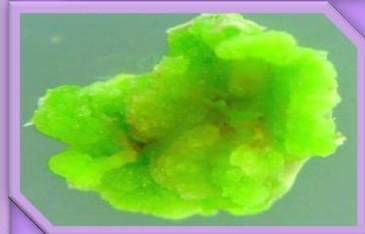
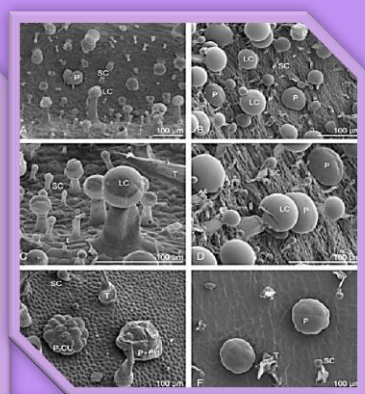


**ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΚΑΙ IN VITRO ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΣΤΟ
ΦΥΤΟ SALVIA**



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΤΣΙΑΚΑ ΜΑΡΙΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

Η ανάθεση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης πραγματοποιήθηκε με απόφαση της 15^{ης} Γ.Σ.Ε.Σ. του τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας (27-6-2012), κατά την οποία εγκρίθηκαν το θέμα και η τριμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή της μελέτης.

Συμβουλευτική & Εξεταστική Επιτροπή

1. Καθηγητής Χατζόπουλος Πολυδεύκης.....Επιβλέπων
2. Επ. Καθηγήτρια Μηλιώνη Δήμητρα.....Μέλος
3. Επ. Καθηγητής Ρήγας Σταμάτης.....Μέλος

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας, του τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την άμεση επίβλεψη του καθηγητή κ. Χατζόπουλου Πολυδεύκη, κατά τη διάρκεια των ακαδημαϊκών ετών 2012-2013. Αυτή η ιδιαίτερα απαιτητική, συνάμα άκρως δημιουργική και εποικοδομητική μελέτη δε θα είχε πραγματοποιηθεί χωρίς την συμβολή ορισμένων ανθρώπων, τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Πολυδεύκη Χατζόπουλο πρωτίστως, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στον πρόσωπο μου, δίνοντας μου την ευκαιρία να αποτελέσω μέλος του Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας. Η συνεχής καθοδήγησή του και οι πολύτιμες συμβουλές του αποτέλεσαν φωτεινούς σηματοδότες καθ' όλη τη διάρκεια της διεξαγωγής της παρούσας μελέτης και συνέβαλαν καταλυτικά στη διεύρυνση του ερευνητικού και πειραματικού τρόπου σκέψης μου. Στην συνέχεια, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Δήμητρα Μηλιώνη και στον Επίκουρο Καθηγητή κ. Σταμάτη Ρήγα για τις ιδιαίτερα χρήσιμες συμβουλές τους και για την υποστήριξή τους, τόσο σε πειραματικό, όσο και σε ηθικό επίπεδο. Ευχαριστώ ακόμη, την υπεύθυνη του εργαστηρίου ιστοκαλλιέργειας της εταιρίας Βίτρο Ελλάς Α.Ε., κ. Μαρία Μερέτη για την άκρως σημαντική στήριξη που μου παρείχε, με την άμεση κάθε φορά χορήγηση του φυτικού υλικού. Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω ένα ιδιαίτερα μεγάλο ευχαριστώ στον υποψήφιο διδάκτωρ κ. Κώστα Κουδουνά για την πολυδιάστατη συνεισφορά του στην εκπόνηση της παρούσας μελέτης, και φυσικά για την άψογη συνεργασία μας. Ακόμη ευχαριστώ θερμά όλα τα μέλη του εργαστηρίου, ανεξαρτήτως βαθμίδας, για τη βοήθειά τους. Το ευχάριστο κλίμα και η ανιδιοτελής διάθεση συνεργασίας που επικρατούν στο εργαστήριο λειτούργησαν ως αρωγοί στην διεξαγωγή της εν λόγω μελέτης. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά, όλους τους δικούς μου ανθρώπους, και ιδιαιτέρως τον αρραβωνιαστικό μου Άκη, οι οποίοι στάθηκαν διαρκώς δίπλα μου και συνέβαλαν με κάθε τρόπο στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Μαρία Τσιάκα,
Αθήνα, 2013

Στη Χρυσάνθη & στον Άκη

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. SALVIA - ΤΟ ΦΑΣΚΟΜΗΛΟ	1
1.1.1. Το φυτό <i>Salvia sclarea</i> (clary sage).....	2
1.1.2. Σύσταση αιθέριων ελαίων του γένους <i>Salvia</i>	3
1.1.3. Σκλαρεόλη: Ιδιότητες & Εμπορική χρήση.....	3
1.2. ΤΑ ΤΡΙΧΩΜΑΤΑ ΣΤΑ ΦΥΤΑ	4
1.2.1. Γενικά.....	4
1.2.2. Οικοφυσιολογικός ρόλος του τριχώματος.....	7
1.2.3. Δημιουργία τριχώματος - Το τρίχωμα του <i>Arabidopsis Thaliana</i>	9
1.2.4. Τα τριχώματα του φυτού <i>Salvia sclarea</i>	10
1.3. ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ	12
1.3.1. Γενικά.....	12
1.3.2. Τερπένια & Βιοσυνθετικά μονοπάτια στα φυτά.....	13
1.4. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ	16
1.5. ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	17
1.5.1. Ορισμός & Ιστορική Αναδρομή.....	17
1.5.2. Η αξιοποίηση της ιστοκαλλιέργειας σήμερα.....	19
1.5.3. Θρεπτικά υποστρώματα στην ιστοκαλλιέργεια.....	20
1.5.4. Ρόλος φυτορμονών & <i>in vitro</i> εφαρμογές.....	21
1.5.5. Ιστοκαλλιέργεια & Το γένος <i>Salvia</i>	22
1.6. ΣΚΟΠΟΣ	23
2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	24
2.1. ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	24
2.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ & ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ	24
2.2.1. Πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού RNA-phenol/chloroform extraction.....	24
2.2.2. Πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού RNA-CTAB extraction S(short).....	25
2.2.3. Πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού RNA-CTAB extraction L(long).....	26
2.3. ΑΝΑΛΥΣΗ & ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ	27
2.3.1. Ανάλυση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτή (gel) αγαρόζης.....	27
2.3.2. Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης νουκλεϊνικών οξέων.....	28
2.4. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	29
2.4.1. Αντίδραση με DNase.....	29
2.4.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφάση (RT-PCR).....	30
2.4.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	31
2.4.4. Σχεδιασμός εκκινητών επιθυμητών γονιδίων.....	34
2.5. ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	37
2.5.1. Παρασκευή βασικού θρεπτικού υποστρώματος για στερεή καλλιέργεια.....	37
2.5.2. Παρασκευή stock διαλυμάτων φυτορμονών.....	38
2.5.3. Παρασκευή τελικών θρεπτικών υποστρωμάτων.....	38
2.5.4. Εγκατάσταση της καλλιέργειας.....	40
2.5.5. Ποσοτικές & Ποιοτικές μετρήσεις.....	41

