολυπληθείς μελέτες (Goren et al., 2003).

Ιδιαίτερα αξιοσημείωτη σε αυτή τη μελέτη είναι η παρατήρηση ότι τα ποσοστά των συστατικών Carvacrol και Thymol, στο αιθέριο έλαιο καθενός από τα δείγματα που αναλύθηκαν φαίνεται ότι επηρεάζονται ταυτόχρονα όντας συμπληρωματικά, καθώς όταν το ένα από τα δύο μειώνεται δραστικά αυξάνεται σημαντικά το άλλο και αντιστρόφως. Επιπλέον αποκλειστικά στο αιθέριο έλαιο συγκεκριμένης περιοχής καταγράφεται ίση περιεκτικότητα σε Carvacrol και Thymol (33.54% και 33.48%, αντίστοιχα). Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται στο σύνολο των αιθέριων ελαίων του είδους, που αναλύθηκαν από τις 27 διαφορετικές περιοχές της Κρήτης. Η ίδια παρατήρηση αναφέρεται και στη μελέτη των (Karousou et al., 2005), συνδέοντας τη μεταβλητότητα της σύστασης του αιθέριου ελαίου του *T. Capitata* με τη γεωγραφική περιοχή στο νησί της Κρήτης, αλλά και με το είδος του φυσικού οικοτόπου στον οποίο αναπτύσσεται το φυτό. Πιο συγκεκριμένα συμπέραναν ότι υψηλό περιεχόμενο σε Carvacrol συνδέεται με το ξηρό περιβάλλον της πεδιάδος, η οποία χαρακτηρίζεται από φρυγανικά συστήματα βλάστησης, ενώ υψηλή περιεκτικότητα σε Thymol στους πιο ορεινούς όγκους, με δασικά συστήματα. Μάλιστα προτείνουν ότι αυτή η σχέση μεταξύ της σύστασης του αιθέριου ελαίου και του φυσικού ενδιαιτήματος ανάπτυξης των φυτών *T. capitata* υποδηλώνει τη χρήση του φυσικού οικοτόπου ως εργαλείο για την εκτίμηση και την πρόβλεψη της ποιοτικής μεταβλητότητας του αιθέριου ελαίου του στην περιοχή της Κρήτης. Το αιθέριο έλαιο από διαφορετική περιοχή παρουσιάζει τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε Carvacrol (68.87% επί του συνόλου του αιθέριου ελαίου), ενώ το αιθέριο έλαιο από άλλη περιοχή έχει τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε Thymol (53.58%). Επίσης η ουσία p-Cymene παρουσιάζεται να είναι σε μεγαλύτερο ποσοστό (24.39%) στο αιθέριο έλαιο συγκεκριμένης περιοχής και το γ-Terpnene ανιχνεύεται σε μέγιστο ποσοστό (10.37%) στο αιθέριο έλαιο του δείγματος διαφορετικής περιοχής. Το άθροισμα των τεσσάρων αυτών συστατικών είναι μεγαλύτερο σε δείγμα το οποίο αποτελεί το 93.90% επί του συνολικού αιθέριου ελαίου.

Πίνακας 3 Το σύνολο των συστατικών (χημικό προφίλ) του αιθέριου ελαίου του θυμαριού που απομονώθηκαν από φυσικούς πληθυσμούς 27 περιοχών της Κρήτη. Ret. Time = Χρόνος κατακράτησης, R.I.b = Δείκτης κατακράτησης από (Adams 2007) και R.I.α = Πειραματικός δείκτης κατακράτησης.

Coridothymus capitatus					
No	**Ret. Time**	**Chemical Compounds**	**Chemical formula**	**R.I.b**	**R.I.a**
1	7.582	Tricyclene	$C_{10}H_{16}$	926	917
2	7.834	α-Thujene	$C_{10}H_{16}$	930	924
3	8.035	α-Pinene	$C_{10}H_{16}$	939	930
4	8.558	Camphene	$C_{10}H_{16}$	954	944
5	9.610	β-Pinene	$C_{10}H_{16}$	979	974
6	10.208	1-Octen-3-ol	$C_8H_{16}O$	979	992
7	10.272	Myrcene	$C_{10}H_{16}$	990	993
8	10.688	α-Phelladrene	$C_{10}H_{16}$	1002	1004
9	10.875	δ-3-Carene	$C_{10}H_{16}$	1002	1009
10	11.145	α-Terpinene	$C_{10}H_{16}$	1017	1017
11	11.564	p-Cymene	$C_{10}H_{14}$	1024	1029
12	11.632	Limonene	$C_{10}H_{16}$	1029	1031
13	12.701	γ-Terpinene	$C_{10}H_{16}$	1059	1061
14	13.836	Terpinolene	$C_{10}H_{16}$	1088	1093
15	14.320	Linalool	$C_{10}H_{18}O$	1096	1106
16	16.398	Borneol	$C_{10}H_{18}O$	1169	1164
17	16.795	Terpinene-4-ol	$C_{10}H_{18}O$	1177	1176
18	17.495	α-Terpineol	$C_{10}H_{18}O$	1188	1195
19	18.633	Thymol methyl ether	$C_{11}H_{16}O$	1235	1238
20	18.875	Carvacrol methyl ether	$C_{11}H_{16}O$	1244	1245
21	20.621	Thymol	$C_{10}H_{14}O$	1290	1283
22	20.888	Carvacrol	$C_{10}H_{14}O$	1299	1290
23	23.942	β-Caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	1419	1442
24	24.881	α-Humulene	$C_{15}H_{24}$	1454	1468
25	25.491	Germacrene-D	$C_{15}H_{24}$	1485	1486
26	29.170	Caryophyllene oxide	$C_{15}H_{24}O$	1583	1589

