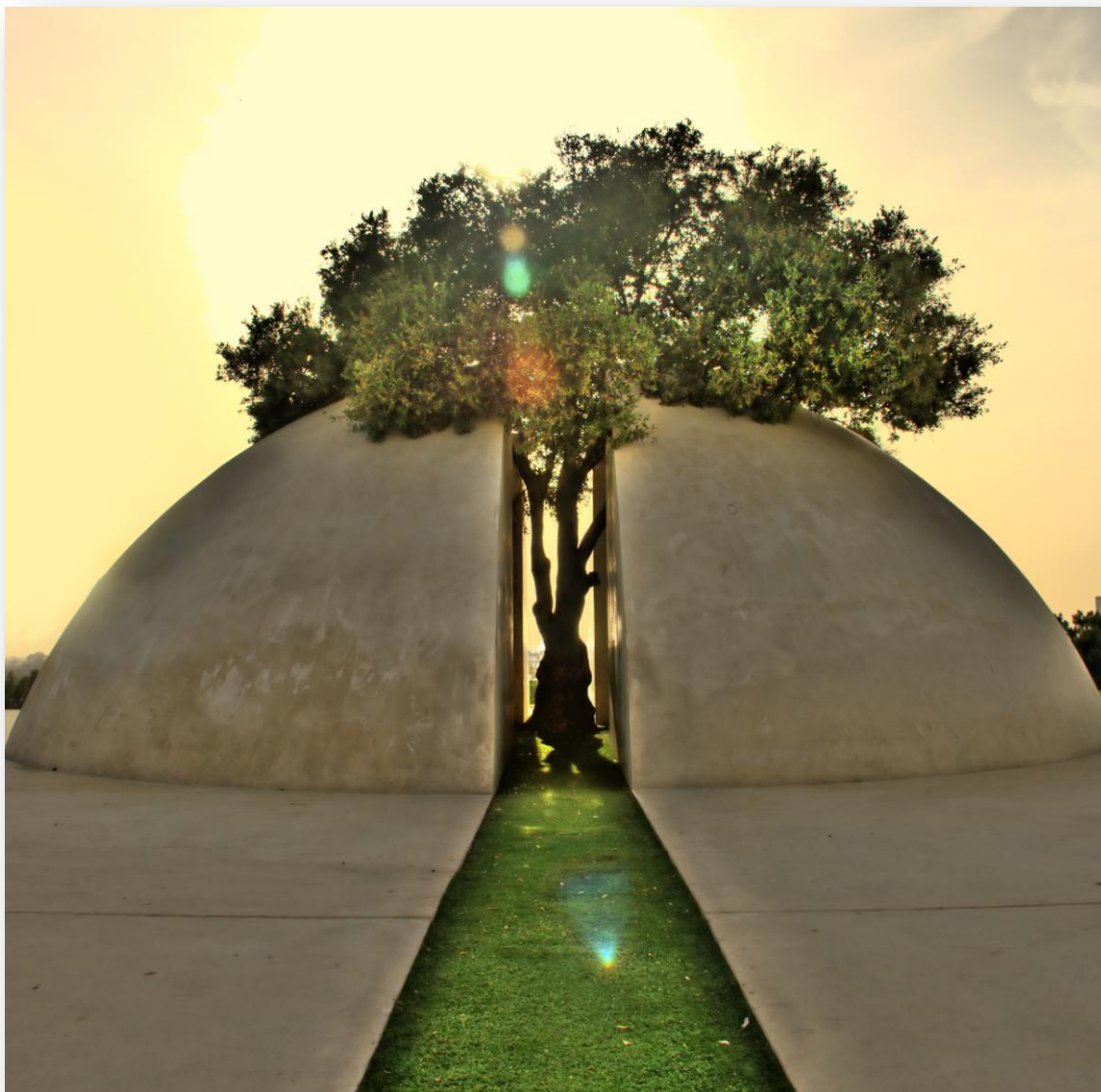


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΥΝ ΣΤΗ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ
ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΕΛΙΑ



ΚΟΥΔΟΥΝΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΑΘΗΝΑ 2011

Η ανάθεση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης έγινε με απόφαση της 16^{ης} ΓΣΕΣ του τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας (19.05.10), κατά την οποία εγκρίθηκαν το θέμα και η τριμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική επιτροπή της μελέτης.

Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή

1. Καθηγητής Χατζόπουλος Πολυδεύκης_____Επιβλέπων
2. Επ. Καθηγήτρια Μηλιώνη Δήμητρα_____Μέλος
3. Λέκτορας Ρήγας Σταμάτης_____Μέλος

ΑΝΤΙ ΠΡΟΛΟΓΟΥ

Στα πλαίσια της συγγραφής αυτής της μελέτης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους που άμεσα ή έμμεσα συνέβαλλαν στην ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Πολυδεύκη Χατζόπουλο, για την συνεχή καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές του, χωρίς τις οποίες θα ήταν αδύνατη η εκπόνηση της συγκεκριμένης μελέτης. Η εμπιστοσύνη που μου έδειξε, έδρασε καταλυτικά για την πιο ώριμη αντιμετώπιση των εργαστηριακών θεμάτων. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια Μηλιώνη Δήμητρα, και τον Λέκτορα Ρήγα Σταμάτη για τις πολύ επικοινωνιακές συμβουλές τους και την παροχή τεχνικής, θεωρητικής και ηθικής στήριξης. Επίσης καταλυτική ήταν και η συμβολή των Δρ. Παναγιώτη Κασαπίδη (ΕΛΚΕΘΕ) και Δρ. Μαρίας Μανιουδάκη (ΜΑΙΧ) χωρίς την βοήθεια των οποίων δεν θα μπορούσε να ολοκληρωθεί η παρούσα εργασία.

Τέλος ιδιαίτερα σημαντικό και θετικό θεωρώ το κλίμα συνεργασίας που επικρατεί στο εργαστήριο ανεξαρτήτως βαθμίδας και ευχαριστώ κάθε μέλος του για την βοήθεια του, μικρή ή μεγάλη.

Στον F.G.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

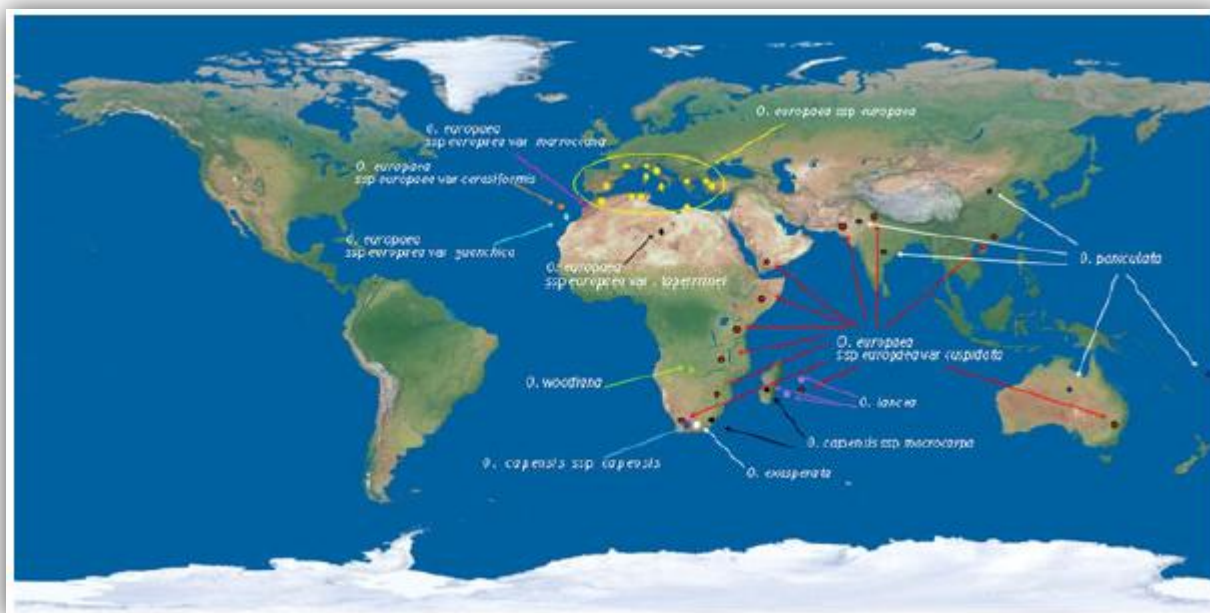
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 ΕΛΙΑ	1
1.2 ΤΟ ΤΡΙΧΩΜΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ	5
1.2.1 Γενικά.....	5
1.2.2 Το τρίχωμα στο <i>A. Thaliana</i>	9
1.2.3 Οικοφυσιολογία των τριχωμάτων.....	10
1.2.4 Μη Αδενώδεις Τρίχες Ελιάς.....	11
1.3 ΝΕΕΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ	13
1.3.1 Genome Sequencer FLX System (454).....	13
1.3.2 The Illumina (Solexa) Genome Analyzer.....	15
1.3.3 The Applied Biosystems SOLiD System.....	17
1.3.4 Εφαρμογές.....	17
1.3.5 Τι ακολουθεί?	19
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	21
2.1 ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	21
2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ	21
2.2.1 Απομόνωση ριβονουκλεϊκών οξέων (RNA)	21
2.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ	22
2.3.1 Ανάλυση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αγαρόζης.....	22
2.3.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των νουκλεϊνικών οξέων.....	22
2.4 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ	23
2.4.1 Χειρισμός με DNase.....	23
2.4.2 Σύνθεση πρώτης αλυσίδας (RT).....	23
2.4.3 Δημιουργία δίκλωνης αλυσίδας cDNA με LD PCR.....	26
2.4.4 Κλασμάτωση των cDNAs βάσει μεγέθους.....	26
Διαδικασία:.....	27
2.5 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΤΩΝ cDNAs	28
2.6 ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	29
2.6.1 Καθαρισμός των αλληλουχιών από τους εκκινητές και ομαδοποίηση τους.....	29

2.6.2 Παράλληλος χειρισμός αρχείων με πολλαπλές ακολουθίες (multi-fasta file)	29
2.7 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	30
Σύνθεση πρώτης αλυσίδας	30
cDNA ενίσχυση	30
Καθαρισμός cDNA	30
Διαλύματα απομόνωσης RNA	31
Διαλύματα Ηλεκτροφόρησης DNA-RNA	31
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	33
3.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ RNA	33
Αντίδραση με DNase	34
3.1.2 Σύνθεση πρώτης αλυσίδας.....	35
3.1.3 Σύνθεση cDNA	35
3.1.6 Κλασμάτωση cDNA ανάλογα με το μέγεθος	37
Pyrosequencing	38
Βιοπληροφορική Ανάλυση	40
Βιολογική Διεργασία	47
Μοριακή Λειτουργία	48
Κυτταρικό Διαμέρισμα	49
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	59
5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	65
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	67
7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	71

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΕΛΙΑ

Το γένος *Olea* ανήκει στην οικογένεια Oleaceae η οποία περιλαμβάνει περίπου 30 γένη και 600 είδη (Cronquist, 1981), κατανεμημένα σε κάθε ήπειρο (εικόνα 1.1). Είναι γενικά αποδεκτό ότι το γένος *Olea* χωρίζεται στα υπογένη *Tetrapilus* (Ασία), *Paniculatae* (Ασία και Αυστραλία) και *Olea* (άγρια και καλλιεργούμενη ελιά-Αφρική και Ευρώπη). Το υπογένος *Olea* χωρίζεται στους τομείς *Ligustroides* (περίπου 10 είδη) και *Olea* (ένα είδος: *O.europaea*) των οποίων τα είδη ευδοκμούν στην Ανατολική Αφρική και στα Νησιά του Ειρηνικού. Συγκεκριμένα ο τομέας *Olea* απαντάται επίσης δυτικά της Σαχάρας, στις Κανάριες Νήσους και στη Λεκάνη της Μεσογείου (Green, 2002). Στον τομέα *Olea* έχουμε το είδος *O. europaea* L, το μόνο καλλιεργούμενο για παραγωγή ελαιόλαδου και βρώσιμων ελιών όπου περιλαμβάνονται πάνω από 1000 ποικιλίες. Εντός του είδους *O. europaea* L. έχουμε τέσσερα υποείδη: το *O. europaea* ssp. *europaea* (Λεκάνη της Μεσογείου), το *O. europaea* ssp. *laperrini* (Σαχάρα), το *O. europaea* ssp. *cerasiformis* (Κανάριοι Νήσοι και Μαδέρα) και το *O. europaea* ssp. *cuspidata* (Κίνα, Ινδία, Πακιστάν, Νεπάλ, Ιράν, Αραβική Χερσόνησο και Νοτιοανατολική Αφρική) (Green and Wickens 1989).



(εικόνα 1.1).

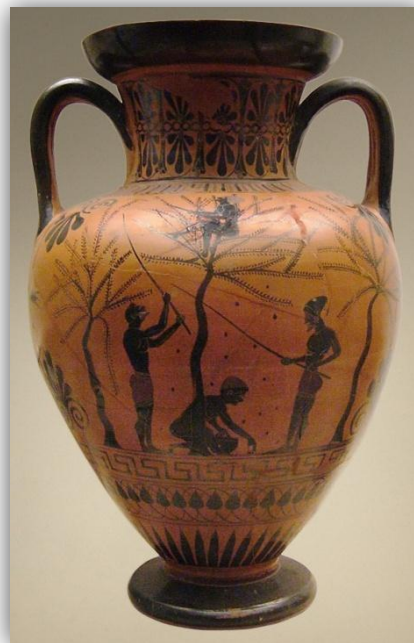
Τα τροπικά και υποτροπικά Αφρο- Ασιατικά είδη όπως τα *Olea chrysophilla* Lam. και *Olea excelsa* Ait πιθανότατα συνείσφεραν στην εξέλιξη της Ευρω-Μεσογειακής ελιάς (*O. europaea* L.) (Zohary 1994). Η Ευρω-Μεσογειακή ελιά (*O. europaea* L. ssp. *europaea*) περιλαμβάνει την άγρια *oleaster* (var. *sylvestris*) και την καλλιεργούμενη ελιά (var. *sativa*). Μελέτες σε ITS και πλαστιδιακές αλληλουχίες δείχνουν ότι οι περισσότεροι πληθυσμοί *O. Europaea* διαφοροποιήθηκαν φυλογενετικά σε πέντε γεωγραφικές ζώνες: α) ισημερινή και νότια Αφρική (ssp. *laperrini*), β) ανατολική Αφρική και νότια Ασία (ssp. *cuspidata*), γ) ανατολική Μεσόγειο (ssp. *europaea est*), δ) δυτική Μεσόγειο (ssp. *europaea west*), ε) βορειοδυτική Αφρική (ssp. *guancica*, *cerasiformis*, *maroccana*) ωστόσο τα αντιφατικά αποτελέσματα μεταξύ ITS-1 και πλαστιδιακού DNA καθώς και οι ενδο-ITS-1 πολυμορφισμοί προτείνουν ένα πιο δυναμικό βιογεωγραφικό

πρότυπο εξάπλωσης (Besnard *et al.* 2007). Το γεγονός ότι ένα δέντρο μπορεί να ξεπεράσει τα 1000 χρόνια ζωής (εικόνα 1.2) καθώς και το ότι εδώ και αρκετούς αιώνες ο άνθρωπος συνεχώς βελτιώνει ποικιλίες και διασταυρώνει πληθυσμούς (εικόνα 1.3) έχει οδηγήσει στην ύπαρξη μεγάλης γενετικής ποικιλομορφίας εντός του είδους.



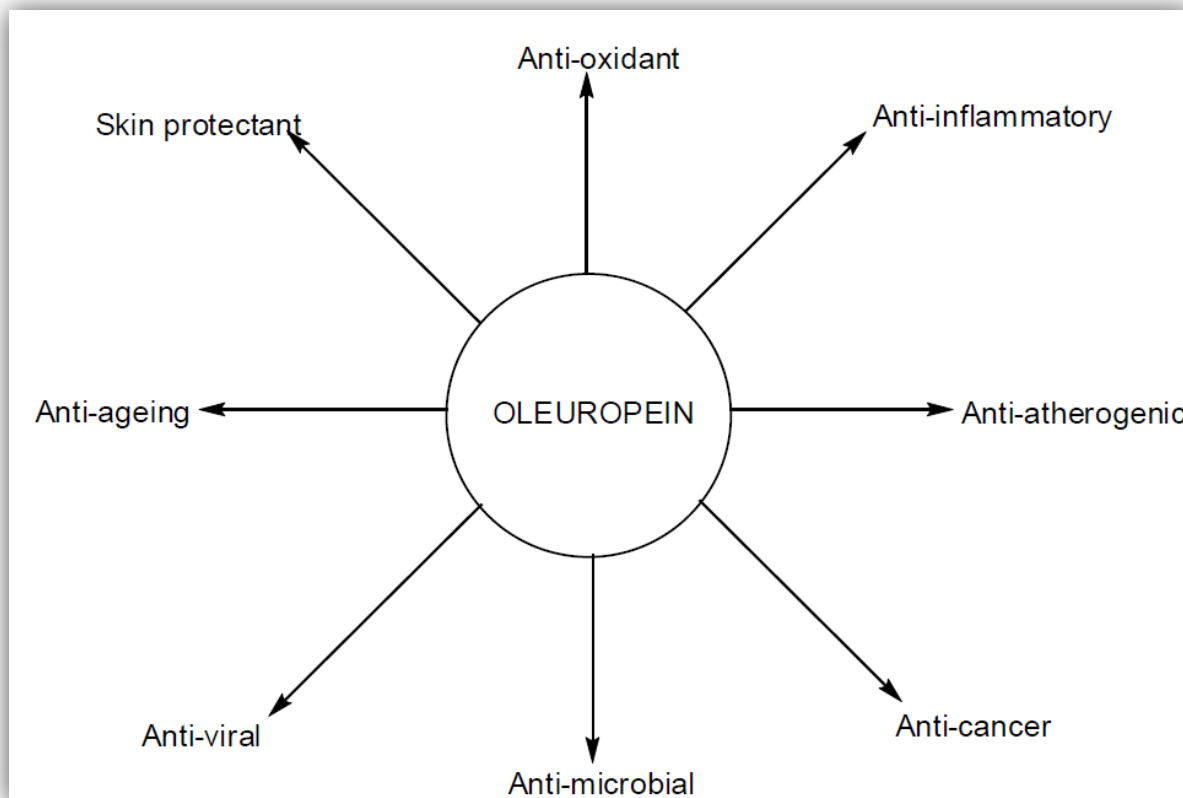
Εικόνα 1.2: Ελαιόδεντρο ηλικίας τουλάχιστον 2.500 ετών (Άνω Βούβες, Κρήτη. <http://tiny.cc/vouves>)

Οι καρποί και το ελαιόλαδο, χρησιμοποιούνταν τόσο για την θρεπτική τους αξία όσο και για τις θεραπευτικές τους ιδιότητες εδώ και πολλά χρόνια. Έρευνες σε καρπούς, φύλλα και λάδι έχουν δείξει ότι το προφίλ των μεταβολιτών δρα συνεργιστικά μειώνοντας την πιθανότητα εμφάνισης στεφανιαίων καρδιακών παθήσεων, αρκετών τύπων καρκίνου και ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα. (Colomer *et al.*, 2007). Ορισμένες πολυφαινόλες του ελαιόλαδου όπως οι υδρόφιλες φαινόλες είναι σπάνιες στο φυτικό βασίλειο ενώ άλλες όπως οι βιοφαινόλες και τα σεκοϊριδοειδή (ολευρωπαΐνη) απαντώνται μόνο στα είδη της οικογένειας *Oleaceae* (Iwai *et al.*, 2005). Ειδικά η ολευρωπαΐνη, το κύριο βιοφαινολικό συστατικό της ελιάς, προστατεύει από καρδιακές παθήσεις, έχει αντιαρρυθμική δράση, ενισχύει τον μεταβολισμό των λιπιδίων, έχει αντικαρκινική, αντιική και αντιμικροβιακή δράση (Omar, 2010) (εικόνα 1.4).



Εικόνα 1.3 Συγκομιδή ελιών 600 πΧ (Λονδίνο, Βρετανικό Μουσείο, B226)

Η ελιά είναι ένα από τα πιο σημαντικά καλλιεργούμενα δέντρα στην Λεκάνη της Μεσογείου. Εδώ εδράζεται το 90% των ελαιώνων διεθνώς. Το 75% της παγκόσμιας παραγωγής ελιών προέρχεται μόνο από την Ισπανία, την Ιταλία και την Ελλάδα. Το 2009 η συνολική παραγωγή ξεπέρασε τους 19.000.000 τόνους. Η παραγωγή ελαιολάδου μόνο ανέρχεται σε 3.000.000 τόνους (FAOSTAT 2007).



(εικόνα 1.4)

Η ελιά είναι δέντρο αειθαλές και ανάλογα με την ποικιλία και τις περιβαλλοντικές συνθήκες μπορεί να φτάσει σε ύψος από 3 έως 20 μέτρα, αν και οι περισσότερες ποικιλίες που καλλιεργούνται δεν ξεπερνούν τα 5. Ο κορμός του νεαρού δέντρου είναι λείος και πράσινος αλλά με την πάροδο του χρόνου γίνεται ανομοιόμορφος με διογκώσεις και σκουραίνει. Τα άνθη του είναι μικρά λευκοκίτρινα, 15-30 ανά ανθοταξία σε βλαστούς τρέχοντος έτους. Τα φύλλα είναι μικρά λογχοειδή και διατηρούνται για 3 χρόνια. Είναι πλούσια σε ταννίνες. Τόσο στην προσαξονική όσο και στην απαξονική επιφάνεια του φύλλου έχουμε ασιδοειδή τριχίδια. Ο καρπός είναι δρύπη, σφαιρικός ή ελλειπτικός και αποτελείται από το εξωκάρπιο, το μεσοκάρπιο που είναι και το βρώσιμο μέρος και το ενδοκάρπιο όπου βρίσκεται το έμβρυο. Ο ώριμος καρπός είναι μαύρου χρώματος και το μέγεθος του εξαρτάται από την ποικιλία, την γονιμότητα του εδάφους, τον αριθμό καρπών ανά δέντρο, την διαθεσιμότητα νερού και τις καλλιεργητικές τεχνικές. Η παραγωγή καρπών ξεκινάει το 3^ο έτος αλλά η πλήρης απόδοση του δέντρου επιτυγχάνεται μεταξύ 11^{ου} και 12^{ου} έτους για ξηρά εδάφη και μεταξύ 7^{ου} και 8^{ου} έτους για αρδευόμενα. Το ριζικό σύστημα έχει την τάση να αναπτύσσεται οριζόντια παρά κάθετα. Η ελιά είναι ανθεκτική σε αντίξοες συνθήκες και προσαρμόζεται στα περισσότερα είδη εδαφών ακόμα και σε εδάφη φτωχά που δεν μπορούν να καλλιεργηθούν και είναι ανθεκτική στην ξηρασία (Therios, 2008)

Η ελιά καλλιεργείται σε πολλές ξηρές ή ημίξηρες περιοχές και παραδοσιακά οι ελαιώνες δεν αρδεύονται αν και η άρδευση ευνοεί την παραγωγή. Οι Μεσογειακές κλιματικές συνθήκες είναι ιδανικές λόγω συχνών βροχοπτώσεων και της θερμοκρασίας. Επίσης παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε υψηλή αλατότητα και γίνονται προσπάθειες για ποικιλίες στις οποίες θα γίνεται χρήση υφάλμυρου νερού (Briccoli *et al.*, 1994).

Υπάρχουν πολλές ποικιλίες που διαφοροποιούνται κυρίως στο μέγεθος, το χρώμα, την περιεκτικότητα σε λάδι και λιπαρά οξέα του καρπού κ.α.. Κάποιες είναι μόνο τοπικού ενδιαφέροντος ενώ άλλες κατανέμονται σε μεγαλύτερες εκτάσεις. Κάθε ποικιλία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για παραγωγή ελαιολάδου ή βρώσιμων ελιών αν και γενικά οι ελαιοπαραγωγικές έχουν μικρότερο λόγο πολτού : πυρήνα (4-7:1) σε σχέση με τις βρώσιμες (7-10:1).

Cultivar	Taxonomy
'Konservolia'	<i>O. europaea</i> var. <i>rotunda</i>
'Karydolia'	<i>O. europaea</i> var. <i>med. maxima</i>
'Gaidourolia'	<i>O. europaea</i> var. <i>major macrocarpa</i>
'Amygdalolia'	<i>O. europaea</i> var. <i>amygdaliformis</i>
'Kalamon'	<i>O. europaea</i> var. <i>ceraticarpa calamata</i>
'Adramitini'	<i>O. europaea</i> var. <i>media subrotunda</i>
'Kothreiki'	<i>O. europaea</i> var. <i>minor rotunda</i>
'Karolia'	<i>O. europaea</i> var. <i>oblonga</i>
'Kolymbada'	<i>O. europaea</i> var. <i>uberina</i>
'Tragolia'	<i>O. europaea</i> var. <i>minor oblonga</i>
'Mastoidis'	<i>O. europaea</i> var. <i>mamilaris</i>
'Throumbolia'	<i>O. europaea</i> var. <i>media oblonga</i>
'Valanolia'	<i>O. europaea</i> var. <i>pyriformis</i>
'Megaritiki'	<i>O. europaea</i> var. <i>argentata</i>
'Lianolia Kerkiras'	<i>O. europaea</i> var. <i>craniomorpha</i>
'Maurolia'	<i>O. europaea</i> var. <i>nigra microcarpa</i>
'Koroneiki'	<i>O. europaea</i> var. <i>microcarpa alba</i>
'Vasilikada'	<i>O. europaea</i> var. <i>regalis</i>
'Aguromanacolia'	<i>O. europaea</i> var. <i>ovalis</i>
'Kalokaerida'	<i>O. europaea</i> var. <i>precox</i>
'Myrtolia'	<i>O. europaea</i> var. <i>microcarpa subrotunda</i>
'Dafnolia'	<i>O. europaea</i> var. <i>clavata</i>
'Asprolia'	<i>O. europaea</i> var. <i>alba</i>
'Chrysolia'	<i>O. europaea</i> var. <i>chrysophylla</i>

Εικόνα 1.5 24 Ελληνικές ποικιλίες και η ταξινόμησή τους (Therios, 2008)

Αρκετά γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα κλειδιά για την βιοσύνθεση λιπαρών οξέων και αντιοξειδωτικών καθώς και την τροποποίηση και αποθήκευση των τριακυλογλυκερολών έχουν απομονωθεί. Η έκφραση γονιδίων κατά την ανάπτυξη του καρπού και του εμβρύου καθώς και η παροδική έκφραση σε διάφορους ιστούς επέτρεψε την ταυτοποίηση των πιο σημαντικών για αποθήκευση λιπαρών οξέων. Με την χρήση RAPDs, οι ελληνικές ποικιλίες χωρίζονται σε δυο μεγάλες και μια μικρότερη ομάδες ανάλογα με το μέγεθος των καρπών. Η πρώτη περιλαμβάνει τις βρώσιμες ελιές, η δεύτερη τις ελαιοπαραγωγικές και η τρίτη τις ελιές αγρίου τύπου. (Hatzopoulos *et al.*, 2002).

Το περιεχόμενο DNA στον πυρήνα υπολογίστηκε με κυτταρομετρία ροής μεταξύ 2.90 ± 0.020 pg/2C και 3.07 ± 0.018 pg/2C στις καλλιεργούμενες ποικιλίες και 3.19 ± 0.047 pg/2C DNA στην άγρια ελιά δείχνοντας μικρή διαφορά μεταξύ τους (Loureiro *et al.*, 2007). Γενικά τα είδη του γένους *Olea* είναι διπλοειδή με 23 ζεύγη χρωμοσωμάτων, ωστόσο έχουν βρεθεί και πολυπλοειδή φυτά σε φυσικούς πληθυσμούς των *O. e. ssp. cerasiformis* (τετραπλοειδή) και *maroccana* (εξαπλοειδή). Έχει προταθεί ότι η πολυπλοειδία ευνοήθηκε ως άμυνα στον ομομεικτικό εκφυλισμό (Besnard *et al.*, 2008).

1.2 ΤΟ ΤΡΙΧΩΜΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

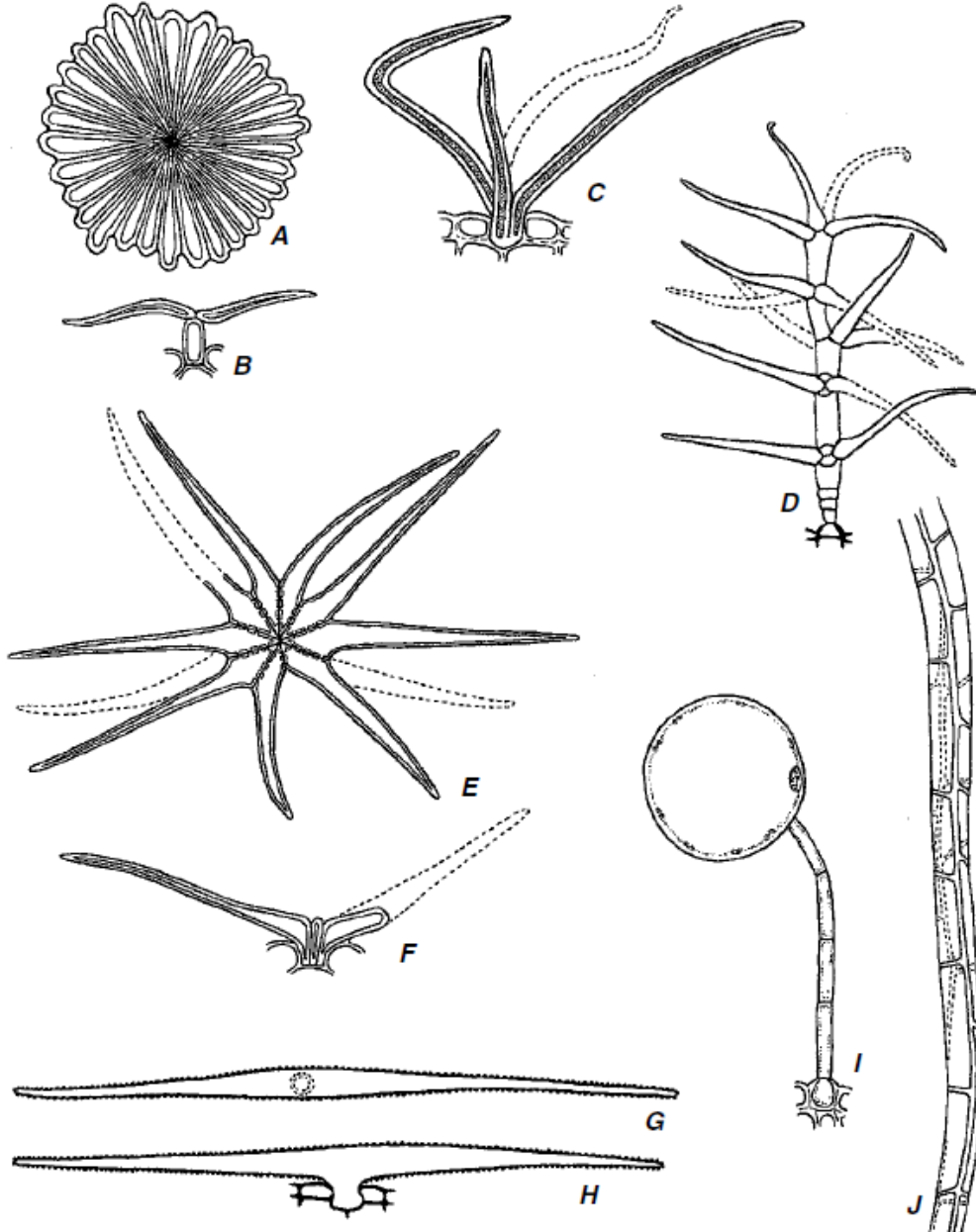
1.2.1 Γενικά

Ο όρος τρίχες αναφέρεται στις μονοκύτταρες και πολυκύτταρες αποφύσεις της επιδερμίδας (εικόνα 1.6). Πρόκειται για όρο γενικό, ο οποίος περιλαμβάνει επιδερμικά εξαρτήματα ποικίλων τύπων, κατασκευών και λειτουργιών (Fahn, 1991).

Στα σημαντικότερα μορφολογικά χαρακτηριστικά περιλαμβάνονται το μήκος, το πλάτος, η διάμετρος και ο αριθμός των κυττάρων που συγκροτούν τις τρίχες. Πολλές φορές οι τρίχες που καλύπτουν το ίδιο όργανο ενός φυτού διαφέρουν σημαντικά στις πιο πάνω διαστάσεις ενώ οι διαφορές είναι ακόμα μεγαλύτερες όταν εξετάζονται διαφορετικά όργανα του φυτού. Ο αριθμός των κυττάρων που συμμετέχουν στην κατασκευή της τρίχας ποικίλλει. Ορισμένες τρίχες είναι μονοκύτταρες, ενώ άλλες είναι πολυκύτταρες. Οι πολυκύτταρες τρίχες αποτελούνται συνήθως από ένα κύτταρο βάσης που στηρίζει το υπόλοιπο τμήμα της τρίχας. Τα γειτονικά επιδερμικά κύτταρα διαφέρουν συνήθως από το κύτταρο της βάσης στο μέγεθος, στο σχήμα, στο πάχος του κυτταρικού τοιχώματος ή στο περιεχόμενο τους. Σημαντικό μορφολογικό χαρακτηριστικό είναι η πυκνότητα των τριχών δηλαδή ο αριθμός των τριχών ανά μονάδα επιφάνειας. Ορισμένα όργανα στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης τους φέρουν πυκνό στρώμα τριχών το οποίο συνήθως αποβάλλεται μέχρι την ενηλικίωση τους. Οι τρίχες της προσαξονικής επιφάνειας των φύλλων συνήθως απορρίπτονται στη διάρκεια της ανάπτυξης του φύλλου ενώ εκείνες της αποαξονικής επιφάνειας παραμένουν (Karabourniotis *et al.*, 1994). Παρά το γεγονός ότι παρατηρείται εξαιρετική ποικιλομορφία των ανατομικών χαρακτηριστικών τους στις διάφορες οικογένειες, ορισμένες φορές είναι ομοιόμορφες σε δεδομένη ταξινομική μονάδα αποτελώντας ταξινομικό κριτήριο (Urhof and Hummel, 1962; Theobald *et al.*, 1979).