2.6. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ & ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ.....	41
2.6.1. Αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφάση (RT-PCR).....	41
2.6.2. Αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).....	41
2.6.3. Απομόνωσης ολικού RNA-phenol/chloroform extraction	41
2.6.4. Απομόνωσης ολικού RNA-CTAB extraction S(short).....	42
2.6.5. Απομόνωσης ολικού RNA-CTAB extraction L(long).....	42
2.6.6. Ηλεκτροφόρησης νουκλεϊκών οξέων.....	42
2.6.7. Χειρισμών Ιστοκαλλιέργειας.....	42
2.6.8. Μοριακά βάρη φυτορμονών.....	42
2.7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ.....	43
2.7.1. Αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).....	43
2.7.2. Αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφάση (RT-PCR).....	44
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	45
3.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΡΙΧΑΣ.....	45
3.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ & ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ RNA.....	46
3.2.1. Απομόνωση & καθαρισμός RNA φύλλων.....	46
3.2.2. Απομόνωση & καθαρισμός RNA κάλλου.....	49
3.2.3. Απομόνωση & καθαρισμός RNA τρίχας.....	50
3.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΩΝ.....	52
3.3.1. Αντίδραση με DNase.....	52
3.3.2. Σύνθεση cDNA.....	54
3.3.3. PCR για το γονίδιο της ακτίνης.....	54
3.3.4. Σχεδιασμός εκκινητών.....	56
3.3.5. PCR επιθυμητών γονιδίων με μήτρα cDNA & gDNA Φύλλου.....	58
3.3.6. PCR επιθυμητών γονιδίων με μήτρα cDNA Τρίχας.....	66
3.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.....	69
3.4.1. Ποιοτικές μετρήσεις.....	69
3.4.2. Ποσοτικές μετρήσεις.....	74
3.4.3. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων καλλογένεσης.....	77
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	79
5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	84
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	86
7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ.....	93

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. SALVIA - ΤΟ ΦΑΣΚΟΜΗΛΟ



Εικόνα 1.1 Salvia – Το φασκόμηλο

Γνωστό από την αρχαιότητα σε Έλληνες και Ρωμαίους, το φασκόμηλο θεωρήθηκε βότανο ιερό και χρησιμοποιήθηκε ευρέως ως πολυφάρμακο για την αντιμετώπιση διαφόρων προβλημάτων υγείας. Το όνομα *Salvia* προέρχεται από το λατινικό ρήμα «*salvare*» που σημαίνει σώζω, ενώ στα ελληνικά από το Θεόφραστο και τον Ιπποκράτη ως σήμερα αναφέρεται και ως αλιφασκιά. Το γένος *Salvia* ανήκει στην οικογένεια *Lamiaceae* (ή αλλιώς και *Labiatae*), της τάξης *Lamiales*, και περιλαμβάνει περίπου 900 είδη ποωδών και ξυλωδών αρωματικών φυτών, ιθαγενή των εύκρατων και τροπικών περιοχών, όπως είναι οι χώρες της Μεσογείου, η Βόρεια Αφρική, η κεντρική και Νότια Αμερική, η κεντρική και Ανατολική Ασία. Στη χώρα μας, ως αυτοφυή απαντώνται 23 είδη *Salvia* με τις κοινές ονομασίες: φασκομηλιά, αγριοσφακιά, αλισφακιά, μηλοσφακιά, σπατζιά κ.λπ. (Davis 1982). Ορισμένα από τα σημαντικότερα είναι τα εξής: *S. glutinosa*, *S. horminum*, *S. pomifera*, *S. sclarea*, *S. triloba* ή *fruticosa* και *S. Officinalis*, ενώ τα είδη *S. eichleriana* Halácsy, *S. pomifera* L. subsp. *pomifera* and *S. teddii* Turrill απαντώνται αποκλειστικά στον ελλαδικό χώρο.