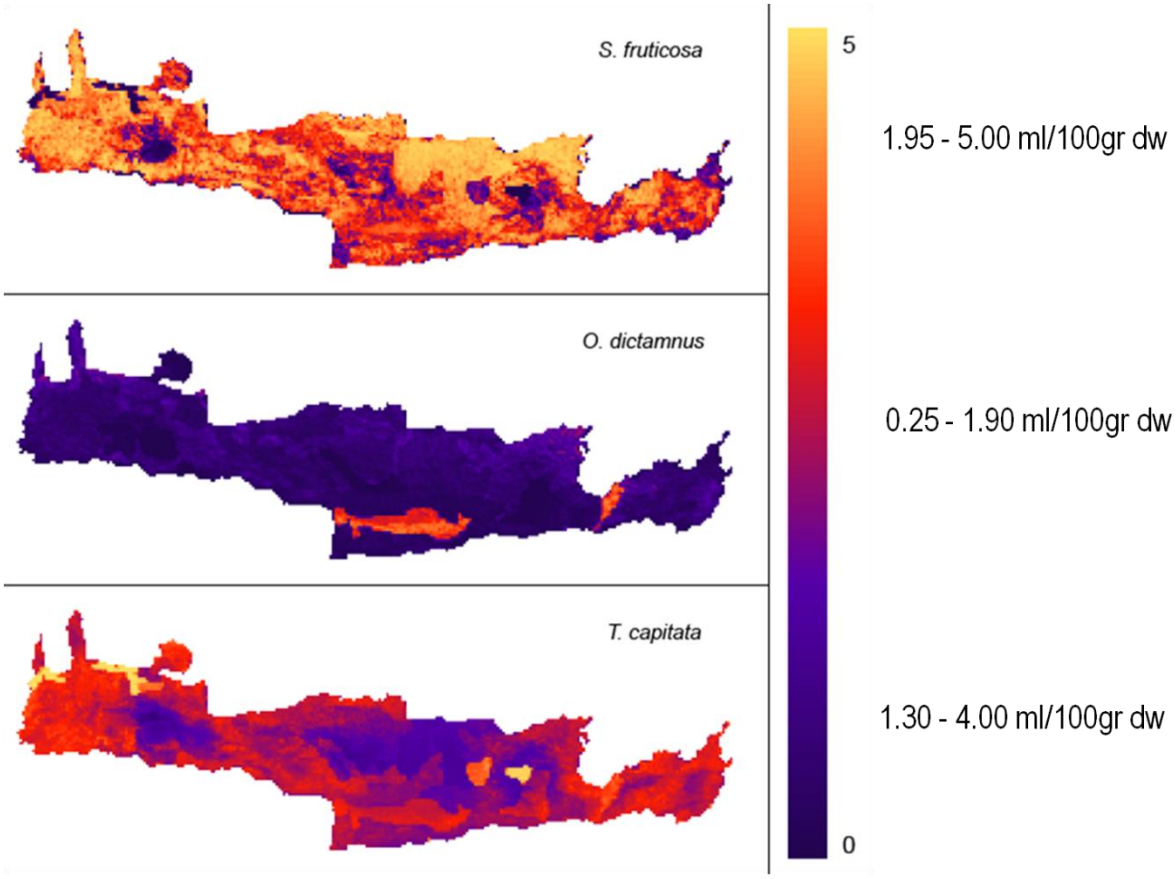
Συμπληρωματικότητα και συνέργια



Εικόνα 8 Συμπληρωματικότητα και συνέργεια των αιθέριων ελαίων των ειδών *S. fruticosa*, *O. dictamnus* και *T. capitata* συλλεγμένα από 27 περιοχές της Κρήτης

Στο παραπάνω Venn διάγραμμα εξετάστηκε το προφίλ των τριών αιθέριων ελαίων (Εικόνα 8) από τις 27 περιοχές της Κρήτης από άποψη αλληλεπικάλυψης βιοδραστικών ουσιών (overlap). Από τη σύγκρισή τους εντοπίστηκαν κάποια συστατικά, τα οποία ταυτίζονται, τα συγκεκριμένα 5 κοινά συστατικά ήταν τα εξής: a-Pinene, Camphene, β-Pinene, Myrcene και p-Cymene καθώς και αρκετά άλλα συστατικά, τα οποία είτε αλληλεπικαλύπτονται είτε αλληλοσυμπληρώνονται ως προς τη δραστικότητα τους. Το γεγονός αυτό είναι ιδιαίτερης φαρμακευτικής σημασίας καθώς με τον κατάλληλο συνδυασμό των επιμέρους αναλογιών μπορεί να διασφαλίσει κανείς συμπληρωματικότητα ως προς τα συστατικά και αν αυτή η συμπληρωματικότητα σχετιστεί με συνεργική δράση να επιτευχθεί κάποια επιθυμητή βιολογική δραστικότητα. Ενδεικτικό παράδειγμα συνεργικής δράσης που συνδυάζεται με συμπληρωματικότητα στα παραπάνω δεδομένα είναι ο συνδυασμός Carvacrol – 1,8-Cineole που έχει αναφερθεί από τους Honórioetal. (2015) στην αντιμετώπιση του *Staphylococcus aureus*.

Χωρική μεταβλητότητα της απόδοσης σε αιθέριο έλαιο



Εικόνα 9 Χωρική μεταβλητότητα της απόδοσης σε αιθέριο έλαιο των ειδών *Salvia fruticosa*, *Origanum dictamnus* και *Thymbra capitata* σε επίπεδο Κρήτης.

Όσον αφορά τις μετρήσεις των αποδόσεων σε αιθέριο έλαιο που πραγματοποιήθηκαν για τα είδη *S. fruticosa, O. dictamnus* και *T. capitata* στα δείγματα των 27 περιοχών, οι αποδόσεις των αιθέριων ελαίων του είδους *S. fruticosa* καταγράφηκαν από 1.95 ml/100gr έως 5.00 ml/100grβάρος επι ξηρού (dw), ενώ οι αποδόσεις των αιθέριων ελαίων στα δείγματα του είδους *O. dictamnus* και *T. capitata* κυμαίνονται από 0.25 ml/100grdw έως 1.90 ml/100grdw και 1.30 εώς 4.00 ml ανά 100gr dw, αντίστοιχα.

Η χωρική μεταβλητότητα αυτής της παραμέτρου, δηλαδή της απόδοσης σε αιθέριο έλαιο των ειδών *Salvia fruticosa*, *Origanum dictamnus* και *Thymbracapitata* σε επίπεδο Κρήτης παρουσιάζεται στην Εικόνα 9. Τα παραπάνω αποτελέσματα προέκυψαν από τις μετρηθείσες αποδόσεις σε αιθέριο έλαιο σε συνδυασμό με επίγειες και δορυφορικές μετρήσεις περιβαλλοντικών παραμέτρων που παρουσιάζονται στον Πίνακα Χ και τη χρήση Γενικευμένων Γραμμικών Μοντέλων.