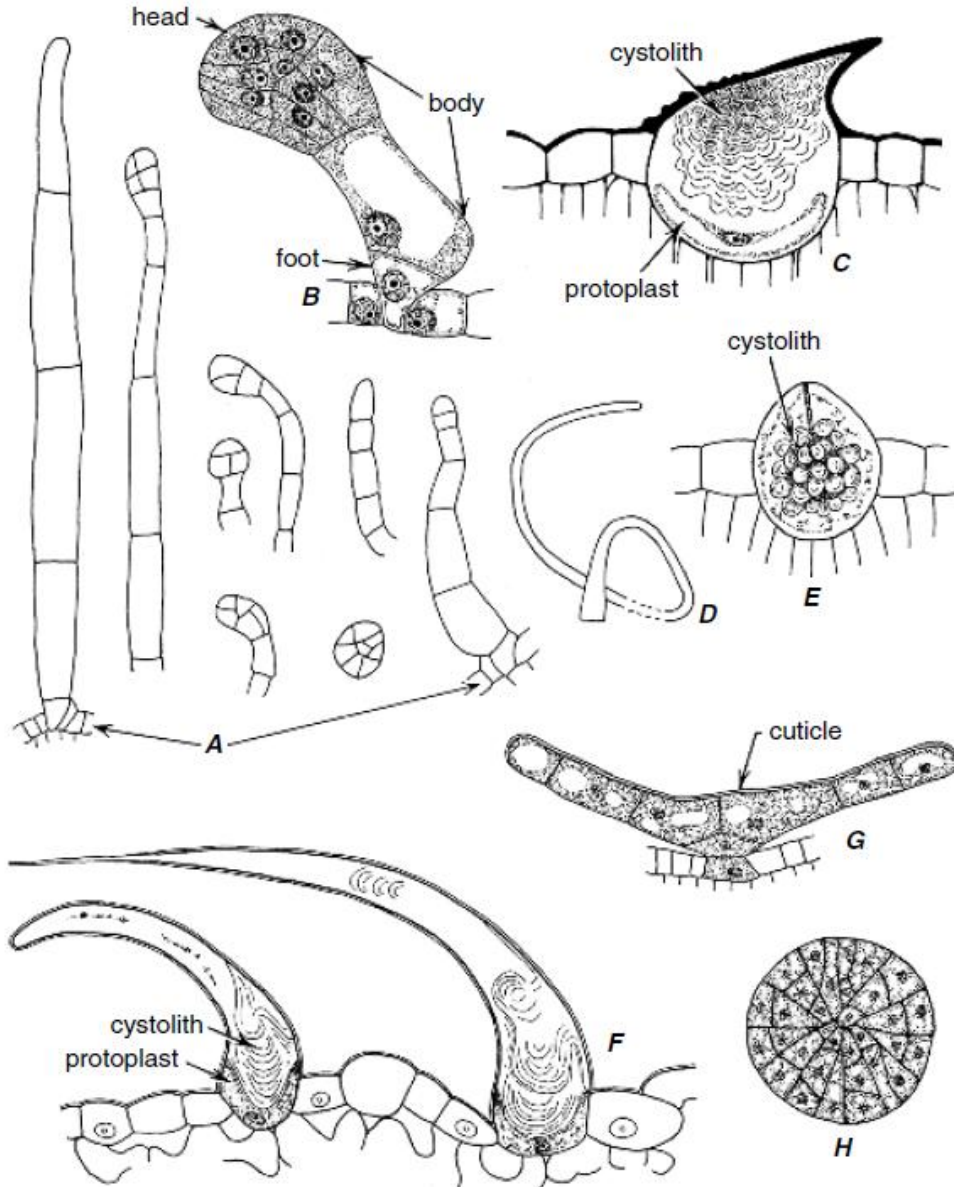
Τα φυτά που αναπτύσσονται σε ξηρά περιβάλλοντα, έχουν την τάση να δημιουργούν τριχώματα μεγαλύτερης πυκνότητας. (Ehleringer, 1984; Fahn, 1986; Fahn and Cutler, 1992). Μελέτες σε τέτοια φυτά δείχνουν ότι η υψηλότερη πυκνότητα μειώνει τον ρυθμό διαπνοής καθώς αυξάνεται η ανακλαστική ικανότητα έναντι της ηλιακής ακτινοβολίας, μειώνοντας έτσι την θερμοκρασία του φύλλου, και αυξάνεται το στρώμα αέρα στο οποίο γίνεται η εξάτμιση. Επίσης τα κύτταρα βάσης των τριχωμάτων φλοιοποιούνται (τουλάχιστον στα ξηρομορφικά φύλλα) εμποδίζοντας την αποπλαστική ροή νερού προς τα τριχώματα. (Fahn, 1986).

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα τριχώματα στα φύλλα επίφυτων (Bromeliads) από τα οποία γίνεται πρόσληψη νερού και θρεπτικών συστατικών (Owen and Thomson, 1991), ενώ στα φυτά του γένους *Atriplex* εκκρίνονται άλατα από τα τριχώματα καθιστώντας τα ικανά να αναπτυχθούν σε εδάφη με υψηλή αλατότητα (Mozafar and Goodin, 1970). Επίσης κατά τα αρχικά στάδια της ανάπτυξης του φύλλου, η εναπόθεση πολυφαινολών στα τριχώματα προστατεύει από την UV-B ακτινοβολία (Karabourniotis and Fasseas 1996). Ακόμα τα τριχώματα παρέχουν προστασία από τα έντομα (Wagner, 1991). Σε διάφορα είδη, η πυκνότητα είναι αρνητικά συσχετισμένη με τις προσβολές και την ωθέτηση. Τα αδενώδη τριχώματα μπορεί να παρέχουν και χημική άμυνα. Κάποια βλαβερά έντομα δηλητηριάζονται ενώ άλλα ακινητοποιούνται από τις εκκρίσεις (Levin, 1973).



Εικόνα 1.6 Τριχώματα. **A, B**, ασπιδοειδές τριχίδιο (*Olea*) σε επιφανειακή (**A**) και πλάγια (**B**) όψη. **C**, θυσσανώδες αστεροειδες τριχίδιο (*Quercus*). **E, F**, αστεροειδές τριχίδιο (*Sida*) σε επιφανειακή (**E**) και πλάγια (**F**) όψη. **G, H**, μονοκύτταρο τριχίδιο με δύο βραχίονες (*Lobularia*) σε επιφανειακή (**G**) και πλάγια (**H**) όψη. **I**, κυστολιθικό τριχίδιο (*Chenopodium*). **J**, τμήμα πολυκύτταρης τρίχας (*Portulaca*). (A-C, I, x210; D-H, J, x105) (Evert, 2006).

Τα τριχώματα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ανάλογα με την μορφολογία τους στις εξής κατηγορίες: α) **θηλές (Papillae)**, που είναι μικρών διαστάσεων αποφύσεις της επιδερμίδας, β) **απλές τρίχες (simple, unbranched)**, πολύ συνηθισμένες μονοκύτταρες ή πολυκύτταρες μη διακλαδιζόμενες, γ) **διακλαδιζόμενες τρίχες με δύο ως πέντε βραχίονες (two- to five-armed)** διαφόρων σχημάτων, δ) **αστεροειδείς τρίχες (stellate)**, έχουν μεγάλο αριθμό βραχιόνων (πάνω από πέντε) και σχήμα αστερία, ε) **ασπιδοειδείς τρίχες (scales, or peltate)**, συνήθως πεπλατυσμένες με δισκοειδή κεφαλή, στ) **τρίχες δενδρώδους μορφής (dendritic – branched)**, διακλαδιζόμενοι βραχίονες γύρω από έναν άξονα, ζ) **τρίχες εξειδικευμένων τύπων**, όπως είναι οι κνησμώδεις τρίχες (*stinging*) και οι κυστολιθικές τρίχες (*cystolith-containing*) (εικόνα 1.7; Theobald *et al.*, 1979)



Εικόνα 1.7 Τριχώματα. **A**, αδενώδεις (με πολυκύτταρες κεφαλές) και μη αδενώδεις τρίχες (*Nicotiana*). **B**, μεγενθυμένη αδενώδης τρίχα (*Nicotiana*). **C**, αγκιστροειδής τρίχα με κυστόλιθους (*Humulus*). **D**, μεγάλη περιελιγμένη μονοκύτταρη, και **E**, μικρή τρίχα με κυστόλιθους (*Boeberia*). **F**, αγκιστροειδής τρίχα με κυστόλιθους (*Cannabis*). **G**, **H**, αδενώδης ασπιδοειδής τρίχα (*Humulus*) σε πλάγια (**G**) και επιφανειακή (**H**) όψη. (A, F, x100; B, D, E, x310; C-G, x245; H, x490) (Evert, 2006)

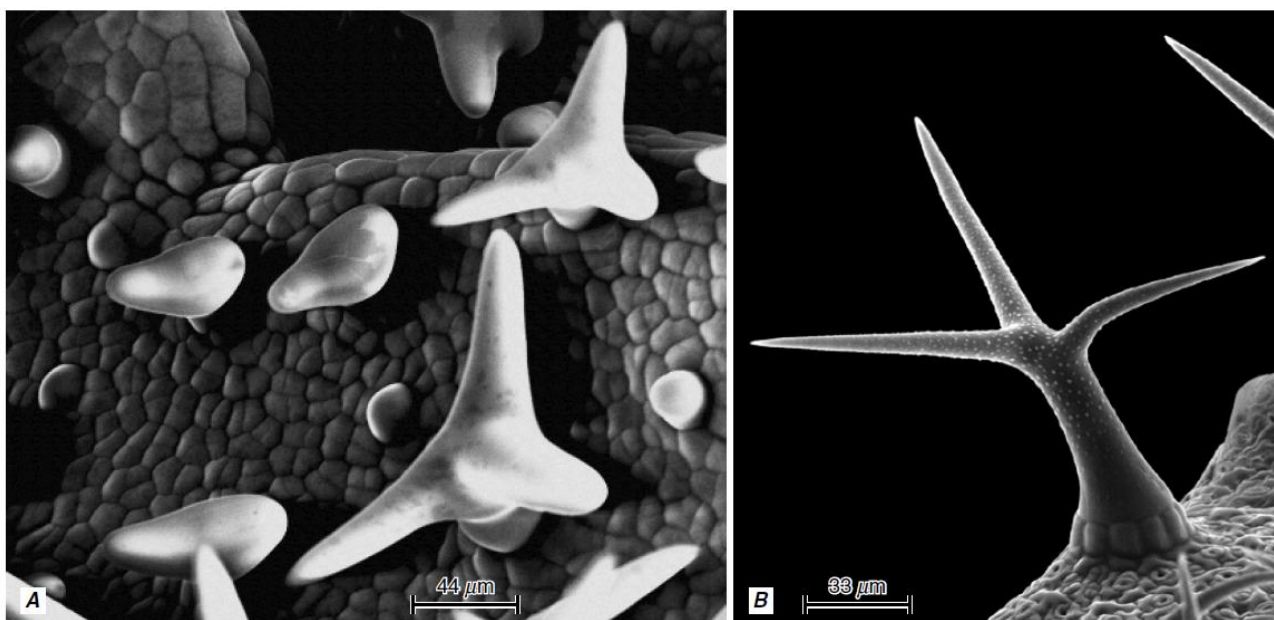
Παρά το γεγονός ότι παρατηρείται εξαιρετική ποικιλομορφία των ανατομικών χαρακτηριστικών τους στις διάφορες οικογένειες, οι τρίχες μπορούν να διακριθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τις αδενώδεις και τις μη αδενώδεις, αναλόγως αν λειτουργούν ως εκκριτικές δομές ή όχι (Peterson and Vermeer, 1984).

Οι αδενώδεις τρίχες, αφορούν δομές οι οποίες διατηρούν ενεργό τον πρωτοπλάστη τους και εκκρίνουν ευρύ φάσμα ουσιών, στο οποίο περιλαμβάνονται πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, λιπίδια, αιθέρια έλαια, άλατα, νέκταρ, πρωτεολυτικά ένζυμα, φλαβονοειδή και τερπένια (Peterson and Vermeer, 1984; Fahn, 1991). Οι ουσίες οι οποίες απεκκρίνονται από τις δομές αυτές έχουν όχι μόνο σημαντικούς αμυντικούς ρόλους έναντι φυτοφάγων εχθρών και παθογόνων αλλά λειτουργούν και ως μόρια προσέλκυσης επικονιαστών και διασπορέων σπερμάτων με σημαντική συμβολή στην επικονίαση και αναπαραγωγή του είδους (Fahn, 1991). Δευτερογενείς μεταβολίτες (κυρίως τερπένια και φαινολικές ενώσεις) οι οποίοι απεκκρίνονται χρησιμοποιούνται στην άμυνα των φυτών ως απωθητικών λήψης τροφής και με τοξική δράση έναντι εντόμων (Kelsey *et al.*, 1984; Taiz and Zeiger, 1991). Απλές φαινολικές ενώσεις παρουσιάζουν σημαντική αλληλοπαθητική δράση, ενώ ορισμένα ισοφλαβονοειδή είναι γνωστά για το ρόλο τους ως φυτοαλεξίνες (Taiz and Zeiger, 1991).

Η ωρίμανση των μη αδενωδών τριχών συνοδεύεται συνήθως από νέκρωση των κυττάρων τους και πλήρωση του νεκρού πλέον κυττάρου με αέρα (δημιουργία lumen). Η ύπαρξη του στρώματος του αέρα, επειδή έχει δείκτη διάθλασης σημαντικά διαφορετικό από εκείνον των κυτταρικών τοιχωμάτων, δημιουργεί ανακλαστικές επιφάνειες με συνέπεια όταν το τρίχωμα είναι πυκνό, η επιφάνεια των οργάνων να εμφανίζεται λευκή ή και ασημόχροη. Παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον το γεγονός της απώθησης του νερού από τα φυτικά μέρη όταν το τρίχωμα είναι πυκνό λόγω της ύπαρξης του αέρα στις τρίχες και της εφυμενίδας στην επιφάνεια τους (Uphof, 1962). Η ύπαρξη των μη αδενωδών τριχών θεωρείται ξηροθερμική προσαρμογή (Fahn, 1991). Οι τρίχες αυτές παίζουν αποφασιστικό ρόλο στη βελτίωση του θερμικού ισοζυγίου του ελάσματος και στην αποφυγή απωλειών νερού δίνοντας στα φυτά ορισμένα φυσιολογικά και οικολογικά πλεονεκτήματα, ιδιαίτερα σε ξηρά ή υψηλής ακτινοβολίας περιβάλλοντα (Ehleringer, 1984). Σε πολλές περιπτώσεις η απονέκρωση των μη αδενωδών τριχών ολοκληρώνεται πριν από την πλήρη έκπτυξη ελάσματος (*Sorbus*, *Mespilus*, *Salix*). Συνήθως οι τρίχες που διαθέτουν παχύτερα κυτταρικά τοιχώματα παραμένουν ζωντανές για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από αυτές που έχουν λεπτά. Τα κυτταρικά τοιχώματα των τριχών αποτελούνται κυρίως από κυτταρίνη, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρείται εναπόθεση ποικίλων ουσιών, μεταξύ των οποίων η λιγνίνη και η σουβερίνη (Uphof, 1962). Η εξωτερική επιφάνεια των κυτταρικών τοιχωμάτων των τριχών καλύπτεται από εφυμενίδα, το πάχος και η δομή της οποίας ποικίλλει σημαντικά ανάλογα με τη θέση του κυττάρου στην τρίχα (Fahn, 1986). Η αποτελεσματικότητα της άμυνας σχετίζεται άμεσα με την πυκνότητα του τριχώματος. Τα ώριμα φύλλα που έχουν χαμηλή πυκνότητα τριχών προσβάλλονται ευκολότερα και συχνότερα από τα νεαρά φύλλα που έχουν υψηλότερη πυκνότητα τριχών (Woodman and Fernandez, 1991). Ένα πολύ χαρακτηριστικό παράδειγμα, είναι η περίπτωση των τριχών του φυτού *Verbascum thapsus* στο οποίο η αποτελεσματικότητα των τριχών στην μηχανική θωράκιση των φύλλων διαφοροποιείται με την πάροδο του χρόνου. Τα γηραιότερα και με αραιότερο τρίχωμα φύλλα προσβάλλονται πιο συχνά από φυτοφάγους εχθρούς σε σχέση με τα νεαρότερα φύλλα (Woodman and Fernandez, 1991). Ο χαμηλός λόγος C/N και συνεπώς η φτωχή θρεπτική τους αξία είναι ένας επιπλέον λόγος που κάνει τις τρίχες αποτελεσματικό μέσο προστασίας έναντι παθογόνων. Τα κυτταρικά τοιχώματα των τριχών είναι δύσπεπτα και δεν αποτελούν προσφιλές υπόστρωμα για έντομα και παθογόνα (Uphof, 1962; Steadman and Saik, 1988).

1.2.2 Το τρίχωμα στο *A. Thaliana*

Το πρότυπο ανάπτυξης και διαφοροποίησης των τριχωμάτων παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Τα τριχίδια του φυτού *Arabidopsis thaliana* έχουν αποτελέσει μοντέλο. Οι τρίχες είναι τα πρώτα επιδερμικά κύτταρα που διαφοροποιούνται στο φύλλο. (Larkin *et al.*, 1996). Η έναρξη και η ωρίμανση τους ακολουθεί βασιπεταλική κατεύθυνση στην προσαξονική επιφάνεια του φύλλου. Το ώριμο τριχίδιο είναι μονοκύτταρο και έχει τρεις διακλαδώσεις. Γενικά η ανάπτυξη χωρίζεται σε δύο φάσεις (Hülskamp, 2000; Hülskamp and Kirik, 2000). Η πρώτη φάση ξεκινάει όταν το πρόδρομο κύτταρο του τριχιδίου ενδο-διπλασιάζει το γενετικό του υλικό και δημιουργεί μια απόφυση στην επιφάνεια του φύλλου. Μετά από δύο-τρεις ενδο-διπλασιασμούς, αναπτύσσεται περισσότερο και γίνονται οι πρώτες δύο διακλαδώσεις. Ο τέταρτος γύρος ενδο-διπλασιασμού λαμβάνει χώρα μετά την πρώτη διακλάδωση (τελικά από 2C προκύπτει 32C) (Hülskamp *et al.*, 1994) και έπειτα η ακραία διακλάδωση διαιρείται κάθετα προς το επίπεδο των πρώτων διακλαδώσεων και έτσι δημιουργείται η τρίτη. Κατά την δεύτερη φάση ανάπτυξης, έχουμε την ταχεία αύξηση μεγέθους, την πάχυνση των κυτταρικών τοιχωμάτων και τελικά την ωρίμανση της τρίχας (εικόνα 1.8).



Εικόνα 1.8 Φωτογραφίες με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης της προσαξονικής επιφάνειας του φύλλου στο *Arabidopsis*. **A**, στάδια μορφογένεσης των τριχωμάτων σε ένα φύλλο. **B**, ώριμο τριχίδιο. (Evert, 2006).

Αρκετοί μεταγραφικοί παράγοντες που καθορίζουν την μορφογένεση, την ανάπτυξη και την διαφοροποίηση της τρίχας στο φύλλο του *Arabidopsis thaliana* έχουν χαρακτηριστεί. Η έναρξη της τριχογένεσης επάγεται από ένα σύμπλοκο μεταγραφικών παραγόντων που αποτελείται από α) μια πρωτεΐνη που περιέχει μια περιοχή MYB τύπου R2R3 και κωδικοποιείται από το γονίδιο *GLABRA1* (*GL1*), β) μια πρωτεΐνη με δομή bHLH που κωδικοποιείται από το γονίδιο *GLABRA3* (*GL3*) και γ) μια πρωτεΐνη που περιέχει WD-40 επαναλήψεις και κωδικοποιείται από το γονίδιο *TRANSPARENT TESTA GLABRA* (*TTG*) (Schellmann και Hülskamp, 2005). Τα μεταλλάγματα *gl1* και *ttg1* δεν παράγουν καθόλου τρίχες στο φύλλο (Walker *et al.*, 1999) Η χωροθέτηση των τριχωμάτων καθορίζεται από μια οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων με πιο καλά μελετημένο το γονίδιο *TRYPTICHON* (*TRY*) (Schellmann *et al.*, 2002). Η πρωτεΐνη TRY θεωρείται ότι μετακινείται μέσω πλασμοδεσμάτων από τα κύτταρα που διαφοροποιούνται σε τρίχα προς τα γειτονικά κύτταρα και αναστέλλει την τριχογένεση, μια διαδικασία που ονομάζεται παράπλευρη

αναστολή (Larkin *et al.*, 2003). Η πρωτεΐνη TRY ανταγωνίζεται με την GL1 στην πρόσδεση με την GL3, εμποδίζοντας την δημιουργία του συμπλόκου GL1/GL3 και συνεπώς την τριχογένεση (Esch *et al.*, 2003). Στα μεταλλάγματα *try* τα τριχίδια είναι ενωμένα σε ομάδες (Schnittger *et al.*, 1999)

Η ανάπτυξη των τριχωμάτων ελέγχεται επίσης από ορμονικά και περιβαλλοντικά σιγνάλα και ρυθμίζεται θετικά από συνθήκες μακράς ημέρας και τις γιβερελλίνες (GAs) (Chien and Sussex, 1996; Telfer *et al.*, 1997). Μεταλλάγματα που στερούνται τις GAs δεν παράγουν τριχώματα και η εξωγενής παροχή τους αποκαθιστά την ανάπτυξη τριχωμάτων. Φυτικές ορμόνες που σχετίζονται με την άμυνα, επηρεάζουν την πυκνότητα των τριχωμάτων. Το γιασμονικό οξύ ενεργεί συνεργιστικά με τις γιβερελλίνες για την αύξηση της πυκνότητας στο *Arabidopsis* ενώ το σαλικυλικό οξύ την μειώνει (Traw and Bergelson, 2003)

1.2.3 Οικοφυσιολογία των τριχωμάτων

Τα τριχώματα ως πρώτη γραμμή άμυνας του φυτού, παρέχουν προστασία από βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις. Οι μέχρι σήμερα γνωστές λειτουργίες των τριχωμάτων, φαίνονται συνοπτικά στον πίνακα 1.1

Ιδιότητες / Λειτουργίες	Τύπος Τριχωμάτων
Μειωμένη κίνηση εντόμων	ΜΑ & ΑΔ
Ρύθμιση θερμοκρασίας	ΜΑ & ΑΔ
Προστασία από ηλιακή ακτινοβολία (UV)	ΜΑ & ΑΔ
Μειωμένη απώλεια νερού	ΜΑ & ΑΔ
Μειωμένη μηχανική απόξεση	ΜΑ & ΑΔ
Μειωμένη ενυδάτωση φύλλου	ΜΑ & ΑΔ
Μειωμένη φωτοσύνθεση λόγω ανάκλασης	ΜΑ & ΑΔ
Επιδερμική ομοιόσταση Ca ⁺⁺	ΜΑ & ΑΔ
Αποτροπή εντόμων και φυτοφάγων	ΑΔ
Ακινητοποίηση εντόμων	ΑΔ
Προσέλκυση επικονιαστών	ΑΔ
Έκκριση ιόντων και βαρέων μετάλλων	ΑΔ
Αλληλοπάθεια	ΑΔ
Απορρόφηση νερού και θρεπτικών	ΜΑ

Πίνακας 1.1 Γνωστές λειτουργίες τριχωμάτων. ΜΑ: Μη Αδενώδεις, ΑΔ: Αδενώδεις (Wagner *et al.*, 2004)

Ακολουθούν ορισμένα χαρακτηριστικά παραδείγματα των μηχανισμών που έχουν υιοθετηθεί.

Στις αδενώδεις τρίχες του φυτού *Solanum berthaultii*, συσσωρεύεται μεγάλη ποσότητα του ενζύμου πολυφαινολική οξειδάση (Polyphenol oxidase) που φτάνει έως το 45% της υδατοδιαλυτής πρωτεΐνης. Στην προσπάθεια τους να τραφούν τα έντομα (όπως οι αφίδες), προκαλούν θραύση των τριχωμάτων και επάγεται μια ταχεία οξείδωση και πολυμερισμός των φαινολικών συστατικών με αποτέλεσμα να παγιδευτούν τα έντομα ή να αποφράξει η στοματική κοιλότητα τους (Kowalski *et al.* 1992).

Το γεράνι *Pelargonium x hortorum* (L.), εκκρίνει από τα τριχώματα του ανακαρδικά οξέα τα οποία είναι τοξικά για το *Tetranychus urticae* (Grazzini *et al.*, 1995). Επίσης αρκετά φυτά επιστρατεύουν τερπενοειδή στα τριχώματα τους για να αμυνθούν. Στην τομάτα *Lycopersicon hirsutum f. hirsutum* (Solanaceae) έχουμε σεσκιτερπένια τα οποία είναι τοξικά για τις προνύμφες του *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae, Carter *et al.* 1989) ενώ τα σεσκιτερπένια του γένους *Helianthus* είναι τοξικά για την προνύμφη του *Homoeosoma electellum* (Rogers *et al.*, 1987). Ίσως το πιο γνωστό σεσκιτερπένιο που περιέχεται σε φυτικό τρίχωμα είναι η αρτεμισίνη. Παράγεται από το *Artemisia annua* και είναι πολύ τοξικό για έντομα, μύκητες και άλλα φυτά. Επίσης είναι πολύ αποτελεσματικό φάρμακο κατά της ελονοσίας ακόμα και για πολύ ανθεκτικά στελέχη του *Plasmodium falciparum*. (Duke, 1994).

Αλκαλοειδή όπως η νικοτίνη, η νορνικοτίνη και η αναβασίνη που εκκρίνονται από τα τριχώματα του φύλλου του καπνού (*Nicotiana*), προκαλούν παράλυση στην αφίδα *Myzus persicae* (Levin, 1973). Οι κνησμώνιδες τρίχες ειδών της οικογένειας Urticaceae και Euphorbiaceae προκαλούν κνησμό και ερεθισμό του δέρματος σε φυτοφάγους οργανισμούς (Fahn, 1979). Επίσης η ρεβιθιά (*Cicer arietinu*) εκκρίνει οξαλικό οξύ από τα τριχώματα της το οποίο προκαλεί αναπτυξιακά προβλήματα στην προνύμφη *Heliothis armigera* (Yoshida *et al.*, 1995).

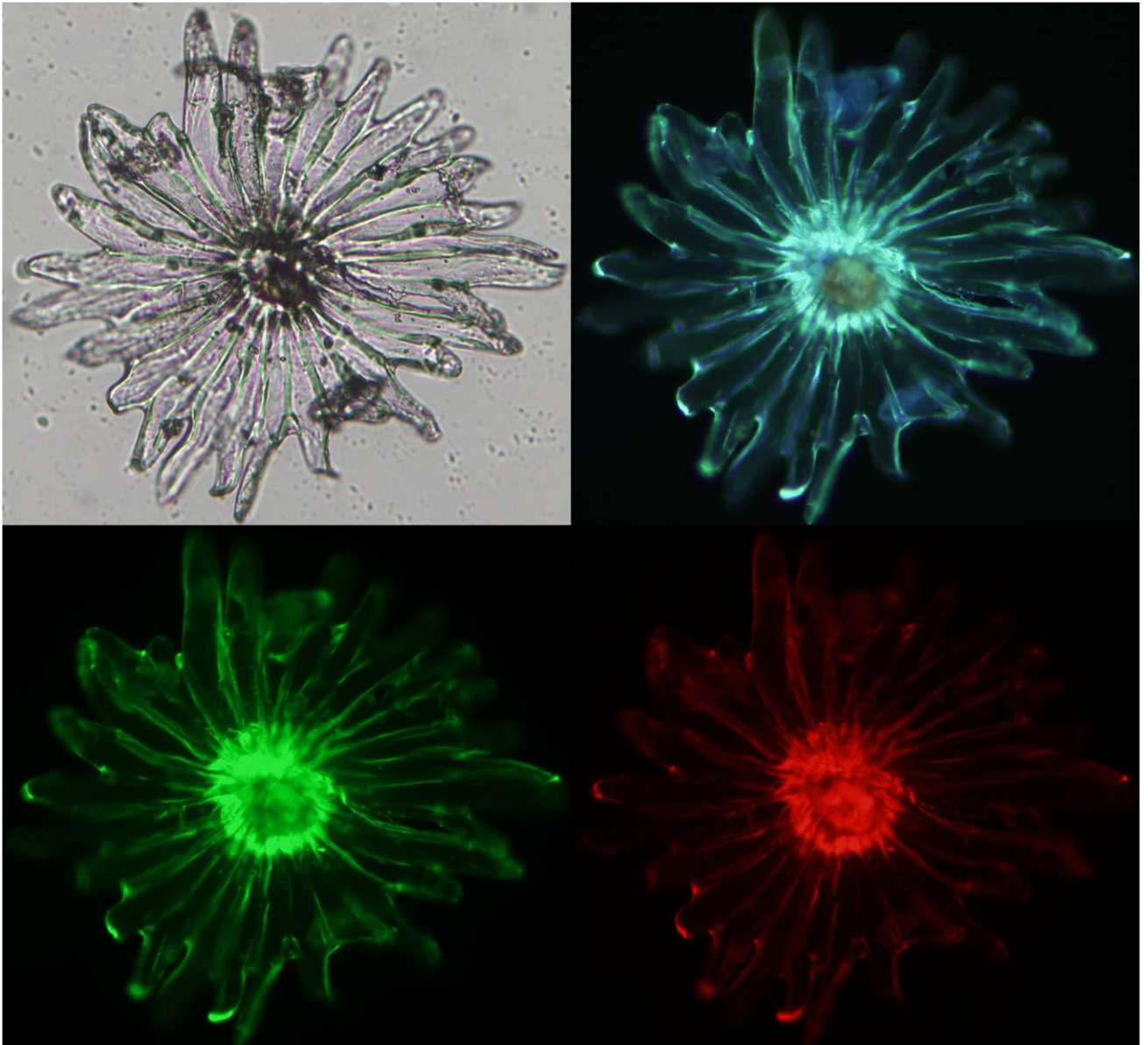
Τα τριχώματα μειώνουν τις διαπνευστικές απώλειες νερού (Fahn and Cutler, 1992), προστατεύουν από την υπεριώδη ακτινοβολία (Karabourniotis *et al.*, 1992) και από την υψηλής έντασης ορατή ακτινοβολία (Karabourniotis *et al.*, 1998). Επίσης αποτελούν μηχανικό φράγμα έναντι εντόμων (Woodman and Fernandez, 1991) και παθογόνων μικροοργανισμών (Allen *et al.*, 1991).

Ένα άλλο χαρακτηριστικό των τριχωμάτων είναι η παραγωγή ουσιών που προκαλούν αλληλοπάθεια και εμποδίζουν έτσι την ανάπτυξη άλλων φυτών. Τέτοια δράση θεωρείται ότι έχει η φυτοτοξίνη 1,8-κινεόλη (μονοτερπένιο) που παράγεται από φυτά του γένους *Salvia* (Kelsey *et al.*, 1984)

Τέλος γίνεται προσπάθεια κατανόησης του ρόλου των τριχωμάτων στις τριτροφικές αλληλεπιδράσεις (tritrophic interactions). Για παράδειγμα, η αύξηση της πυκνότητας των τριχωμάτων στο φύλλο της σόγιας (*Glycine max*), έχει σαν αποτέλεσμα την αυξημένη θήρευση φυτοφάγων εντόμων από το κόκκινο μυρμηγκί (*Solenopsis invicta*) (Styrsky *et al.*, 2006). Αυτές οι αλληλεπιδράσεις μπορεί να ευνοήσουν την αποτελεσματικότητα της βιολογικής καταπολέμησης των παρασίτων.

1.2.4 Μη Αδενώδεις Τρίχες Ελιάς

Οι μη αδενώδεις τρίχες της ελιάς με βάση τα μορφολογικά και ανατομικά χαρακτηριστικά τους κατατάσσονται στις ασπιδοειδείς τρίχες (scales ή peltate hairs) (Fahn, 1991). Πρόκειται για πεπλατυσμένες, έμμισχες, πολυκύτταρες τρίχες με χαρακτηριστικό σχήμα ασπίδας. Αποτελούνται από ένα κύτταρο βάσης και μια πολυκύτταρη κεφαλή (εικόνα 1.6, 1.10). Το κύτταρο της βάσης είναι βυθισμένο στην επιδερμίδα και συνήθως διαφέρει από τα γειτονικά επιδερμικά κύτταρα στο μέγεθος, στο σχήμα, στο πάχος του κυτταρικού τοιχώματος ή στο περιεχόμενο του. Τα επιδερμικά κύτταρα τα οποία περιβάλλουν το βασικό τμήμα της τρίχας διαφοροποιούνται σε μορφή και μέγεθος και ονομάζονται βοηθητικά κύτταρα. Η ιδιόμορφη συγκρότηση των κυττάρων αυτών είναι ορατή μόνο από το εσωτερικό του φύλλου (Karabourniotis *et al.*, 1995).



Εικόνα 1.9 Μη αδενώδης τρίχα της ελιάς σε ορατό και UV φάσμα με διάφορα φίλτρα.

Η μορφολογία του κυττάρου της βάσης είναι χαρακτηριστική των ασπιδοειδών μη αδενωδών τριχών που παρουσιάζονται σε πολλά είδη της οικογένειας Oleaceae (Urhof, 1962). Στα νεαρά στάδια ανάπτυξης τους, οι μη αδενώδεις τρίχες της ελιάς παρουσιάζουν αξιοσημείωτη ομοιότητα με αδενώδεις τρίχες (Fahn, 1986; Karabourniotis et al., 1996). Η ανάπτυξη των ασπιδοειδών τριχών περιλαμβάνει αρχικά το σχηματισμό μιας προεξοχής (papilla) ενός επιδερμικού κυττάρου. Στη συνέχεια δημιουργείται περικλινές τοίχωμα, το οποίο χωρίζει την papilla στο κύτταρο της βάσης και στο τελικό κύτταρο απ' το οποίο στη συνέχεια θα δημιουργηθεί η πολυκύτταρη κεφαλή της τρίχας (Karabourniotis et al., 1998).

Μετά την ολοκλήρωση της έκπτυξης του ασπιδοειδούς τμήματος, εναποτίθεται σουβερίνη στο κύτταρο της βάσης, με συνέπεια τη διακοπή της επικοινωνίας του με το υπόλοιπο φύλλο. Το γεγονός αυτό προκαλεί τη νέκρωση της τρίχας και το σχηματισμό μιας κοιλότητας. Εναπόθεση σουβερίνης πραγματοποιείται και στο κυτταρικό τοίχωμα των κυττάρων της ασπίδας (Fahn, 1986).

Παρατηρήσεις των φύλλων της ελιάς με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης δείχνουν σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις εναποθέσεις υλικών με διαφορετικές κρυσταλλικές δομές. Τα υλικά αυτά είναι γνωστά ως επιεφυμενιδικοί κηροί. Χημικά το στρώμα των κηρών των φύλλων της ελιάς αποτελείται από ομόλογες

σειρές η αλκανίων, αλδεϊδών, αλκοολών, ελεύθερων λιπαρών οξέων (κυρίως τριτερπενοειδών) και ακυλιωμένων εστέρων (μεθύλ-φαινύλ-εστέρες). Τα κυριότερα συστατικά των κηρών των φύλλων της *Olea europaea cvs Coratina* και *Cipressino* είναι τα πεντακυκλικά τετρατερπένια (Bianchi *et al.*, 1993).

Όσον αφορά στην πυκνότητα του τριχώματος των φύλλων της ελιάς, μειώνεται τόσο στην προσαξονική όσο και στην αποαξονική επιφάνεια, καθώς το φύλλο αναπτύσσεται. Η μείωση αυτή είναι περισσότερο έντονη στην προσαξονική πλευρά, με αποτέλεσμα τα ώριμα φύλλα να μην έχουν ουσιαστικά τρίχωμα στην επιφάνεια αυτή. Την ίδια τάση, όχι όμως τόσο έντονη, ακολουθεί και η αποαξονική επιφάνεια, η οποία διατηρεί ένα ποσοστό των αρχικών τριχών σε όλη τη ζωή του φύλλου (Karabourniotis *et al.*, 1994; 1995).

1.3 ΝΕΕΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ

Τις τελευταίες τρεις δεκαετίες, η τεχνολογία αλληλούχισης DNA έχει κάνει μεγάλα άλματα.

Η μεθοδολογίες έχουν εξελιχθεί και από σήμανση με ραδιενέργεια έχουμε περάσει σε σήμανση με φθορίζουσες ουσίες, από ηλεκτροφόρηση σε πολυακρυλαμίδη περάσαμε σε ηλεκτροφόρηση επί τριχοειδούς (Tettelin and Feldblyum, 2009).