Στις μέρες μας, το φασκόμηλο χρησιμοποιείται ευρέως στην λαϊκή θεραπευτική, καθώς είναι γνωστές οι καταπραϋντικές δράσεις του σε συμπτώματα δυσπεψίας, σε φλεγμονές του στόματος και του φάρυγγα, ουλίτιδες, ενώ χορηγούμενο σε διάφορες μορφές εμφανίζει σημαντικές θεραπευτικές ιδιότητες, αντισπασμωδική, αντισηπτική και αντιδρωτική (Barnes J. et al., 2002). Ακόμη, σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες φαίνεται να επάγει την αύξηση των επιπέδων του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη, συμμετέχοντας έτσι και στην αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της νόσου «Αλτσχάιμερ», όπου τα επίπεδα της ακετυλοχολίνης παρουσιάζονται χαμηλά (Perry et al., 1999, Akhondzadeh et al., 2003). Παράλληλα εκχυλίσματα από φασκόμηλο συνάδουν στην αύξηση της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών αμυντικών ενζύμων SOD, CAT, GPx, και GST στο ήπαρ αρουραίων με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, ενώ ταυτόχρονα συμβάλλουν και στη μείωση των μυοκαρδιακών και ηπατικών τιμών TBARS (Zhu et al., 2004). Η υψηλή περιεκτικότητα του αιθέριου ελαίου του σε φαινόλες, γνωστές για τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες, καθιστούν το φασκόμηλο φυσικό συντηρητικό σε επεξεργασμένα τρόφιμα και ποτά (Zheng et al., 2001). Στη βιομηχανία τροφίμων χρησιμοποιείται ακόμη, ως φυσική πηγή αρώματος και γεύσης. Παράλληλα, σε διάφορες φαρμακοτεχνικές μορφές, περιλαμβάνεται σε αρκετά φυτοθεραπευτικά σκευάσματα. Τέλος, το αιθέριο έλαιο του φυτού, χάρις στις αρωματικές του ιδιότητες

αξιοποιείται στην αρωματοποιία, στην κοσμετολογία, ως απωθητικό εντόμων, ως βελτιωτικό οσμής και γεύσης στις τσίχλες (Prakash, 1990).

1.1.1. Το φυτό *Salvia sclarea* (clary sage)

Το είδος *Salvia sclarea* είναι ένα από τα πιο γνωστά και διαδεδομένα σε χρήση μέλη της οικογένειας *Lamiaceae*. Το όνομα *sclarea* προέρχεται από τη λατινική λέξη «*clarus*» που σημαίνει καθαρός, διότι οι Ρωμαίοι το χρησιμοποιούσαν σε διάλυμα πλύσης για τον καθαρισμό των ματιών. Πρόκειται για διετές αρωματικό ποώδες φυτό, το οποίο φτάνει σε ύψος τα 1.2m, με χοντρό, τετραγωνισμένο στέλεχος που καλύπτεται εκτενώς από τρίχες. Τα καρδιόσχημα φύλλα του, φτάνουν σε μήκος τα 20cm είναι φλεβώδη με τραχιά επιφάνεια και καλύπτονται τόσο με αδενώδη, όσο και μη αδενώδη τριχώματα. Τα άνθη του είναι σχετικά μικρά (μέχρι 3 cm), λογχοειδή, εκφυόμενα 2-6 κατά σπονδύλους, ενώ εμφανίζουν έντονη χρωματική ποικιλομορφία, με το χρώμα τους να κυμαίνεται από απαλό μωβ σε λιλά, ή από λευκό σε ροζ. Στην Ελλάδα είναι γνωστό με τις ονομασίες αγιάννης (Αη Γιάννης) και γοργόγιαννης. Φύεται σε ξηρά και βραχώδη εδάφη, σε υψόμετρο 300-900 m, κυρίως στην Ήπειρο και στη Μακεδονία.

Kingdom:	<i>Plantae</i>
Order:	<i>Lamiales</i>
Family:	<i>Lamiaceae</i>
Genus:	<i>Salvia</i>
Species:	<i>S. sclarea</i>

Πίνακας 1.1
Συστηματική ταξινόμηση του
είδους *Salvia sclarea*



Εικόνα 1.2. *Salvia sclarea* στην
αρωματοθεραπεία

Σήμερα το αιθέριο έλαιο του φυτού χρησιμοποιείται για τις αρωματικές και αποσμητικές του ιδιότητες σε καλλυντικά και προϊόντα περιποίησης, στην αρωματοποιία και στην βιομηχανία τροφίμων ως ενισχυτικό γεύσης. Επίσης, αξιοποιείται στην αρωματοθεραπεία, καθώς φαίνεται να επιδρά καταπραυντικά στον θάλαμο του εγκεφάλου, σε καταστάσεις άγχους, φόβου, παράνοιας και παραισθήσεων (Holmes, 1993). Από διάφορες μελέτες φαίνεται να εμφανίζει οιστρογονική και αντιμυκητιακή δράση (Carruba et al., 2002, Fournier, 1948) αλλά και αντισπασμωδικές ιδιότητες, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιείται και για την αντιμετώπιση πεπτικών διαταραχών. Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση παρασκευής αλοιφής από τα φύλλα του φυτού, σε συνδυασμό με άλλα βότανα, από γηγενείς Τζαμαϊκανούς για την ανακούφιση από τσιμπήματα σκορπιών (Grieve, 1984). Τέλος, όπως στην αρχαιότητα έτσι και σήμερα, το τσάι από τα φύλλα του φυτού, χρησιμεύει στον καθαρισμό των ματιών σε διάφορες περιπτώσεις μολύνσεων