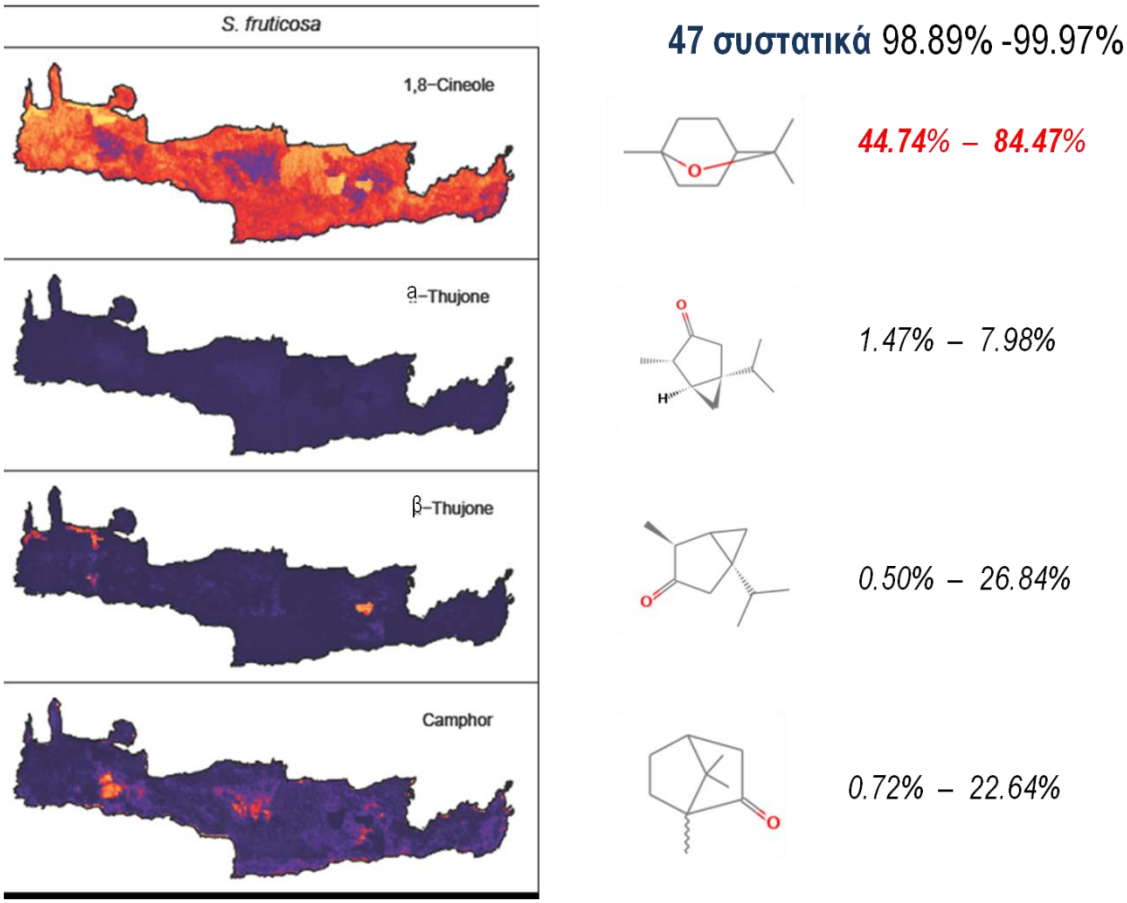
Από τη σύγκριση των ειδών ως προς τις αποδόσεις σε αιθέριο έλαιο προκύπτει εμφανώς μια διαβάθμιση από το είδος *O. dictamnus* στο είδος *T. capitata* και στο είδος *S. fruticosa* που αντιστοιχεί σε διαβάθμιση από χαμηλές προς υψηλές αποδόσεις παραγωγής αιθέριου ελαίου ανά μονάδα ξηρής βιομάζας. Όμως, παρόλο που το είδος *S. fruticosa* φαίνεται να έχει μεγάλη απόδοση σε αιθέριο έλαιο στο μεγαλύτερο τμήμα του νησιού της Κρήτης, εμφανίζει σαφώς χωρικές διαφοροποιήσεις με περιοχές όπου προβλέπονται πολύ χαμηλές αποδόσεις. Σύμφωνα με το παραπάνω μοντέλο πρόβλεψης, η απόδοση σε αιθέριο έλαιο του *S. fruticosa* στο νησί της Κρήτης αναμένεται να παρουσιάζει υψηλές τιμές στην περίπτωση που το είδος αυτοφύεται σε πεδινές περιοχές, ενώ χαμηλές τιμές να καταγράφονται όταν το είδος αυτοφύεται σε ορεινά οικοσυστήματα. Αντίθετα το είδος *O. dictamnus* φαίνεται ότι έχει πολύ περιορισμένη χωρική κατανομή ως προς την αναμενόμενη υψηλή απόδοση σε αιθέριο έλαιο σε δύο συγκεκριμένες περιοχές στο νησί της Κρήτης. Τέλος το είδος *T. capitata* παρουσιάζει μεγάλη χωρική κατανομή στην οποία αναμένονται μεγάλες αποδόσεις όμως υπάρχουν και αρκετά μεγάλες εκτάσεις στις οποίες η απόδοσή του φυτού σε αιθέριο έλαιο είναι ελάχιστη. Οι πληροφορίες αυτές των μοντέλων σχετικά με την απόδοση των αιθέριων ελαίων είναι βαρύνουσας σημασίας, καθώς γίνεται αντιληπτή η

σημασία της γεωγραφικής περιοχής συγκομιδής ή καλλιέργειας των παραπάνω αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών με σκοπό την μέγιστη απόδοση σε αιθέριο έλαιο.

Πίνακας 4 Σύνοψη των 12 περιβαλλοντικών μεταβλητών που επιλέχθηκαν για χρήση στα γενικευμένα γραμμικά μοντέλα.

Μεταβλητή	Τύπος	Περιγραφή
bio2	βιοκλιματική	Μέσο ημερήσιο θερμοκρασιακό εύρος
bio15	βιοκλιματική	Εποχικότητα κατακρημνισμάτων
east	τοπογραφική	Ανατολική συνιστώσα προσανατολισμού του εδάφους
herbs	κάλυψης	Ποσοστό εδαφικής κάλυψης από ποώδη βλάστηση
north	τοπογραφική	Βόρεια συνιστώσα προσανατολισμού του εδάφους
s_AWC	εδαφική	Χωρητικότητα κατακράτησης νερού του εδάφους
s_IL	εδαφική	Αδιαπέραστο στρώμα εδάφους
s_TOC	εδαφική	Ποσοστό οργανικού άνθρακα
s_TpH	εδαφική	pH ανώτερου εδαφικού τμήματος
s_TSOD	εδαφική	Περιεκτικότητα του ανώτερου εδαφικού τμήματος σε Na^+
slope	τοπογραφική	Κλίση του εδάφους
trees	κάλυψης	Ποσοστό εδαφικής κάλυψης από δενδρώδη βλάστηση

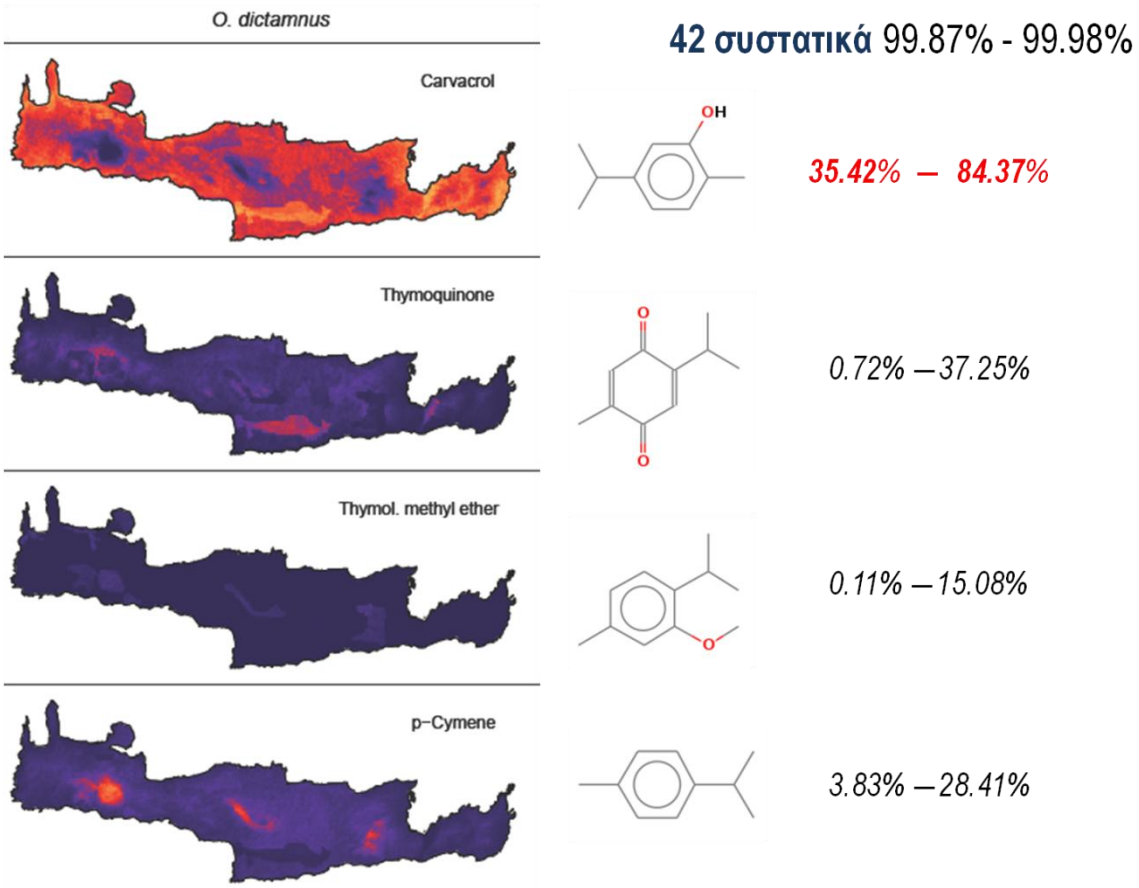
Χωρική μεταβλητότητα της περιεκτικότητας του αιθέριου ελαίου σε επιμέρους συστατικά



Εικόνα 10 Χωρική μεταβλητότητα της περιεκτικότητας του αιθέριου ελαίου του είδους *S. fruticosa* στα κυρίαρχα συστατικά.