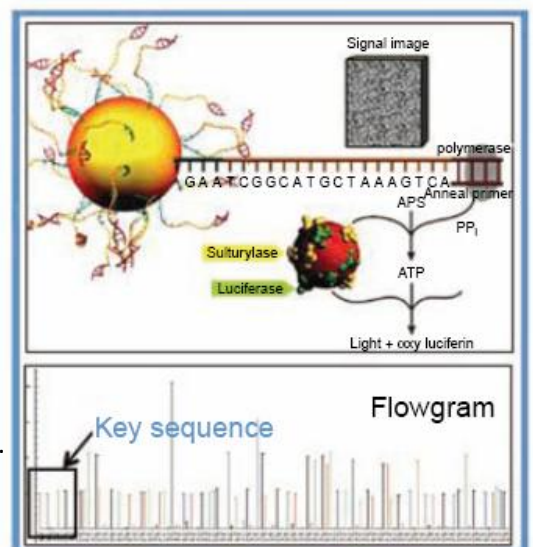
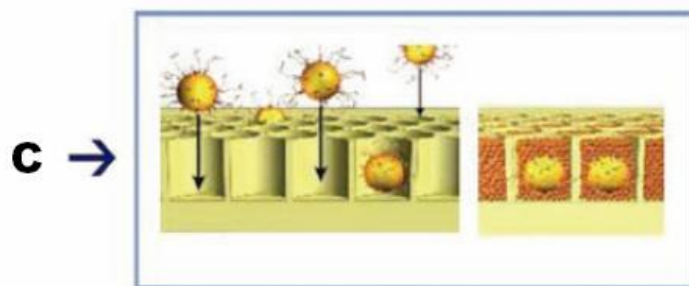
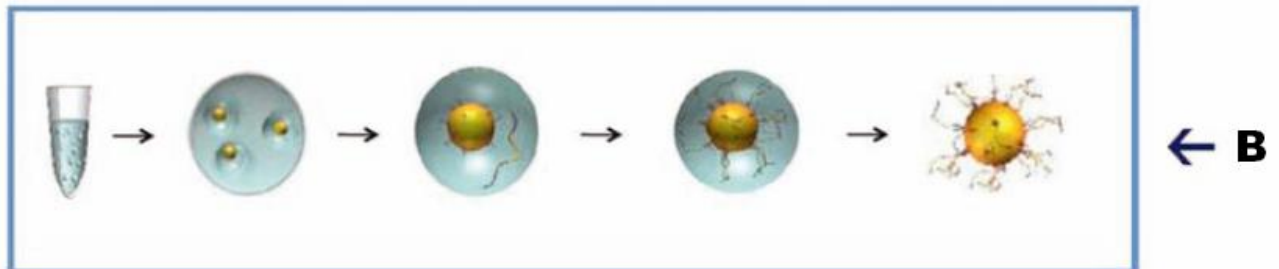
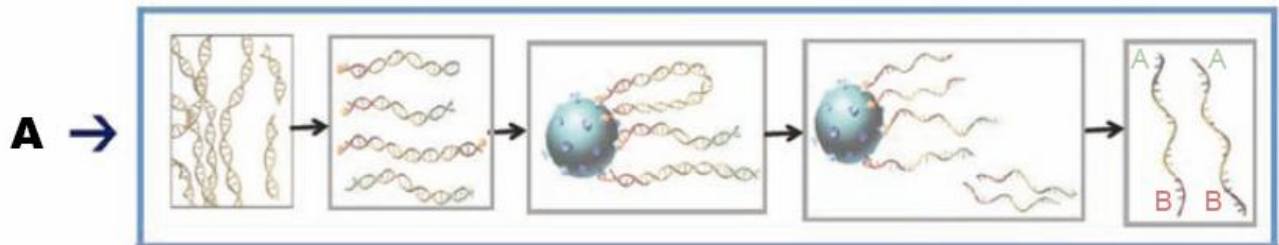
Τις αλλαγές τις καθοδηγεί η ανάγκη για περισσότερη, γρηγορότερη και φθηνότερη αλληλούχιση DNA. Έτσι έχουν αναπτυχθεί πλατφόρμες αλληλούχισης με υψηλή απόδοση (high throughput) όπου η ταχύτητα και το κόστος σχετικά με τον αριθμό βάσεων που αλληλουχούν είναι δραματικά μικρότερο σε σύγκριση με την κλασική μέθοδο αλληλούχισης (Sanger). Μέχρι στιγμής τρεις πλατφόρμες next generation ξεχωρίζουν, η *GS FLX (454)*, η *Illumina (Solexa)* και η *AB SOLiD*.

1.3.1 Genome Sequencer FLX System (454)

Η πλατφόρμα της *Roche GS FLX*, βασίζεται στην τεχνολογία αλληλούχισης «κατά την σύνθεση» (pyrosequencing) που αναπτύχθηκε από την 454 Life Sciences και ήταν η πρώτη διαθέσιμη πλατφόρμα «next generation» αλληλούχισης (Margulies *et al.*, 2005). Το δείγμα DNA θραυσατοποιείται σε μικρά τμήματα. Δύο μικροί αντάπτορες (A&B) λιγοποιούνται στα θραύσματα. Οι αντάπτορες περιέχουν αλληλουχίες για ενίσχυση και αλληλούχιση καθώς και μια «ακολουθία κλειδί». Ο αντάπτορας B συνδέεται στο 5' άκρο του με βιοτίνη ώστε να ακινητοποιηθούν τα θραύσματα σε μαγνητικά σφαιρίδια (beads) με επικάλυψη στρεπταβιδίνης. Τα δίκλινα θραύσματα δένουν στα σφαιρίδια και στην συνέχεια αποδιατάσσονται ώστε να ελευθερωθεί η συμπληρωματική ακολουθία η οποία περιέχει τον A και τον B αντάπτορα. Αυτές οι ακολουθίες αποτελούν την μητρική ssDNA βιβλιοθήκη. Για την ενίσχυση τους στο *GS FLX*, χρησιμοποιείται η τεχνική της γαλακτωματοποίησης (emulsion-based clonal amplification, emPCR) (Dressman *et al.*, 2003). Η ssDNA βιβλιοθήκη στη συνέχεια υβριδίζει σε άλλα σφαιρίδια τα οποία έχουν επικάλυψη με ακινητοποιημένους εκκινητές. Η διαδικασία αυτή έχει βελτιστοποιηθεί ώστε να παράγονται σφαιρίδια που στο καθένα έχει υβριδίσει μόνο ένα θραύσμα. Στη συνέχεια τα σφαιρίδια μαζί με την βιβλιοθήκη, γαλακτωματοποιούνται μαζί με τα αντιδραστήρια που απαιτούνται για την ενίσχυση σε ένα διάλυμα (water-in-oil). Κάθε σφαιρίδιο φέρει ένα θραύσμα της βιβλιοθήκης και παγιδεύεται σε ένα γαλάκτωμα όπου λαμβάνει χώρα μια ανεξάρτητη αντίδραση PCR. Μετά την ενίσχυση, τα σφαιρίδια ελευθερώνονται και το κάθε ένα φέρει πολλά αντίγραφα του ίδιο αρχικού ssDNA. Για την αλληλούχιση, τα σφαιρίδια τοποθετούνται σε μια πλάκα που φέρει πηγάδια (PicoTiterPlate), μαζί με σφαιρίδια που περιέχουν τα απαραίτητα ένζυμα καθώς και σφαιρίδια επιστοίβασης.

Σε ρευστή μορφή προσθέτονται τα νουκλεοτίδια, ενός τύπου κάθε φορά και με συγκεκριμένη σειρά. Όταν ένα νουκλεοτίδιο είναι συμπληρωματικό με την μήτρα, ενσωματώνεται στην νεοσυντιθέμενη αλυσίδα από την πολυμεράση.

Η ενσωμάτωση συνοδεύεται από ισομοριακή απελευθέρωση ενός πυροφωσφορικού (PPi). Το πυροφωσφορικό μόριο μετατρέπεται σε ATP από την σουλφουρυλάση χρησιμοποιώντας φωσφοθειική αδενοσίνη (APS). Στη συνέχεια το ATP υδρολύεται από την λουσιφεράση χρησιμοποιώντας λουσιφερίνη και παράγεται οξυλουσιφερίνη και φώς. Η εκπομπή φωτός ανιχνεύεται από μια κάμερα CCD. Η ένταση του φωτός που εκπέμπεται από ένα συγκεκριμένο πηγάδι είναι ανάλογη με τον αριθμό των νουκλεοτιδίων που ενσωματώθηκαν. Όσα νουκλεοτίδια δεν ενσωματώθηκαν, καταστρέφονται από την απυράση. Έτσι ολοκληρώνεται ένας κύκλος αντιδράσεων με ένα νουκλεοτίδιο, στον δεύτερο κύκλο προστίθεται ένα άλλο νουκλεοτίδιο κτλ. Μετά την ολοκλήρωση έχουμε ένα προφίλ εκπομπών από κάθε πηγάδι το οποίο αντιστοιχίζεται στην μητρική ακολουθία που υπήρχε στο σφαιρίδιο. Τα αποτελέσματα επεξεργάζονται ώστε να αφαιρεθούν χαμηλής ποιότητας διαβάσματα, ανάμεικτες ακολουθίες (πάνω από ένα τμήμα DNA ανά σφαιρίδιο) και αλληλουχίες που δεν φέρουν την αρχική «ακολουθία κλειδί». (εικόνα 1.10, πίνακας 1.2)



Εικόνα 1.10 Σύνοψη της λειτουργίας του Roche/454.

A, Προετοιμασία της ss cDNA βιβλιοθήκης.

B, Μοναδιαία ενίσχυση των τμημάτων σε γαλάκτωμα.

C, εναπόθεση των σφαιριδίων στην πλάκα PicoTiterPlate.

D, Αλληλούχιση κατά την σύνθεση (www.454.com)

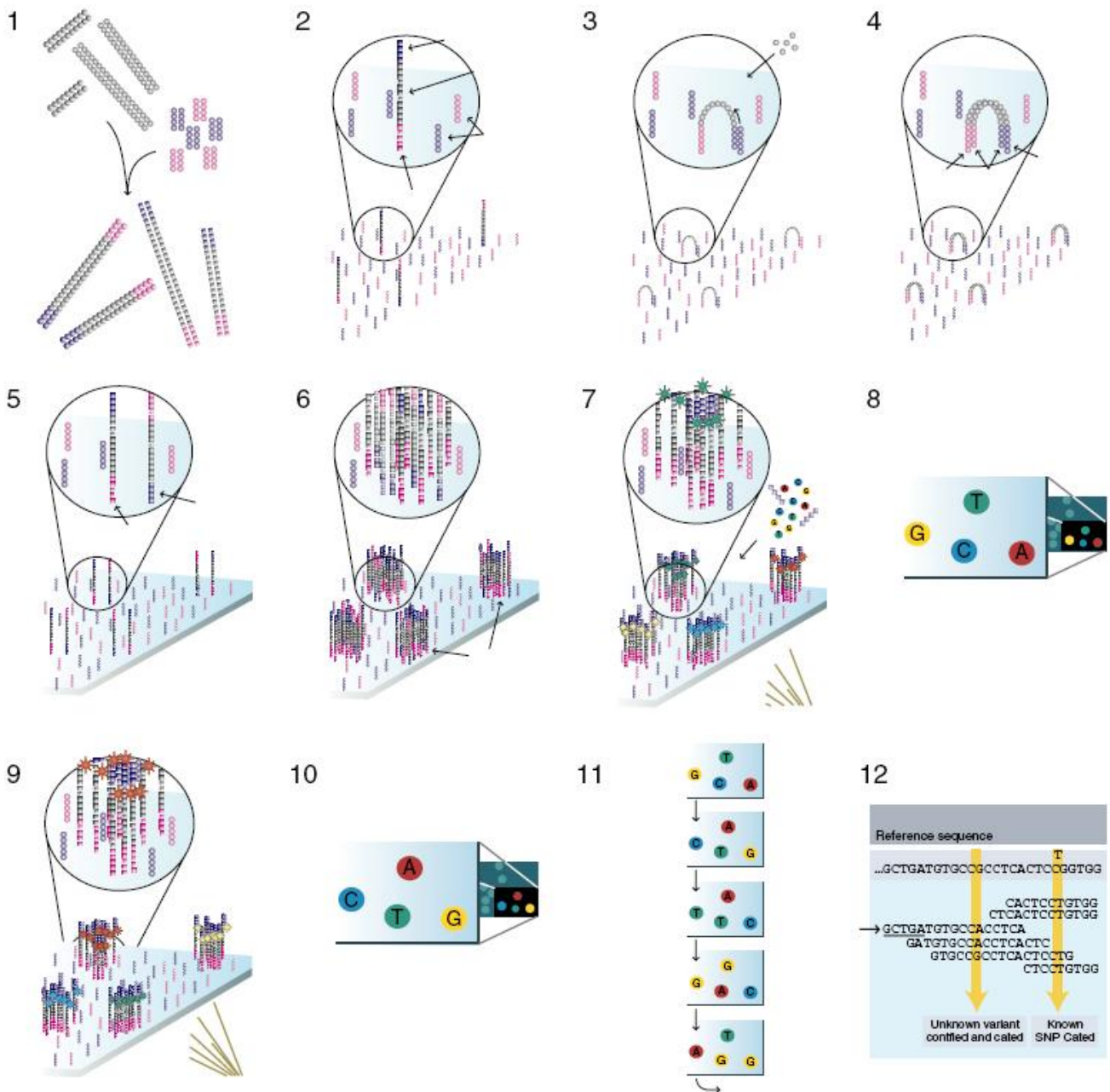
D →

Ένα μειονέκτημα του pyrosequencing είναι η αδυναμία αλληλούχισης ομοπολυμερών ακολουθιών όπως τα polyAs καθώς και το κόστος ανά βάση είναι υψηλότερο σε σχέση με τις άλλες δύο πλατφόρμες (SOLiD και Solexa) (Rothberg and Leamon, 2008). Το μεγάλο πλεονέκτημα του pyrosequencing έναντι των άλλων δύο είναι το μέγεθος των διαβασμάτων (Metzker, 2009). Σε 10 ώρες μπορούν να αλληλουχηθούν 1.000.000 ανεξάρτητα μόρια DNA μέσου μεγέθους 400bp (0.4 Gb).

1.3.2 The Illumina (Solexa) Genome Analyzer

Η πλατφόρμα αλληλούχισης της Solexa, είναι εμπορικά διαθέσιμη από το 2006. Η αρχή λειτουργίας βασίζεται στην αλληλούχιση «κατά την σύνθεση». Το DNA θραυσματοποιείται σε κομμάτια μικρότερα των 800 βάσεων. Τα άκρα των θραυσμάτων γίνονται τυφλά, φωσφορυλιώνονται, και προστίθεται μια αδενίνη στα 3' άκρα. Έπειτα λιγοποιούνται αντάπτορες με μία θυμίνη και ακολουθεί αποδιάταξη και υβριδοποίηση σε συμπληρωματικούς αντάπτορες που είναι ακινητοποιημένοι σε μια στερεή επιφάνεια. Κάθε μονόκλωνο τμήμα που είναι ακινητοποιημένο στο ένα άκρο, δημιουργεί μια δομή «γέφυρας» λόγω υβριδισμού του άλλου άκρου του με κάποιον γειτονικό ακινητοποιημένο αντάπτορα. Προστίθενται τα απαραίτητα αντιδραστήρια και ακολουθεί ενίσχυση με «bridge PCR» αφού οι αντάπτορες λειτουργούν ως εκκινήτες. (Adessi *et al.*, 2000 ; Fedurco *et al.*, 2006). Μετά από αρκετούς κύκλους, έχουμε περίπου 1000 αντίγραφα του αρχικού ssDNA δημιουργώντας ένα cluster. Ακολουθεί η σύνθεση DNA και η αλληλούχιση με προσθήκη των τεσσάρων νουκλεοτιδίων «ανάστροφου τερματισμού» που το καθένα έχει σημανθεί με διαφορετική φθορίζουσα χρωστική. Κατά την σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας, ανιχνεύεται από μια κάμερα CCD ο τύπος του νουκλεοτιδίου που ενσωματώθηκε (λόγω φθορισμού) καθώς και η θέση του πάνω στην επιφάνεια. Στην συνέχεια αφαιρείται από το 3' άκρο της βάσης η ομάδα τερματισμού και η φθορίζουσα χρωστική και ακολουθεί άλλος ένας κύκλος. Έτσι συνθέτοντας την συμπληρωματική ακολουθία και ανιχνεύοντας βάση-βάση τον φθορισμό, γίνεται αλληλούχιση του cluster και κατ'επέκταση του αρχικού ssDNA. (εικόνα 1.11, πίνακας 1.2)

Το 2008 έγινε μια αναβάθμιση (Genome Analyzer II) και πλέον μετά την ολοκλήρωση της αλληλούχισης, οι μητρικές αλυσίδες αναγεννούνται *in situ* και ακολουθεί δεύτερος γύρος αλληλούχισης από το άλλο άκρο. Αρχικά τα τμήματα που αλληλουχήθηκαν αφαιρούνται, γίνεται «bridge PCR» στις συμπληρωματικές ακολουθίες και ακολουθεί ξανά αλληλούχιση. Έτσι (paired-end sequencing) μπορούν να αλληλουχηθούν τμήματα μεγέθους 2x100 bp από θραύσματα μεγέθους 200bp έως 5kb και σε κάθε «τρέξιμο» το Genome Analyzer II αλληλουχεί 45-50 Gb (γιγαβάσεις). Σε σύγκριση με την κλασική μέθοδο αλληλούχισης (Sanger), η πλατφόρμα της Illumina, παράγει τρομακτικά περισσότερα αποτελέσματα με πολύ λιγότερο κόστος ανά βάση και σε λιγότερο χρόνο αλλά η πιθανότητα λάθους είναι μεγαλύτερη (Metzker, 2009). Τα λάθη κατά την αλληλούχιση μπορούν να διορθωθούν εάν υπάρχει αρκετή επικάλυψη μεταξύ των διαβασμάτων ωστόσο το μικρό τους μέγεθος το καθιστά δύσκολο (Lander and Waterman, 1988).



Εικόνα 1.11 Σύνοψη της λειτουργίας της πλατφόρμας Illumina.

- 1, Προετοιμασία του δείγματος DNA. 2, Προσκόλληση των τμημάτων στην επιφάνεια.
- 3, Ενίσχυση με «bridge PCR». 4, Δημιουργία δίκλωνων τμημάτων. 5, Αποδιάταξη αυτών.
- 6, Ενίσχυση. 7, Προσδιορισμός πρώτης βάσης. 8, Καταγραφή σήματος.
- 9, Προσδιορισμός δεύτερης βάσης. 10, Καταγραφή σήματος.
- 11, Αλληλούχηση μετά από πολλούς κύκλους. 12, Στοιχισμός αποτελεσμάτων (www.illumina.com)

1.3.3 The Applied Biosystems SOLiD System

Η πλατφόρμα AB SOLiD βασίζεται στην τεχνολογία αλληλούχισης «μέσω λιγοποίησης». Εδώ υπάρχει η δυνατότητα δημιουργίας δύο ειδών βιβλιοθήκης, είτε θραυσμάτων είτε «συζευγμένων τμημάτων» (mate-paired) ανάλογα με τον ερευνητικό στόχο. Στην πρώτη περίπτωση εφαρμόζονται υπέρηχοι και προκύπτουν τμήματα μεγέθους 60-90 bp. Στην δεύτερη, με τον ίδιο τρόπο έχουμε μεγαλύτερα τμήματα (0,6-10 kb), επιλέγεται μετά από ηλεκτροφόρηση το κατάλληλο μέγεθος (ανάλογα την περίπτωση) και γίνεται λιγοποίηση με έναν συνθετικό εκκινητή (CAP adapter). Ακολουθεί αραίωση και συνθήκες που ευνοούν την ενδομοριακή λιγοποίηση (κυκλοποίηση) δημιουργώντας έτσι μια βιβλιοθήκη τυχαίων κυκλικών τμημάτων συγκεκριμένου μεγέθους. Στην συνέχεια γίνεται πέψη με μια περιοριστική ενδονουκλεάση τύπου III (EcoP15I, θέση αναγνώρισης στον CAP και κόβει 25 και 27 βάσεις μακριά). Έτσι προκύπτει μια βιβλιοθήκη από συζευγμένα τυχαία 27μερή τα οποία αρχικά στο γονιδίωμα διαχωρίζονταν από τμήματα του μεγέθους που επιλέχθηκε στην ηλεκτροφόρηση.

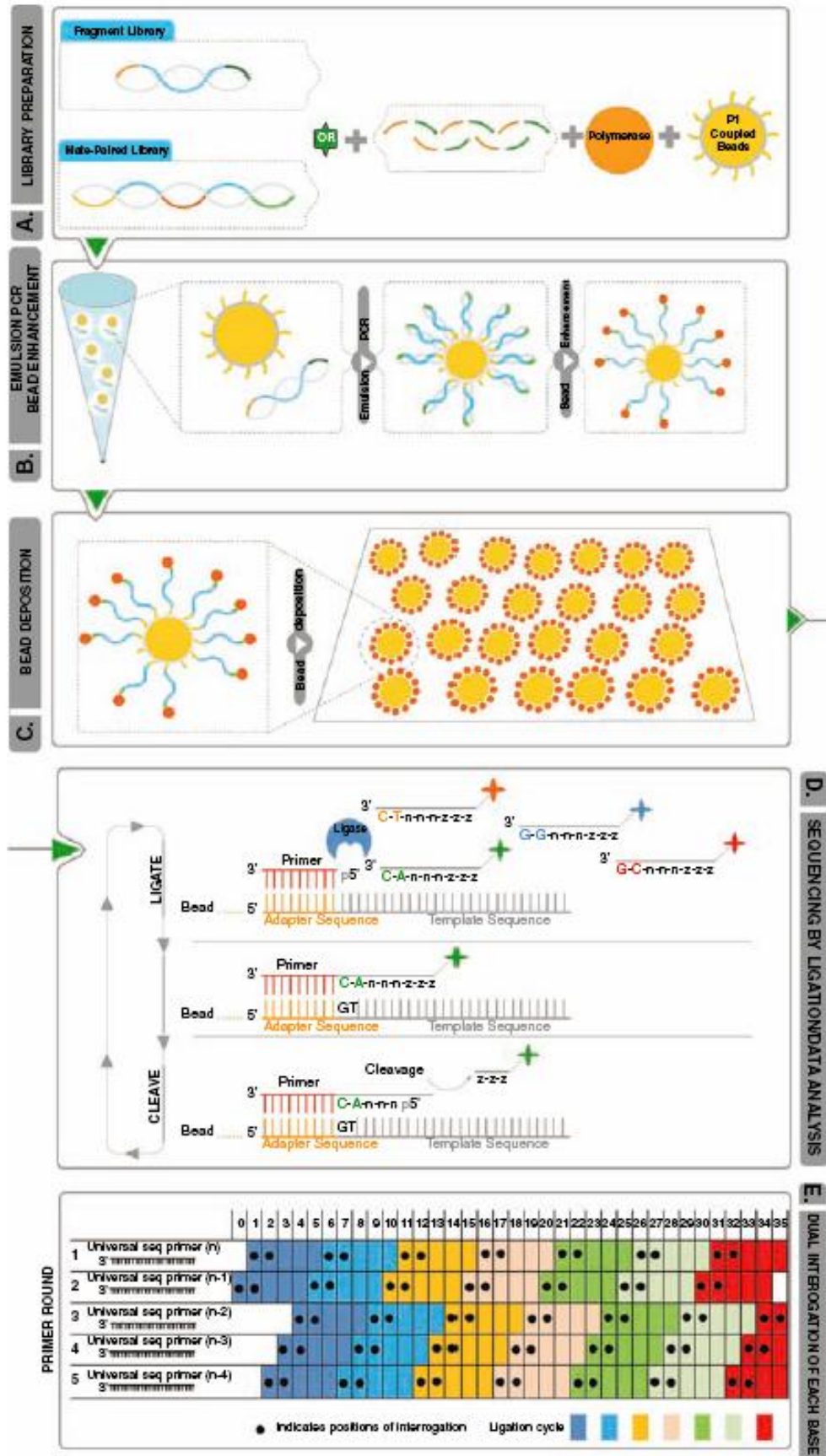
Τα θραύσματα DNA λιγοποιούνται με αντάπτορες και ακινητοποιούνται σε σφαιρίδια όπου ενισχύονται με emPCR. Μετά το PCR, η μητρικές αλυσίδες αποδιατάσσονται, γίνεται επιλογή των σφαιριδίων που φέρουν τα ενισχυμένα τμήματα και γίνεται μια τροποποίηση στο 3' άκρο ώστε να είναι εφικτή η ακινητοποίηση τους σε γυάλινη επιφάνεια με ομοιοπολικό δεσμό. Η πρωτοτυπία του συστήματος είναι η χρήση της DNA λιγάσης και σημασμένων ολιγονουκλεοτιδίων για την αλληλούχιση (Housby and Southern, 1998). Στην αρχή, υβριδίζει ένας εκκινητής στον αντάπτορα που έχει προστεθεί στο DNA. Στην συνέχεια προστίθεται ένα pool οκταμερών με όλους τους πιθανούς συνδυασμούς βάσεων (A, C, G και T) στις θέσεις 1 έως 5 (1024 συνδυασμοί). Μόνο το ολιγονουκλεοτίδιο του οποίου οι 5 πρώτες βάσεις είναι συμπληρωματικές με την άγνωστη αλυσίδα θα είναι στην κατάλληλη θέση ώστε να δημιουργηθεί 3'-5' φωσφοδιεστερικός δεσμός με τον εκκινητή. Έχουμε τέσσερις φθορίζουσες χρωστικές και κάθε οκταμερές είναι σημασμένο με μία, σε αντιστοιχία με τα τέσσερα πιθανά δινουκλεοτίδια των θέσεων 1 και 2. Μετά την ανίχνευση σήματος, αφαιρούνται οι βάσεις 6-8 και ακολουθεί νέος γύρος. Έπειτα από 7 κύκλους λιγοποίησης, έχουμε πιθανούς συνδυασμούς δινουκλεοτιδίων για τις θέσεις 4+5, 9+10, 14+15, 19+20, 24+25, 29+30 και 34+35. Προκειμένου να ολοκληρωθεί η αλληλούχιση, αφαιρούνται όλα τα προϊόντα λιγοποίησης από την μήτρα και επαναλαμβάνεται από την αρχή η διαδικασία με εκκινητή που διαφέρει κατά 1, 2, 3 ή 4 βάσεις από τον προηγούμενο. Συνολικά γίνονται 5 φορές 7 κύκλοι λιγοποίησης ώστε να αλληλουχηθούν 25-35 βάσεις (εικόνα 1.12, πίνακας 1.2)

Η πλατφόρμα SOLiD™ 3 Plus μπορεί να αλληλουχίσει πάνω από 60 Gb, το κόστος εξοπλισμού είναι μικρότερο από τις άλλες δύο πλατφόρμες, ωστόσο το μικρό μέγεθος των διαβασμάτων περιορίζει τις εφαρμογές της. (Metzker, 2009)

1.3.4 Εφαρμογές

Οι νέες τεχνολογίες αλληλούχισης έχουν ήδη εφαρμοστεί σε αρκετούς τομείς. Οι σημαντικότεροι είναι:

- de novo αλληλούχιση γονιδιωμάτων, πιο στοχευμένη επαναλληλούχιση για εντοπισμό μεταλλάξεων ή πολυμορφισμών
- αλληλούχιση τρανσκριπτομάτων (deep sequencing) κατευθείαν από cDNAs χωρίς την ανάγκη βιβλιοθηκών σε βακτήρια, BACs κτλ
- Μεγάλης κλίμακας ανίχνευση μεθυλίσεων σε DNA που έχει υποστεί χειρισμό με bisulfate
- Προσδιορισμός αλληλεπιδράσεων DNA-πρωτεΐνης μετά από ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης



Εικόνα 1.12 Αλληλούχηση κατά την λιγοποίηση.

A, Προετοιμασία βιβλιοθήκης. B, πρόσδεση σε σφαιρίδια και ενίσχυση σε γαλάκτωμα (emulsion PCR). C, Εναπόθεση σφαιριδίων. D, αλληλούχηση μέσω λιγοποίησης. E, Αλλαγή εκκινήτη και επανάληψη διαδικασίας. (www.appliedbiosystems.com)

1.3.5 Τι ακολουθεί?

Οι νέες αυτές τεχνολογίες έφεραν επανάσταση στην γονιδιωματική κάνοντας εφικτή την μαζική παράλληλη αλληλούχιση με χαμηλό κόστος, στο μέλλον όμως ίσως αναλάβουν ακόμα πιο νέες τεχνολογίες (Next-Next Generation Sequencing) τον ρόλο αυτό, αλληλουχώντας μοναδιαία μόρια (single-molecule sequencing). Προσπάθειες για να δημιουργηθούν τέτοιες πλατφόρμες έχουν ήδη γίνει. Η αλληλούχιση μοναδιαίων μορίων βοηθάει στο να αυξηθεί ο αριθμός τμημάτων DNA που μπορούν ανεξάρτητα να αναλυθούν σε μια δεδομένη επιφάνεια επιτυγχάνοντας πολύ μεγαλύτερη αναλυτικότητα. Επίσης παρακάμπτεται το βήμα της ενίσχυσης σε clusters, μειώνοντας έτσι το κόστος. Πρώτη η Helicos Biosciences προσέφερε τέτοιες υπηρεσίες με το HeliScope το οποίο χρησιμοποιεί μια μικροτεχνική που βασίζεται στον φθορισμό και ονομάζεται TIRM (Total Internal Reflection Microscopy) για να ανιχνεύσει τον φθορισμό κατά την ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων (Harris *et al.*, 2008). Προς αυτή την λογική αλληλούχισης (single molecule) κινείται και η VisiGen Biotechnologies, η οποία έχει κατασκευάσει μια νανο-συσκευή που καταγράφει τα νουκλεοτίδια που ενσωματώνει η DNA πολυμεράση σε πραγματικό χρόνο βασιζόμενη στην μεταφορά ενεργείας φθορισμού μέσω συντονισμού (FRET- Fluorescence Resonance Energy Transfer) (Blow, 2008). Τέλος η Pacific Biosciences έχει αναπτύξει την τεχνολογία SMRT (Single-Molecule Real-Time) κατά την οποία γίνεται αλληλούχιση «κατά την σύνθεση» μοναδιαίων μορίων και βασίζεται με μια νανοδομή (ZMW, Zero-Mode Waveguide) όπου καταγράφεται ο πολυμερισμός σε πραγματικό χρόνο (Eid *et al.*, 2009).

Links	
Χάρτης με ήδη εγκατεστημένες πλατφόρμες ανά χώρα (Next & Next-Next Generation Sequencing)	http://tiny.cc/sequencers
Συγκριτική διάλεξη των νέων τεχνολογιών (Current Topics in Genome Analysis 2010)	http://tiny.cc/Course
Next Generation Sequencers	
Genome Sequencer FLX System (454)	http://tiny.cc/pyro1
	http://tiny.cc/pyro2
The Illumina (Solexa) Genome Analyzer	http://tiny.cc/illumina1
	http://tiny.cc/illumina2
The Applied Biosystems SOLiD System	http://tiny.cc/SOLiD
	http://tiny.cc/SOLiD2
Next-Next Generation Sequencers	
Helicos Biosciences	http://tiny.cc/tsms
Pacific Biosciences	http://tiny.cc/pacbio
Oxford Nanopore	http://tiny.cc/nanop1
Ion Torrent - Semiconductor Sequencing	http://tiny.cc/ion1
	http://tiny.cc/ion2
IBM DNA Transistor	http://tiny.cc/ibm1

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε προέρχεται από την ελιά *O. europaea* L. ssp. *europaea* var. *sativa*, καλλιεργήσιμης ελαιοπαραγωγού ποικιλίας «Κορωνέικη». Η συλλογή του τριχώματος των φύλλων της ελιάς έγινε από ελαιόδεντρο που βρίσκεται στον ελαιώνα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών από νεαρά αναπτυσσόμενα φύλλα.

Η απομόνωση του τριχώματος των φύλλων έγινε με την βοήθεια ξυραφιού από την αποαξονική επιφάνεια, πολύ προσεκτικά ώστε να μην παρασύρονται άλλα κύτταρα της επιδερμίδας. Κάθε φορά συλλέγονταν λίγα φύλλα και ακολουθούσε αμέσως απομόνωση τριχώματος καθώς και το πρωτόκολλο εκχύλισης RNA ώστε το δείγμα να είναι φρέσκο.

2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

2.2.1 Απομόνωση ριβονουκλεϊκών οξέων (RNA)

- Λειοτρίβιση ιστού σε υγρό άζωτο.
- Για κάθε 0.1gr ιστού προσθέτουμε στο erpendorf 100μl RNA Extraction Buffer και 100μl φαινόλη.
- Έντονη ανάδευση (vortex 1 min).
- Φυγοκέντριση για 4 λεπτά στις 13000rpm

(Δημιουργούνται 2 φάσεις, η υδατική είναι πάνω και η οργανική κάτω).

- Μεταφέρουμε το υπερκείμενο (υδατική φάση) σε καθαρό erpendorf.
- Προσθέτουμε ίσο όγκο φαινόλης και ανάδευση (vortex 1 min).
- Φυγοκέντριση για 4 λεπτά στις 13000rpm.
- Μεταφέρουμε το υπερκείμενο (υδατική φάση) σε καθαρό erpendorf.
- Προσθέτουμε ίσο όγκο διαλύματος 1:1

(φαινόλη) / (24:1 χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη).

- Έντονη ανάδευση (vortex 1 min).
- Φυγοκέντριση για 2 λεπτά στις 13000rpm.
- Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε καθαρό erpendorf.
- Προσθέτουμε ίσο όγκο διαλύματος 24:1 χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη
- Έντονη ανάδευση (vortex 1 min).
- Φυγοκέντριση για 2 λεπτά στις 13000rpm.
- Μεταφέρουμε το υπερκείμενο (υδατική φάση) σε καθαρό erpendorf.

- Προσθέτουμε 2.5 όγκους 100% EtOH (παγωμένη) και 1/10 του όγκου CH₃COONa 3M (pH 4.8)
- Αναδεύουμε αργά 20-30 φορές με το χέρι και βάζουμε το erpendorf στους -20°C για 16-18 ώρες (overnight).
- Φυγοκεντρούμε για 20 min στις 13000 rpm στους 4 °C.
- Αποχύνουμε το υπερκείμενο και αφήνουμε το pellet να στεγνώσει
- Επαναδιαλύουμε σε αποστειρωμένο ddH₂O.
- Το δείγμα φυλάσσεται στους -80 °C.

2.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

2.3.1 Ανάλυση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αγαρόζης

Ηλεκτροφόρηση είναι η τεχνική εκείνη, κατά την οποία μόρια εξαναγκάζονται να κινηθούν διαμέσου ενός πορώδους υλικού, με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου. Επιθυμητή ποσότητα αγαρόζης τοποθετείται σε κατάλληλο όγκο νερού (w/v) και θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων για μερικά λεπτά (έως την πλήρη διάλυση της αγαρόζης)

- Ακολούθως προστίθεται ποσότητα πυκνού TAE, ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 1x και αναδεύεται.
- Τελευταία προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 0.5μg/ml
- Το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει λίγο και έπειτα τοποθετείται σε καλούπι της συσκευής ηλεκτροφόρησης, στο οποίο έχουν προσαρτηθεί τα αντίστοιχα χτενάκια για τη δημιουργία θέσεων προσθήκης διαλύματος νουκλεϊκών οξέων (πηγαδάκια).
- Μετά τη στερεοποίηση του πηκτώματος αγαρόζης, αφαιρούνται τα χτενάκια και τοποθετείται το δοχείο-καλούπι στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία πληρείται με ρυθμιστικό διάλυμα.
- Στα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα προστίθεται κατάλληλη μπλε χρωστική και έπειτα ποσότητα αυτών τοποθετείται στις θέσεις-πηγαδάκια του πηκτώματος αγαρόζης.
- Εφαρμόζεται συνεχής τάση 50-120V.
- Το πήκτωμα αγαρόζης εξετάζεται σε υπεριώδη ακτινοβολία.