1.1.2. Σύσταση αιθέριων ελαίων του γένους *Salvia*

Η σύσταση των αιθέριων ελαίων των αρωματικών φυτών ποσοτικά και ποιοτικά παρουσιάζει έντονη διακύμανση τόσο μεταξύ των ειδών, όσο και μέσα στο ίδιο το είδος ανά γεωγραφική περιοχή και ανάλογα την εποχή συλλογής, αλλά ακόμα και στο ίδιο το φυτό στα διάφορα φυτικά μέρη. Βασικά συστατικά του αιθέριου ελαίου των ειδών του γένους *Salvia* είναι τα τερπενοειδή και τα φλαβονοειδή. Στα εναέρια φυτικά τμήματα απαντώνται σε μεγαλύτερες ποσότητες κυρίως, φλαβονοειδή και πτητικά μονοτερπένια (οξυγονωμένα μονοτερπένια και μονοτερπενικοί υδρογονάνθρακες) και σε μικρότερες ποσότητες σεσκιτερπένια και διτερπένια, ενώ στο ριζικό σύστημα κυριαρχούν τα διτερπένια. Το έλαιο του *S.sclarea* ελληνικής προέλευσης, ως προς την σύστασή του διαφέρει σημαντικά, τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά σε σχέση με αυτά που φύονται σε άλλες μεσογειακές χώρες. Αποτελείται κυρίως από λιναλοόλη, γερανιόλη, νερόλη, τερπινεόλη, οξικό εστέρα λιναλοόλης, οξικό εστέρα γερανιόλης και σκλαρεόλη. Σε ανάλυση ελαίου φυτών *S.sclarea* ελληνικής και σερβικής προέλευσης φαίνεται χαρακτηριστικά η ποικιλομορφία στην σύσταση. Και στα δύο φυτά εντοπίζονται τα μονοτερπένια λιναλοόλη και οξικός εστέρας της λιναλοόλης σε υψηλά επίπεδα, ενώ στην ελληνικής προέλευσης εντοπίζονται ακόμα σε υψηλά επίπεδα σκλαρεόλη, γερανιόλη, μανούλη, γερμακρένιο D, και οξικός εστέρας νερόλης τα οποία στην σερβικής βρίσκονται σε ιδιαίτερα χαμηλά, σχεδόν μη ανιχνεύσιμα (Torres et al., 1997).

Χημικά Συστατικά	Ελληνικής προέλευσης	Αμερικανικής προέλευσης	Γαλλικής προέλευσης	Ρωσικής προέλευσης
<i>Linalool</i>	17.2	20.3-28.6	9.0-16.0	10.4-19.3
<i>Linalyl acetate</i>	14.3	44.9-53.4	49.0-73.6	45.3-61.8
<i>Geraniol</i>	6.5	1.7-3.3	0.1-0.3	0.6-1.2
<i>Geranyl acetate</i>	7.5	1.9-3.2	0.3-0.5	0.8-1.2
<i>Terpineol</i>	15.1	1.1-3.1	0.2-0.6	1.2-2.5
<i>Nerol</i>	5.5	0.6-1.2	Tr-0.1	0.3-0.5
<i>Neryl acetate</i>	5.2	1.0-1.7	0.2-0.3	0.4-0.6
<i>Sclareol</i>	5.2	0.2-0.4	0.1-0.2	0.1-0.2

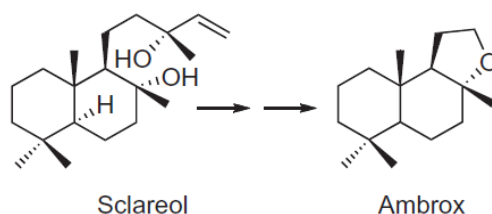
*tr=traces

Πίνακας 1.2. Συγκριτική χημική σύσταση αιθέριου ελαίου εμπορικών δειγμάτων *Salvia sclarea*

1.1.3. Σκλαρεόλη: Ιδιότητες & Εμπορική χρήση

Η σκλαρεόλη [(13*R*)-λαβδα-14-εν-8,13-διόλη] όπως προαναφέρθηκε είναι ένα από τα βασικά συστατικά του αιθέριου ελαίου του φυτού *Salvia sclarea*. Πρόκειται για ένα λαβδανικό διτερπένιο εξέχουσας σημασίας για το τομέα της αρωματοποιίας, καθώς χρησιμοποιείται για την σύνθεση πληθώρας συστατικών, που λειτουργούν ως υποκατάστατα της άμβρας (π.χ. Ambrox®). Η άμβρα είναι μια ουσία που απομονώνεται από το άμπαρι. Το άμπαρι είναι μια κηρώδης ουσία, η οποία συσσωρεύεται στον έντερο της φάλαινας φυσητήρα και αξιοποιείται στην αρωματοποιία ως στερεωτικό αρωμάτων. Δεδομένου όμως ότι οι φάλαινες φυσητήρες είναι απειλούμενο είδος, η εμπορία προϊόντων από αυτές απαγορεύεται σε

πληθώρα χωρών, με αποτέλεσμα η άμβρα να έχει αντικατασταθεί πλέον από άλλες ουσίες. Στη φύση η σκλαρεόλη απαντάται σε τέσσερα φυτικά είδη διαφορετικών οικογενειών: *Salvia sclarea* (Lamiaceae), *Cistus creticus* (Cistaceae), *Nicotiana glutinosa* (Solanaceae) και *Cleome spinosa* (Brassicaceae). Ωστόσο σήμερα η σημαντικότερη πηγή της σκλαρεόλης είναι τα άνθη και τα φύλλα του φυτού *Salvia sclarea*.



Εικόνα 1.3. Χημική δομή των μορίων της σκλαρεόλης & ενός υποκατάστατου της άμβρας (Nils Gönnewich, 2012)

Σύμφωνα με πληθώρα μελετών η σκλαρεόλη φαίνεται να διαθέτει αντιμικροβιακές και αντιμυκητιακές ιδιότητες, ο ρόλος της όμως *in planta* δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί πλήρως (Ulubelen *et al.*, 1994, Demetzos *et al.*, 1999, Chinou, 2005). Αναλυτικότερα, η σκλαρεόλη εμφανίζει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση έναντι των στελεχών *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* και *Staphylococcus hominis* (Anastasaki *et al.*, 1999). Ακόμη από μελέτες προκύπτει ότι η σκλαρεόλη επάγει την απόπτωση ανθρώπινων λευχαιμικών κυττάρων, καθώς και καρκινικών κυττάρων σε περιπτώσεις κακοήθους όγκου του μαστού, αναστέλλοντας τη διαδικασία της κυτταρικής διαίρεσης, με τον μόνιμο «εγκλωβισμό» των κυττάρων στη φάση ηρεμίας-G₀. Μάλιστα, δεν παρατηρήθηκαν τοξικές επιδράσεις σε φυσιολογικά κύτταρα (Angelopoulou *et al.*, 2001, Dimas *et al.*, 2001, Dimas *et al.*, 2006). Τέλος, η σκλαρεόλη συμμετέχει επικουρικά στην δράση γνωστών αντικαρκινικών φαρμάκων, όπως είναι η δοξορουβικίνη και το ετοποσίδιο σε MDD2 καρκινικές σειρές (Dimas *et al.*, 2006).