Τα 47 συστατικά που ανιχνεύθηκαν στο αιθέριο έλαιο του *S. fruticosa* αποτελούν ποσοστό 98.89% έως 99.97% επί της συνολικής ποσότητας του αιθέριου ελαίου του ανά περιοχή μελέτης. Το συστατικό 1,8-Cineole (ευκαλυπτόλη) είναι η κυρίαρχη ουσία σε όλες τις περιοχές που μελετήθηκαν και κυμαίνεται από 44.74% έως 84.47%. Το συστατικό Camphor (καμφορά) ανιχνεύεται σε ποσοστά από 0.72% έως 22.64% στο αιθέριο έλαιο της πλειοψηφίας των δειγμάτων της συγκεκριμένης μελέτης. Όπως επίσης και οι ουσίες α-Thujone και β-Thujone με ποσοστά 1.47% – 7.98% και 0.50% – 26.84%, αντίστοιχα.

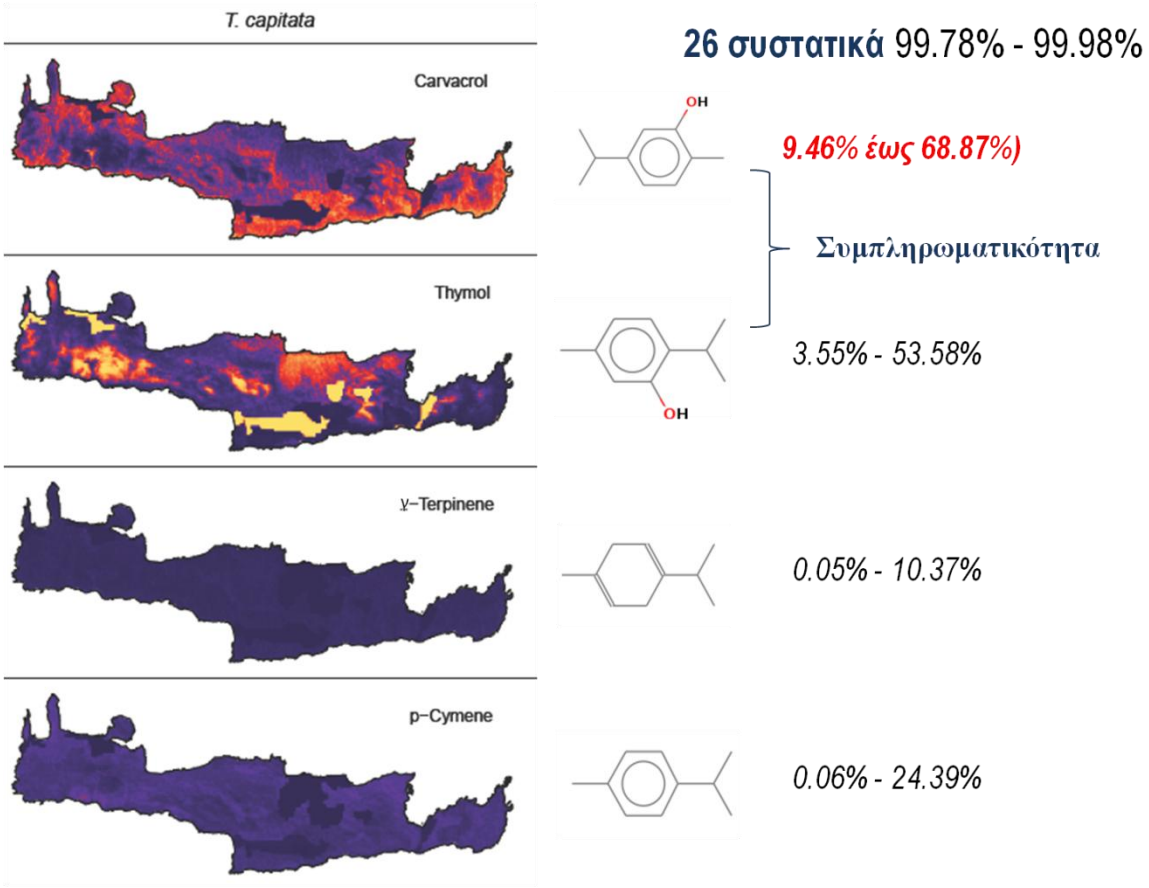
Στους χάρτες της Εικόνας 10 αποτυπώνεται επίσης με βάση τα Γενικευμένα Γραμμικά Μοντέλα μοντέλα πρόβλεψης η αναμενόμενη αφθονία για κάθε μία από τις κυρίαρχες ουσίες του αιθέριου ελαίου του είδους *S. fruticosa*. Η ουσία 1,8-Cineol αναμένεται να βρίσκεται σε αφθονία στο αιθέριο έλαιο των φυτών στο μεγαλύτερο μέρος της Κρήτης εκτός των ορεινών εκτάσεων. Αντίθετα το συστατικό Camphor αναμένεται να παρουσιάζει υψηλές τιμές στο αιθέριο έλαιο φυτών του είδους, τα οποία συλλέγονται από τα ορεινά και πολύ χαμηλές τιμές σε όλες τις υπόλοιπες περιοχές του νησιού. Όσον αφορά τα συστατικά α-Thujone και β-Thujone λόγω των χαμηλών μετρήσεων που καταγράφηκαν στα συγκεκριμένα δείγματα, καθώς και των χαρακτηριστικών του μοντέλου πρόβλεψης που χρησιμοποιήθηκε η προβλεπόμενη περιεκτικότητα των αιθέριων ελαίων στις συγκεκριμένες ουσίες δεν εμφανίζει πολύ υψηλή χωρική διαφοροποίηση. Συνεπώς θα δοκιμαστεί σε μελλοντική ανάλυση η εξαγωγή των συγκεκριμένων κατανομών με τη χρήση διαφορετικού μοντέλου πρόβλεψης, μεγαλύτερης ευαισθησίας ως προς τις μετρήσεις.



Εικόνα 11 Χωρική μεταβλητότητα της περιεκτικότητας του αιθέριου ελαίου του είδους *O. dictamnus* στα κυρίαρχα συστατικά.