2.3.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των νουκλεϊνικών οξέων

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των νουκλεϊνικών οξέων έγινε με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (Optical Density, OD) χρησιμοποιώντας το φασματοφωτόμετρο U-1100 της Hitachi. Τα νουκλεϊνικά οξέα απορροφούν σε μήκος κύματος 260nm και η συγκέντρωσή τους υπολογίζεται από τον τύπο των Beer-Lambert. Σε μήκος κύματος 280nm απορροφούν οι πρωτεΐνες εξαιτίας κυρίως της περιέχουσας τρυπτοφάνης, ενώ στα 240nm απορροφούν τα φαινολικά παράγωγα.

Επομένως ο λόγος OD₂₆₀/OD₂₈₀ αντιπροσωπεύει την καθαρότητα του διαλύματος των νουκλεϊκών οξέων ως προς τις πρωτεΐνες. Ο ιδανικός λόγος ισούται με 1.8 για DNA και 2 για RNA.

Η συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων υπολογίζεται από τον τύπο των Beer-Lambert:

$$C(\mu\text{g/ml}) = \text{O.D.}(260) * \alpha * D.F.$$

Όπου α ορίζεται ως η συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων που παρατηρείται όταν $\text{O.D.}_{260}=1$ και συγκεκριμένα για δείγμα DNA, $\alpha=50 \mu\text{g/ml}$ ενώ για RNA, $\alpha=40\mu\text{g/ml}$, D.F. είναι ο συντελεστής αραίωσης και ισούται με την αραίωση που έχει πραγματοποιηθεί για να γίνει η φωτομέτρηση.

2.4 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ

2.4.1 Χειρισμός με DNase

Απαραίτητο βήμα για να καταστραφεί το DNA που απομονώνεται κατά την απομόνωση RNA.

- προσθέτουμε τα ακόλουθα αντιδραστήρια σε ένα αποστειρωμένο erpendorf:

Trichome	
Nucleic Acids	75 μl
RQ1 buffer	15 μl
RQ1 DNase (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	5 μl
RNase Out	1 μl
H ₂ O	54 μl
TOTAL	150 μl

- 1 ώρα στους 37 °C
- Ανεβάζουμε τον όγκο στα 400 μl
- Ακολουθεί καθαρισμός με με φαινόλη/Sevag και καθίζηση με αιθανόλη

2.4.2 Σύνθεση πρώτης αλυσίδας (RT)

Όλες οι συνήθεις τεχνικές κατασκευής cDNA βιβλιοθήκης βασίζονται στην ικανότητα του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase - RT) να μεταγράψει το mRNA σε μονόκλωνο DNA στην αντίδραση της σύνθεσης πρώτης αλυσίδας.

Σε μερικές περιπτώσεις η αντίστροφη μεταγραφάση σταματάει πριν μεταγραφεί ολόκληρη η αλληλουχία του mRNA. Αυτό ισχύει κυρίως για μεγάλοι μεγέθους mRNA ή για μηνύματα με πολλές δευτεροταγείς διαμορφώσεις.

Προκειμένου να αυξηθεί η αντιπροσώπευση ολοκληρωμένων μεταγραφημάτων στην cDNA βιβλιοθήκη, χρησιμοποιείται ένας τροποποιημένος oligo(dT) εκκινήτης, ο RyoRT primer ο οποίος υβριδίζει στην poly A⁺ ουρά του mRNA ώστε να ξεκινήσει η αντίστροφη μεταγραφή, καθώς και το SMART ολιγονουκλεοτίδιο το οποίο λειτουργεί ως μικρή μήτρα επιμήκυνσης του 5' άκρου του mRNA.

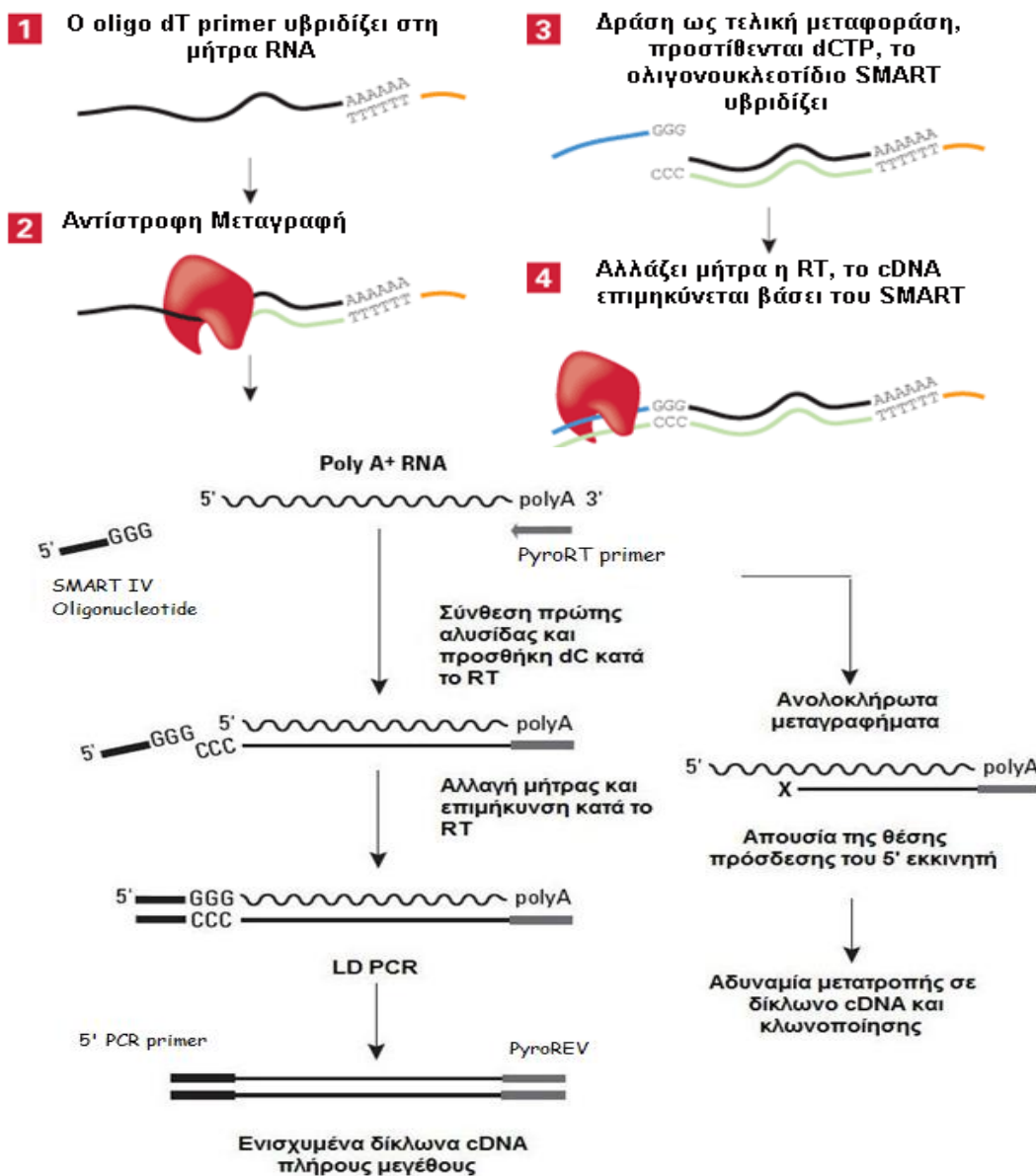
Όταν η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφάσης φτάσει στο 5' άκρο του μηνύματος, το ένζυμο SuperScript RT II, λόγω της ιδιότητας της τελικής μεταφοράς που φέρει, προσθέτει λίγες βάσεις στο 3' άκρο της συντιθέμενης αλυσίδας cDNA, κυρίως κυτοσίνες (oligo(C)).

Το ολιγονουκλεοτίδιο SMART, λόγω του ότι φέρει στο 3' άκρο του γουανίνες (oligo(G)), υβριδίζει με τις κυτοσίνες που προστέθηκαν με αποτέλεσμα να αυξάνεται η μήτρα mRNA.

Η αντίστροφη μεταγραφάση αλλάζει μήτρα και συνεχίζει την επιμήκυνση του cDNA μέχρι το τέλος του ολιγονουκλεοτιδίου.

Το μονόκλωνο cDNA που θα προκύψει, θα φέρει ολόκληρο το 5' άκρο του mRNA καθώς και την συμπληρωματική ακολουθία του ολιγονουκλεοτιδίου SMART, η οποία και αποτελεί θέση πρόσδεσης («άγκυρα») του 5' PCR primer που χρησιμοποιείται κατά την Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) που ακολουθεί, ώστε να δημιουργηθούν ενισχυμένα δίκλινα cDNA. Μόνο όσα μονόκλινα cDNA φέρουν αυτήν την ακολουθία στο 5' άκρο τους θα αποτελέσουν μήτρα κατά την ενίσχυση με την PCR.

Επίσης στη PCR, χρησιμοποιείται ο PyroREV primer ο οποίος είναι αρκετά όμοιος με τον PyroRT primer, μόνο που δημιουργεί σημειακές μεταλλάξεις στην polyA⁺ ουρά ώστε να μειωθούν τα ομοπολυμερή. Αυτό είναι απαραίτητο καθώς το pyrosequencing έχει αδυναμία αλληλούχισης ομοπολυμερών ακολουθιών (>7-8μερή). (Beldade *et al*, 2006)



Αφού φωτομετρήθηκε το δείγμα RNA, η συγκέντρωση του προσδιορίστηκε ως 112ng/μl.

- Αρχικά για την δημιουργία ss cDNA προσθέτουμε τα ακόλουθα αντιδραστήρια σε ένα αποστειρωμένο eppendorf:

Trichome	
RNA	1 μl
SMART (10μM)	4 μl
PyroRT (10μM)	4 μl
ddH ₂ O	1 μl
TOTAL	10 μl

- Ανακατεύουμε ελαφρά και κάνουμε spin στην φυγόκεντρο
- Επιάζουμε στους 65 °C για 5 λεπτά
- Τοποθετούμε τα eppendorfs στον πάγο για 2 λεπτά
- Κάνουμε spin στην φυγόκεντρο
- Προσθέτουμε τα ακόλουθα στο eppendorf:

Trichome	
5x First Strand Buffer	4 μl
DTT (100mM)	2 μl
dNTP mix (5mM)	2 μl
Superscript II (200u/μl)	1 μl
RNase Out	1 μl
TOTAL	20 μl

- Ανακατεύουμε απαλά με την πιπέτα και κάνουμε spin
- Επιάζουμε στους 42 °C για 1 ώρα
- Προσθέτουμε 0.5 μl Superscript II (200u/μl)
- Επιάζουμε στους 42 °C για 1 ώρα
- Επιάζουμε στους 70 °C για 15 min
- Τοποθετούμε τα eppendorfs στον πάγο για να τερματίσουμε την αντίδραση
- Αποθηκεύουμε στους -20 °C την αντίδραση ss cDNA

2.4.3 Δημιουργία δίκλωνης αλυσίδας cDNA με LD PCR

- Προθερμαίνουμε την συσκευή PCR στους 95 °C
- Σε αποστειρωμένο eppendorf βάζουμε τα εξής:

trichome	
ss cDNA	2 μl
Phusion (2u/μl)	2 μl
PCR Buffer	20 μl
dNTPs Mix (5mM)	5 μl
5' PCR Primer (10μM)	5 μl
PyroREV Primer	5 μl
ddH ₂ O	61 μl
Total	100 μl

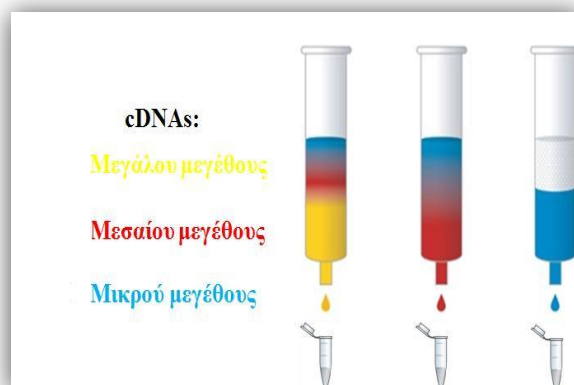
- Ανακατεύουμε απαλά και κάνουμε ένα spin στην φυγόκεντρο
- Προγραμματίζουμε την συσκευή PCR ως εξής
 - 1st step 95 °C for 1 min
 - 2nd step 95 °C for 15 sec
 - 3rd step 68 °C for 6 min
 - 4th step go to step 2 for 27 times
- Αποθηκεύουμε στους -20 °C

2.4.4 Κλασμάτωση των cDNAs βάσει μεγέθους

Ο σκοπός είναι να διαχωριστούν τα cDNAs που έχουν προκύψει ανάλογα με το μέγεθος τους ώστε να επιλέξουμε τα μεγαλύτερα.

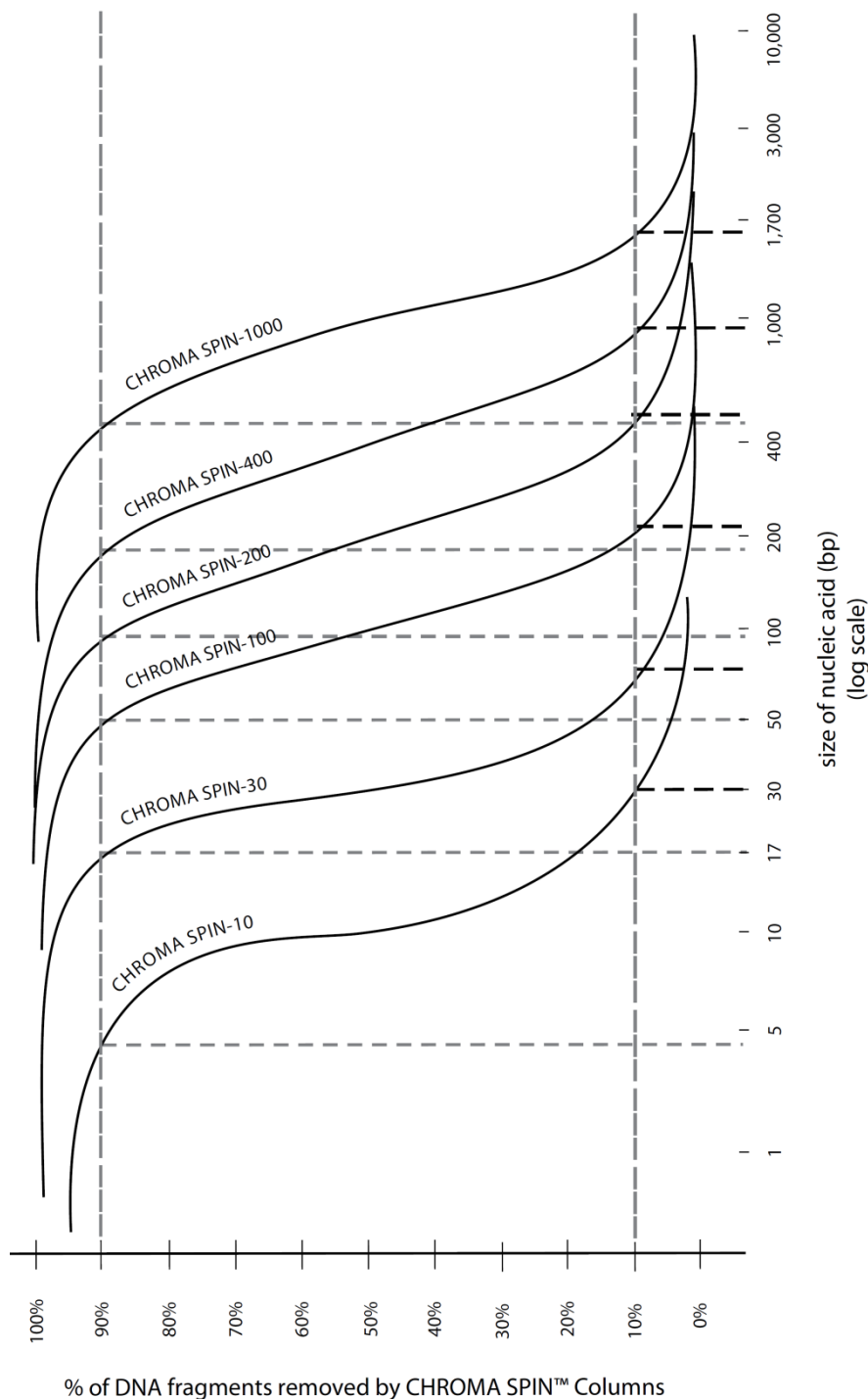
Χρησιμοποιήθηκαν οι κολόνες CHROMA SPIN-400 οι οποίες περιέχουν μικροσκοπικά ισοδιαμετρικά σφαιρίδια με πόρους από υδρόφιλο υλικό.

Τα μόρια που είναι μεγαλύτερα από το μέγεθος των πόρων, δεν μπορούν να εισέλθουν στους πόρους με αποτέλεσμα να κινούνται γρηγορότερα προς την βάση της κολώνας από όσο χρειάζονται τα μικρά μόρια που εισέρχονται στους πόρους. Έτσι οι πρωτεΐνες και τα διάφορων μεγεθών DNA εκλύονται κατά σειρά ελάσσονος μεγέθους.



Διαδικασία:

- Σημαίνουμε 16 erpendorfs (1.5ml) και τα τοποθετούμε σε ένα στατό
- Προετοιμάζουμε την κολώνα
 - Ανακατεύουμε για να διαλυθεί το μίγμα
 - Με μια πιπέτα Gilson (1000μl) ανακατεύουμε απαλά ώστε να αφαιρέσουμε τις φυσαλίδες και αφαιρούμε το καπάκι της βάσης αφήνοντας να στάξει φυσιολογικά
 - Προσαρμόζουμε την κολώνα σε ένα βραχίονα
 - Αφήνουμε το Storage Buffer να στάξει μέχρι να μπορούμε να δούμε την επιφάνεια του gel. Ο όγκος του πορώδους υλικού της κολώνας πρέπει να είναι στο 1 ml
 - Η ροή πρέπει να είναι 1 σταγόνα ανά 40-60 sec και κάθε σταγόνα περίπου 40 μl
- Όταν τελιώσει η ροή, προσθέτουμε προσεκτικά 700 μl Fractionation Column Buffer και αφήνουμε να στάξει
- Αφού σταματήσει η ροή, προσθέτουμε όλο το μίγμα (περίπου 100μl) στην επάνω επιφάνεια
- Αφήνουμε το μίγμα να απορροφηθεί πλήρως (δεν πρέπει να υπάρχει υγρό στην επάνω επιφάνεια του μίγματος της κολώνας)
- Με 100 μl Fractionation Column Buffer ξεπλύνουμε το erpendorf που περιείχε το μίγμα και το προσθέτουμε στην επάνω επιφάνεια της κολώνας
- Αφήνουμε το Fractionation Column Buffer να εισέλθει στο μίγμα της κολώνας. Η στρώση της βαφής πρέπει να είναι αρκετά mm μέσα στην κολώνα
- Όταν η ροή αραιώσει, προσθέτουμε 600 μl buffer κλασμάτωσης και αμέσως ξεκινάμε την συλλογή μία σταγόνα ανά erpendorf (#1-16) (περίπου 35 μl σε κάθε erpendorf)
- Μόλις ολοκληρωθεί η συλλογή, τοποθετούμε το καπάκι στην κορυφή της κολώνας ώστε να σταματήσει η ροή
- Ελέγχουμε το προφίλ των διαλυμάτων των erpendorfs σε ένα gel αγαρόζης/EtBr 1.1% w/v, ηλεκτροφορώντας 3 μl από κάθε erpendorf σε καθώς και 0.1 μg DNA size marker. Ηλεκτροφορούμε στα 100 V για 15 min (στα πρώτα 5 min ελέγχουμε σε UV)
- Προσδιορίζουμε τα καλύτερα κλάσματα με βάση την ένταση των ζωνών σε UV, επιλέγουμε τα μεγαλύτερα και τα ομογενοποιούμε.



2.5 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΤΩΝ cDNAs

Η αλληλούχιση έγινε με την πλατφόρμα GS FLX της Roche που βασίζεται στην τεχνολογία αλληλούχισης «κατά την σύνθεση» (454 pyrosequencing) σε συνεργασία με το εργαστήριο Γενετικής και Μοριακής Βιοτεχνολογίας του Ινστιτούτου Θαλάσσιας Βιολογίας και Γενετικής του ΕΛΚΕΘΕ στην Κρήτη. Για την αλληλούχιση χρησιμοποιήθηκε το 1/16 της πλακέτας PicoTiterPlate.

2.6 ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

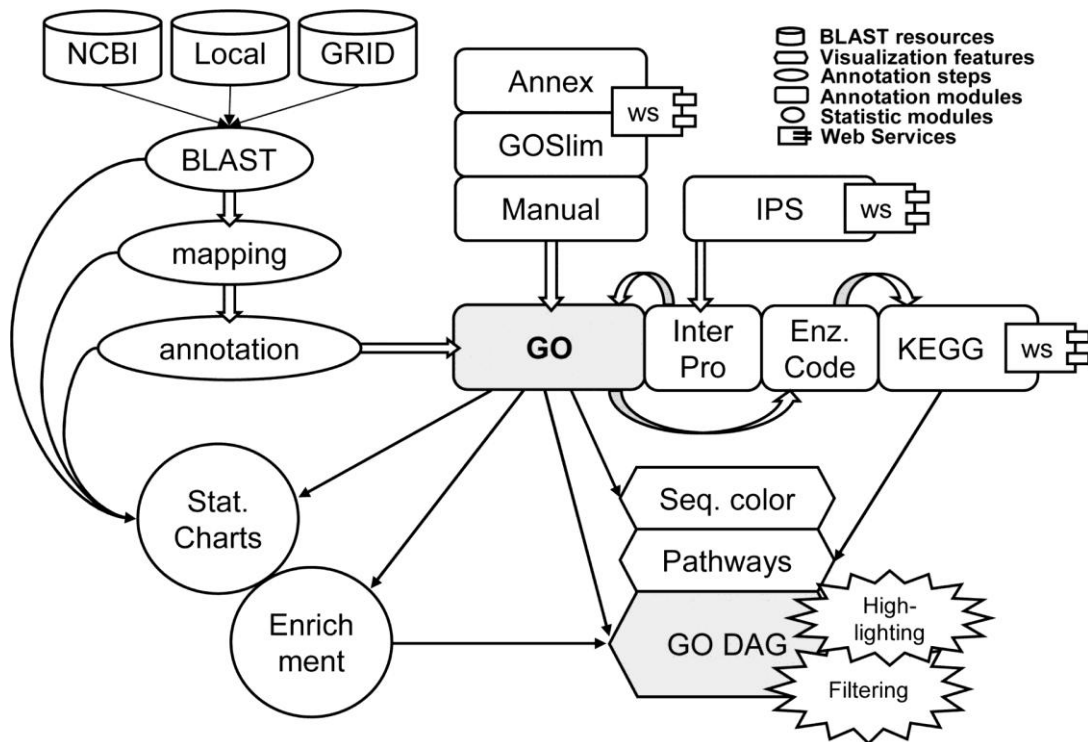
2.6.1 Καθαρισμός των αλληλουχιών από τους εκκινητές και ομαδοποίηση τους

Οι αλληλουχίες «καθαρίστηκαν» (trimmed) από τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν κατά την σύνθεση του dscDNA με την βοήθεια του αλγόριθμου cutadapt v. 0.9. Η ομαδοποίηση τους σε clusters (διαβάσματα που έχουν ομοιότητες και αντιπροσωπεύουν το ίδιο γονίδιο) έγινε με την βοήθεια του CD-HIT-EST. Σαν ελάχιστο ποσοστό ομοιότητας ορίστηκε το 95% και ελάχιστο μέγεθος οι 100 βάσεις. Οι παράμετροι του αλγόριθμου ρυθμίστηκαν ώστε να ελέγχεται κάθε αλληλουχία καθώς και η συμπληρωματική της με τις υπόλοιπες και το clustering να γίνεται με βάση την μέγιστη ομοιότητα και όχι στο πρώτο cluster που πληρείται ο κανόνας του 95%. Η βιοπληροφορική ανάλυση έγινε σε συνεργασία με το εργαστήριο Γενετικής Βελτίωσης και Βιοτεχνολογίας Οπωροκηπευτικών του MAIX, στην Κρήτη.

2.6.2 Παράλληλος χειρισμός αρχείων με πολλαπλές ακολουθίες (multi-fasta file)

Μετά την αλληλούχιση, προέκυψε ένα αρχείο με πολλές ακολουθίες.

Ίσως ο πιο γνωστός τρόπος μαζικού blast είναι με το πρόγραμμα Blast2Go (Götz et al, 2008) .



Σχηματική αναπαράσταση της εφαρμογής Blast2GO.

2.7 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Σύνθεση πρώτης αλυσίδας

- **SMART Oligonucleotide (10 μM)**
5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTG GCC ATT ACG GCC GGG -3'
- **PyroRT Primer (10 μM)**
5'-ACC AGG TCA CTC GAG GAC ATG TTT TTT TCT TTT TTT TTT (N₋₁) (N)-3'
(N₋₁ = A, G, or C) και (N = A, G, C, or T)
- **Superscript™ Reverse Transcriptase (200u/μl)**
Storage Buffer: 20mM Tris-HCL (pH 7.5), 100mM NaCl, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 0.01% (v/v) NP-40, 50% (v/v) glycerol
- **5X First-Strand Buffer**
250 mM Tris (pH 8.3)
15 mM MgCl₂
375 mM KCl
DTT (dithiothreitol, 0.1M)
- **RNase Out (40u/ μl)**
Storage Buffer: 20mM Tris-HCL (pH 8.0), 50mM KCl, 0.5mM EDTA, 8mM DTT, 50% (v/v) glycerol
- **RQ1 RNase-Free DNase (1u/μl)**
Storage Buffer: 10mM HEPES (pH 7.5), 50% (v/v) glycerol, 10mM CaCl₂, 10mM MgCl₂
- **RQ1 DNase Reaction Buffer (10X)**
400mM Tris-HCL (pH 8.0)
100mM MgSO₄
10mM CaCl₂

cDNA ενίσχυση

- **5' PCR Primer (10 μM)**
5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT-3'
- **PyroREV (10 μM)**
5'-ACC AGG TCA CTC GAG GAC ATG TTT TGT TCT TGT TGT TTT (N₋₁) (N)-3'
(N₋₁ = A, G, or C) και (N = A, G, C, or T)
- **dNTP Mix** (5 mM each of dATP, dCTP, dGTP, and dTTP;
- **Phusion HF DNA Polymerase (2u/ μl)**
Storage Buffer: 20mM Tris-HCL (pH 7.4), 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 100mM KCl, 0.5% Tween 20, 0.5% Nonidet P40, 200μg/ml BSA, 50% (v/v) glycerol
- **Phusion HF Buffer (5X)**
7.5 mM MgCl₂

Καθαρισμός cDNA

- 10 CHROMA SPIN-400 Columns
- 30 ml 1X Fractionation Column Buffer

Διαλύματα απομόνωσης RNA

- **RNA extraction Buffer:** 100 mM tris-HCL (pH = 9.5), 0.5% SDS w/v
- **Sevag:** (24 : 1 χλωροφόρμιο – ισοαμυλική αλκοόλη)
- **Φαινόλη** (pH 8.0)

Διαλύματα Ηλεκτροφόρησης DNA-RNA

- **TAE (50x) :** 100ml από 0.5M EDTA pH=8, 57ml CH₃COOH, 242gr Tris base σε τελικό όγκο 1 lt
- **EtBr** : 10mg/ml (φυλάσσεται σε σκουροχρωμο δοχείο)
- **Loading dye:** 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 40% (w/v) sucrose

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ RNA

Η απομόνωση RNA από τις τρίχες των φύλλων της ελιάς, αποδείχτηκε μια δύσκολη υπόθεση καθώς αφενός η ποσότητα RNA που μπορούσε να απομονωθεί κάθε φορά ήταν μικρή, αφετέρου η καθαρότητα των δειγμάτων δεν ήταν τόσο καλή αφού οι λόγοι OD_{260}/OD_{280} (πρωτεϊνικές προσμίξεις) και OD_{240}/OD_{260} (φαινολικές προσμίξεις) ήταν σχετικά χαμηλοί.

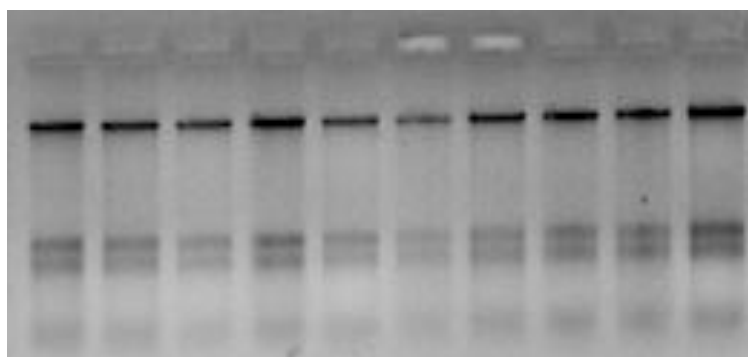
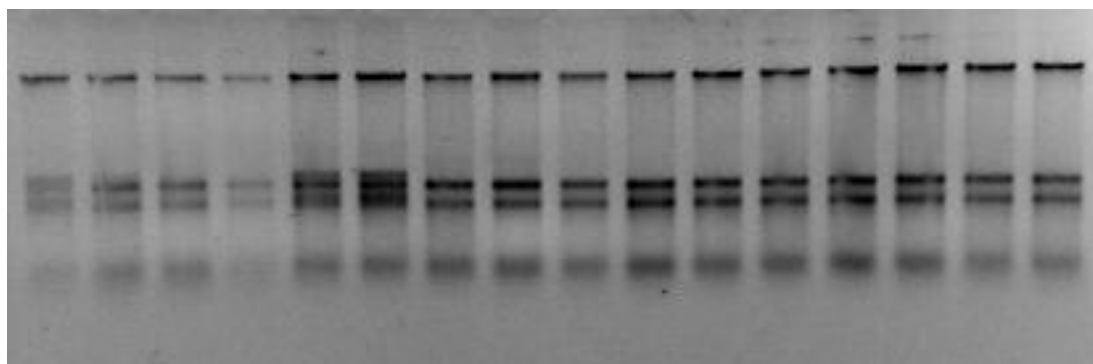
Επομένως για να συγκεντρωθεί καθαρότερο δείγμα αλλά και επαρκής ποσότητα, έγιναν πολλές ανεξάρτητες απομονώσεις οι οποίες ομογενοποιούνταν και ξαναπερνούσαν από καθαρισμό και ομογενοποίηση 2 ή 3 φορές.

Σε κάθε erpendorf μοιράζαμε περίπου 20-30mg ιστού και μετά την απομόνωση RNA έμεναν 5-10 μg νουκλεϊκών με λόγο καθαρότητας OD_{240}/OD_{260} κοντά στο 1.2.

Συνολικά έγιναν 78 απομονώσεις RNA οι οποίες ανά 3 ομογενοποιούνταν σε 1 erpendorf και γινόταν καθαρισμός

(phenol → 1:1 phenol/chloroform → chloroform → H₂O.)

Τα 26 erpendorfs ηλεκτροφορήθηκαν (1.5μl / πηγαδάκι)



Εικόνα 3.1 Απομονώσεις νουκλεϊκών οξέων από τα τριχώματα.

Έπειτα ομογενοποιήθηκαν σε 5 erpendorfs και φωτομετρήθηκαν (10 μl):

Δείγμα	D.F.	260/280	C (μg/ml)
1	1/100	1.3	104
2	1/100	1.26	192
3	1/100	1.25	280
4	1/100	1.15	248
5	1/100	1.21	184

Αυτά τα 5 δείγματα ομογενοποιήθηκαν σε 2 erpendorfs και ξαναέγινε καθαρισμός και τελικά το πιο διαυγές από τα δύο erpendorfs επιλέχθηκε για άλλο ένα καθαρισμό.

Τελικά το δείγμα που χρησιμοποιήθηκε σαν μήτρα για την δημιουργία dscDNA φωτομετρήθηκε:

Δείγμα	D.F.	260/280	C (μg/ml)	total
A	1/120	1.17	100.8	10 μg

Αντίδραση με DNase

Ακολούθησε πέψη με DNase ώστε να αφαιρεθεί το DNA που από το δείγμα πριν την σύνθεση ss cDNA.

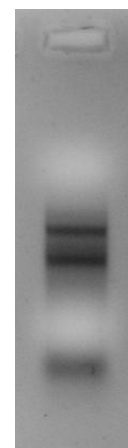
Trichome	
Nucleic Acids	75 μl
RQ1 buffer	15 μl
RQ1 DNase (1u/μl)	5 μl
RNase Out	1 μl
H ₂ O	54 μl
TOTAL	150 μl

Η αντίδραση χωρίστηκε σε 2 erpendorfs και τοποθετήθηκε για 1 ώρα στους 37 °C στην κεφαλή της PCR. Έπειτα ομογενοποιήθηκαν τα 2 erpendorfs σε ένα, προστέθηκαν 250 μl ddH₂O (τελικός όγκος 400 μl) και ακολούθησε καθαρισμός με φαινόλη/SEVAG και overnight precipitation στους -20 °C (2ΧΦΟΗ/SEVAG → SEVAG → 2,5V EtOH 100% & 1/10V CH₃COONa 3M, pH 4.8).

Την επόμενη ημέρα, το δείγμα τοποθετήθηκε στους -80 °C για 15 λεπτά και ακολούθησε φυγοκέντριση στους 4 °C για 30 λεπτά στις 13.000rpm. Τελικά έγινε επαναδιάλυση σε 30μl ddH₂O. Από αυτό 2 μl ηλεκτροφορήθηκαν και 5 μl φωτομετρήθηκαν. Το δείγμα φυλάχθηκε στους -80 °C

	Πρίν την DNase	Μετά την DNase
Concentration	100.8 ng/μl	112 ng/μl
Total	7.56 μg	3.36 μg
260/280	1.17	1.40
Recovery		44.4%

Εικόνα 3.2 RNA μετά από πέψη με DNase.