1.2. ΤΑ ΤΡΙΧΩΜΑΤΑ ΣΤΑ ΦΥΤΑ

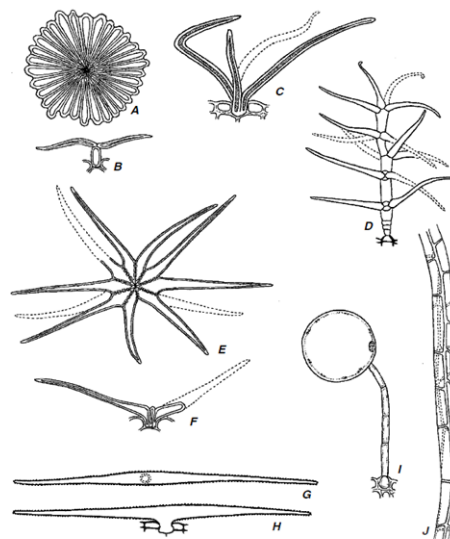
1.2.1. Γενικά

Με τον όρο τρίχωμα χαρακτηρίζονται οι μονοκύτταρες και πολυκύτταρες αποφύσεις της επιδερμίδας, οι οποίες εμφανίζουν έντονη ποικιλομορφία ως προς την κατασκευή (πλάτος, μήκος, διάμετρος) και τις λειτουργίες τους, τόσο ανάμεσα στα διάφορα φυτικά είδη, όσο και στα φυτικά όργανα του ίδιου φυτού (Fahn, 1991). Ωστόσο, παρά την έντονη αυτή διακύμανση στο τρίχωμα, σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρείται ομοιομορφία ανάμεσα στα μέλη της ίδιας οικογένειας, γεγονός που την καθιστά χρήσιμο ταξινόμικό κριτήριο των ειδών (Uphof and Hummel, 1962, Theobald *et al.*, 1979). Εξέχουσας σημασίας μορφολογικό χαρακτηριστικό θεωρείται επίσης η πυκνότητα των τριχωμάτων, που ορίζεται ως ο αριθμός των τριχών ανά μονάδα επιφάνειας. Ορισμένα όργανα στα πρώιμα αναπτυξιακά τους στάδια διαθέτουν πυκνό στρώμα τριχών, το οποίο απορρίπτεται κατά την ενηλικίωσή τους.

Κατά κανόνα αυτό που αποβάλλεται συνήθως είναι το τρίχωμα της προσαξονικής επιφάνειας των φύλλων, ενώ αυτό της αποαξονικής επιφάνειας διατηρείται (Karabourmiotis et al., 1994). Παράλληλα, φυτικά είδη που αναπτύσσονται σε ξηρά περιβάλλοντα, έχουν την τάση να δημιουργούν τριχώματα μεγαλύτερης πυκνότητας, με σκοπό την μείωση του ρυθμού διαπνοής και της θερμοκρασίας του φύλλου, λόγω αύξησης της ανακλαστικής ικανότητας έναντι της ηλικιακής ακτινοβολίας (Ehleringer, 1984, Fahn, 1986, Fahn and Cutler, 1992).

Εικόνα 1.4. Τριχώματα:

A, B, ασπιδοειδής τρίχα (*Olea*) σε επιφανειακή (A) & πλάγια (B) όψη
 C, θυσσανώδης αστεροειδής τρίχα (*Quercus*)
 D, δενδρώδης τρίχα (*Platanus*)
 E, F, αστεροειδής τρίχα (*Sida*) σε επιφανειακή (E) & πλάγια (F) όψη
 G, H, μονοκύτταρη τρίχα με δύο βραχίονες (*Lobularia*) σε επιφανειακή (G) & πλάγια (H) όψη
 I, κυστολιθική τρίχα (*Chenopodium*)
 J, τμήμα πολυκύτταρης τρίχας (*Portulaca*)
 (A-C, I, x210, D-H, J, x105) (Evert, 2006)



Με βάση την δομή και την μορφολογία τους τα τριχώματα διακρίνονται σε διάφορες κατηγορίες: στα απλά τριχώματα-«simple unbranched» (μονοκύτταρες ή πολυκύτταρες μη διακλαδιζόμενες δομές), στα διακλαδιζόμενα με δύο ως πέντε βραχίονες («two- to five-armed»), στα ασπιδοειδή-«peltate» (πεπλατυσμένα με δισκοειδή κεφαλή), στα αστεροειδή-«stellate», (σε σχήμα αστερία με αριθμό βραχιόνων μεγαλύτερο από πέντε), στις θηλές-«papillae», (μικρών διαστάσεων αποφύσεις της επιδερμίδας), αλλά και σε αυτά πιο εξειδικευμένων τύπων, όπως είναι οι κνησμώνδη τριχώματα-«stinging» (Theobald et al., 1979). Αντίστοιχα, με βάση τον τρόπο λειτουργίας τους, δηλαδή την παρουσία ή όχι εκκριτικής ικανότητας, τα τριχώματα κατηγοριοποιούνται σε δύο επιμέρους κατηγορίες: τα αδενώδη και τα μη αδενώδη (Peterson and Vermeer, 1984). Στα τριχώματα και των δύο κατηγοριών συναντάται ένα ευρύ φάσμα μορφολογικών και ανατομικών χαρακτηριστικών (Μποζαμπαλίδης, 2003). Τα αδενώδη τριχώματα απαντώνται στο 30% των τραχεόφυτων και εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία ως προς τη μορφή, τη θέση και τη χημική σύσταση των ουσιών που εκκρίνουν (Dickison, 2000). Συχνό φαινόμενο είναι η συνύπαρξη και των δύο κατηγοριών στο ίδιο φυτικό είδος, με τις μη αδενώδεις να υπερτερούν σε μέγεθος και πυκνότητα, προσφέροντας έτσι προστασία στις αδενώδεις (Gurr and McGrath, 2002, Simmons and Gurr, 2005).