Τα 42 συστατικά που εντοπίστηκαν στο αιθέριο έλαιο του *O. dictamnus* αποτελούν ποσοστό 99.87% έως 99.98% επί της συνολικής ποσότητας του αιθέριου ελαίου του δίκταμου, ανά περιοχή. Η κύρια ουσία του αιθέριου ελαίου του δίκταμου είναι η Carvacrol (καρβακρόλη), η οποία ανιχνεύεται στα αιθέρια έλαια των συγκεκριμένων δειγμάτων σε υψηλό ποσοστό και συγκεκριμένα από 35.42% έως 84.37% επί του συνόλου του αιθέριου ελαίου. Οι αμέσως επόμενες ουσίες που συναντώνται σε σχετικά υψηλά ποσοστά στο αιθέριο έλαιο των συγκεκριμένων δειγμάτων είναι το p-Cymene (π-κυμένιο), το οποίο ανιχνεύεται σε ποσοστό από 3.83% έως 28.41% και η Thymoquinone (Θυμοκινόνη), η οποία ανιχνεύεται στο αιθέριο έλαιο του δίκταμου σε ποσοστό από 0.72% έως 37.25%.

Βάση των μοντέλων πρόβλεψης (Generalized Linear Models) η αναμενόμενη αφθονία για κάθε μία από τις κυρίαρχες ουσίες του αιθέριου ελαίου του δίκταμου διαμορφώνονται ως εξής (Εικόνα 11). Η ουσία Carvacrol αναμένεται να βρίσκεται σε αφθονία στο αιθέριο έλαιο των φυτών στο μεγαλύτερο μέρος της Κρήτης εκτός των ορεινών εκτάσεων, με μέγιστες αναμενόμενες τιμές στην έκταση όπου παρατηρείται και η μέγιστη απόδοση σε αιθέριο έλαιο του συγκεκριμένου φυτού. Αντίθετα το συστατικό p-Cymene αναμένεται να παρουσιάζει υψηλές τιμές στο αιθέριο έλαιο των φυτών, τα οποία συλλέγονται από τα ορεινά και πολύ χαμηλές τιμές σε όλες τις υπόλοιπες περιοχές του νησιού. Το συστατικό Thymoquinone η αφθονία του στο αιθέριο έλαιο του δίκταμου είναι πολύ περιορισμένη χωρικά και ταυτίζεται επίσης με την έκταση, στην οποία παρατηρείται η μέγιστη απόδοση σε αιθέριο έλαιο. Τέλος όσον αφορά την ουσία Thymol methyl ether δεν μπορεί να αποτυπωθεί με ακρίβεια η χωρική διαφοροποίηση της λόγω των χαμηλών μετρήσεων που καταγράφηκαν στα συγκεκριμένα δείγματα καθώς και των χαρακτηριστικών του μοντέλου πρόβλεψης που χρησιμοποιήθηκε. Συνεπώς θα δοκιμαστεί επίσης σε μελλοντική ανάλυση η εξαγωγή των συγκεκριμένων κατανομών με τη χρήση διαφορετικού μοντέλου πρόβλεψης μεγαλύτερης ευαισθησίας ως προς τις μετρήσεις.

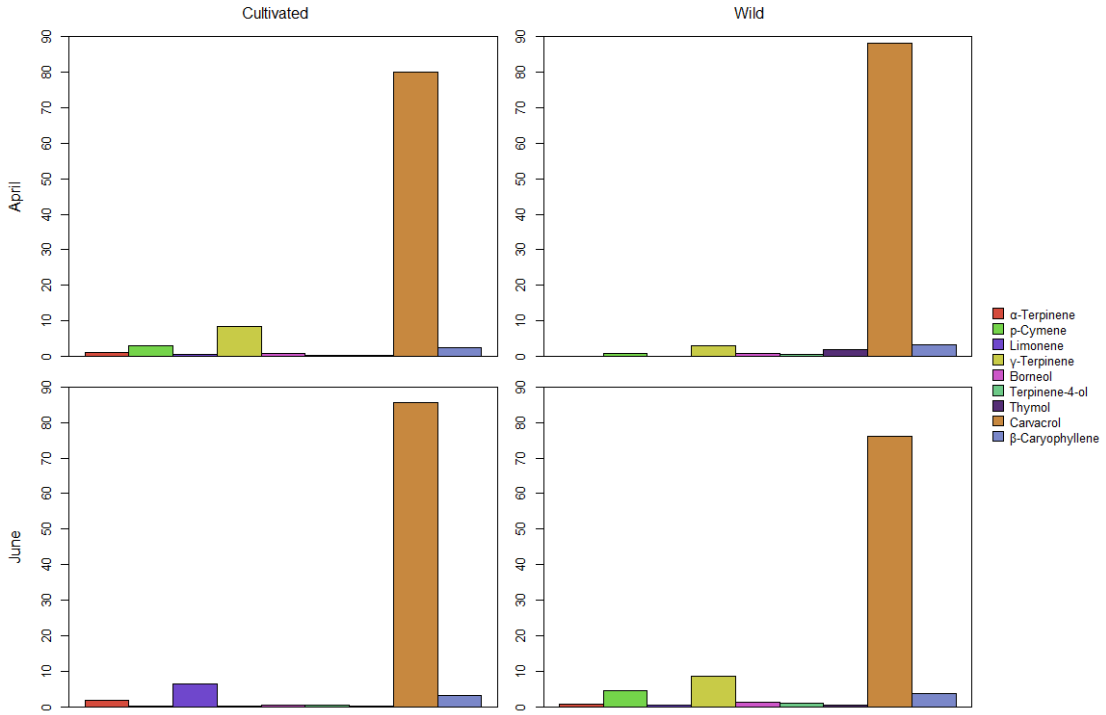


Εικόνα 12 Χωρική μεταβλητότητα της περιεκτικότητας του αιθέριου ελαίου του είδους *T. capitata* στα κυρίαρχα συστατικά.

Τα 26 συστατικά που εντοπίστηκαν στο αιθέριο έλαιο του είδους *T. capitata* αποτελούν ποσοστό 99.78% έως 99.98% επί της συνολικής ποσότητας του αιθέριου ελαίου του. Η κύρια ουσία του αιθέριου ελαίου του *T. capitata* είναι η Carvacrol, η οποία ανιχνεύεται σε ποσοστό 9.46% έως 68.87% ή η Thymol με ποσοστό 3.55% - 53.58%. Όσον αφορά τις δύο αυτές ουσίες παρατηρείται το φαινόμενο της συμπληρωματικότητας ως προς τα ποσοστά, δηλ. όταν η καρβακρόλη εντοπίζεται σε χαμηλό ποσοστό, στο ίδιο αιθέριο έλαιο η θυμόλη εντοπίζεται σε πολύ υψηλό ποσοστό καθώς και το αντίστροφο. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνεται και από τα μοντέλα πρόβλεψης (Εικόνα 12) καθώς αποτυπώνεται και στο χάρτη η συμπληρωματική αυτή σχέση της αφθονίας των δύο ουσιών χωρικά. Στο μεγαλύτερο μέρος των δειγμάτων καταγράφονται σε αρκετά υψηλά ποσοστά και οι ουσίες p-Cymene (0.06% - 24.39%) και γ-Terpinene (0.05% - 10.37%), παρόλα αυτά για τους ίδιους λόγους που αναλύθηκαν και παραπάνω δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο χωρικό πρότυπο διαφοροποίησης για τις δύο αυτές ουσίες με βάση το μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία.