3.1.2 Σύνθεση πρώτης αλυσίδας

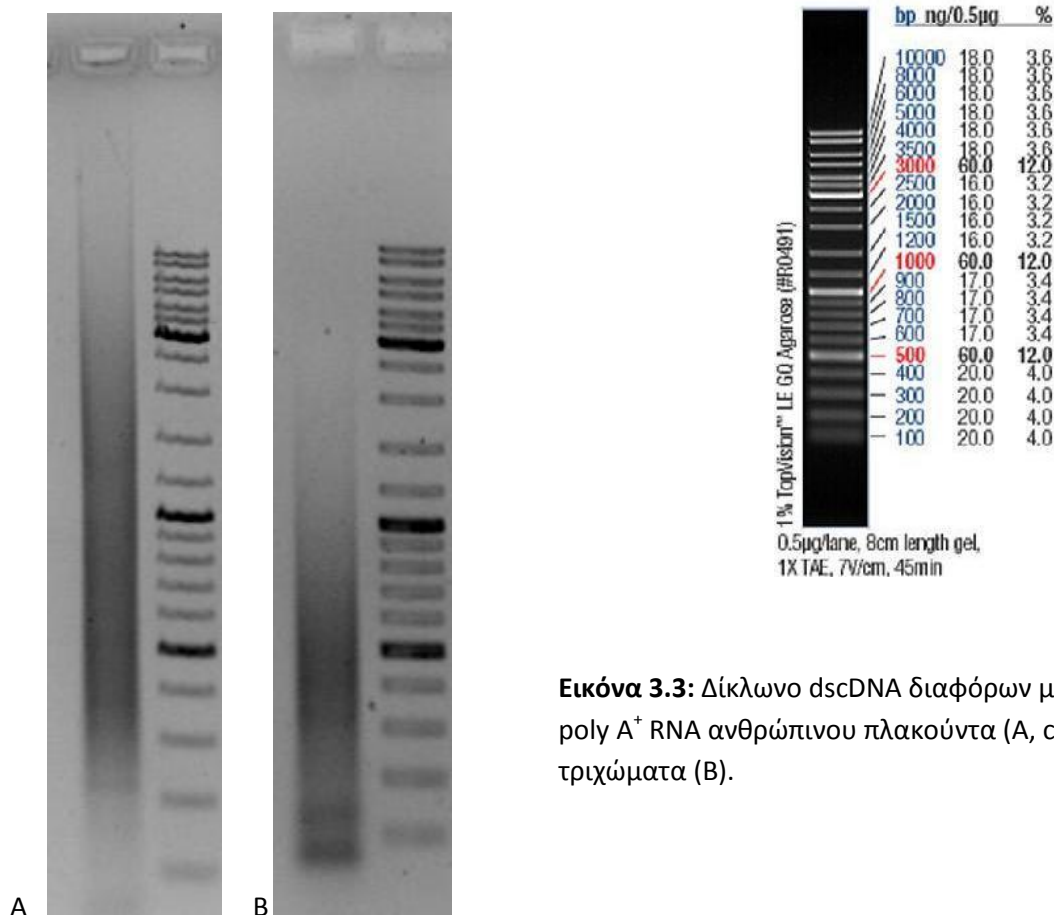
Χρησιμοποιήθηκε 1 μl (112 ng) από το δείγμα RNA τριχιδίων. Η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφάσης έγινε για 2 ώρες στους 42 °C σε τελικό όγκο 20 μl και μόλις ολοκληρώθηκε η 1 ώρα προστέθηκε 0.5 μl (50u) ενζύμου.

3.1.3 Σύνθεση cDNA

Μετά την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφάσης, ακολούθησε η σύνθεση της δεύτερης αλυσίδας. Σαν μήτρα χρησιμοποιήθηκαν 2 μl από το RT (1/10 του όγκου), η αντίδραση του LD PCR έγινε στα 100μl και αφού ολοκληρώθηκε, 5μl δείγματος (1/20 του όγκου) ηλεκτροφορήθηκαν με 1μl loading dye σε πολύ λεπτό gel αгарόζης, 1%.

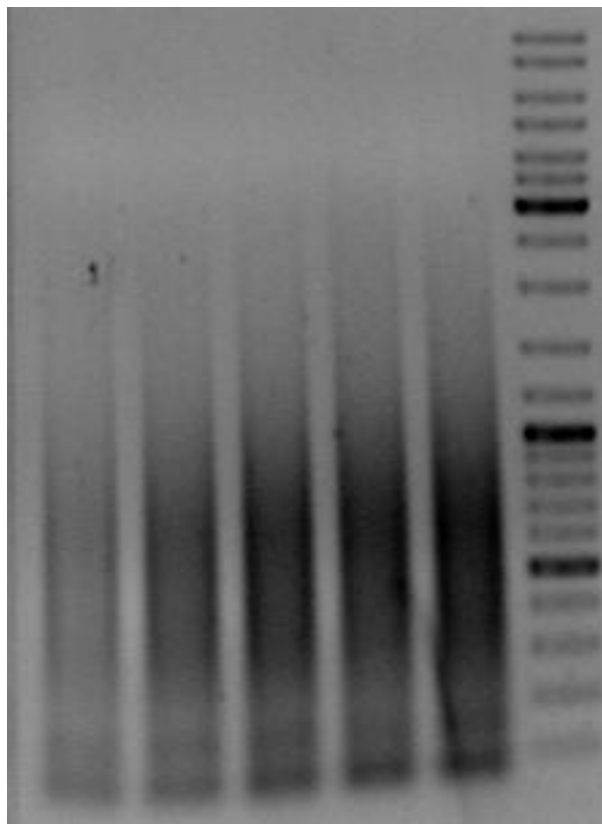
Τα ίδια βήματα έγιναν πρώτα και με poly A⁺ RNA ανθρώπινου πλακούντα (50 ng) σαν control.

Σκοπός της ηλεκτροφόρησης είναι αφενός να ελεγχθεί ότι και οι δύο αντιδράσεις δούλεψαν και αφετέρου να εκτιμηθεί μια παραλλακτικότητα στα προϊόντα της αντίδρασης η οποία δηλώνει διαφορετικού μήκους cDNA (smear).



Εικόνα 3.3: Δίκλωνο ds-cDNA διαφόρων μεγεθών (smear) από poly A⁺ RNA ανθρώπινου πλακούντα (A, control) και από τριχώματα (B).

Προκειμένου να εξακριβωθεί το κατά πόσο ο χρόνος επιμήκυνσης στο PCR ευνοεί το smear, έγιναν άλλες 4 αντιδράσεις από την ίδια μήτρα ss cDNA αυξάνοντας τον χρόνο στους 68 °C με βήμα 30 sec.



1st step 95 °C for 1 min

2nd step 95 °C for 15 sec

3rd step 68 °C for X min

4th step got to step 2 for 27 times

Εικόνα 3.4: Επίδραση του χρόνου επιμήκυνσης κατά το LD-PCR στο smear. Από αριστερά έχουμε 6:00, 6:30, 7:00, 7:30 και 8:00 λεπτά. Ηλεκτροφόρηση 5μl από τα 100.



Σαν πιο αποδοτικό PCR θεωρήθηκε αυτό με χρόνο επιμήκυνσης τα 7:30 min. Ακολούθησαν άλλα 5 PCR των 7:30 min με μήτρα το υπόλοιπο RT (2 μl each / 10 μl total). Το mastermix ήταν κοινό οπότε επιλέχθηκαν 2 για έλεγχο με ηλεκτροφόρηση.

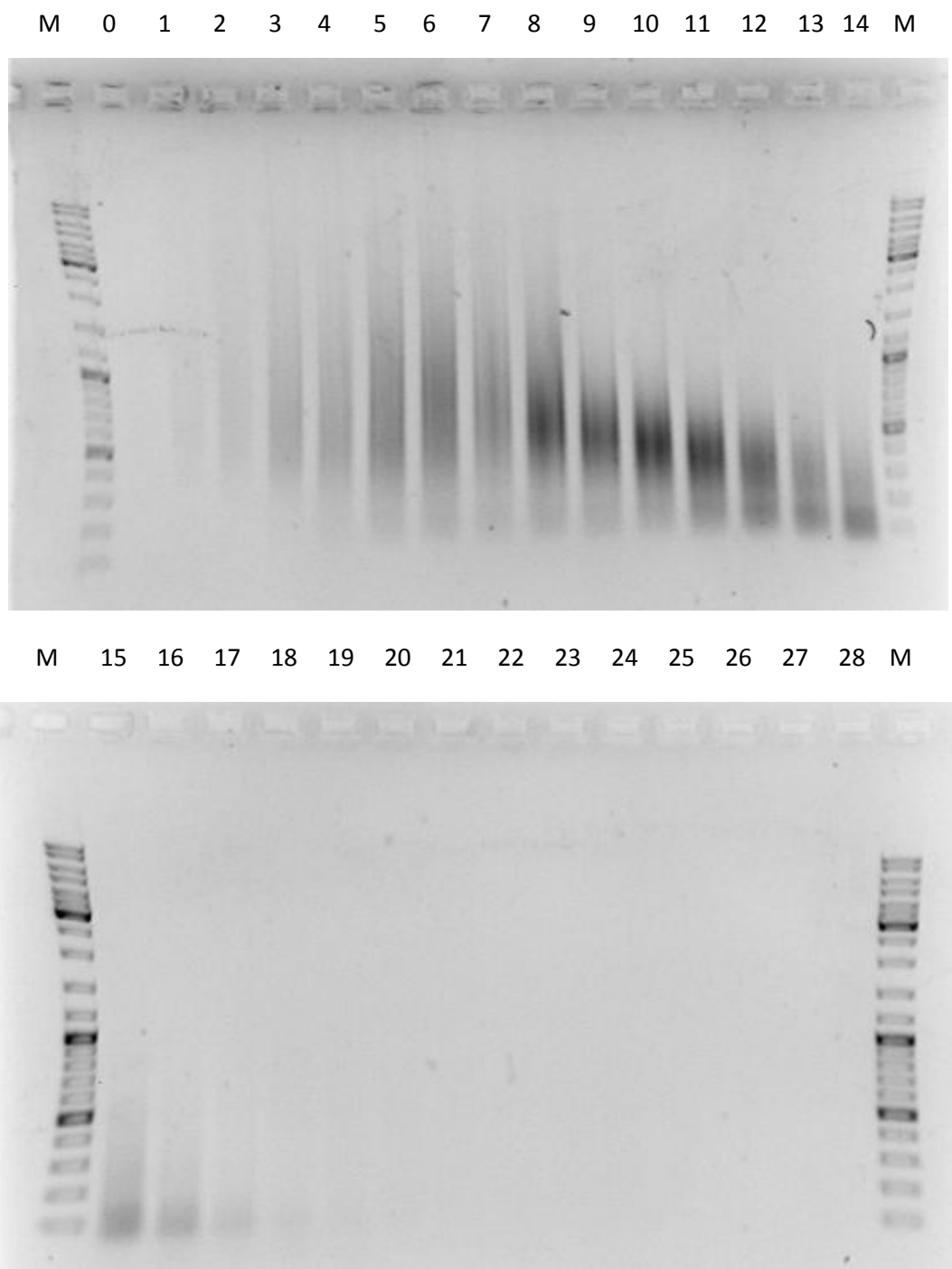
Συνολικά λοιπόν έγιναν 6 αντιδράσεις με elongation time 7:30 min. Αυτά ενώθηκαν σε 2 erpendorfs ανά τρία και έγινε overnight precipitation στους -20 °C (προστέθηκαν 2.5V EtOH 100% & 1/10V CH₃COONa ,3M, pH 4.8).

Την επόμενη ακολούθησε φυγοκέντριση στις 13.000 rpm για 30 min, το κάθε pellet επαναδιαλύθηκε σε 50 μl ddH₂O και τα 2 δείγματα ομογενοποιήθηκαν.

3.1.6 Κλασμάτωση cDNA ανάλογα με το μέγεθος

Προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα απώλειας υλικού κατά την κλασμάτωση, έγινε συλλογή όλων των κλασμάτων μέχρι να κατέβει τελείως η βαφή από την κολώνα και προέκυψαν 28 κλάσματα.

Έπειτα για να ελεγχθεί το προφίλ των κλασμάτων, ηλεκτροφορήθηκαν 3μl από κάθε κλάσμα σε 2 πολύ λεπτά gel αγαρόζης 1% μαζί με 1μl loading dye σε κάθε πηγαδάκι. Επίσης φορτώθηκε και molecular marker ώστε να εκτιμηθεί ο μέσος όρος μεγέθους cDNA των κλασμάτων. Σκοπός είναι να ομογενοποιηθούν τα κλάσματα των οποίων ο μέσος όρος είναι μεγαλύτερος από 500 βάσεις.



Εικόνα 3.5 Ηλεκτροφόρηση κάθε κλάσματος.

Όπως φαίνεται από τις εικόνες τα κλάσματα 0-11 ικανοποιούν την συνθήκη $M.O. \geq 500\text{bp}$ και αυτά ομογενοποιήθηκαν σε ένα erpendorf (συνολικά περίπου 500μl).

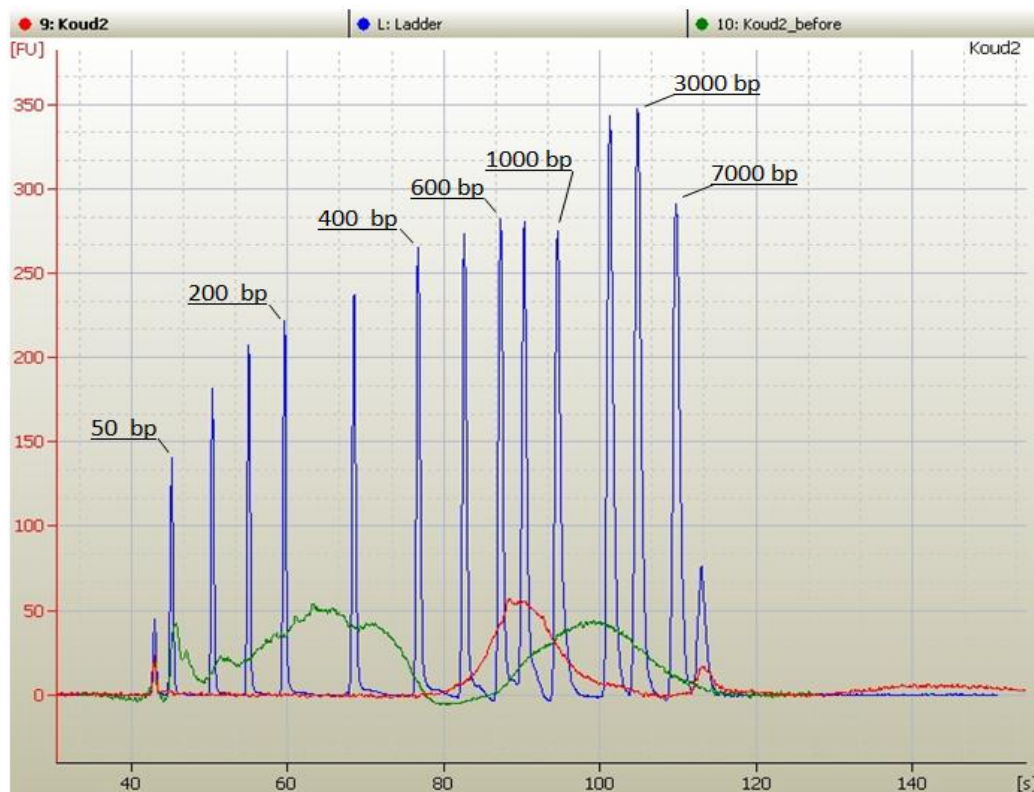
Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του δείγματος προσδιορίστηκε στο Nanodrop ND-1000 spectrophotometer

ds cDNA	
Concentration	87.9 ng/μl
OD _{260/280}	1.79
total	~ 44 μg

Στάλθηκαν 200 μl (17.6 μg) στον ΕΛΚΕΘΕ (Κρήτη) για αλληλούχιση.

Pyrosequencing

Για την αλληλούχιση του μεταγραφώματος του τριχώματος της ελιάς χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο του Rapid Library Preparation της Roche και το αντίστοιχο κιτ. Χρησιμοποιήθηκαν 160 μl cDNA συγκέντρωσης 90 ng/μl (συνολικά περίπου 14 μg) τα οποία θραύστηκαν με πεπιεσμένο άζωτο (1 λεπτό σε πίεση 2.1 bar). Κατόπιν προσδέθηκαν στα άκρα των θραυσμάτων οι ειδικοί προσαρμογείς, απομακρύνθηκαν τα θραύσματα μικρού μεγέθους (<350-400 βάσεις) και η βιβλιοθήκη ποσοτικοποιήθηκε με φωτομέτρηση σε φθοριόμετρο QuantiFluor™-ST Fluorometer (Promega). Οι προσαρμογείς του Rapid Library Preparation κιτ φέρουν στο άκρο τους ένα μόριο της φθορίζουσας ουσίας FAM, που επιτρέπει την άμεσα ποσοτικοποίηση σε φθοριόμετρο με μεγάλη ακρίβεια. Επίσης έγινε ηλεκτροφόρηση 1μl από το δείγμα πριν και μετά την παρασκευή της βιβλιοθήκης σε High Sensitivity DNA chip στο μηχάνημα Bioanalyser (Agilent) για να εκτιμηθεί η κατανομή των θραυσμάτων. Η βιβλιοθήκη DNA που παρασκευάστηκε εκτιμήθηκε ότι περιείχε περίπου $18,96 \times 10^9$ μόρια ανά μl και η κατανομή των θραυσμάτων ήταν από 500 έως 1700 βάσεις με μέσο μέγεθος τις 695 βάσεις. Κατόπιν παρασκευάστηκε αραιώση του δείγματος συγκέντρωσης 1×10^7 μόρια ανά μl.



Εικόνα 3.6:
Ηλεκτροφόρηση 1μl από το δείγμα πριν (πράσινο) και μετά (κόκκινο) την παρασκευή της βιβλιοθήκης σε High Sensitivity DNA chip, μαζί με DNA Ladder mix (μπλε). Οι κορυφές αντιστοιχούν σε 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 1000, 2000, 3000 και 7000 bp.

Ακολούθησε η emulsion PCR όπου δοκιμάστηκαν δύο αναλογίες θραυσμάτων DNA προς σφαιρίδια DNA, 4:1 και 16:1. Η διαδικασία αυτή (titration) γίνεται για να προσδιοριστεί η βέλτιστη αναλογία ώστε η πλειοψηφία των σφαιριδίων να προσδεθεί με ένα μόνο θραύσμα DNA. Μετά την emulsion PCR γίνεται καθαρισμός και επιλογή των σφαιριδίων που φέρουν πολλαπλασιασμένο DNA στην επιφάνειά τους, μέσω probes που υβριδίζουν με το DNA και προσδένονται με βιοτίνη σε μαγνητικά σφαιρίδια επικαλυμένα με στρεπταβιδίνη. Τα εμπουτισμένα σφαιρίδια DNA μετρώνται με ειδικό μηχάνημα (Coulter counter, Beckman) και προσδιορίζεται το ποσοστό εμπλουτισμού σε σχέση με τον αρχικό αριθμό σφαιριδίων που χρησιμοποιήθηκαν. Τιμές εμπλουτισμού μεταξύ 5 και 20% είναι ενδεικτικές για βιβλιοθήκες που δίνουν συνήθως καλά αποτελέσματα αλληλούχησης. Για τη βιβλιοθήκη του τριχώματος της ελιάς ο εμπλουτισμός ήταν περίπου 9% για την αναλογία 4:1 και 29.7% για την αναλογία 16:1. Χρησιμοποιήθηκε τελικά η πρώτη αναλογία και φορτώθηκαν 125000 σφαιρίδια DNA στο 1/16 της πλάκας (PicoTiter Plate) και αλληλουχήθηκαν στο μηχάνημα GS FLX με χρήση του GS FLXTitanium Sequencing kit (Roche).



Εικόνα 3.7: Snapshots από το πρόγραμμα που έκανε την πρώτη ανάλυση των αποτελεσμάτων στο software GS Run Browser (full processing). Το δείγμα μας είναι στο πρώτο lane (region 1). Διακρίνονται στατιστικά της αλληλούχησης όπως πόσα πηγαδάκια φορτώθηκαν, πόσα είχαν το key sequence, πόσα είχαν διπλά διαβάσματα κτλ

Βιοπληροφορική Ανάλυση

Από την αλληλούχιση με το GS-FLX προέκυψε ένα αρχείο τύπου «.sff» (Standard Flowgram File) το οποίο περιέχει όλα τα διαβάσματα καθώς και πληροφορίες για το καθένα. Συνολικά τα διαβάσματα ήταν 13059.

Αρχικά αφαιρέθηκαν οι αλληλουχίες των εκκινήτων (trimming) που χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία των ds cDNAs με τον αλγόριθμο *cutadapt* (v.0.9). Λόγω του ότι η κατεύθυνση της αλληλούχισης δεν είναι γνωστή, αφαιρέθηκαν και οι ανάστροφες συμπληρωματικές αλληλουχίες των εκκινήτων.

Πιο συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα ήταν τα εξής:

- Το ολιγονουκλεοτίδιο SMART αφαιρέθηκε από το 5' άκρο των διαβασμάτων 8587 φορές συνολικά (7569 φορές βρέθηκε ολόκληρο). Λόγω της πιθανότητας να έχει ενσωματωθεί πολλαπλές φορές ο αλγόριθμος ορίστηκε ώστε να το εντοπίζει έως 3 φορές διαδοχικά.
- Η ανάστροφη και συμπληρωματική ακολουθία του SMART αφαιρέθηκε από το 3' άκρο 1865 φορές συνολικά (799 φορές βρέθηκε ολόκληρο). Επίσης έως 3 φορές διαδοχικά.
- Το ολιγονουκλεοτίδιο PyroREX αφαιρέθηκε από το 5' άκρο 990 φορές συνολικά (799 φορές ολόκληρο).
- Η ανάστροφη και συμπληρωματική ακολουθία του PyroREX αφαιρέθηκε από το 3' άκρο 527 φορές συνολικά (250 φορές ολόκληρος).

Ακολούθησε ομαδοποίηση τους σε clusters (διαβάσματα που έχουν ομοιότητες και αντιπροσωπεύουν το ίδιο γονίδιο), με την βοήθεια του CD-HIT-EST. Σαν ελάχιστο ποσοστό ομοιότητας ορίστηκε το 95% και ελάχιστο μέγεθος οι 100 βάσεις. Οι παράμετροι του αλγόριθμου ρυθμίστηκαν ώστε να ελέγχεται κάθε αλληλουχία καθώς και η συμπληρωματική της με τις υπόλοιπες και το clustering να γίνεται με βάση την μέγιστη ομοιότητα και όχι στο πρώτο cluster που πληρείται ο κανόνας του 95%. Όσες αλληλουχίες δεν εντάσσονται σε κάποιο cluster θεωρούνται singleton (δηλαδή είναι αλληλουχίες με μοναδιαία εκπροσώπηση αφού δεν έχουν επικάλυψη με τα υπόλοιπα).

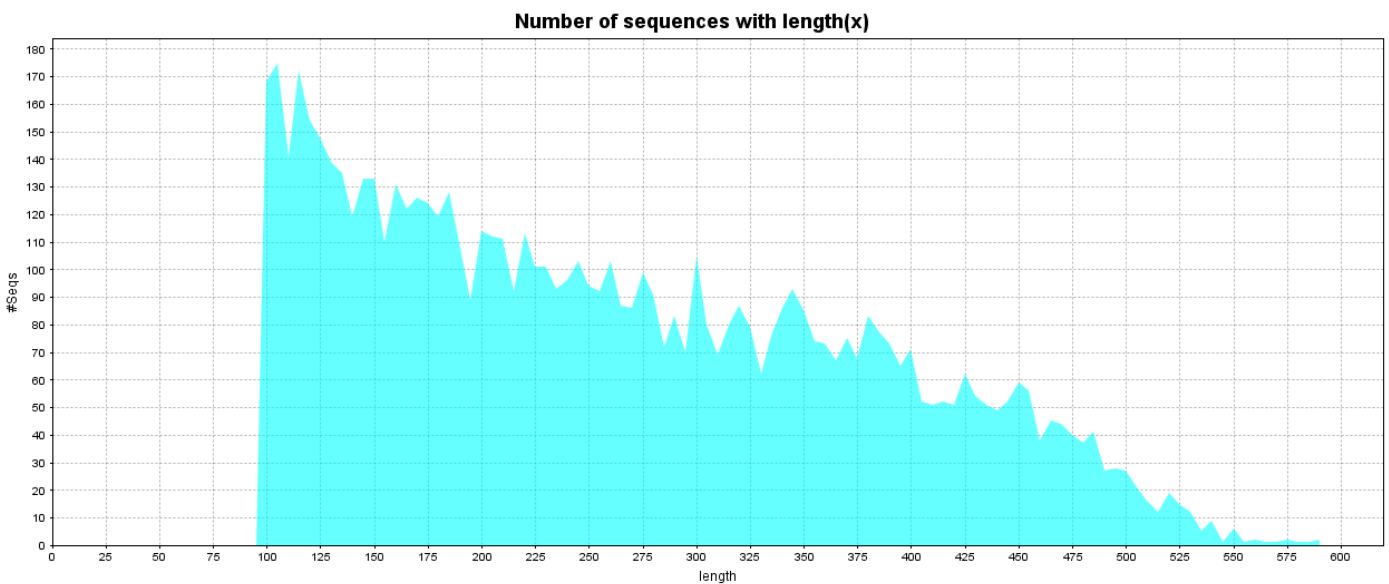
Συγκεντρωτικά καταλήξαμε στα εξής:

	Άθροισμα αλληλουχιών	Μέσο μέγεθος	Ελάχιστο μέγεθος	Μέγιστο μέγεθος	Μέγεθος του 50%
Συνολικά	7258	262,4 bp	100 bp	593bp	245 bp
Σε clusters	2659	267,5 bp	100 bp	593 bp	248 bp
Singletons	4599	259,4 bp	100 bp	562 bp	242 bp

Προέκυψαν συνολικά 769 clusters με το μικρότερο να αποτελείται από 2 αλληλουχίες ενώ το μεγαλύτερο από 67.

Οι 7258 ακολουθίες είναι σε ένα αρχείο (multifasta) και ο χειρισμός τους γίνεται παράλληλα με το Blast2Go (Götz et al, 2008). Χρησιμοποιήθηκε η έκδοση 2.4.8.

Στην παρακάτω γράφημα βλέπουμε την κατανομή μεγέθους των αλληλουχιών



Το πρώτο βήμα είναι η μαζική αναζήτηση ομολογιών (BLAST - Basic Local Alignment Search Tool). Χρησιμοποιήθηκε η βάση του NCBI με τις εξής παραμέτρους:

- **Blast DataBase** : **nr**
- **Blast Program** : **blastx (v. 2.2.25+)**
- **Blast ExpectValue** : **1.0E-6**

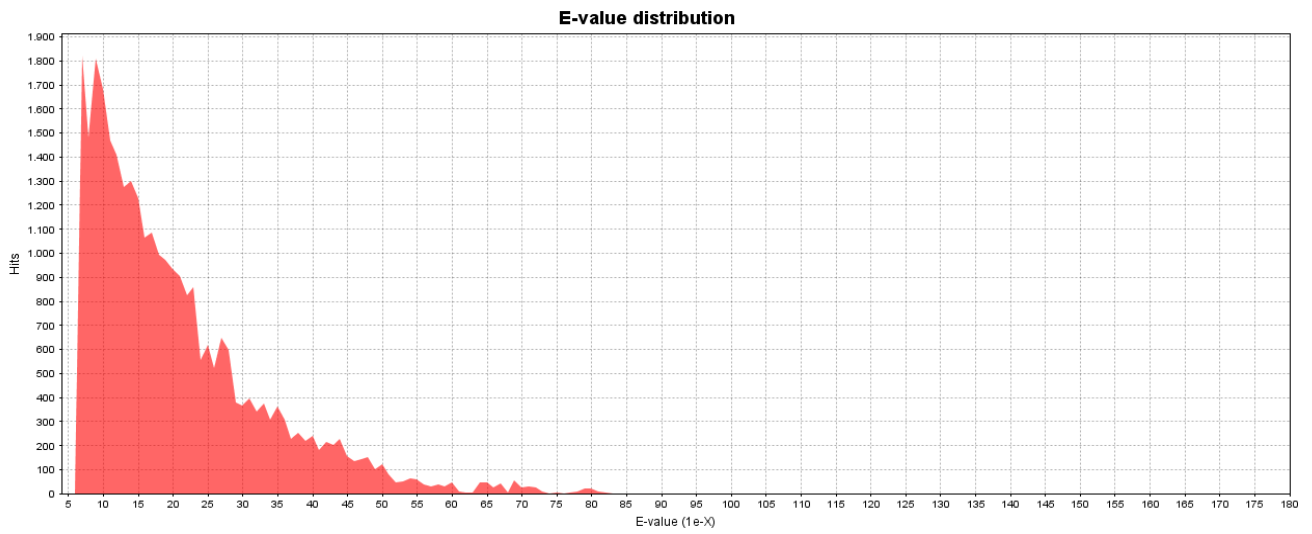
Η βάση δεδομένων nr περιλαμβάνει όλες τις ακολουθίες που είναι διαθέσιμες στις βάσεις GenBank, EMBL, DDBJ και PDB.

Ο αλγόριθμος που χρησιμοποιήθηκε είναι ο blastx, ο οποίος συγκρίνει την μεταφραζόμενη ακολουθία αμινοξέων κάθε αλληλουχίας με γνωστές πρωτεΐνες. Κάθε αλληλουχία μεταφράζεται και στα έξι πιθανά αναγνωστικά πλαίσια και καθένα ελέγχεται ανεξάρτητα για την ομοιότητα του προϊόντος του με γνωστές πρωτεΐνες. Έτσι είναι πολύ χρήσιμος σε αναλύσεις ESTs, όπου η κατεύθυνση αλληλούχισης καθώς και το αναγνωστικό πλαίσιο είναι άγνωστα, καθώς και πιο αναλυτικός καθώς η σύγκριση γίνεται σε επίπεδο αμινοξέων.

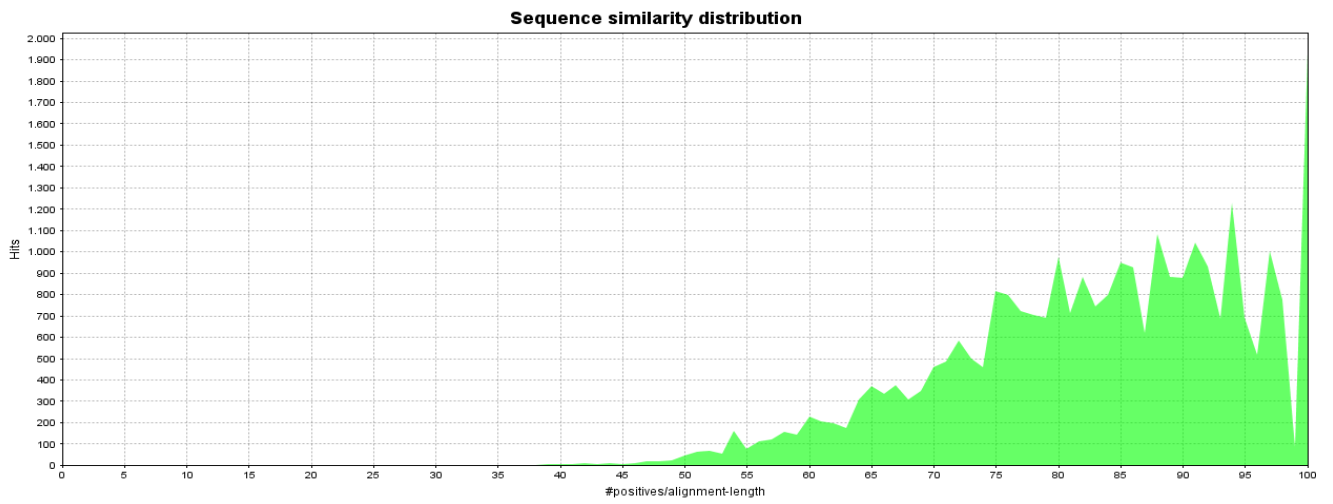
Το Expect value είναι μια παράμετρος που εκφράζει τον αριθμό των τυχαίων (εσφαλμένων) αποτελεσμάτων που αναμένονται όταν γίνεται ένα BLAST. Η τιμή του μειώνεται όσο αυξάνει ο βαθμός ομοιότητας. Για παράδειγμα, όταν ένα αποτέλεσμα έχει EValue = 1, τότε στην δεδομένη βάση αναμένεται 1 ακολουθία να έχει τον ίδιο βαθμό ομοιότητας με την δική μας κατά τύχη. Όσο πιο κοντά στην τιμή 0 είναι, τόσο πιο σημαντική είναι η ομοιότητα. Όταν ρυθμίζεται λοιπόν η τιμή του EValue $\leq 1.0E-6$, ορίζουμε ένα «κατώφλι ομοιότητας» και επιστρέφουν μόνο αποτελέσματα που πληρούν αυτή την προϋπόθεση, επιτυγχάνοντας πιο «αυστηρά» BLAST.

Από 7258 ακολουθίες που έγιναν BLAST, βρέθηκαν 1835 να πληρούν τον κανόνα του EValue $\leq 1.0E-6$.

Από το βήμα του blast προέκυψαν τα ακόλουθα στατιστικά γραφήματα

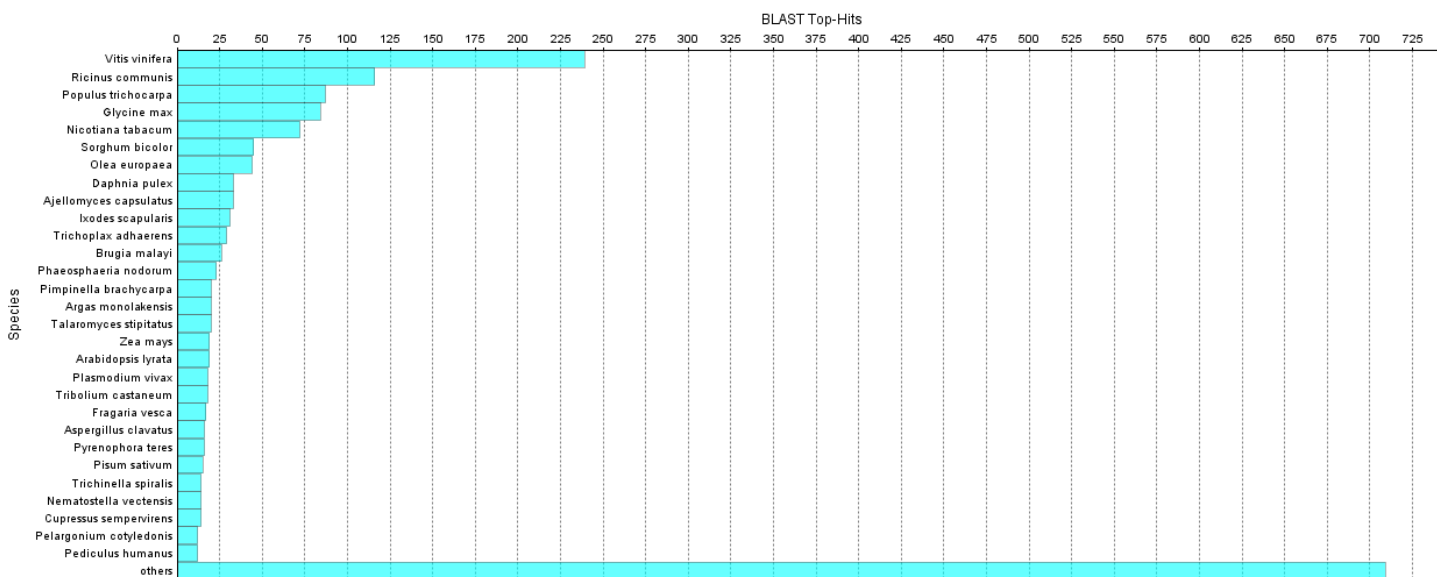


Η συνολική κατανομή των τιμών των EValues



Η συνολική κατανομή του βαθμού ομοιότητας των ακολουθιών

Top-Hit species distribution

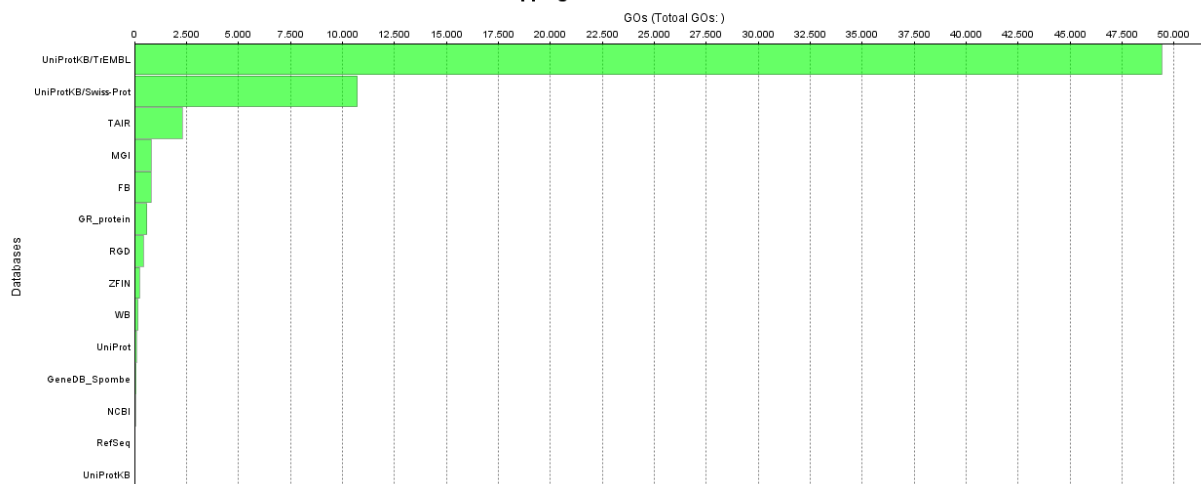


Τα είδη με το βέλτιστο αποτέλεσμα στο blast

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας του blast, ακολούθησε το βήμα της χαρτογράφησης (mapping) των αποτελεσμάτων. Σε αυτό το βήμα γίνεται ανάκτηση όλων των χαρακτηρισμών (Gene Ontology terms, GO terms) που έχουν αντιστοιχηθεί στα γονίδια που επέστρεψαν σαν αποτέλεσμα στο blast. Σε κάθε ακολουθία μπορούν να συσχετιστούν από κανένα έως πολλά GO terms.