Αναλυτικότερα, οι αδενώδεις τρίχες είναι πολυκύτταρα επιδερμικά εξαρτήματα, τα οποία συγκροτούνται συνήθως από τρία μέρη: α) την κεφαλή, το εκκριτικό μέρος της τρίχας, β) τον μίσχο, οποίος συνδέει την κεφαλή με την επιδερμίδα και γ) τη βάση, το διαφοροποιημένο επιδερμικό κύτταρο με το οποίο συνδέεται ο μίσχος. Η κεφαλή και ο μίσχος δύναται να είναι μονοκύτταροι ή πολυκύτταροι σχηματισμοί, ενώ ο δεύτερος σε ορισμένες περιπτώσεις φαίνεται να απουσιάζει. Τα γειτονικά επιδερμικά και υπο-επιδερμικά κύτταρα, που περιβάλλουν το κύτταρο της βάσης της αδενώδους τρίχας, διαφέρουν από αυτό ως προς το μέγεθος, τη δομή και το πάχος του

κυτταρικού τους τοιχώματος και διαφοροποιούνται σε συλλεκτικά κύτταρα υπεύθυνα για την μεταφορά πρόδρομων υλικών του εκκρίματος στη τρίχα. Η οργάνωση των εκκριτικών κυττάρων σχετίζεται με τη φύση του παραγόμενου εκκρίματος. Παραδείγματος χάριν, στα αδενώδη τριχώματα που εκκρίνουν αιθέρια έλαια απαντάται σωληνοειδές ενδοπλασματικό δίκτυο, ενώ σε εκείνα που εκκρίνουν βλέννες, κοκκιώδες ενδοπλασματικό δίκτυο. Καθώς το έκκριμα είναι δηλητηριώδες για τα κύτταρα, η επιστροφή του στο φύλλο παρεμποδίζεται μέσω της εναπόθεσης υμενίνης ή/και σουβερίνης στα πλευρικά τοιχώματα του μίσχου (Werker, 2000).

Τα κύτταρα του μίσχου διαθέτουν οργάνωση παρεγχυματικού κυττάρου. Τα εγκάρσια τοιχώματά τους διατρέχονται από πληθώρα πλασμοδεσμών για τη διευκόλυνση της μεταφοράς των ουσιών προς την κεφαλή, ενώ τα πλευρικά τοιχώματα συνήθως αποφελλώνονται, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό κασπαρικών λωρίδων, παρεμποδίζοντας την αποπλαστική μεταφορά εκκρίματος από την κεφαλή προς την επιδερμίδα.

Ανάμεσα στις κατηγορίες αδενωδών τριχωμάτων διαφορά παρατηρείται και στον τρόπο έκκρισης. Για παράδειγμα, το έκκριμα διέρχεται από το κυτταρικό τοίχωμα και ως επί το πλείστον συγκεντρώνεται σε έναν ελεύθερο χώρο (θύλακα) που δημιουργείται μεταξύ της εφυμενίδας και του τοιχώματος της κεφαλής. Υπό την πίεση της συνεχούς παροχής εκκρίματος, ο όγκος του θύλακα αυξάνεται με αποτέλεσμα την διάρρηξη της εφυμενίδας και την απελευθέρωση του εκκρίματος στο περιβάλλον. Αντίθετα, σε άλλες περιπτώσεις η εφυμενίδα φέρει πόρους, μέσα από τους οποίους, το έκκριμα διαφεύγει στο περιβάλλον. Παράλληλα, σε ορισμένους τύπους αδενωδών τριχωμάτων, το έκκριμα αποθηκεύεται για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε ειδικά κυτταρικά διαμερίσματα.

Τα αδενώδη τριχώματα εκκρίνουν μεγάλη ποικιλία ουσιών, όπως υδατικά διαλύματα, αιθέρια έλαια στα αρωματικά φυτά, μίγματα τερπενίων (κυρίως μονοτερπενίων και διτερπενίων) φλαβονοειδή, μείγματα πρωτεϊνών και υδατανθράκων, πρωτεολυτικά ένζυμα στα εντομοφάγα φυτά κλπ. (Bosabalidis *et al.*, 1998, Wang *et al.*, 2001, Schilmiller *et al.*, 2008). Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις η δομή και η κυτταρική οργάνωση της αδενώδους τρίχας είναι αποτέλεσμα προσαρμογής στον μηχανισμό σύνθεσης και αποβολής του εκκρίματος. Αξιοσημείωτο γεγονός είναι ότι η ποσότητα του εκκρινόμενου προϊόντος ποικίλει και μπορεί μάλιστα να αγγίζει το 30% του ξηρού βάρους ενός ώριμου φύλλου.