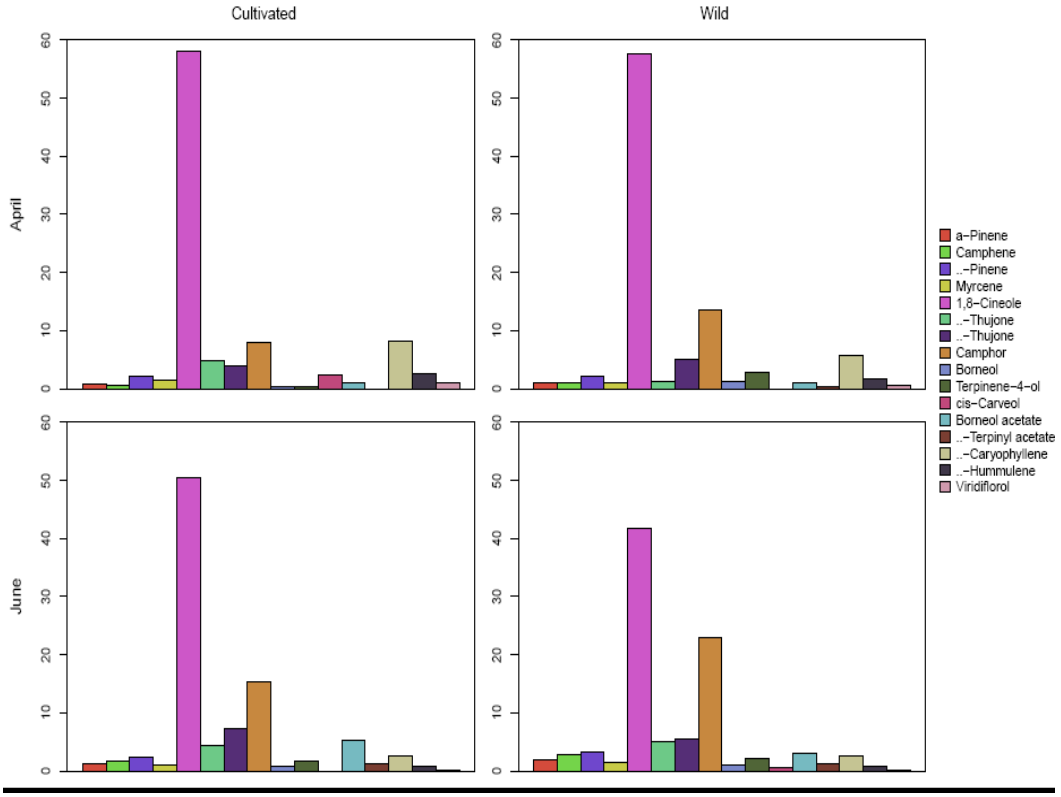
Σύσταση αιθέριου ελαίου σε καλλιεργούμενα φυτά

Από το σύνολο των περιπτώσεων που θα μπορούσε να ελεγχθεί η σύσταση αιθέριου ελαίου σε καλλιεργούμενα φυτά κατ' αντιπαραβολή με την σύσταση που εμφανίζουν οι φυσικοί πληθυσμοί επελέγη η περίπτωση θέσεων όπου προβλεπόταν παραγωγή Carvacrol για το είδος *T. capitata.* Υπενθυμίζουμε τη διαφοροποίηση των θέσεων αυτών ως προς τις θέσεις όπου παράγεται Thymol. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 13 για τους μήνες Απρίλιο και Ιούνιο όπου φαίνεται πολύ καθαρά ότι η σύσταση των καλλιεργούμενων φυτών ακολουθεί κατ' αντιστοιχία τη σύσταση των αυτοφυών.



Εικόνα 13 Σύσταση αιθέριων ελαίων σε επιμέρους συστατικά από καλλιεργούμενα και αυτοφυή φυτά του είδους *Thymbra capitata*.

Επίσης επελέγη προς έλεγχο τυχαία καλλιέργεια φυτών του είδους *S. fruticosa* σε σχέση με γειτνιάζοντες φυσικούς πληθυσμούς. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 14 απ' όπου προκύπτει ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ αυτών των γειτνιαζόντων πληθυσμών.



Εικόνα 14 Σύσταση αιθέριων ελαίων σε επιμέρους συστατικά από καλλιεργούμενα και αυτοφυή φυτά του είδους *Salvia fruticosa*.

Επιπλέον παρατηρήσεις και δεδομένα που προέκυψαν σχετικά με τη σύγκριση καλλιέργειας-φυσικών πληθυσμών ήταν τα παρακάτω. Η απόδοση σε αιθέριο έλαιο των καλλιεργούμενων και των αυτοφυών πληθυσμών του *S. fruticosa* ήταν αυξημένη τον Ιούνιο (4.13 ml/100gr dw και 2.97 ml/100gr dw, αντίστοιχα) σε σχέση με το Απρίλιο (1.75 ml/100gr dw και 1.63 ml/100gr dw, αντίστοιχα). Η κατηγορία των οξυγονωμένων μονοτερπενίων, στην οποία ανήκει και το συστατικό 1,8-Cineole, με ιδιαίτερη εμπορική αξία επίσης κατέγραψε τα εξής ποσοστά στο αιθέριο έλαιο των καλλιεργούμενων και των ελεύθερων πληθυσμών κατά τον Απρίλιο 80.92% και 84.90% (επί της συνολικής ποσότητας του αιθέριου ελαίου) αντίστοιχα, ενώ των Ιούνιο αποτελούσε το 88.66% και 85.48%, των αιθέριων ελαίων αντίστοιχα.

Επίσης όσον αφορά την απόδοση σε αιθέριο έλαιο των καλλιεργούμενων και των αυτοφυών πληθυσμών του *T. capitata* παρουσίασε επίσης αύξηση κατά τον Ιούνιο (4.70 ml/100gr dw και 4.27 ml/100gr dw, αντίστοιχα) σε σχέση με αυτή του Απριλίου (1.65 ml/100gr dw και 2.80 ml/100gr dw, αντίστοιχα). Στο αιθέριο έλαιο του είδους *T. capitata* η τερπενική ομάδα με το ιδιαίτερο εμπορικό ενδιαφέρον είναι επίσης αυτή των οξυγονωμένων μονοτερπενίων, της οποίας κυρίαρχο συστατικό αποτελεί η ουσία Carvacrol. Τον Απρίλιο η περιεκτικότητα του αιθέριου ελαίου του σε οξυγονωμένα μονοτερπένια ήταν 81.92% για τους καλλιεργούμενους και 91.94% για τους αυτοφυείς πληθυσμούς, ενώ τον Ιούνιο ήταν 87.47% και 80.07% αντίστοιχα.

Τα παραπάνω αποτελέσματα όσον αφορά τις αποδόσεις σε αιθέριο έλαιο συμπίπτουν με τη βιβλιογραφία καθώς αναφέρεται ότι η απόδοση αυξάνεται κατά την περίοδο της ανθοφορίας τόσο σε καλλιεργούμενους όσο και σε αυτοφυείς πληθυσμούς του είδους *S. fruticosa* (Prins & Freitas, 2010) και του *T. capitata* (Salas et al., 2010).