Στο παρακάτω γράφημα φαίνονται ο αριθμός των GO terms που ανακτήθηκαν από κάθε βάση για τις αλληλουχίες μας.

Mapping database sources



Στην συνέχεια, ακολούθησε το βήμα του Annotation. Εδώ επιλέγονται αυστηρά τα GO terms που ανακτήθηκαν στο βήμα του Mapping και αντιστοιχίζονται στις αλληλουχίες. Η επιλογή γίνεται με βάση τον πιο εξειδικευμένο χαρακτηρισμό εντός ενός εύρους αξιοπιστίας. Οι παράμετροι ορίστηκαν ως εξής:

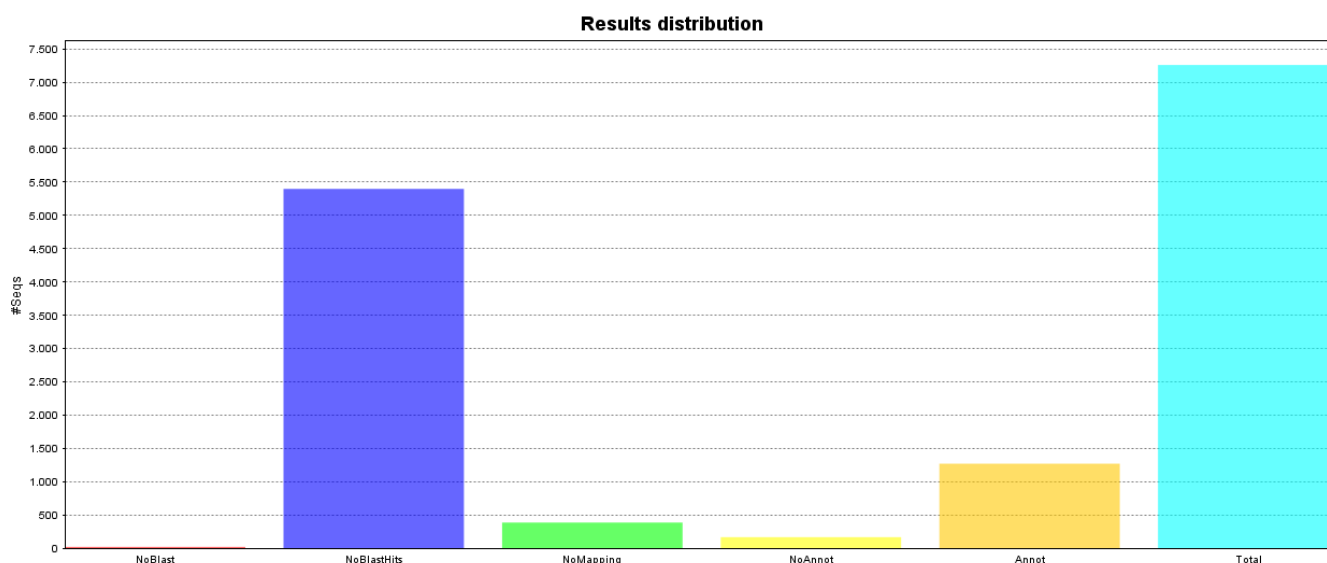
- **E-Value-Hit-Filter** : 1.0E-6
- **Annotation CutOff** : 55
- **GO Weight** : 5
- **Hsp-Hit Coverage CutOff** : 0

Το E-Value-Hit-Filter ορίζει ότι μόνο τα αποτελέσματα των οποίων το E-Value $\leq 1.0E-6$ θα χρησιμοποιηθούν για το annotation. Οι υπόλοιπες τρεις ρυθμίσεις, είναι οι προεπιλεγμένες τιμές του προγράμματος.

Συνοπτικά τα αποτελέσματα του annotation ήταν:

- **Annotations (συνολικά)** : 5976
- **Αλληλουχίες με annotation** : 1274
- **Κωδικοί ενζύμων (συνολικά)** : 628
- **Αλληλουχίες με κωδικό ενζύμου** : 521

Η κατανομή των αλληλουχιών μας φαίνεται στο παρακάτω γράφημα:



Από τις 7258 αλληλουχίες, αντιστοιχήθηκε annotation στις 1274. Πιο συγκεκριμένα, από τα 4599 singletons, βρέθηκε annotation για τα 902 ενώ από τις 2659 αλληλουχίες που ανήκουν σε clusters, έγιναν annotated οι 372.

Οι κωδικοί των ενζύμων (EC numbers) που αντιστοιχήθηκαν στις αλληλουχίες, εμπλέκονται στα παρακάτω μονοπάτια σύμφωνα με την βάση δεδομένων KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*).

Amino Acid Metabolism

- Arginine and proline metabolism 9
- Alanine, aspartate and glutamate metabolism 7
- Cysteine and methionine metabolism 5
- Phenylalanine metabolism 4
- Glycine, serine and threonine metabolism 4
- Tyrosine metabolism 4
- Tryptophan metabolism 5
- Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis 2
- Histidine metabolism 2
- Valine, leucine and isoleucine biosynthesis 2

Metabolism of Other Amino Acids

- Cyanoamino acid metabolism 1
- Selenocompound metabolism 1
- Glutathione metabolism 7

Nucleotide Metabolism

- Purine metabolism 9
- Pyrimidine metabolism 3

Translation

- Aminoacyl-tRNA biosynthesis 1

Signal Transduction

- Phosphatidylinositol signaling system 6

Energy Metabolism

- Sulfur metabolism 3
- Carbon fixation in photosynthetic organisms 6
- Nitrogen metabolism 7
- Methane metabolism 11
- Oxidative phosphorylation 8

Metabolism of Cofactors and Vitamins

- Vitamin B6 metabolism 2
- Porphyrin and chlorophyll metabolism 3
- Pantothenate and CoA biosynthesis 3
- Retinol metabolism 2
- Riboflavin metabolism 2

Lipid Metabolism

- Sphingolipid metabolism 2
- Fatty acid biosynthesis 4
- Biosynthesis of unsaturated fatty acids 2
- Steroid hormone biosynthesis 3
- Glycerophospholipid metabolism 3
- alpha-Linolenic acid metabolism 3
- Fatty acid metabolism 8

Carbohydrate Metabolism

- C5-Branched dibasic acid metabolism 2
- Glyoxylate and dicarboxylate metabolism 3
- Butanoate metabolism 4
- Amino sugar and nucleotide sugar metabolism 3
- Ascorbate and aldarate metabolism 3
- Galactose metabolism 4
- Fructose and mannose metabolism 4
- Pentose phosphate pathway 5
- Inositol phosphate metabolism 6
- Pentose and glucuronate interconversions 5
- Propanoate metabolism 5
- Starch and sucrose metabolism 10
- Pyruvate metabolism 10
- Glycolysis / Gluconeogenesis 11

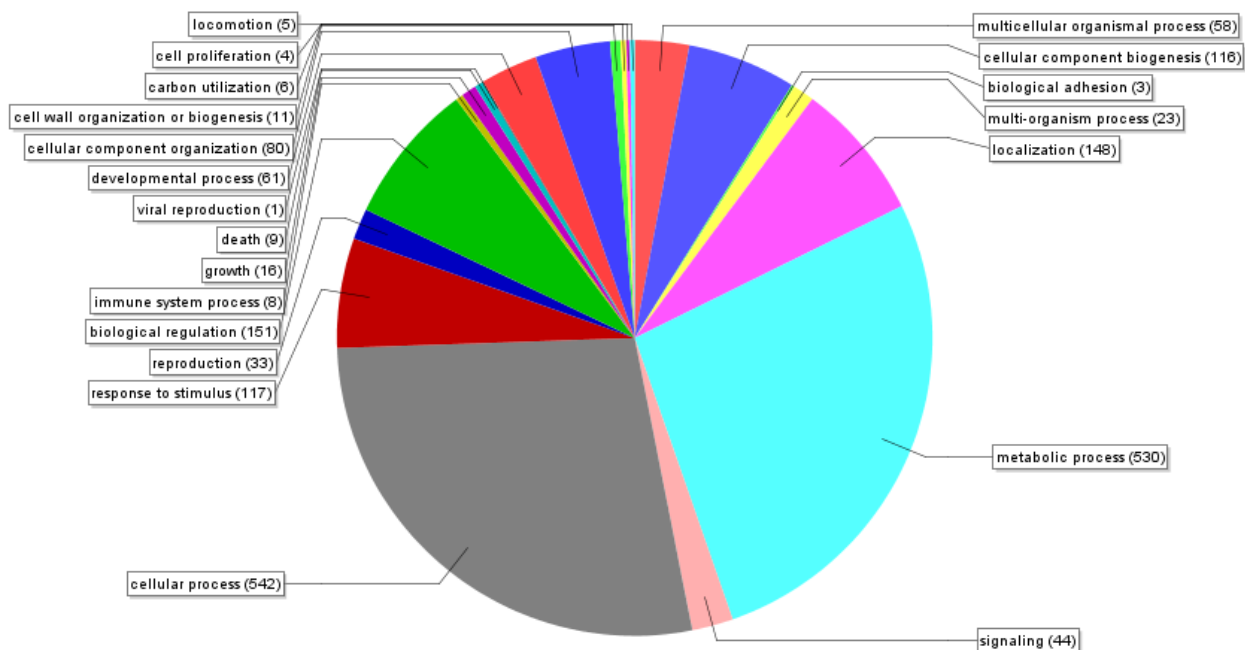
Glycan Biosynthesis and Metabolism	
• Glycosphingolipid biosynthesis	1
• Glycosaminoglycan degradation	1
Metabolism of Terpenoids and Polyketides	
• Terpenoid backbone biosynthesis	2
• Limonene and pinene degradation	2
• Diterpenoid biosynthesis	1
Biosynthesis of Other Secondary Metabolites	
• Isoquinoline alkaloid biosynthesis	1
• Anthocyanin biosynthesis	1
• Flavonoid biosynthesis	3
• Phenylpropanoid biosynthesis	5
• Tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis	2
Xenobiotics Biodegradation and Metabolism	
• Fluorobenzoate degradation	1
• Chlorocyclohexane and chlorobenzene degradation	1
• Naphthalene degradation	1
• Toluene degradation	2
• Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	3
• Aminobenzoate degradation	3
• Chloroalkane and chloroalkene degradation	2
• Drug metabolism - cytochrome P450	4
• Drug metabolism - other enzymes	2

Πίνακας 3.1

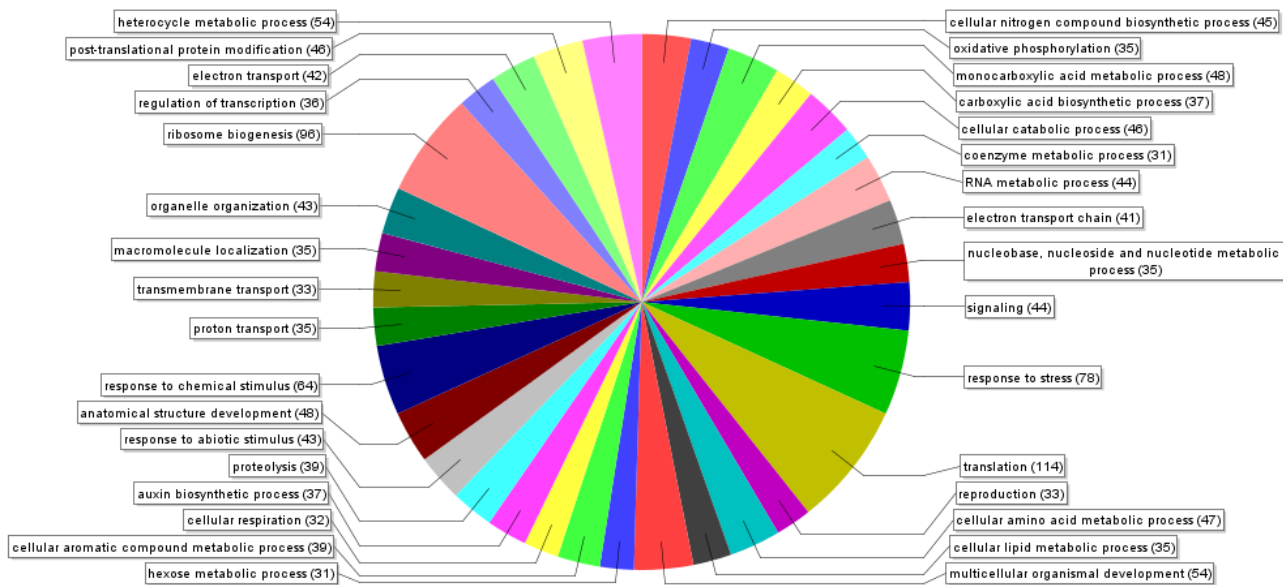
Περίπου τα 2/3 λοιπόν των annotations προέρχονται από τα singletons. Από τα αποτελέσματα αυτών δημιουργήθηκαν δύο τύπων γραφήματα («επιπέδου περιγραφής GO 2» και «πολλαπλών επιπέδων») για κάθε μια από τις εξής τρεις κατηγορίες: α) Βιολογική Διεργασία, β) Μοριακή Λειτουργία, και γ) Κυτταρικό Διαμέρισμα. Η διαφορά είναι ότι τα γραφήματα «επιπέδου περιγραφής GO 2» αναφέρονται στους γενικούς κύριους άξονες ενώ τα «πολλαπλών επιπέδων» είναι πιο αναλυτικά. Σε παρένθεση είναι ο αριθμός των αλληλουχιών. Πιο συγκεκριμένα:

Βιολογική Διεργασία

biological_process Level 2

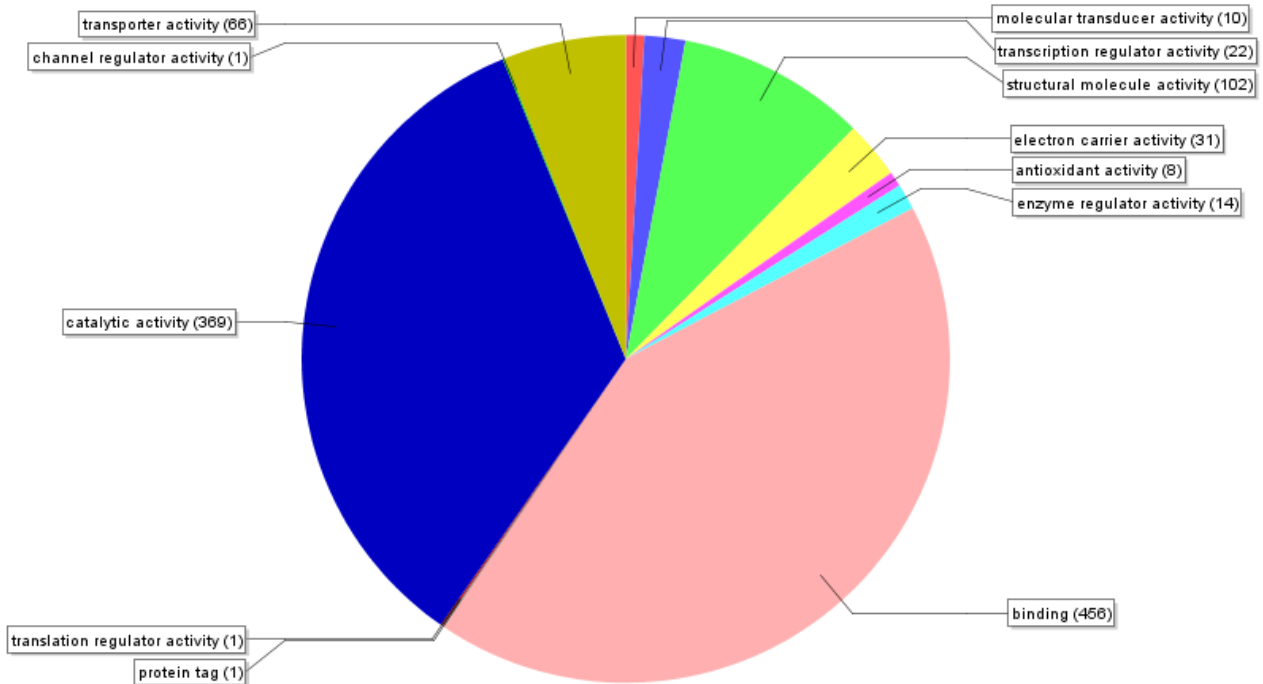


Sequence distribution: biological_process(Filterd by #Seqs: cutoff=30.0)

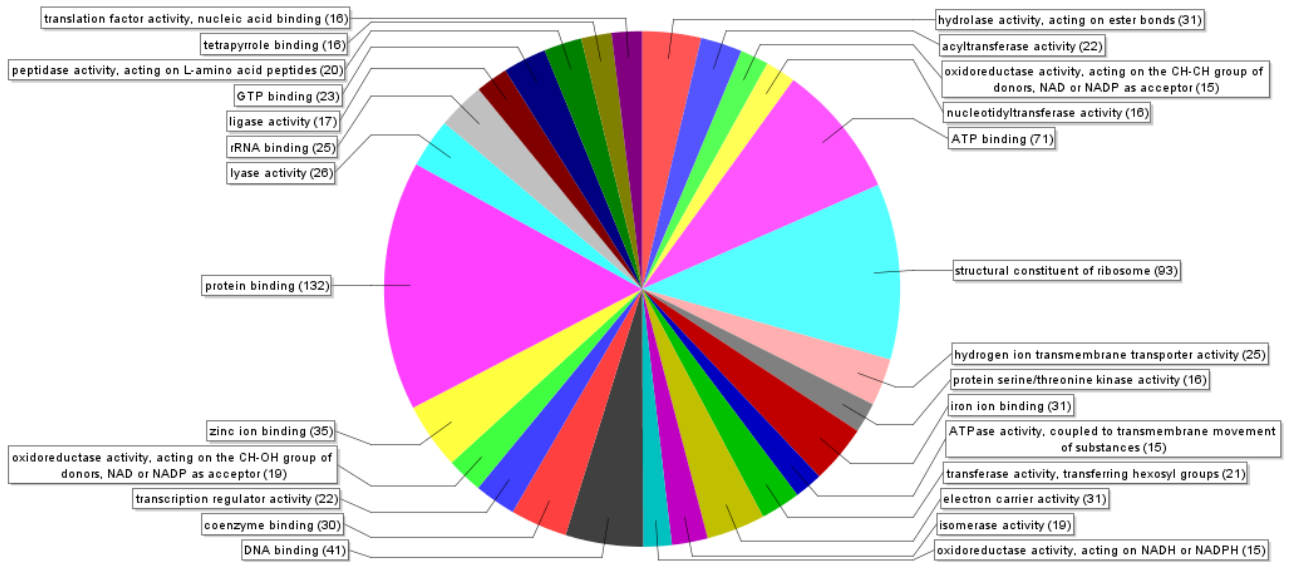


Μοριακή Λειτουργία

molecular_function Level 2

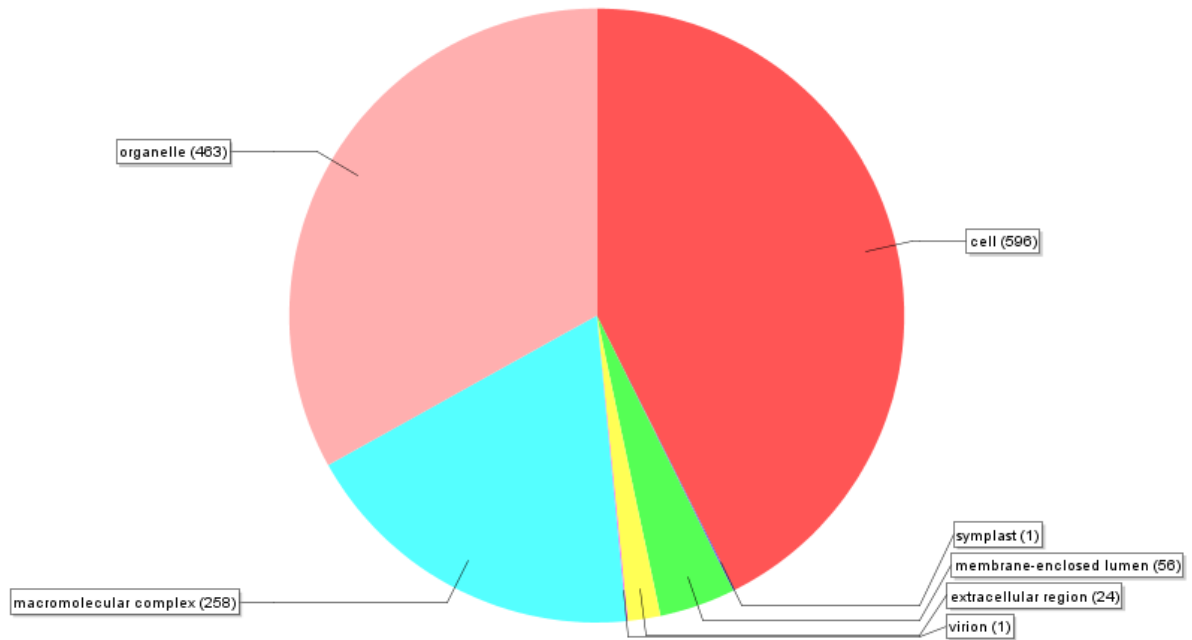


Sequence distribution: molecular_function(Filtered by #Seqs: cutoff=15.0)

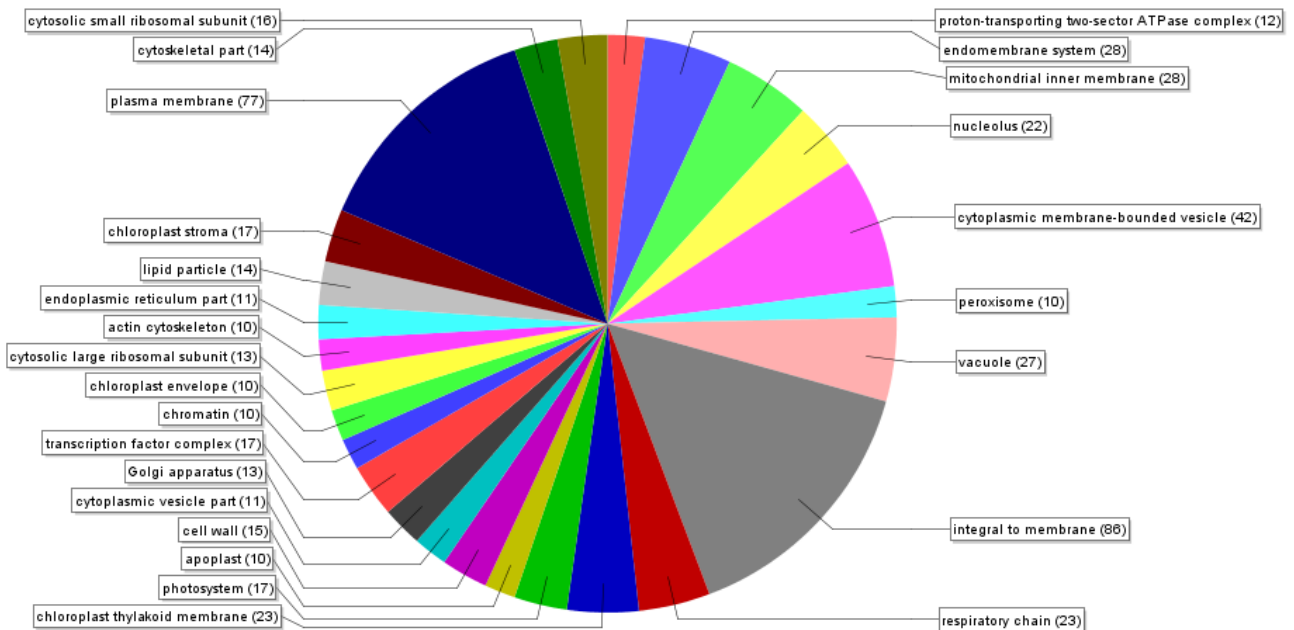


Κυτταρικό Διαμέρισμα

cellular_component Level 2



Sequence distribution: cellular_component (Filtered by #Seqs: cutoff=10.0)



Προκειμένου να αποκλειστεί η πιθανότητα μόλυνσης, να επαληθευτούν τα αποτελέσματα αλλά και να αποφευχθεί η πιθανότητα κάποιες αλληλουχίες να μην είναι καταχωρημένες στο NCBI, όλα τα reads ξαναέγιναν Blast, στην βάση δεδομένων TrichOME (Dai *et al.* 2010) η οποία είναι εξειδικευμένη βάση με ESTs από βιβλιοθήκες φυτικών τριχωμάτων διαφόρων ειδών. Χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος tBlastx (μιας και ο Blastx δεν είναι διαθέσιμος) και για τον λόγο αυτό όσα annotations αντικαταστάθηκαν/διορθώθηκαν με το αποτέλεσμα της βάσης TrichOME έγιναν ξανά blast στην βάση NCBI με τον tBlastx ώστε οι τιμές E-Value να είναι συγκρίσιμες. Επιλέχθηκε το αποτέλεσμα με το μικρότερο E-Value.

Από τα 769 clusters, πήραμε annotations για τα εξής clusters:

Cluster	Annotation	Database
4	unknown	NCBI
9	hypothetical protein VITISV_002825	NCBI
14	unknown	NCBI
16	hypothetical protein Bm1_17870	NCBI
21	metallothionein-like protein	NCBI
22	26S proteasome subunit	NCBI
23	Catalase	TrichOME
24	photosystem i p700 apoprotein a2	NCBI
25	photosystem i p700 apoprotein a2	NCBI
26	metallothionein-like protein	NCBI
31	senescence-associated protein	NCBI
35	10 kda secreted protein	NCBI
38	hypothetical protein NitaMp027	NCBI
43	lipid transfer protein	NCBI
46	bark storage protein	NCBI
47	protein	NCBI
50	unknown	NCBI
52	predicted protein	NCBI
58	lipid transfer protein	NCBI
60	hypothetical protein SORBIDRAFT_1180s002020	NCBI
62	protein	NCBI
64	transcript antisense to ribosomal rna protein	NCBI
66	senescence-associated protein	NCBI
67	photosystem ii protein d1	NCBI
77	mflj00348 protein	NCBI
78	lipid transfer protein	NCBI
79	unknown	NCBI
80	predicted protein	NCBI
83	metallothionein-1-like protein	NCBI
89	senescence-associated protein	NCBI
95	10 kDa putative secreted protein	NCBI
107	PREDICTED: hypothetical protein	NCBI
111	polyketide synthase	NCBI
113	ORF124	NCBI
119	ribosomal protein s7	NCBI
120	protein	NCBI
123	bark storage protein	NCBI
124	protein	NCBI
125	protein	NCBI
127	conserved hypothetical protein	NCBI

Αποτελέσματα

Cluster	Annotation	Database
130	protein	NCBI
131	chk1 checkpoint-like protein	NCBI
139	unknown	TrichOME
143	Cytochrome P450-like TBP protein	TrichOME
145	ccr4-associated factor	NCBI
147	cp12 domain-containing protein 1	NCBI
149	Putative senescence-associated protein	TrichOME
151	hypothetical protein	NCBI
155	ribosomal protein s7	NCBI
160	hypothetical protein	NCBI
178	predicted protein	NCBI
182	cytochrome c oxidase subunit II	NCBI
184	senescence-associated protein	NCBI
186	Patellin-3	NCBI
187	photosystem i p700 apoprotein a2	NCBI
188	atp synthase cf0 subunit i	NCBI
189	hypothetical protein	NCBI
190	10 kda secreted protein	NCBI
191	senescence-associated protein	NCBI
192	protein	NCBI
193	hypothetical protein	NCBI
194	protein	NCBI
195	cytochrome P450 like_TBP	NCBI
196	Putative GDSL-motif lipase/acylhydrolase	TrichOME
198	hypothetical protein	NCBI
199	protein	NCBI
200	papain-like cysteine proteinase	NCBI
201	lipid transfer protein	NCBI
202	photosystem i p700 apoprotein a2	NCBI
203	atp synthase cf0 subunit iii	NCBI
204	hypothetical protein	NCBI
207	conserved hypothetical protein	NCBI
213	protein	NCBI
214	bark storage protein	NCBI
218	senescence-associated protein	NCBI
220	unknown	NCBI
221	metallothionein-like protein	NCBI
223	senescence-associated protein	NCBI
225	ribosomal protein I15	NCBI
230	predicted protein	NCBI
232	cytoplasmic 2	NCBI
234	60s ribosomal protein I15	NCBI
240	senescence-associated protein	NCBI
241	polyadenylate-binding protein 4	NCBI
249	cytochrome c	NCBI
256	ORF124	NCBI
259	orf86	NCBI
269	conserved hypothetical protein	NCBI
274	predicted protein	NCBI
296	conserved hypothetical protein	NCBI

Cluster	Annotation	Database
303	atpase subunit 1	NCBI
304	hypothetical protein DAPPUDRAFT_67127	NCBI
305	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NCBI
306	ribosomal protein s8	NCBI
307	cral trio domain protein	NCBI
311	conserved hypothetical protein	NCBI
313	hypothetical protein VITISV_002825	NCBI
314	phosphate transporter	NCBI
315	peroxisomal hydratase-dehydrogenase-epimerase	NCBI
317	hypothetical protein DAPPUDRAFT_68692	NCBI
318	histone h4-like	NCBI
321	translation initiation factor eIF4A	NCBI
322	eukaryotic translation initiation factor	NCBI
324	nascent polypeptide-associated complex subunit alpha	NCBI
325	protein	NCBI
326	10 kDa putative secreted protein	TrichOME
327	diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase	NCBI
328	photosystem i p700 apoprotein a2	NCBI
329	protein	NCBI
330	protein	NCBI
332	vamp protein sec22	NCBI
333	histone h4-like	NCBI
337	mutt domain	NCBI
340	protein	NCBI
342	cell wall-associated hydrolase	NCBI
345	swap domain-containing protein	NCBI
349	unknown	NCBI
350	hypothetical protein VITISV_039385	NCBI
353	photosystem i p700 apoprotein a2	NCBI
356	lipid transfer protein	NCBI
357	protein	NCBI
359	protein	NCBI
360	protein	NCBI
361	histone h3	NCBI
362	unknown	NCBI
364	loc398314 protein	NCBI
365	ypothetical protein VITISV_039385	NCBI
366	plasma membrane h+ atpase	NCBI
369	wd-40 repeat family protein	NCBI
370	diphosphoinositol polyphosphate	NCBI
371	10 kda secreted protein	NCBI
373	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NCBI
375	cytochrome b	NCBI
377	atp synthase cf0 subunit iii	NCBI
379	40s ribosomal protein s16	NCBI
381	60s ribosomal protein l15	NCBI
383	protein	NCBI
385	Putative senescence-associated protein	TrichOME
387	unnamed protein product	NCBI
388	hypothetical protein VITISV_009275	NCBI

Αποτελέσματα

Cluster	Annotation	Database
389	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	NCBI
393	calcium-binding protein	NCBI
394	ribosomal protein l39	NCBI
397	pi starvation-induced protein	NCBI
398	voltage-gated clc-type chloride	NCBI
399	ORF137	NCBI
400	nadh dehydrogenase subunit 1	NCBI
403	zinc finger	NCBI
405	Cytochrome P450-like TBP protein	TrichOME
412	mbd10 dna binding methyl- binding	NCBI
414	carbonic anhydrase	NCBI
417	zinc finger	NCBI
419	60s ribosomal protein l27a	NCBI
421	glutamate synthase	NCBI
423	ubiquitin-like protein 5	NCBI
424	predicted protein	NCBI
425	ribosomal protein s4	NCBI
426	40s ribosomal protein s18	NCBI
429	26s proteasome non-atpase regulatory subunit 4	NCBI
431	ribulose bisphosphate carboxylase oxygenase activase chloroplast	NCBI
432	cytosolic glutamine synthetase	NCBI
438	unknown	NCBI
445	calcium-binding protein	NCBI
449	metallothionein-like protein	NCBI
450	psba_consus	NCBI
451	proteasome (macropain) 26s non- 4	NCBI
452	NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit 4	NCBI
454	auxin-induced putative CP12 domain-containing protein	NCBI
460	unnamed protein product	NCBI
464	unknown	TrichOME
466	protein	NCBI
467	hypothetical protein NitaMp027	NCBI
472	ribulose bisphosphate carboxylase oxygenase activase chloroplast	NCBI
474	30S ribosomal protein S7	TrichOME
478	chloroplast protein 12	NCBI
479	kdel motif-containing protein 1	NCBI
483	myosin heavy chain-related	NCBI
487	mitochondrial peroxiredoxin prx1	NCBI
488	nadh-ubiquinone oxidoreductase nufs7 psst 20 kda subunit	NCBI
498	SJCHGC01393 protein	TrichOME
500	glucosyltransferase homolog	NCBI
522	ribulose bisphosphate carboxylase oxygenase activase chloroplast	NCBI
524	protein	NCBI
527	microtubule-associated protein rp eb family member 1	NCBI
536	Orf122	TrichOME
540	60S ribosomal protein L10-B	TrichOME
548	protein	NCBI
566	unnamed protein product	NCBI
570	chromosome 19 open reading frame 29	NCBI
571	26s protease regulatory subunit 8	NCBI