Το αιθέριο έλαιο, που απομονώθηκε από καλλιεργούμενα φυτά του είδους *S. fruticosa* κατά τον Απρίλιο του 2018 (αμέσως πριν την ανθοφορία) είχε μικρότερη περιεκτικότητα στα συστατικά Camphor και Terpinene-4-ol, κατά 5.69% και 2.60% αντίστοιχα, σε σχέση με αυτό που απομονώθηκε από τον άγριο πληθυσμό. Αντίθετα η περιεκτικότητά του σε α-Thujone ήταν μεγαλύτερη κατά 3.41%. Επίσης το αιθέριο έλαιο, που απομονώθηκε από τα καλλιεργούμενα φυτά του ίδιου είδους κατά τον Ιούνιο του 2018 (περίοδος ανθοφορίας) περιείχε μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε 1,8-Cineole σε σχέση με το αιθέριο έλαιο του αυτοφυούς πληθυσμού, κατά 8.68% και μικρότερη περιεκτικότητα σε Camphor κατά 7.57%.

Ακόμη το αιθέριο έλαιο από την καλλιέργεια του είδους *S. fruticosa* που απομονώθηκε τον Απρίλιο διαφέρει από αυτό του Ιουνίου ως προς τα συστατικά: 1,8-Cineol (αυξημένη περιεκτικότητα κατά 7.74%), Camphor μικρότερο ποσοστό κατά 7.45%, β-Thujone (μικρότερη περιεκτικότητα κατά 3.37%) και β-Caryophyllene (μεγαλύτερο ποσοστό κατά 5.48%). Όσον αφορά το αιθέριο έλαιο από τον αυτοφυή πληθυσμό του ίδιου είδους, που απομονώθηκε τον Απρίλιο διαφέρει από αυτό του Ιουνίου ως προς τα συστατικά: 1,8-Cineol (μεγαλύτερη περιεκτικότητα κατά 15.93%), Camphor (μικρότερη περιεκτικότητα κατά 9.33%), α-Thujone (μικρότερη περιεκτικότητα κατά 3.63%) και β-Caryophyllene (μεγαλύτερη περιεκτικότητα κατά 3.04%).

Σε αντίστοιχη εργασία, συγκρίνεται το περιεχόμενο του αιθέριου ελαίου του *S.fruticosa* μεταξύ καλλιεργούμενων και άγριων πληθυσμών, από την περιοχή Antalya της Τουρκίας. Παρατηρείται ότι η καλλιέργεια οδηγεί σε αύξηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου, μείωση της απόδοσης σε αιθέριο έλαιο, καθώς και των συνολικών φλαβονοειδών που περιέχει. Η μείωση αυτή αποδίδεται κυρίως στις συνθήκες ανάπτυξης απουσία στρες. Συνίσταται η καλλιέργεια του *S. fruticosa* για τη χρήση του στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμακευτικών προϊόντων καθώς δεν υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση του περιεχομένου του ως προς την αντιοξειδωτική δράση μεταξύ των καλλιεργούμενων και αυτοφυών φυτών (Dincer et al., 2012).

Το αιθέριο έλαιο, που απομονώθηκε από καλλιεργούμενα φυτά του είδους *T. capitata* κατά τον Απρίλιο του 2018 (αμέσως πριν την ανθοφορία) είχε μεγαλύτερη περιεκτικότητα στα συστατικά: γ-Terpinene, p-Cymene και Limonene κατά 5.30%, 2.08% και 0.33% αντίστοιχα, σε σχέση με αυτό που απομονώθηκε κατά τον ίδιο μήνα από τον αυτοφυή πληθυσμό. Αντίθετα η περιεκτικότητά του σε Carvacrol ήταν μικρότερη κατά 8.28%. Επίσης το αιθέριο έλαιο, που απομονώθηκε από το καλλιεργούμενο θυμάρι κατά τον Ιούνιο του 2018 (περίοδος ανθοφορίας) περιείχε μεγαλύτερη περιεκτικότητα ως προς τα συστατικά: Carcacrol και Limonene κατά 9.65% και 5.89%, αντίστοιχα συγκριτικά με το αιθέριο έλαιο του αυτοφυούς πληθυσμού. Μικρότερη περιεκτικότητα ανιχνεύθηκε στα συστατικά γ-Terpinene (κατά 8.38%) και p-Cymene (κατά 4.30%).

Ακόμη το αιθέριο έλαιο από την καλλιέργεια του είδους *T. capitata* που απομονώθηκε τον Απρίλιο διαφέρει από αυτό του Ιουνίου, έχοντας μικρότερη περιεκτικότητα σε Carvacrol (κατά 5.74%) και Limonene (κατά 5.87%) και μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε γ-Terpinene (κατά 8.18%) και p-Cymene (2.69%). Το αιθέριο έλαιο από τον αυτοφυή πληθυσμό του είδους *S. fruticosa* που απομονώθηκε τον Απρίλιο διαφέρει από αυτό του Ιουνίου, καθώς καταγράφεται μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε Carvacrol (κατά 12.19%) και μικρότερο ποσοστό των συστατικών: γ-Terpinene (κατά 5.49%), Limonene (κατά 0.31%) και p-Cymene (κατά 3.69%).

Σύνοψη

1. Εν κατακλείδι, παρά το γεγονός ότι οι αποδόσεις των ειδών σε παραγωγή αιθέριων ελαίων σε επίπεδο Κρήτης εμφανίζουν γενικότερη συμφωνία με τα έως τώρα βιβλιογραφικά δεδομένα, προκύπτει στατιστικά σημαντική χωρική διαφοροποίηση από τη δράση περιβαλλοντικών παραμέτρων, η οποία μπορεί να αποδοθεί χαρτογραφικά με τη χρήση Γενικευμένων Γραμμικών Μοντέλων, και η οποία μπορεί να αξιοποιηθεί στο σχεδιασμό παραγωγής πρώτης ύλης για τη φαρμακοβιομηχανία και τη βιομηχανία τροφίμων από συλλογή ή από καλλιέργεια φυτικού υλικού.
2. Το ίδιο φαίνεται να ισχύει και για την παραγωγή συγκεκριμένων δευτερογενών μεταβολιτών που περιλαμβάνονται στο αιθέριο έλαιο των υπό εξέταση ειδών. Δηλαδή προκύπτει στατιστικά σημαντική χωρική διαφοροποίηση από τη δράση περιβαλλοντικών παραμέτρων, η οποία μπορεί να αποδοθεί χαρτογραφικά με τη χρήση Γενικευμένων Γραμμικών Μοντέλων, και η οποία μπορεί να αξιοποιηθεί στο σχεδιασμό παραγωγής πρώτης ύλης για τη φαρμακοβιομηχανία και τη βιομηχανία τροφίμων από συλλογή ή από καλλιέργεια φυτικού υλικού.
3. Η σύσταση αιθέριων ελαίων σε επιμέρους συστατικά από καλλιεργούμενα φυτά των υπό εξέταση ειδών φαίνεται να είναι αντίστοιχη με τη σύσταση που καταγράφεται στους γειτονικούς αυτοφυείς πληθυσμούς.

Όλα τα παραπάνω, δηλαδή η χωρική απόδοση της μεταβλητότητας ως προς τις αποδόσεις των φυτών και τη σύσταση των αιθέριων ελαίων των υπό εξέταση ειδών, όπως και η συγκριτική αξιολόγηση καλλιεργούμενων φυτών με αυτοφυείς πληθυσμούς αποτελούν βασικά εργαλεία για τη διασφάλιση της ποιότητας της πρώτης ύλης (quality assurance) και τον ποιοτικό έλεγχο (quality control) σε σκευάσματα φυτικής προέλευσης που παράγονται από τη φαρμακοβιομηχανία και τη βιομηχανία τροφίμων.

Βιβλιογραφία

Alzweiri, M., Al Sarhan, A., Mansi, K., Hudaib, M., Aburjai, T., 2011.Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Jordan, the Northern Badia region.Journal of Ethnopharmacology137, 27-35.