Cluster	Annotation	Database
580	protein	NCBI
583	ac1147-like protein	NCBI
593	eukaryotic translation initiation factor subunit 6 interacting protein	NCBI
613	cytosolic aldehyde dehydrogenase	NCBI
614	fk506 binding protein	NCBI
617	Cytochrome P450-like TBP protein	TrichOME
622	RRNA intron-encoded homing endonuclease	TrichOME
627	chloroplast 30s ribosomal protein	NCBI
650	Zinc finger, CCCH-type	TrichOME
653	Cytochrome P450-like TBP protein	TrichOME
656	cytochrome oxidase subunit 3	NCBI
659	nadh dehydrogenase subunit 1	NCBI
670	hypothetical protein VITISV_018435	NCBI
686	10 kDa putative secreted protein	TrichOME
712	Putative glycine rich protein	TrichOME
727	atp synthase subunit 6	NCBI

Πίνακας 3.2

Από τα αποτελέσματα, ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι εξής κατηγορίες

- Αλληλουχίες σχετικές με την ανάπτυξη και διαφοροποίηση τριχωμάτων

Annotation	GO ID	Organism	E-Value	Size (bp)
Calcium-binding protein CML42	trichome branching	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2.8e-16	393
preprotein translocase subunit secA (AGY1)	trichome morphogenesis	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1.9e-17	477
acyltransferase-like protein	trichome morphogenesis	<i>Petunia x hybrida</i>	3.2e-17	234
Arp2/3 complex 20 kD subunit	Cell morphogenesis	<i>Ricinus communis</i>	2.2e-37	318

Πίνακας 3.3

- Αλληλουχίες σχετιζόμενες με άμυνα

Response to abiotic stress				
Annotation	GO ID	Organism	E-Value	Size (bp)
glutathione s-transferase	toxin catabolic process	<i>Ricinus communis</i>	1.3e-42	418
metallothionein-like protein	metal ion binding	<i>Pimpinella brachycarpa</i>	2.9e-18	480
ITN1 (Increased Tolerance to NaCl)	response to salt stress	<i>Arabidopsis thaliana</i>	9.2e-18	216
LTL1 (Li-tolerant lipase 1)	Hyperosmotic salinity response / response to lithium ion	<i>Arabidopsis thaliana</i>	8.9e-20	340

Response to abiotic stress				
HOS15	response to cold	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3.5e-19	422
2-cys peroxiredoxin	response to oxidative stress	<i>Vigna radiata</i>	1.1e-44	378
ELIP (early light-inducible protein)	response to UV-B, red, far red	<i>Ricinus communis</i>	2e-35	353
AREB2 (abscisic acid responsive element-binding protein 2)	response to water deprivation	<i>Populus suaveolens</i>	5.9e-12	312
Response to biotic stress				
WRKY transcription factor	defense response to bacterium	<i>Ricinus communis</i>	2.2e-18	379
CCR4 associated factor 1a	response to biotic stimulus	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1.9e-9	307
pathogenesis-related protein 1	response to stress	<i>Vitis vinifera</i>	6.4e-28	450

Πίνακας 3.4

- Αλληλουχίες που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση τερπενοειδών

Enzyme	EC number	Μονοπάτι	Organism (TopBlast)	E-Value	Size (bp)
4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol kinase	2.7.1.148	Terpenoid backbone biosynthesis	<i>Nicotiana benthamiana</i>	1.3e-13	342
1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase	1.1.1.267	Terpenoid backbone biosynthesis	<i>Rauvolfia verticillata</i>	1.4e-19	440
(E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl-diphosphate synthase	1.17.7.1	Terpenoid backbone biosynthesis	<i>Vitis vinifera</i>	4e-44	360
taxadien-5α-ol O-acetyltransferase	2.3.1.162	Diterpenoid biosynthesis	<i>Ricinus communis</i>	3.27e-38	416

Πίνακας 3.5

- Αλληλουχίες που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση φλαβονοειδών / φαινυλοπροπανοειδών

Βιοσύνθεση φλαβονοειδών				
Enzyme	EC number	Organism (TopBlast)	E-Value	Size (bp)
6'-deoxychalcone synthase	2.3.1.170	<i>Actinidia deliciosa</i>	4e-27	272
chalcone isomerase	5.5.1.6	<i>Petunia x hybrida</i>	1.6e-13	369
dihydrokaempferol 4-reductase	1.1.1.219	<i>Ocimum basilicum</i>	8.9e-52	387
Βιοσύνθεση φαινυλοπροπανοειδών				
Enzyme	EC number	Organism (TopBlast)	E-Value	Size (bp)
cinnamyl-alcohol dehydrogenase	1.1.1.195	<i>Nicotiana tabacum</i>	7.7e-25	472
coniferin beta-glucosidase	3.2.1.126	<i>Vitis vinifera</i>	6e-24	454
cinnamoyl-CoA reductase	1.2.1.44	<i>Paulownia sp.</i>	1e-39	332
phenylalanine ammonia-lyase	4.3.1.24	<i>Digitalis lanata</i>	2.2e-18	330

Πίνακας 3.6

Τέλος προκειμένου να διασταυρωθούν κατά το δυνατόν τα αποτελέσματα, αλληλουχήθηκαν 96 κλώνοι με την μέθοδο Sanger οι οποίοι προέρχονταν από μια cDNA βιβλιοθήκη του ίδιου ιστού που είχαμε κατασκευάσει στο εργαστήριο παλιότερα. Η βιβλιοθήκη δημιουργήθηκε με το Creator™SMART™ cDNA Library Construction Kit (Clontech) στο πλασμίδιο pDNR-LIB και η αλληλούχηση έγινε με το εκκινητή M13F.

Seq. Description	eValue
reticulon-like protein b16	2,40E-37
ankyrin repeat-containing protein	1,09E-62
lipid transfer protein	9,91E-32
transcript antisense to ribosomal rna protein	4,66E-49
hypothetical protein NitaMp027	9,89E-32
heat shock factor-binding protein 1	2,81E-34
photosystem ii reaction center w protein	2,27E-09
zinc finger	1,19E-83
nitrate reductase	1,46E-64
uncharacterized protein	9,68E-27
transcript antisense to ribosomal rna protein	1,07E-52
glutamine synthetase	8,25E-66
60s ribosomal protein l27	1,35E-31
cysteine proteinase inhibitor	8,43E-06
atp-dependent clp protease adaptor protein	2,02E-08
40s ribosomal protein	2,64E-21
conserved protein	2,36E-19
ubiquitin-conjugating enzyme e2 10	2,36E-99
aleurain-like protease	6,97E-10
cinnamyl alcohol dehydrogenase	7,79E-25
chalcone isomerase	3,47E-100
protein	3,46E-06
histone h3	6,92E-76
ORF137 [Pinus koraiensis]	1,04E-52
transcript antisense to ribosomal rna protein	6,45E-53

Seq. Description	eValue
zinc ribbon domain containing 1	1,19E-13
polyubiquitin	1,91E-31
uncharacterized protein	1,55E-67
phosphorylase-like protein protein	9,17E-21
atp sulfurylase	4,42E-31
carbonic chloroplast precursor protein	3,07E-55
dead box atp-dependent rna helicase	1,47E-66
dead box atp-dependent rna helicase	6,52E-17
polyubiquitin	1,48E-137
Seq. Description	eValue
ubiquitin fusion protein	6,16E-50
disease resistance protein rpp8	5,70E-25
zinc ribbon domain containing 1	4,51E-11
clavamate synthase-like protein	3,02E-40
fructose bisphosphate aldolase	4,48E-58
uncharacterized protein	3,86E-76
transitional endoplasmic reticulum	2,99E-30
cytochrome c oxidase subunit va	1,12E-35
dcn1-like protein 2	2,82E-46

Πίνακας 3.7

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το τρίχωμα των φύλλων της ελιάς, παρουσιάζει ενδιαφέρον καθώς σχετίζεται με την ανθεκτικότητα σε βιοτική και αβιοτική καταπόνηση. Αυτός ο ιστός, παίζει σημαντικό ρόλο στη βελτίωση του θερμικού ισοζυγίου του ελάσματος και στην αποφυγή απωλειών νερού δίνοντας στα φυτά ορισμένα φυσιολογικά και οικολογικά πλεονεκτήματα, ιδιαίτερα σε ξηρά ή υψηλής ακτινοβολίας (υπεριώδη και ορατή) περιβάλλοντα. Ο οπτικός ρόλος του τριχώματος αποδίδεται στην εναπόθεση φαινολικών ουσιών, κυρίως φλαβονοειδών, στα κυτταρικά τοιχώματα των τριχών κατά τα αρχικά στάδια ανάπτυξης των φύλλων. Παράλληλα η εναπόθεση των ουσιών αυτών στα κυτταρικά τοιχώματα των τριχών δημιουργεί ένα χημικά αντίξοο περιβάλλον για την διείσδυση φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών στο εσωτερικό του μεσοφύλλου. Είναι επίσης γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι η ύπαρξη στρώματος μη αδενωδών τριχών σε φυτικά όργανα συνδέεται με αυξημένη ανθεκτικότητα των φυτών έναντι προσβολών εντόμων αφού αποτελούν μηχανικό φράγμα. Η αποτελεσματικότητα της άμυνας σχετίζεται άμεσα με την πυκνότητα του τριχώματος. Τα ώριμα φύλλα που έχουν χαμηλή πυκνότητα τριχών προσβάλλονται ευκολότερα και συχνότερα από τα νεαρά φύλλα που διαθέτουν υψηλότερη πυκνότητα τριχών. Η φτωχή θρεπτική τους αξία είναι ένα πρόσθετο μέσο προστασίας έναντι εντόμων. Επίσης ενδιαφέρον παρουσιάζει το χαρακτηριστικό σχήμα τους. Το αναπτυξιακό μοτίβο καθώς και η διαφοροποίηση των κυττάρων σε ασπιδοειδή μορφή, είναι κάτι που δεν έχει μελετηθεί. Προκειμένου να προσδιορίσουμε το μεταγραφικό δυναμικό αυτού του ιδιαίτερα εξειδικευμένου ιστού, απομονώσαμε RNA, δημιουργήσαμε ds-cDNA και έγινε αλληλούχιση με την μέθοδο Pyrosequencing.

Αρχικά η απομόνωση του RNA αποδείχτηκε δύσκολη καθώς όχι μόνο είχαμε μικρή ποσότητα αλλά και ο λόγος καθαρότητας (OD_{260}/OD_{280}) ήταν χαμηλός. Αυτό ίσως να οφείλεται στην ύπαρξη μεταβολιτών που εμποδίζουν την διαδικασία.

Παρά το γεγονός ότι κατά την προετοιμασία της βιβλιοθήκης η θραυσματοποίηση του δείγματος ήταν καλή (εικόνα 3.7), τα στατιστικά της αλληλούχισης, έδειξαν ότι το δείγμα δεν ήταν το βέλτιστο δυνατό (εικόνα 3.8). Από τα 51.374 πηγάδια που αλληλουχήθηκαν και περιείχαν το key sequence, 13.059 (25.42%) πέρασαν τα φίλτρα επεξεργασίας κατά τα οποία γίνεται αφαίρεση διαβασμάτων χαμηλής ποιότητας και διαβασμάτων με ανάμεικτες ακολουθίες (πάνω από ένα τμήμα DNA ανά σφαιρίδιο). Τα αντίστοιχο % ποσοστό στα άλλα lanes ήταν σχεδόν διπλάσιο. Επίσης το μέσο μέγεθος των διαβασμάτων που πέρασαν τα φίλτρα ήταν αρκετά μικρότερο σε σχέση με τα υπόλοιπα lanes. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε σε κακή ποιότητας μητρικό υλικό, είτε σε κακή προετοιμασία της βιβλιοθήκης είτε και στα δύο μαζί. Από την αλληλούχιση τελικά προέκυψαν 13.059 reads συνολικού μεγέθους λίγο πάνω από 2.5 Mb με μέσο μέγεθος 204.06 bp. Από την βιοπληροφορική ανάλυση προέκυψαν 1274 αλληλουχίες με annotations. Τα αποτελέσματα διασταυρώθηκαν με την βάση δεδομένων TrichOME (Dai *et al.*, 2010) η οποία είναι εξειδικευμένη βάση με ESTs από βιβλιοθήκες φυτικών τριχωμάτων διαφόρων ειδών. Επίσης αλληλουχήθηκαν 96 κλώνοι από cDNA βιβλιοθήκη του ίδιου ιστού με την μέθοδο Sanger.

Οι αλληλουχίες εμπλέκονται σε διάφορα μονοπάτια. Εντοπίστηκαν αλληλουχίες που σχετίζονται με τον πρωτογενή καθώς και με τον δευτερογενή μεταβολισμό, αλληλουχίες που σχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με την άμυνα του φυτού στο περιβάλλον του καθώς και αλληλουχίες που συμμετέχουν στην μορφογένεση των τριχωμάτων. Παρότι τα τριχώματα της ελιάς θεωρούνται μη αδενώδη, ο ιστός φαίνεται να παίζει

ενεργό ρόλο για το φυτό. Η πιθανότητα ενεργού μεταβολισμού σε μη αδενώδεις τρίχες, έχει ήδη υπονοηθεί (Chen *et al.*, 2003; Sinlapadech *et al.*, 2007).

Αρκετές αλληλουχίες που σχετίζονται με τον πρωτογενή μεταβολισμό εντοπίστηκαν (πίνακας 3.1). Αρχικά ταυτοποιήθηκαν ένζυμα που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση και των 20 αμινοξέων. Παρότι τα αμινοξέα είναι απαραίτητα για την βιοσύνθεση τόσο πρωτεϊνών όσο και μεταβολιτών (πχ η φαινυλαλανίνη για τα φαινυλοπροπανοειδή), θεωρείται ότι η είσοδος αμινοξέων στα φυτικά τριχώματα είναι περιορισμένη. Στον βασιλικό για παράδειγμα (*Ocimum basilicum*), όπου συσσωρεύονται φαινυλοπροπανοειδή, παρά το ότι το τελικό προϊόν δεν έχει άζωτο, έχουν εντοπιστεί ένζυμα που ανακυκλώνουν την αμινομάδα (πχ αμινοτρανσφεράσες) στα τριχώματα (Gang *et al.*, 2001). Τόσο το γεγονός ότι παρά την έλλειψη αζώτου, δεν έχουμε εξισορρόπηση του, όσο και το ότι οι μεταβολίτες που δημιουργούνται στο τριχώμα δεν μεταφέρονται προς το φυτό, δείχνουν ότι η επικοινωνία με το φύλλο είναι περιορισμένη. Αυτό ίσως είναι μια εξελικτική προσαρμογή ώστε να συντηρούνται χωροταξικά αυτοί οι πολύτιμοι μεταβολίτες.

Ιδιαίτερα ενεργό παρατηρήθηκε το μονοπάτι της γλυκόλυσης / γλυκονεογένεσης. Από τις αλληλουχίες, εντοπίστηκαν 11 διαφορετικά ένζυμα που συμμετέχουν σε αυτό. Το γεγονός αυτό αποτελεί ένδειξη ότι ο ιστός χρησιμοποιεί της γλυκόζη για την παραγωγή ενέργειας και όχι την φωτοσύνθεση. Ένζυμα που συμμετέχουν στην γλυκονεογένεση έχουν ήδη εντοπιστεί στα τριχώματα του *Arabidopsis* και πιστεύεται ότι είναι η πηγή εξοζών. Οι εξόζες είναι απαραίτητες κατά την βιοσύνθεση κυτταρικού τοιχώματος, μια ιδιαίτερα ενεργή διαδικασία κατά την ανάπτυξη των τριχωμάτων (Jakoby *et al.*, 2008).

Μια άλλη μεταβολική κατηγορία που βρέθηκε ενεργή, αφορά σε ένζυμα που εμπλέκονται στον μεταβολισμό λιπιδίων. Μελέτες σε τριχώματα διαφόρων φυτών, επιβεβαιώνουν αυτό το αποτέλεσμα και πιστεύεται ότι ο μεταβολισμός λιπιδίων συνδέεται με την παραγωγή κηρών (Aziz *et al.*, 2005; Falara *et al.*, 2008, Fridman *et al.*, 2005).

Αρκετές αλληλουχίες εντοπίστηκαν να σχετίζονται με την άμυνα. Αρχικά, ισχυρή ένδειξη ότι ο ιστός έχει αμυντικό ρόλο αποτελεί το γεγονός ότι εντοπίστηκαν 7 ένζυμα που σχετίζονται με τον μεταβολισμό της γλουταθειόνης (πίνακας 3.1). Στο *Arabidopsis* έχει παρατηρηθεί ότι η συγκέντρωση γλουταθειόνης στα τριχώματα είναι δύο με τρεις φορές υψηλότερη από την συγκέντρωση στα επιδερμικά κύτταρα (Gutierrez-Alcala *et al.*, 2000). Ειδικότερα το ένζυμο S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST, πίνακας 3.4) είναι γνωστό ότι συμβάλει στην αποικοδόμηση ξеноβιοτικών προσκολλώντας μόρια γλουταθειόνης σε αυτά. Αυτή η σηματοδότηση έχει σαν αποτέλεσμα την μεταφορά τους στα χυμοτόπια (Rea *et al.*, 1998) Επίσης η GST, σχετίζεται με την αντίδραση υπερευαισθησίας των φυτών σε παθογόνα. Κατά την μόλυνση, παράγεται H₂O₂ το οποίο εμποδίζει την ανάπτυξη των παθογόνων αλλά και επάγει την έκφραση της GST με αποτέλεσμα να προστατεύεται το κύτταρο από την οξειδωτική καταπόνηση (Marrs *et al.*, 1996). Στην απόκριση σε οξειδωτική καταπόνηση, συμμετέχουν επίσης ένζυμα από την οικογένεια των υπεροξειρεδοξινών. Ειδικά οι 2-Cys υπεροξειρεδοξίνες είναι ένζυμα με αντιοξειδωτική δράση και ελέγχουν τα επίπεδα του H₂O₂ για την μεταγωγή σήματος (Perez-Ruiz *et al.*, 2006).

Ένα γονίδιο που φάνηκε να εκφράζεται έντονα είναι αυτό της μεταλλοθειονίνης. Αλληλουχίες από πέντε διαφορετικά clusters χαρακτηρίστηκαν ως «metallothionein-like protein». Στον πίνακα 3.4 είναι μια αλληλουχία με τα μικρότερο E-Value από το cluster 26. Οι μεταλλοθειονίνες είναι πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους με κατάλοιπα κυστεΐνης που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα σε μέταλλα καθώς

μπορούν να δεσμεύουν ιόντα μετάλλων μέσω των θειολικών ομάδων. Πιο συγκεκριμένα εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα σε χαλκό (Cu), την ομοιόσταση ψευδαργύρου (Zn) και την αποτοξίνωση καδμίου (Cd) ενώ ερευνάται η ικανότητα δέσμευσης και άλλων μετάλλων (Hassinen *et al.*, 2011) Έχουν ήδη γίνει αναφορές για υψηλή έκφραση μεταλλοθειονινών σε τριχώματα του *Vicia faba* και του *Arabidopsis* (Foley *et al.*, 1994; Guo *et al.*, 2003). Είναι γνωστό ότι αρκετά φυτά συσσωρεύουν ή/και εκκρίνουν από τα τριχώματα τους ιχνοστοιχεία και μέταλλα όπως Ca, Cd, Zn, Mn, Ni, Pb, S, Si και άλλα (Wagner *et al.*, 2004)

Εντοπίστηκαν αρκετές αλληλουχίες που σχετίζονται με την αβιοτική καταπόνηση (πίνακας 3.4) όπως το *ITN1* το ομόλογο του οποίου στο *Arabidopsis* είναι το *At3g12360* που σχετίζεται με την καταπόνηση λόγω υψηλής αλατότητας (Sakamoto *et al.*, 2008), το *LTL1* το ομόλογο του οποίου στο *Arabidopsis* είναι το *At3g04290* και σχετίζεται επίσης με την καταπόνηση σε αλατότητα αλλά και με υψηλή συγκέντρωση λιθίου (Naranjo *et al.*, 2006). Επίσης εντοπίστηκε ένα ομόλογο του *HOS15* (High expression of Osmotically Responsive Genes 15, *At5g67320*). Το *HOS15* κωδικοποιεί για μια WD-40 πρωτεΐνη η οποία συμμετέχει στην από-ακετυλίωση των ιστονών. Αλληλεπιδρά εξειδικευμένα με την H4 ιστόνη και τα μεταλλάγματα *hos15* είχαν υψηλότερο επίπεδο ακετυλίωσης της H4 ιστόνης. Επίσης ήταν υπερευαίσθητα στο ψύχος και κατ'επέκταση θεωρείται ότι δρα σαν καταστολέας των γονιδίων που σχετίζονται με την αντοχή στο ψύχος (Zhu *et al.*, 2007) Ένα άλλο ενδιαφέρον annotation είναι το ELIP (Early Light-Inducible Protein). Οι ELIPs συσσωρεύονται παροδικά και θεωρείται ότι έχουν προστατευτικό ρόλο σε φυτά που εκτίθενται σε υψηλής έντασης φως. Δεν σχετίζονται άμεσα με την σύνθεση και συγκρότηση εξειδικευμένων φωτοσυνθετικών συμπλεγμάτων αλλά επηρεάζουν την βιογένεση όλων των συμπλεγμάτων που προσδένουν την χλωροφύλλη (Tzvetkova-Chevolleau *et al.*, 2007). Τέλος εντοπίστηκε μια ακολουθία η οποία κωδικοποιεί για το AREB2 (Abscisic acid Responsive Element-Binding protein 2) το οποίο είναι ένας bZIP μεταγραφικός παράγοντας με εξειδίκευση στα στοιχεία που αποκρίνονται στο αμπισικό οξύ (ABA responsive elements – ABREs). Το αμπισικό οξύ είναι μια φυτορμόνη απαραίτητη για την ανάπτυξη του φυτού και παίζει σημαντικό ρόλο ως μόριο μεταγωγής σήματος λόγω διάφορων καταπονήσεων, επάγοντας την έκφραση πρωτεϊνών απόκρισης. Στο *Arabidopsis* πρόσφατα αποδείχτηκε ότι υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης το AREB2 (*At3g19290*) δρα συνεργιστικά με τα AREB1 & AREB3 και ρυθμίζουν την έκφραση των ABRE-εξαρτώμενων γονιδίων που σχετίζονται με απόκριση σε υδατική καταπόνηση, δρουν δηλαδή σαν κύριοι μεταγραφικοί παράγοντες (Yoshida *et al.*, 2010).

Αντίστοιχα εντοπίστηκαν αλληλουχίες που σχετίζονται με απόκριση σε βιοτική καταπόνηση (πίνακας 3.4). Μια ομάδα μεταγραφικών παραγόντων που εμπλέκονται στην άμυνα των φυτών (αβιοτική και βιοτική) είναι η WRKY. Άλλοι εμπλέκονται επάγοντας την άμυνα (θετικοί ρυθμιστές) και άλλοι καταστέλλοντας την (αρνητικοί ρυθμιστές) (Pandey *et al.*, 2009). Για παράδειγμα, blast της αλληλουχίας μας μόνο στο *Arabidopsis thaliana*, επέστρεψε σαν πρώτο αποτέλεσμα το *WRKY11* (*At4g31550*) το οποίο είναι αρνητικός ρυθμιστής της άμυνας. Τα μεταλλάγματα *wrky11* είχαν αυξημένη αντοχή στο *Pseudomonas syringae* (Journot-Catalino *et al.*, 2006). Επίσης ένα annotation ήταν το PR-1 (Pathogenesis Related 1). Τα PR-1 είναι μια οικογένεια γονιδίων που εκφράζονται από τα φυτά σαν απόκριση σε παθογόνα. Ορισμένες PR-1 πρωτεΐνες έχουν αποδεδειγμένο προστατευτικό ρόλο απέναντι σε μύκητες και βακτήρια ενώ άλλων η λειτουργία δεν είναι γνωστή (Li *et al.*, 2011). Ένα άλλο γονίδιο σχετικό με την (α)βιοτική άμυνα είναι το *CCR4-associated factor 1a* (*CAF1a*), το οποίο συμμετέχει στην αποαδενυλίωση των mRNAs, την μείωση δηλαδή της 3' polyAs ουράς, διαδικασία η οποία οδηγεί στην ανακύκλωση των mRNAs. Η έκφραση του επάγεται από διάφορα ερεθίσματα και ορμόνες που σχετίζονται με συνθήκες καταπόνησης. Στο T-DNA μετάλλαγμα του *AtCAF1a* (*At3g44260*) παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση των pathogenesis-related γονιδίων PR1 και PR2 και τα φυτά ήταν πιο ευπαθή στο *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000, ενώ

υπερέκφραση του *AtCAF1a* οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης των PR1 και PR2 και αυξημένη ανθεκτικότητα στο ίδιο παθογόνο. Θεωρείται λοιπόν ότι το *AtCAF1a* εκτός από το ότι συμμετέχει στην ρύθμιση της αποαδενυλίωσης, συμμετέχει και στην άμυνα του φυτού σε παθογόνα (Liang *et al.*, 2009).

Πιο αποτελεσματική άμυνα ωστόσο σε βιοτική καταπόνηση είναι ο δευτερογενής μεταβολισμός. Στο παράρτημα βρίσκονται οι εικόνες των αντίστοιχων μονοπατιών.

Τα τερπενοειδή αποτελούν την μεγαλύτερη κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών στο φυτικό βασίλειο. Είναι οργανικά ενώσεις με αριθμό ατόμων άνθρακα πολλαπλάσιο του 5 και έχουν αναφερθεί πάνω από 36.000 διαφορετικά μόρια με μεγάλη παραλλακτικότητα στις δομές τους (Buckingham, 2007). Από τις ακολουθίες μας, εντοπίστηκε ένα ένζυμο που εμπλέκεται αποκλειστικά στην βιοσύνθεση των διτερπενοειδών (πίνακας 3.5, εικόνα 7.2). Γνωστά διτερπένια που παράγονται στα τριχώματα είναι η σαλβινορίνη-A (*Salvia divinorum*) με παραισθησιογόνο/ψυχοτρόπο δράση (Siebert, 2004) καθώς και οι CBTols και CBTdiols (*Nicotiana tabacum*) με αμυντική δράση (Wang and Wagner, 2003). Η βιοσύνθεση των διτερπενοειδών, είναι αποτέλεσμα της βιοσύνθεσης των τερπενοειδών (Terpenoid backbone biosynthesis). Στο μονοπάτι αυτό (πίνακας 3.5, εικόνα 7.1) εντοπίσαμε τρία ένζυμα. Γενικά τα τερπένια προέρχονται είτε από το μονοπάτι του μεβαλονικού οξέος (MEV) είτε από το μονοπάτι του 2-C-μεθυλ-D-ερυθριτολ-4-φωσφορικού οξέος (MEP). Το πρώτο λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα/ ενδοπλασματικό δίκτυο, και θεωρείται ότι καταλήγει κυρίως σε σεσκιτερπένια (C₁₅) και τριτερπένια (C₃₀) ενώ το δεύτερο στα πλαστίδια και παράγει μονοτερπένια (C₁₀) και διτερπένια (C₂₀) (Van Cutsem *et al.*, 2011). Παρότι τα τρία ένζυμα που εντοπίσαμε δεν συμμετέχουν αποκλειστικά στην βιοσύνθεση τερπενοειδών, το γεγονός ότι είναι και τα τρία στο μονοπάτι MEP (από τα έξι συνολικά), ενισχύει την πιθανότητα της *de novo* σύνθεσης διτερπενοειδών στο τρίχωμα της ελιάς καθώς και αποτελεί ένδειξη πιθανής παραγωγής και μονοτερπενοειδών. Έχει παρατηρηθεί ότι τα κυριότερα συστατικά των επιεφυμενιδικών κηρών των φύλλων της *Olea europaea cvs Coratina* και *Cipressino* είναι τα τερπένια (Bianchi *et al.*, 1993).

Επίσης εντοπίστηκαν 3 ένζυμα που εμπλέκονται αποκλειστικά στην βιοσύνθεση φλαβονοειδών (πίνακας 3.6, εικόνα 7.4). Τα φλαβονοειδή παίζουν άμεσα ρόλο στην άμυνα απέναντι σε οξειδωτική καταπόνηση, καθώς η δομή τους επιτρέπει την αντίδραση με ηλεκτρόνια και την σταθεροποίησή τους (Blokhina *et al.*, 2003). Συσώρευση φλαβονοειδών γλυκοσιδίων έχει παρατηρηθεί στα τριχώματα του *Phyllyrea latifolia* (Oleaceae) (Tattini and Gucci, 1999). Τα φλαβονοειδή προκύπτουν από το μονοπάτι βιοσύνθεσης των φαινυλοπροπανοειδών στο οποίο βρήκαμε 4 ένζυμα (πίνακας 3.6, εικόνα 7.4). Τα φαινυλοπροπανοειδή είναι αρκετά συχνά στα φυτικά τριχώματα και έχουν αμυντικό ρόλο. Για παράδειγμα ο βασιλικός (*Ocimum basilicum*) βιοσυνθέτει φαινυλοπροπανοειδή και τερπένια στο τρίχωμα του (Gang *et al.*, 2001).

Μεταξύ των αλληλουχιών εντοπίστηκαν ορισμένες οι οποίες σχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των τριχωμάτων (πίνακας 3.3). Στα φυτά οι καλμοντουλίνες σχετίζονται με διάφορα αναπτυξιακά μονοπάτια καθώς και αποκρίσεις σε καταπονήσεις ενώ έχει αποδειχθεί η αλληλεπίδραση τους με μεταγραφικούς παράγοντες, με σηματοδοτικές πρωτεΐνες (κινάσες, φωσφατάσες) καθώς και με πρωτεΐνες άγνωστης λειτουργίας. Μέσα από το σύστημα καλμοντουλίνης-ασβεστίου, μικρές αλλαγές στη συγκέντρωση Ca²⁺ έχουν σαν αποτέλεσμα γενικευμένες αντιδράσεις σε φυσιολογικό και μοριακό επίπεδο. Στο φυτό *Arabidopsis* υπάρχουν πολλές διαφορετικές καλμοντουλίνες (Calmodulins-CaMs) και πάνω από 50 πρωτεΐνες που μοιάζουν με καλμοντουλίνες (CaM-likes-CMLs). Πρόσφατα αποδείχτηκε ότι μια από αυτές, η CML42 (*At4g20780*) ελέγχει τον αριθμό διακλαδώσεων στα τριχώματα.

Τα knockout μεταλλάγματα *cml42* δεν διακρίνονται από τα αγρίου τύπου με εξαίρεση το γεγονός ότι παρουσιάζουν τριχώματα με αυξημένο αριθμό διακλαδώσεων (Dobney *et al.*, 2009). Ένα άλλο γονίδιο που σχετίστηκε με τα τριχώματα στο *Arabidopsis* είναι το *AGY1* (Albino or Glassy Yellow 1, *At4g01800*). Το *AGY1* κωδικοποιεί για μια υπομονάδα της SecA τρανσλοκάσης. Knockout μεταλλάγματα του *AGY1* είχαν σαν αποτέλεσμα (μεταξύ άλλων) τα τριχώματα να έχουν μειωμένο αριθμό διακλαδώσεων. Το προφίλ έκφρασης του *AGY1* προσδιορίστηκε με φυτά *AtcpSecA::GUS* όπου εντοπίστηκε δραστηριότητα του GUS τόσο στην βάση όσο και στην κορυφή των τριχωμάτων υποδεικνύοντας ότι πιθανώς σχετίζεται με την μορφογένεση των τριχωμάτων (Liu *et al.*, 2010). Ένας άλλος χαρακτηρισμός με ενδιαφέρον είναι μια πρωτεΐνη που μοιάζει με ακυλτρανσφεράση από το υβρίδιο *Petunia x hybrida*. Το ομόλογο αυτού γονίδιο στο *Arabidopsis* είναι το *PERMEABLE LEAVES 3 (PEL3, At5g23940)*. Ενθέσεις σε αυτό το γονίδιο οδήγησαν σε φαινοτύπους με τριχώματα ενωμένα μεταξύ τους. Η έκφραση του γονιδίου στα τριχώματα του *Arabidopsis* επιβεβαιώθηκε με GFP όπου εντοπίστηκε τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα των τριχωμάτων (Marks *et al.*, 2009; Panikashvili *et al.*, 2009). Τέλος εντοπίστηκε μια υπομονάδα (20 kD) του συμπλόκου ARP2/3 (Actin Related Protein 2/3). Στο *Arabidopsis* τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις υπομονάδες του ARP2/3 ονομάζονται *DISTORTED* και το σύμπλοκο αυτό ελέγχει τον πολυμερισμό της ακτίνης. Πιο συγκεκριμένα το ομόλογο γονίδιο στο *Arabidopsis* είναι το *ARPC4 (At4g14147)* του οποίου τα μεταλλάγματα φέρουν παραμορφωμένα τριχώματα. Τόσο η κατευθυνόμενη έκπτυξη, όσο και η έναρξη διακλάδωσης στα τριχώματα εξαρτώνται από τον πολυμερισμό νημάτων ακτίνης. (El-Assal *et al.*, 2004; Kotchoni *et al.*, 2009)

Συνοψίζοντας λοιπόν, στα πλαίσια αυτής της μεταπτυχιακής μελέτης, κάναμε χρήση της νέας τεχνολογίας μαζικής παράλληλης αλληλούχισης (Pyrosequencing) προκειμένου να μελετήσουμε το τρανσκριπτομικό προφίλ ενός ιδιαίτερα εξειδικευμένου και διαφοροποιημένου ιστού της ελιάς. Σύμφωνα με τα όσα έχουμε δει, είναι η πρώτη απόπειρα ανάλυσης, σε μεταγραφικό επίπεδο, πολυκύτταρων μη-αδενωδών τριχωμάτων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα τριχώματα της αποαξονικής επιφάνειας του φύλλου της ελιάς είναι μεταγραφικά ενεργά. Εντοπίστηκαν ακολουθίες που σχετίζονται με τη μορφογένεση των τριχωμάτων, με άμυνα απέναντι σε βιοτική και αβιοτική καταπόνηση, με βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών καθώς και με τον μεταβολισμό λιπιδίων. Προφανώς και ο εντοπισμός ενός mRNA δεν αποδεικνύει ύπαρξη και λειτουργία του αντίστοιχου ενζύμου, πόσο μάλλον του αντίστοιχου μεταβολίτη που χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα. Αποτελεί ωστόσο ισχυρή ένδειξη και έναυσμα για περαιτέρω μελέτη του ιστού τόσο σε πρωτεομικό (proteomics) όσο και σε μεταβολομικό (metabolomics) επίπεδο.

5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ελιά (*Olea europaea* L.) είναι ένα από τα πιο σημαντικά καλλιεργούμενα δέντρα στην Ανατολική Μεσόγειο και τα προϊόντα της θεωρούνται υψηλότερης θρεπτικής αξίας. Τόσο η προσαξονική όσο και η αποαξονική φυλλική επιφάνεια φέρει μεγάλο αριθμό μη αδενωδών πολυκύτταρων ασπιδοειδών τριχωμάτων τα οποία όμως αποπίπτουν έντονα από την προσαξονική επιφάνεια κατά την ωρίμανση του φύλλου. Προκειμένου να εντοπίσουμε γονίδια που πιθανώς εμπλέκονται στη βιοσύνθεση μεταβολιτών, στην άμυνα του φυτού αλλά και στο πολύ αυστηρό μοτίβο ανάπτυξης και διαφοροποίησης των τριχωμάτων, προχωρήσαμε σε ανάλυση του τρανσκριπτομικού προφίλ του ιστού της αποαξονικής επιφάνειας με την μέθοδο 454 (Pyrosequencing).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ενεργά είναι τα μονοπάτια βιοσύνθεσης φαινυλοπροπανοειδών, φλαβονοειδών, διτερπενίων και πιθανώς και άλλων τερπενίων. Επίσης εντοπίστηκαν γονίδια που σχετίζονται με απόκριση σε (α)βιοτική καταπόνηση καθώς και μεταγραφικοί παράγοντες που συμμετέχουν στην αρχιτεκτονική των τριχωμάτων, υπονοώντας ότι τα τριχώματα της ελιάς παίζουν ενεργό ρόλο στην ομοίωση του φυτού.

Abstract

Olive (*Olea europaea* L.) is one of the most important fruit crop trees in the Eastern Mediterranean and its products are considered of highly nutritive value. On the adaxial and the abaxial side of the leaves, olive leaves bear a great number of non-glandular multicellular peltate trichomes which detach from the adaxial side during leaf maturation. In order to find genes that are possibly involved in the biosynthesis of metabolites, in the plant's defense and in the trichome morphogenesis, we proceeded in a transcriptomic analysis of the abaxial tissue through 454 (Pyrosequencing).

Our results showed that the pathways responsible for the biosynthesis of phenylpropanoids, flavonoids, diterpenes and possibly other terpenes are active. Genes involved in the defense against (a)biotic stress and transcriptional factors involved in the trichome architecture were also identified, indicating that olives' trichome plays an important role in the homeostasis of the plant.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

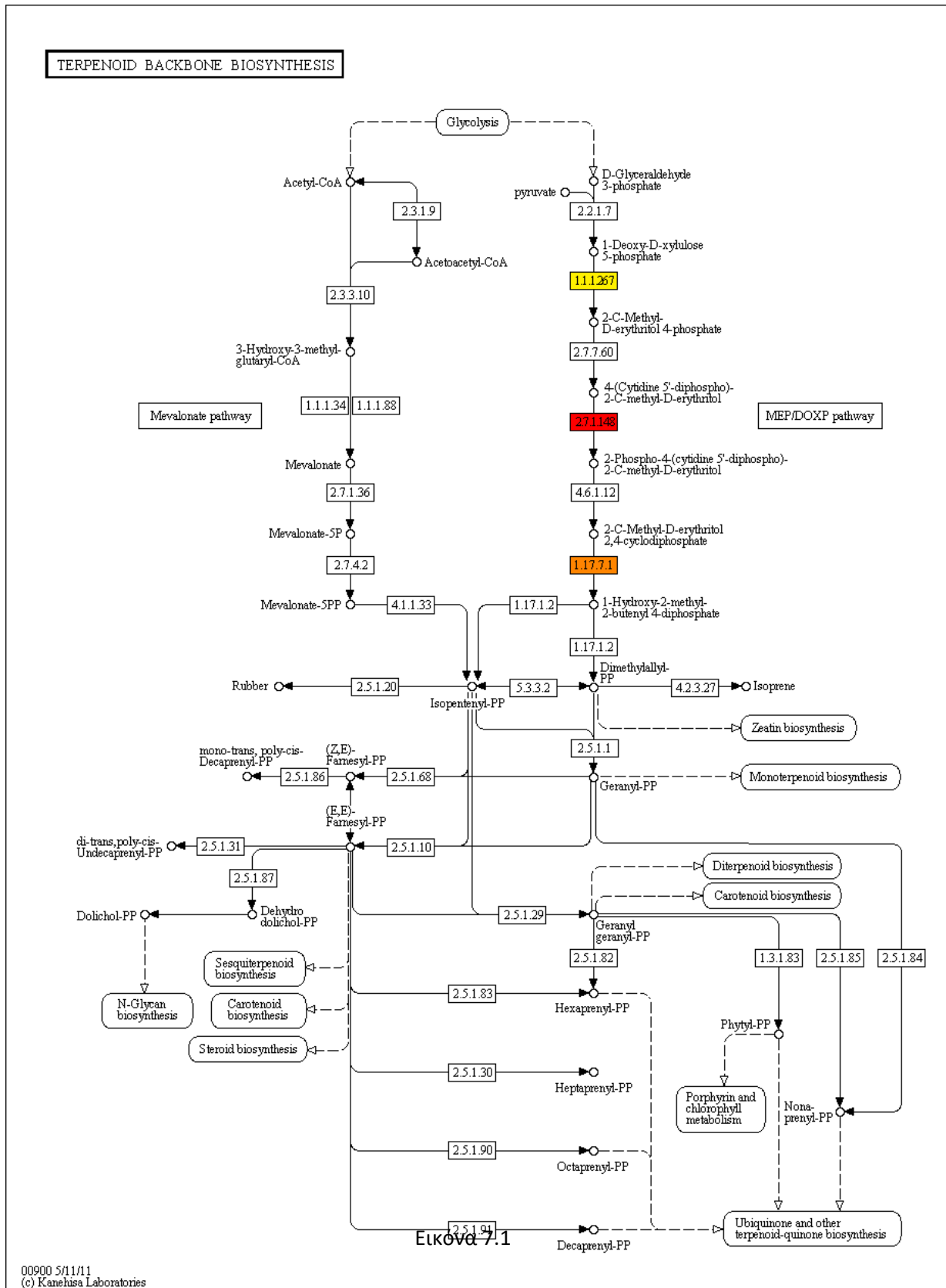
- **Adessi C., Matton G., Ayala G., Turcatti G., Mermod JJ., Mayer P., and Kawashima E., (2000)** . Solid phase DNA amplification: Characterisation of primer attachment and amplification mechanisms . *Nucleic Acids Res* , 28 : e87
- **Allen, E.A., Hoch, H.C., Steadman, R.J., (1991)**. Influence of leaf surface features on spore deposition and epiphytic growth of phytopathogenic fungi. In: “Microbial Ecology of Leaves” (Andrews, J.H., Hirano, S.S. eds.) Brock/Springer, New York. pp. 87 - 110
- **Aziz N., Paiva, N. L., May, G. D., Dixon, R. A.,** Transcriptome analysis of alfalfa glandular trichomes. *Planta* (2005), 221, 28–38.
- **Beldade P., Rudd S., Gruber JD., Long AD (2006)**. A wing expressed sequence tag resource for *Bicyclus anynana* butterflies, an evo-devo model. *BMC Genomics*, 7, 130
- **Besnard G., Christin PA., Baali-Cherif D., Bouguedoura N., Anthelme F., (2007)**. Spatial genetic structure in the Laperrine’s olive (*Olea europaea* subsp. *laperrinei*), a long-living tree from the central Saharan mountains. *Heredity* 99: 649–657
- **Besnard G., Garcia-Verdugo C., Rubio De Casas R., Treier UA., Galland N., Vargas P., (2008)** Polyploidy in the Olive complex (*Olea europaea*): evidence from flow cytometry and nuclear microsatellite analyses. *Ann Bot* 101:25–30
- **Bianchi G., Vlahov G., Anglani C. and Murelli C., (1993)**. Epicuticular wax of olive leaves. *Phytochemistry* 32 (1) : 49 – 52
- **Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K. V.,** Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann. Bot.* (2003), 91, 179–194
- **Blow N., (2008)** . DNA sequencing: Generation next - next . *Nat Methods* , 5 : 267 – 274
- **Briccoli B, C., P. Basta, C. Tocci, D. Turco,** Influence of Irrigation With Brackish Water on Young Olive Plants, *Olivae*, 53,35-38. (1994)
- **Buckingham J., (2007)** Dictionary of Natural Products. Chapman and Hall/CRC, London.
- **Carter CD, Gianfagna TJ, Sacalis JN, (1989)** Sesquiterpenes in glandular trichomes of a wild tomato species and toxicity to the Colorado potato beetle. *J Agric Food Chem* 37:1425–1428
- **Chen F., D’Auria J.C., Tholl D., Ross J.R., Gershenzon J., Noel J.P. and Pichersky E. (2003)** An Arabidopsis thaliana gene for methylsalicylate biosynthesis, identified by a biochemical genomics approach, has a role in defense. *Plant J.* 36, 577–588.
- **Chien J.C. and Sussex I.M., (1996)** Differential regulation of trichome formation on the adaxial and abaxial leaf surfaces by gibberellins and photoperiod in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol* 111, 1321–1328
- **Colomer R., Moreno-Nogueira JM., Garcia-Luna PP., Garcia-Peris P., Garcia-de-Lorenzo A., Zarazaga A., Quecedo L., del Llano J., Usan L., Casimiro C., (2007)** Fatty acids, cancer and cachexia: a systematic review of the literature. *Br J Nutr* 97:823–831
- **Conesa A., Götz S., García-Gómez J.M., Terol J., Talón M. & Robles M., (2005)** Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21: 3674-3676
- **Cronquist, (1981)** An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York, NY
- **Dai, X., Wang, G., Yang, D.S., Tang, Y., Broun, P., Marks, M.D., Sumner, L.W., Dixon, R.A., and Zhao, P.X.** TrichOME: a comparative omics database for plant trichomes. *Plant Physiol.* (2010) Jan;152(1):44-54. Epub 2009 Nov 25
- **Dobney, S., Chiasson, D., Lam, P., Smith, S.P., and Snedden, W.A. (2009)**. The calmodulin-related calcium sensor CML42 plays a role in trichome branching. *J. Biol. Chem.* 284: 31647–31657
- **Dressman D., Yan H., Traverso G., Kinzler KW., and Vogelstein B., (2003)** Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations . *Proc Natl Acad Sci U S A* , 100 : 8817 – 8822
- **Duke S.O., (1994)** Glandular trichomes: a focal point of chemical and structural interactions. *Int. J. Plant Sci.* 155: 617–620.
- **Ehleringer J., (1984)** Ecology and ecophysiology of leaf pubescence in North American desert plants. In: *Biology and Chemistry of Plant Trichomes*, pp. 113–132, E. Rodriguez, P. L. Healey, and I. Mehta, eds. Plenum Press, New York.
- **Eid J., Fehr A., Gray J., Luong K., Lyle J., Otto G., Peluso P., Rank D., Baybayan P., Bettman B., et al., (2009)** Real - time DNA sequencing from single polymerase molecules . *Science* , 323 : 133 – 138
- **El-Assal SE, Le J, Basu D, Mallery EL, Szymanski DB. 2004.** *DISTORTED2* encodes an ARPC2 subunit of the putative *Arabidopsis* ARP2/3 complex. *Plant J.* 38:526–38
- **Esch J.J., Chen M., Sanders M., et al., (2003)** A contradictory GLABRA3 allele helps define gene interactions controlling trichome development in *Arabidopsis*. *Development* 130, 5885–5894
- **Evert , R. F. (2006)** . *Esau’s plant anatomy*. Wiley, Hoboken, New Jersey, USA
- **Fahn A., (1991)** *Plant anatomy*. Pergamon Press, Oxford
- **Fahn A., (1986)** Structural and functional properties of trichomes of xeromorphic plants. *Ann. Bot.* 57, 631–637
- **Fahn A. and D.F. CUTLER., (1992)** Xerophytes. *Encyclopedia of Plant Anatomy*, Band 13, Teil 3, Gebrüder Borntraeger, Berlin.
- **Falara V., Fotopoulos V., Margaritis T., Anastasaki T. et al.,** Transcriptome analysis approaches for the isolation of trichome-specific genes from the medicinal plant *Cistus creticus* subsp *creticus*. *Plant Mol. Biol.* (2008), 68, 633–651
- **Faostat, (2007)** <http://faostat.fao.org>

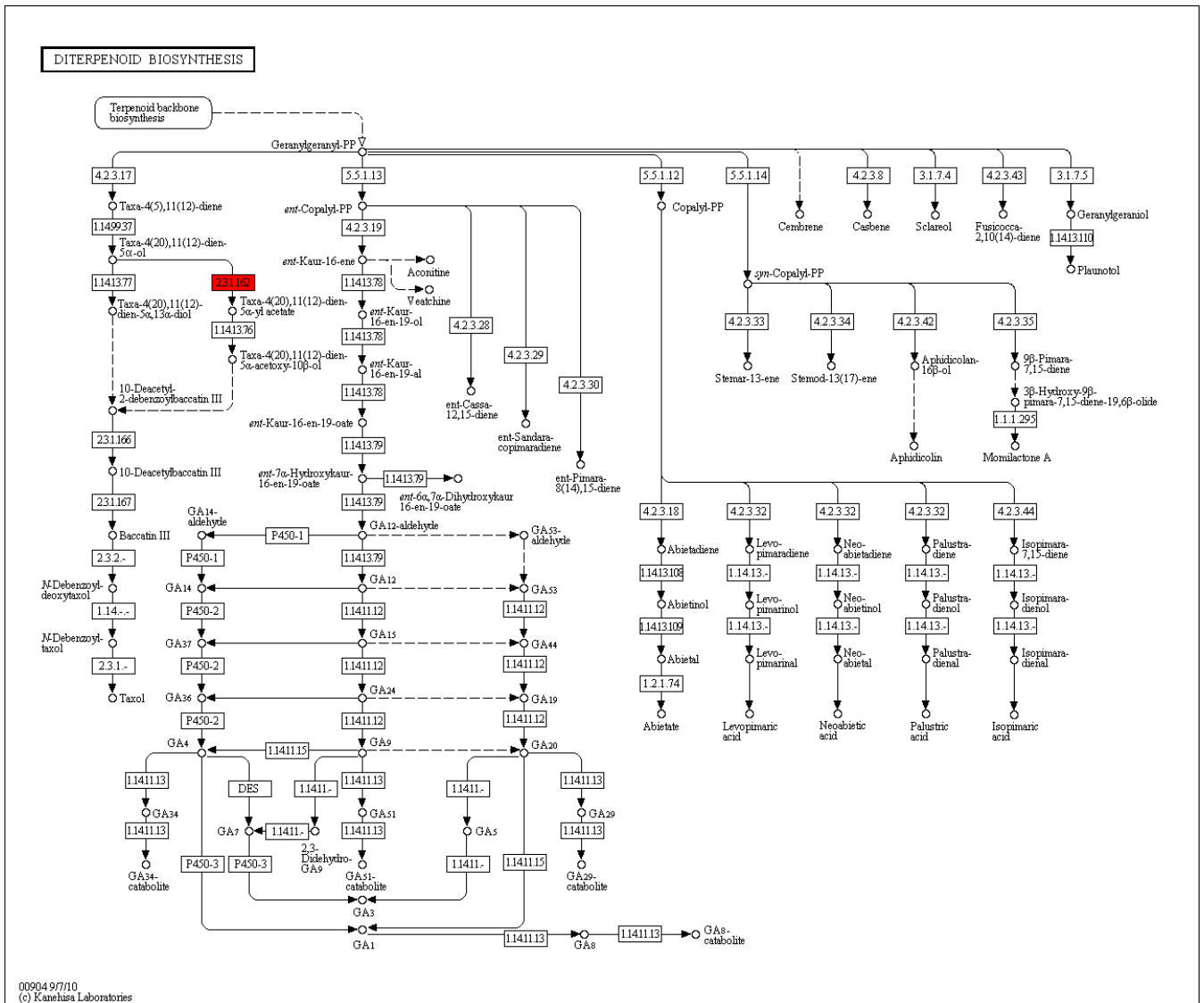
- **Fedurco M., Romieu A., Williams S., Lawrence I., and Turcatti G., (2006)** BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid - phase amplified DNA colonies. *Nucleic Acids Res* , 34 : e22
- **Foley R.C. and Singh K.B., (1994)** Isolation of a *Vicia faba* metallothionein-like gene: expression in foliar trichomes. *Plant Mol. Biol.* 26, 435–444.
- **Fridman E., Wang J. H., Iijima Y., Froehlich J. E. et al.,** Metabolic, genomic, and biochemical analyses of glandular trichomes from the wild tomato species *Lycopersicon hirsutum* identify a key enzyme in the biosynthesis of methylketones. *Plant Cell* (2005), 17, 1252–1267.
- **Gang D.R., Wang J., Dudareva N., Nam K.H., Simon J.E., Lewinsohn E. and Pichersky E., (2001)** An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. *Plant Physiol.* 125, 539–555.
- **Götz Stefan, Juan Miguel García-Gómez, Javier Terol, Tim D. Williams, María José Nueda, Montserrat Robles, Manuel Talón, Joaquín Dopazo and Ana Conesa**
High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Res.* 2008 June; 36(10): 3420–3435.
- **Grazzini R.A., Hesk D., Yerger E., Cox-Foster D., Medford J., Craig R. and Mumma R.O., (1995)** Distribution of anacardic acids associated with small pest resistance among cultivars of *Pelargonium x hortorum*. *J. Am. Hort. Soc.* 120: 343–346
- **Green PS, (2002)** A revision of *Olea* L. (*Oleaceae*). *Kew Bull* 57:91–140
- **Green PS., Wickens GE., (1989)** The *Olea europaea* complex. In: Tan K (ed) *The Davis and Hedge Festschrift*. Edinburgh University Press, Edinburgh, UK, pp 287–299
- **Guo WJ, Bundithya W, Goldsbrough PB. (2003).** Characterization of the *Arabidopsis* metallothionein gene family: tissue-specific expression and induction during senescence and in response to copper. *New Phytologist* 159: 369–381.
- **Gutierrez-Alcala G., Gotor C., Meyer A.J., Fricker M., Vega J.M. and Romero L.C., (2000)** Glutathione biosynthesis in *Arabidopsis* trichome cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 97, 11108–11113
- **Harris TD., Buzby PR., Babcock H., Beer E., Bowers J., Braslavsky I., Causey M., Colonell J., Dimeo J., Efcavitch JW., et al., (2008)** Single - molecule DNA sequencing of a viral genome . *Science* , 320 : 106 – 109
- **Hassinen V. H., Tervahauta A. I., Schat H., Kärenlampi S. O., (2011)** Plant metallothioneins--metal chelators with ROS scavenging activity? *Plant Biol* (Stuttg). Mar;13(2):225-32
- **Hatzopoulos P., Banilas G., Giannoulia K., Gazis F., Nikoloudakis N., Milioni D., Haralampidis K., (2002)** Breeding, molecular markers and molecular biology of the olive tree. *Eur J Lipid Sci Technol* 104:574–586
- **Housby JN. and Southern EM., (1998)** Fidelity of DNA ligation: A novel experimental approach based on the polymerisation of libraries of oligonucleotides . *Nucleic Acids Res*, 26 : 4259 – 4266
- **Hulskamp M., (2000)** Cell morphogenesis: how plants spit hairs. *Curr. Biol.* 10, R308–R310.
- **Hulskamp M., and V. KIRIK., (2000)** Trichome differentiation and morphogenesis in *Arabidopsis*. *Adv. Bot. Res.* 31, 237–260
- **Hulskamp M., S. MISÉRA and G. JÜRGENS., (1994)** Genetic dissection of trichome cell development in *Arabidopsis*. *Cell* 76, 555–566
- **Iwai K., Oi Y., Koyama F., Watanabe K., Hiraoka M., Sekiguchi T., (2005)** Patent Application: JP 2004-342612 20041126, Jap Kokai Tokkyo Koho
- **Jakoby M. J., Falkenhan D., Mader M.T., Brininstool, G. et al.,** Transcriptional profiling of mature *Arabidopsis* trichomes reveals that *NOECK* encodes the MIXTA-like transcriptional regulator MYB106. *Plant Physiol.* (2008), 148, 1583–1602
- **Journot-Catalino N, Somssich IE, Roby D, Kroj T:** The transcription factors WRKY11 and WRKY17 act as negative regulators of basal resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* (2006):3289-3302.
- **Karabourniotis G., Kofidis G., Fasseas C., Liakoura V. and Drossopoulos I., (1998)** Polyphenol deposition in leaf hairs of *Olea europea* (Oleaceae) and *Quercus ilex* (Fagaceae). *Amer. J. Bot.* 85 (7): 1007-1012
- **Karabourniotis G., Fasseas C., (1996)** The dense indumentum with its polyphenol content may replace the protective role of the epidermis in some young xeromorphic leaves. *Canadian Journal of Botany* 74: 347-351
- **Karabourniotis G., Kotsabassidis D. and Manetas Y., (1995)** Trichome density and its protective potential against ultraviolet-B radiation damage during leaf development. *Can. J. Bot.* 73:376-383
- **Karabourniotis G., Papadopoulos K., Papamarkou M. and Manetas Y., (1992)** Ultraviolet-b radiation absorbing capacity of leaf hairs. *Physiol. Plant.* 86: 414-418
- **Karabourniotis G., Papastergiou N., Kabanopoulou E., Fasseas C., (1994)** Foliar sclereids of *Olea europaea* L. may function as optical fibers. *Canadian Journal of Botany* 72 : 330-336
- **Kelsey R. G., Reynolds G. W., and E. Rodriguez., (1984)** The chemistry of biologically active constituents secreted and stored in plant glandular trichomes. In E. Rodriguez, P. L. Healey, and I. Mehta, eds., *Biology and Chemistry of Plant Trichomes*. New York, NY: Plenum Press, pp. 187–241.
- **Kotchoni SO, Zakharova T, Mallery EL, Le J, El-Assal Sel-D, Szymanski DB (2009)** The association of the *Arabidopsis* actin-related protein2/3 complex with cell membranes is linked to its assembly status but not its activation. *Plant Physiol.* Dec;151(4):2095-109
- **Kowalski SP., Eannetta NT., Hirzel AT., Steffens JC., (1992)** Purification and characterization of polyphenol oxidase from glandular trichomes of *Solanum berthaultii*. *Plant Physiol* 100: 677–684
- **Lander ES and Waterman MS ., (1988)** Genomic mapping by fingerprinting random clones: A mathematical analysis . *Genomics* , 2 : 231 – 239

- **Larkin J. C., N. Young, M. Prigge and M. D. Marks., (1996)** The control of trichome spacing and number in *Arabidopsis*. Development 122, 997–1005.
- **Larkin J.C., Brown M.L. and Schiefelbein J., (2003)** How do cells know what they want to be when they grow up? Lessons from epidermal patterning in *Arabidopsis* Annu. Rev. Plant Biol. 54, 403–430.
- **Levin D.A., (1973)** The role of trichomes in plant defense. Q. Rev. Biol. 48, 3–15
- **Li ZT, Dhekney SA, Gray DJ.(2011)** PR-1 gene family of grapevine: a uniquely duplicated PR-1 gene from a Vitis interspecific hybrid confers high level resistance to bacterial disease in transgenic tobacco. Plant Cell Rep. 2011 Jan;30(1):1-11
- **Liu, D., Gong, Q., Ma, Y., Li, P., Li, J., Yang, S., Yuan, L., Yu, Y., Pan, D., Xu, F., and Wang, N.N. (2010).** cpSecA, a thylakoid protein translocase subunit, is essential for photosynthetic development in *Arabidopsis*. J. Exp. Bot. 61: 1655–1669
- **Liang, W., Li, C., Liu, F., Jiang, H., Li, S., Sun, J., Wu, X., and Li, C. (2009).** The *Arabidopsis* homologs of CCR4-associated factor 1 show mRNA deadenylation activity and play a role in plant defence responses. Cell Res. 19:307-316
- **Loureiro J., Rodriguez E., Costa A., Santos C., (2007)** Nuclear DNA content estimations in wild olive (*Olea europaea* L. ssp. europaea var. sylvestris Brot.) and Portuguese cultivars of *O. europaea* using flow cytometry. Genet Resour Crop Evol 54:21–25
- **Margulies M., Egholm M., Altman WE., Attiya S., Bader JS., Bemben LA., Berka J., Braverman MS., Chen YJ., Chen Z., et al., (2005)** Genome sequencing in microfabricated high - density picolitre reactors . Nature , 437 : 376 – 380
- **Marks MD, Wenger JP, Gilding E, Jilk R, Dixon RA (2009)** Transcriptome analysis of *Arabidopsis* wild-type and gl3-sst trichomes identifies four additional genes required for trichome development. Mol. Plant 2, 803–822.
- **Marrs K.A.,** The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. (1996), 47, 127–158
- **Metzker ML., (2009)** Sequencing technologies — The next generation . Nat Rev Genet , 11 : 31 – 46
- **Mozafar A., and J.R. Goodin, (1970)** Vesiculated hairs: a mechanism for salt tolerance in *Atriplex halimus* L. Plant Physiol. 45, 62–65.
- **Naranjo, M.A., Forment, J., Roldan, M., Serrano, R. and Vicente, O. (2006)** Overexpression of *Arabidopsis thaliana* LTL1, a salt-induced gene encoding a GDSL-motif lipase, increases salt tolerance in yeast and transgenic plants. Plant Cell Environment 29: 1890-1900
- **Omar S.H., (2010)** Oleuropein in Olive and its Pharmacological Effects, Sci Pharm. 2010; 78: 133–154
- **Owen T.P., JR., and W.W. Thomson., (1991)** Structure and function of a specialized cell wall in the trichomes of the carnivorous bromeliad *Brocchinia reducta*. Can. J. Bot. 69, 1700–1706
- **Pandey, S.P. and Somssich, I.E. (2009)** The role of WRKY transcription factors in plant immunity. Plant Physiol. 150, 1648–1655.
- **Panikashvili D, Shi JX, Schreiber L, Aharoni A. 2009.** The *Arabidopsis* DCR encoding a soluble BAHD acyltransferase is required for cutin polyester formation and seed hydration properties. Plant Physiology 151: 1773–1789.
- **Perez-Ruiz J.M., Spinola M.C., Kirchsteiger K., Moreno J., Sahrawy M., and Cejudo F.J., (2006).** Rice NTRC is a high-efficiency redox system for chloroplast protection against oxidative damage. Plant Cell 18: 2356–2368
- **Peterson R.L. and Vermeer J., (1984)** Histochemistry of trichomes. In: Biology and Chemistry of Plant trichomes. Plenum Press, New York. pp.71-94.
- **Rea P. A., Li Z.S., Lu Y.P., Drozdowicz Y.M., Martinoia E.,** From vacuolar GS-X pumps to multispecific ABC transporters. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. (1998), 49, 727–760
- **Rogers C.E., Gershenson J., Ohno N., Mabry T.J., Stipanovic R.D. and Kreitner G.L., (1987)** Terpenes of wild sunflowers (*Helianthus*): An effective mechanism against seed predation by larvae of the sunflower moth, *Homoeosoma electellum* (Lepidoptera: Pyralidae). Environ. Entomol. 16: 586–592
- **Rothberg JM. and Leamon JH., (2008)** The development and impact of 454 sequencing . Nat Biotechnol , 26 : 1117 – 1124
- **Sakamoto H, Matsuda O, Iba K. (2008).** ITN1, a novel gene encoding an ankyrin-repeat protein that affects the ABA-mediated production of reactive oxygen species and is involved in salt-stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal 56, 411–422.
- **Schellmann S., A. Schnittger, V. Kirik, T. Wada, K. Okada, A. Beermann, J. Thumfahrt, G. Jurgers, and M. Hulskamp., (2002).** TRIPTYCHON and CAPRICE mediate lateral inhibition during trichome and root hair patterning in *Arabidopsis*. EMBO J. 21, 5036–5046.
- **Schnittger,A., Folkers,U., Schwab,B., JuÈrgens,G. and HuÈlskamp,M. (1999)** Generation of a spacing pattern: the role of TRIPTYCHON in trichome patterning in *Arabidopsis*. Plant Cell, 11, 1105±1116
- **Siebert D.J., (2004)** Localization of salvinorin A and related compounds in glandular trichomes of the psychoactive sage, *Salvia divinorum*. Ann. Bot. 93, 763–771
- **Sinlapadech, T., Stout, J., Ruegger, M.O., Deak, M. and Chapple, C. (2007)** The hyper-fluorescent trichome phenotype of the brt1 mutant of *Arabidopsis* is the result of a defect in a sinapic acid:-UDPG glucosyltransferase. Plant J. 49, 655–668
- **Steadman J.R., and Shaik M., (1988)** Leaf pubescence contents race nonspecific rust resistance in bean (*Phaseolus vulgaris*). Phytopath. 78: 1566
- **Styrsky JD, Kaplan I, Eubanks MD., (2006)** Plant trichomes indirectly enhance tritrophic interactions involving a generalist predator, the red imported fire ant. Biol Control 36:375–384
- **Taiz L. and Zeiger E., (1991)** Plant Physiology. Benjamin/ Cummings publishing company. pp. 318-345

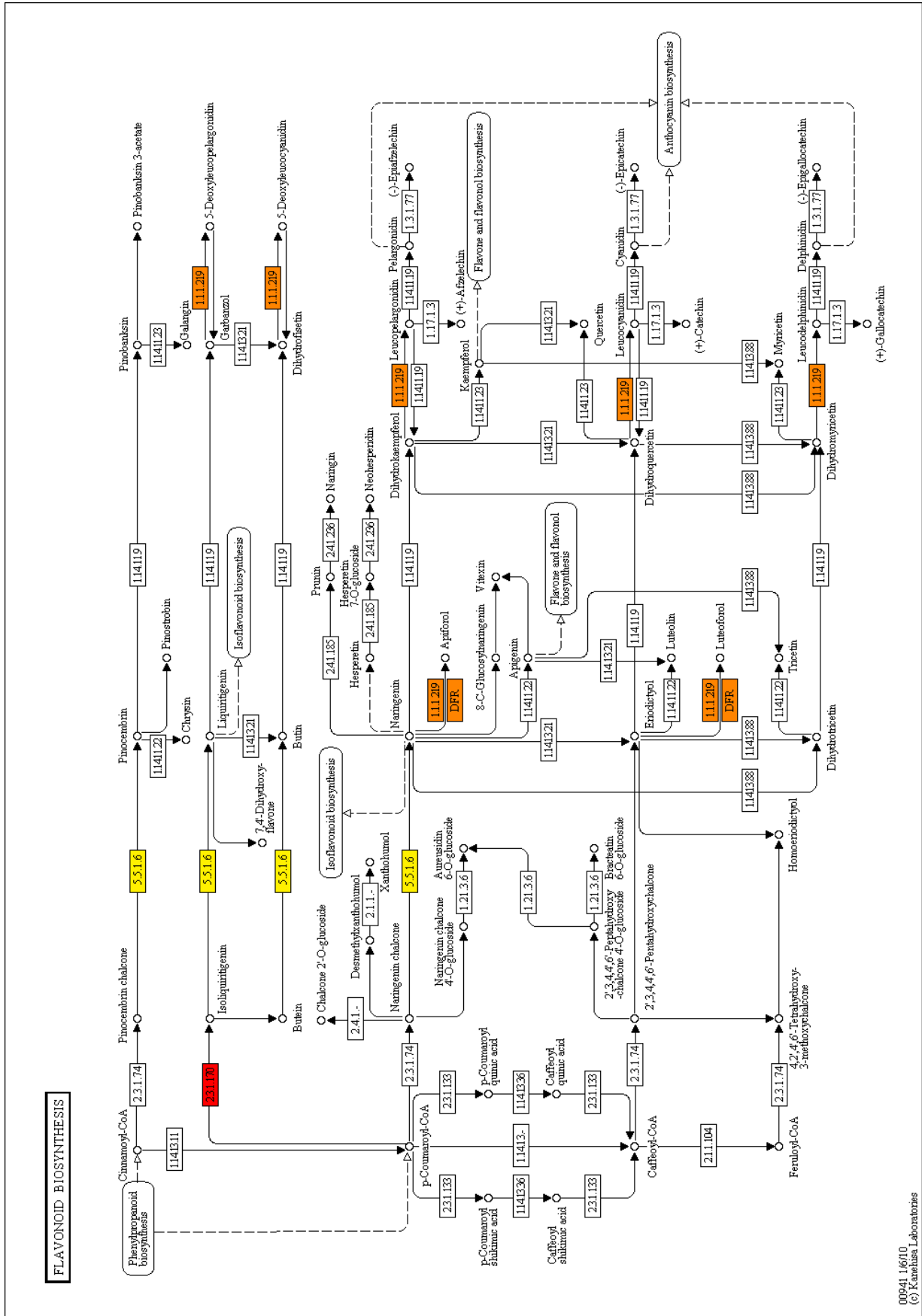
- **Tattini M. and Gucci R., (1999)** Ionic relations of *Phillyrea latifolia* L. plants during NaCl stress and relief from stress. *Can. J. Bot.* 77, 969–975.
- **Telfer A., Bollman K.M. and Poethig R.S., (1997)** Phase change and the regulation of trichome distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124, 645–654
- **Tettelin H. and Feldblyum T., (2009)** Bacterial genome sequencing . *Methods Mol Biol* , 551 : 231 – 247
- **Theobald W.L., J. L. Krahulik and R. C. Rollins, (1979)** Trichome description and classification. In: *Anatomy of the Dicotyledons*, 2nd ed., vol. I, *Systematic Anatomy of Leaf and Stem, with a Brief History of the Subject*, pp. 40–53, C. R. Metcalfe and L. Chalk. Clarendon Press, Oxford
- **Therios I., (2008)** *Olives*, *Crop Production Science in Horticulture* 18, CABI Publishing
- **Tzvetkova-Chevolleau T, Franck F, Alawady AE, Dall’Osto L, Carriere F, Bassi R, Grimm B, Nussaume L, Havaux M. (2007)** The light stress induced protein ELIP2 is a regulator of chlorophyll synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 50: 795–809
- **Traw M.B. and Bergelson J., (2003)** Interactive effects of jasmonic acid, salicylic acid, and gibberellin on induction of trichomes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 133, 1367–1375
- **Uphof J. C. TH., and K. Hummel., (1962).** *Plant Hairs*. *Encyclopedia of Plant Anatomy*, Band 4, Teil 5. Gebrüder Borntraeger, Berlin
- **Van Cutsem E, Simonart G, Degand H, Faber AM, Morsomme P, Boutry M. (2011)** Gel-based and gel-free proteomic analysis of *Nicotiana tabacum* trichomes identifies proteins involved in secondary metabolism and in the (a)biotic stress response. *Proteomics*. Feb;11(3):440-54
- **Wagner G.J., (1991)** Secreting glandular trichomes: More than just hairs. *Plant Physiol.* 96, 675–679.
- **Wagner, G.J., Wang, E. and Shepherd, R.W. (2004)** New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome. *Ann. Bot.* 93, 3–11
- **Walker A. R., P. A. Davison, A. C. Bolognesi-Winfield, C. M. James, N. Srinivasan, T. L. Blundell, J. J. Esch, M. D. Marks, and J. C. Gray., (1999)** The *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein. *Plant Cell* 11, 1337–1350.
- **Wang E. and Wagner G.J., (2003)** Elucidation of the functions of genes central to diterpene metabolism in tobacco trichomes using posttranscriptional gene silencing. *Planta*, 216, 686–691.
- **Woodman R.L. and Fernandez G.W., (1991)** Differential mechanical defence: herbivory, evapotranspiration and leaf hairs. *Oikos*, 60: 11 – 19
- **Yoshida M., Cowgill S.E. and Wightman J.A., (1995)** Mechanism of resistance to *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in chickpea: The role of oxalic acid in leaf exudate as an antibiotic factor. *J. Econ. Entomol.* 88: 1783–1786
- **Yoshida T. et al. (2010)** AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *Plant J* 61, 672–685
- **Zhu J, Jeong J, Zhu Y, Sokolchik I, Miyazaki S, Zhu JK, Hasegawa PM, Bohnert HJ, Shi H, Yun DJ et al. (2007)** Involvement of *Arabidopsis* HOS15 in histone deacetylation and cold tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105:4945-4950
- **Zohary D., (1994)** The wild genetic resources of the cultivated olive. *Acta Hort* 356:62–65

7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ





Εικόνα 7.2



00941_1/6/10
© Kanabisa Laboratories

Εικόνα 7.4