Argyropoulou, C., Papadatou, M., Grigoriadou, C., & Skaltsa, H. (2014a). Evaluation of the Essential Oil Content of Cretan Dittany Cultivated in Northern Greece. *Medicinal & Aromatic Plants*, *03*(02), 2–5. https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000157

Argyropoulou, C., Papadatou, M., Grigoriadou, C., & Skaltsa, H. (2014b). Evaluation of the Essential Oil Content of Cretan Dittany Cultivated in Northern Greece. *Medicinal & Aromatic Plants*, *03*(02), 2–5. https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000157

Chauhan, A., Kumar, M., & Chauhan, P. (2014). GC-MS Technique and its Analytical Applications in Science and Technology. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*, *5*(6). https://doi.org/10.4172/2155-9872.1000222

Cláudia L. Prins, I. J. C. V., & and Silvério P. Freitas. (2010). Growth regulators and essential oil production. *Brazilian Society of Plant Physiology*, *22*(2), 91–102. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/S1677-04202010000200003

Cvetkovikj, I., Stefkov, G., Karapandzova, M., & Kulevanova, S. (2015). Essential oil composition of Salvia fruticosa Mill. populations from Balkan Peninsula. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin*, *6192955496*(582495), 19–264. Retrieved from http://bulletin.mfd.org.mk/volumes/Volume 61_1/61_1_004.pdf

Dincer, C., Topuz, A., Sahin-Nadeem, H., Ozdemir, K. S., Cam, I. B., Tontul, I., … Ay, S. T. (2012). A comparative study on phenolic composition, antioxidant activity and essential oil content of wild and cultivated sage (Salvia fruticosa Miller) as influenced by storage. *Industrial Crops and Products*, *39*(1), 170–176. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.02.032

Eissa, T.A.F., Palomino, O.M., Carretero, M.E., Gómez-Serranillos, M.P., 2014.Ethnopharmacological study of medicinal plants used in the treatment of CNS disorders in Sinai Peninsula, Egypt.Journal of Ethnopharmacology151, 317-332.

Ferrari, S. L. P., & Neto, F. C. (n.d.). BETA REGRESSION FOR MODELLING RATES AND PROPORTIONS, 1–18.

Fick, S. E. (2017). WorldClim 2 : new 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas, (May). https://doi.org/10.1002/joc.5086

Fielding, J., Turland, N., 2005. Flowers of Crete.Kew Royal Botanical Gardens.

Goren, A. C., Bilsel, G., Bilsel, M., Demir, H., & Kocabaş, E. E. (2003). Analysis of Essential Oil of Coridothymus capitatus (L.) and Its Antibacterial and Antifungal Activity. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, *58*(9–10), 687–690. https://doi.org/10.1515/znc-2003-9-1016

Gortzi, O., Lalas, S., Chinou, I., & Tsaknis, J. (2007). Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of Origanum dictamnus extracts before and after encapsulation in liposomes. *Molecules*, *12*(5), 932–945. https://doi.org/10.3390/12050932

Gürdal, B., Kültür, Ş., 2013.An ethnobotanical study of medicinal plants in Marmaris (Muğla, Turkey).Journal of Ethnopharmacology146, 113-126.

Honório, V.G., Bezerra, J., Souza, G.T., Carvalho, R.J., Gomes-Neto, N.J., Figueiredo, R.C., ...&Magnani, M., 2015. Inhibition of Staphylococcus aureus cocktail using the synergies of oregano and rosemary essential oils or carvacrol and 1, 8-cineole. Frontiers in Microbiology 6, 1223

Jaradat, N.A., Ayesh, O.I., Anderson, C., 2016. Ethnopharmacological survey about medicinal plants utilized by herbalists and traditional practitioner healers for treatments of diarrhea in the West Bank/Palestine.Journal of Ethnopharmacology, 182, 57-66.

Karousou, R., Deirmentzoglou, S., 2011. The herbal market of Cyprus: Traditional links and cultural exchanges. Journal of Ethnopharmacology133, 191-203.

Karousou, R., Koureas, D. N., & Kokkini, S. (2005). Essential oil composition is related to the natural habitats: Coridothymus capitatus and Satureja thymbra in NATURA 2000 sites of Crete. *Phytochemistry*, *66*(22), 2668–2673. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.09.020

Karousou, R., Vokou, D., & Kokkini, S. (1998). Variation of Salvia fruticosa Essential Oils on the Island of Crete (Greece). *Botanica Acta*, *111*(3), 250–254. https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1998.tb00705.x

Lardos, A., Heinrich, M., 2013. Continuity and change in medicinal plant use: the example of monasteries on Cyprus and historical iatrosophia texts. Journal of Ethnopharmacology150, 202-214.

Legendre, P. and Legendre, L. (2012) Numerical Ecology. 3rd English Edition.Elsevier.

Liolios, C. C., Graikou, K., Skaltsa, E., & Chinou, I. (2010). Dittany of Crete: A botanical and ethnopharmacological review. *Journal of Ethnopharmacology*, *131*(2), 229–241. https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.06.005

Martinez-Frances, V., Rivera, D., Heinrich, M., Obón, C., Ríos, S., 2015.An ethnopharmacological and historical analysis of "Dictamnus", a European traditional herbal medicine.Journal of Ethnopharmacology175, 390-406.

Salas, J. B., Téllez, T. R., Alonso, M. J. P., Pardo, F. M. V., de los Ángeles Cases Capdevila, M., & Rodríguez, C. G. (2010). Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of Thymbra capitata (L.) Cav. in Spain. *Acta Botanica Gallica*, *157*(1), 55–63. https://doi.org/10.1080/12538078.2010.10516189

Sargin, S.A., 2015. Ethnobotanical survey of medicinal plants in Bozyazı district of Mersin, Turkey.Journal of Ethnopharmacology173, 105-126.

Skoula, M., Gotsiou, P., Naxakis, G., & Johnson, C. B. (1999). A chemosystematic investigation on the mono- and sesquiterpenoids in the genus Origanum (Labiatae). *Phytochemistry*, *52*(4), 649–657. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00268-X

Souleles, C., & Argyriadou, N. (1997). Constituents of the Essential Oil of Salvia sclarea Growing Wild in Greece. *International Journal of Pharmacognosy*, *35*(3), 218–220. https://doi.org/10.1076/phbi.35.3.218.13295

Stashenko, E., & Martinez, J. R. (2014). Gas Chromatography-Mass Spectrometry. In *Advances in Gas Chromatography*. ΚΑΚΛΑΜΑΝΟΣ, Γ. (2009). ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΟΡΜΟΝΩΝ ΜΕ ΑΥΞΗΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ. ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ. Karousou, R., Vokou, D., & Kokkini, S. (1998). Variation of Salvia fru. https://doi.org/10.5772/57492

Vrachnakis, T., 2003.Trichomes of Origanum dictamnus L.(Labiatae). Phyton 43, 109-133.

ΚΑΚΛΑΜΑΝΟΣ, Γ. (2009). *ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΟΡΜΟΝΩΝ ΜΕ ΑΥΞΗΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ*. ΚΑΚΛΑΜΑΝΟΣ, Γ. (2009). ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΟΡΜΟΝΩΝ ΜΕ ΑΥΞΗΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ. ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ. Karousou, R., Vokou, D., & Kokkini, S. (1998). Variation of Salvia fru.