Όσον αφορά στις μη αδενώδεις τρίχες, η ύπαρξη τους θεωρείται αποτέλεσμα προσαρμογής σε ξηρά και θερμά περιβάλλοντα, καθώς συμμετέχουν στην αποφυγή απώλειας νερού και στη μείωση της θερμοκρασίας του φύλλου (Ehleringer, 1984). Αυτό επιτυγχάνεται με την εισαγωγή αέρα στο απονεκρωμένο, ύστερα από την ωρίμανση, εσωτερικού του κυττάρου της τρίχας. Έτσι το εσωτερικό μέρος αποκτώντας διαφορετικό δείκτη διάθλασης από το κυτταρικό τοίχωμα, λειτουργεί ως ανακλαστική επιφάνεια της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, απομακρύνοντας την από το φύλλο.

Παραδείγματα αδενωδών τριχωμάτων

Αδενώδη τριχώματα («glandular trichomes») τα οποία εκκρίνουν αιθέρια έλαια απαντώνται σε πολλές οικογένειες, πχ. *Lamiaceae*, *Solanaceae*, *Cannabaceae*, *Asteraceae*, *Geraniaceae*. Συγκεκριμένα, η οικογένεια των *Lamiaceae* (γνωστή και ως *Labiatae* ή *Χειλανθή*) περιλαμβάνει ορισμένα από τα πιο γνωστά αρωματικά φυτά, όπως το φασκόμηλο (*Salvia sclarea*), το δενδρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*), τη λεβάντα (*Lavandula vera*, *L. stoechas*), το θυμάρι (*Thymus vulgaris*, *Th. capitatus*), τη ρίγανη (*Origanum vulgare*), το δίκταμο ή ρίγανη της Κρήτης (*Origanum dictamnus*), τη μαντζουράνα (*Majorana hortensis*), το δυόσμο (*Mentha viridis*), το βασιλικό (*Ocimum basilicum*), το μελισσοβότανο (*Melissa officinalis*), το θρούμπι (*Satureja thymbra*) κ.α. Τα αδενώδη τριχώματα των φυτών αυτών αποτελούν τα πιο σημαντικά εργοστάσια παραγωγής αιθέριων ελαίων, πολύτιμων στην βιομηχανία τροφίμων, στην φαρμακοβιομηχανία, στη γεωργία και την κοσμετολογία για την παρασκευή αρωμάτων, καλλυντικών, φαρμακευτικών προϊόντων, εντομοκτόνων, αντισηπτικών κ.λπ.

1.2.2. Οικοφυσιολογικός ρόλος του τριχώματος

Το τρίχωμα αποτελεί έναν από τους αποτελεσματικότερους εξελικτικά μηχανισμούς επιβίωσης των φυτικών ειδών, με την μεγαλύτερη λειτουργική διαφοροποίηση ανάλογα με την μορφολογία, το αναπτυξιακό στάδιο, την τοπολογία του φυτού, αλλά και με τους εκάστοτε αβιοτικούς παράγοντες που επικρατούν. Στο τρίχωμα εκφράζονται γονίδια και απαντώνται πρωτεΐνες και προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού άμεσα σχετιζόμενα με την άμυνα του φυτού (*Gutierrez-Alcala et al., 2000, Shepherd et al., 2005, Liu et al., 2006*). Τα κριτήρια χαρακτηρισμού και οριοθέτησης, είτε της ανατομίας, είτε της λειτουργικότητας των τριχωμάτων, ώστε να γίνει η διάκριση τους δεν είναι αυστηρά, και μάλιστα πολλές φορές είναι επικαλυπτόμενα. Η έντονη αυτή διαφοροποίηση, ακόμα και μεταξύ τριχωμάτων του ίδιου φυτικού οργάνου έρχεται ως απόρροια του ρόλου που καλείται να διαδραματίσει κάθε φορά το τρίχωμα. Ορισμένοι από τους βασικότερους ρόλους που αποδίδονται στο τρίχωμα, αδενώδες και μη παρατίθενται μαζί με χαρακτηριστικά παραδείγματα στον ακόλουθο πίνακα:

<i>Ρόλος τριχώματος</i>	<i>Παραδείγματα</i>
Προστασία από υψηλές εντάσεις ορατής & UV ακτινοβολίας	μείωση της περατότητας της φωτοσυνθετικά ενεργής ακτινοβολίας στα υποκείμενα φωτοσυνθετικά κύτταρα, τροποποίηση της ποιότητας & της ποσότητας του εισερχόμενου σε υποκείμενους ιστούς του μεσοφύλλου (<i>Karabourniotis and Bornman, 1999, Karabourniotis et al., 1999</i>) επιλεκτικό φίλτρο προστασίας έναντι βλαβών από την UV-B ακτινοβολία (<i>Karabourniotis et al., 1995, Karabourniotis and Fasseas, 1996, Manetas, 1996</i>)
Πρόσληψη- Περιορισμός απώλειας νερού μέσω διαπνοής	απορρόφηση υδρατμών από την ατμόσφαιρα ή νερού της δρόσου & της βροχής (<i>Fahn & Cutler, 1992, Dickison, 2000</i>) αύξηση της ποσότητας του ακίνητου αέρα στην επιφάνεια του φύλλου οδηγεί σε μείωση διάχυσης υδρατμών, ανάκλαση & σκέδαση προσπίπτουσας ακτινοβολίας οδηγεί σε μείωση της θερμοκρασίας, άρα και της διαπνοής (<i>Fahn & Cutler, 1992, Dickison, 2000, Manetas, 2003</i>)
Προστασία από υψηλές συγκεντρώσεις τοξικών ουσιών	περιορισμός των τοξικών συγκεντρώσεων στοιχείων (π.χ. Na, Cl, Ca, S, Si) & βαρέων μετάλλων (π.χ. Cd, Zn, Mn, Ni, Pb) είτε μέσω απομόνωσης στις μη αδενώδεις τρίχες, είτε απέκκρισης από τις αδενώδεις τρίχες στο εξωτερικό περιβάλλον (<i>Wagner et al., 2004</i>)
Άμυνα έναντι διαφόρων φυτοπαθογόνων	μηχανικός φραγμός, βάσει πυκνότητας, προσανατολισμού & μορφολογίας των τριχών χημικός φραγμός, βάσει τοξικών εκκρινόμενων ενώσεων, στην επαφή & περαιτέρω εξέλιξη της προσβολής (<i>Blakeman, 1971, Allen et al., 1991</i>)
Αλληλοπαθητική δράση & προστασία έναντι τραυματισμών	αλληλοπαθητική δράση τοξικών εκκρινόμενων ενώσεων οδηγεί στη διαμόρφωση των φυτοκοινωνιών & στη χωροθέτηση των φυτικών ειδών (<i>Duke et al., 2000</i>) επιφανειακό μηχανικό φράγμα προστασίας των υποκείμενων ιστών από αβιοτικούς παράγοντες όπως π.χ. ανέμου, χαλαζόπτωσης κ.λπ. (<i>Wagner et al., 2004</i>) δέκτης ερεθισμάτων αμυντικών μηχανισμών ύστερα από τραυματισμό αβιοτικής ή βιοτικής προέλευσης (<i>Peterson & Vermeer, 1984</i>)
Συμβολή στην επικονίαση (προσέλκυση επικονιαστών & διεξαγωγή)	μηχανισμός παγίδευσης των εντόμων εντός του άνθους (<i>Murugan et al., 2006</i>) μηχανική καθοδήγηση στους επικονιαστές (<i>Ascensao et al., 2005</i>) λειτουργία ψευδο-γύρης για τους επικονιαστές (<i>Davies & Turner, 2004</i>) προσέλκυση επικονιαστών μέσω χρωματισμών & ελκυστικών εκκρινόμενων ενώσεων (<i>Masinde, 2004, Ortiz-Perez et al., 2006</i>) συλλογή & διασπορά της γύρης με μηχανικό τρόπο (<i>Moyano et al., 2003</i>) προστασία γύρης έναντι δυσμενών αβιοτικών παραγόντων (<i>Huang et al., 2002</i>)
Διασπορά σπερμάτων	διασπορά των σπερμάτων από ζώα ή έντομα μέσω μηχανικής αγκίστρωσης ή χημικής προσκόλλησης του τριχώματος (<i>Barthlott & Porembski, 1996</i>), από τον άνεμο (<i>Hensen & Muller, 1997</i>), από το νερό (<i>Steyn et al., 2004</i>)
Εγκαθίδρυση σπερμάτων στο έδαφος & διευκόλυνση της βλάστησης	προσκόλληση σπερμάτων στα εδαφικά σωματίδια, λόγω της κολλώδους υφής του εκκρίματος ή λόγω της μορφολογίας του τριχώματος (<i>Zeriahene et al., 1998</i>) μείωση της πιθανότητας αφυδάτωσης των σπερμάτων κατά τη βλάστηση λόγω κατακράτησης νερού, μέσω βλενώδους εκκρίματος των αδενωδών τριχών (<i>Gutterman, 2000</i>)

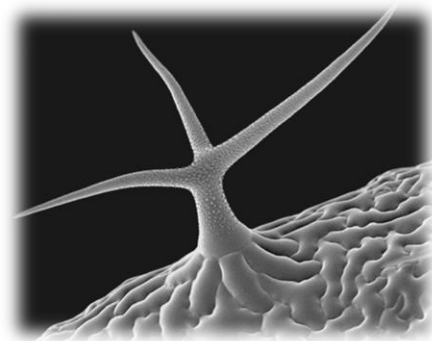
Πίνακας 1. 3. Λειτουργίες τριχώματων & αντίστοιχα παραδείγματα

1.2.3. Δημιουργία τριχώματος - Το τρίχωμα του *Arabidopsis thaliana*

Τα τριχώματα, όπως προαναφέρθηκε αποτελούν αποφύσεις της επιδερμίδας, η οντογένεση των οποίων δύναται να πραγματοποιηθεί κάτω από διαφορετικά πρότυπα (Werker, 2000). Συγκεκριμένα μια μονοκύτταρη ή πολυκύτταρη τρίχα μπορεί να προκύψει είτε από ένα, είτε από περισσότερα επιδερμικά κύτταρα, μέσω αντικλινών, περικλινών και κεκλιμένων διαιρέσεων, ή ακόμα και από διάφορους συνδυασμούς τους (Afolayan and Meyer, 1995, Μποζαμπαλίδης, 2003). Αξιοσημείωτη είναι και η οντογένεση μέσω διαχωρισμού κυττάρων της αντικλινώς επιμηκυνόμενης επιδερμίδας, και όχι μέσω προεξοχής ενός πρωτοδερμικού κυττάρου.

Για τα περισσότερα φυτικά είδη η οντογένεση του τριχώματος ξεκινά στα πρώτα αναπτυξιακά στάδια, πριν από την ανάπτυξη των στομάτων, σε ορισμένες περιπτώσεις μάλιστα πριν γίνει ορατή η εμφάνιση των φυλλικών καταβολών. Στο φυτό *Arabidopsis thaliana*, στα κύτταρα του τριχώματος των νεαρών φυλλικών καταβολών η διαφοροποίηση ξεκινά, ενώ στα γειτονικά τους βρίσκονται ακόμα σε εξέλιξη κυτταρικές διαιρέσεις. Σε αντιδιαστολή τα κύτταρα του τριχώματος των σέπαλων του φυτού *Salvia splendens* εισέρχονται σε φάση διαφοροποίησης αποκλειστικά μόνο μετά την ολοκλήρωση των κυτταρικών διαιρέσεων των υπολοίπων κυττάρων της επιδερμίδας (Larkin et al., 1997).

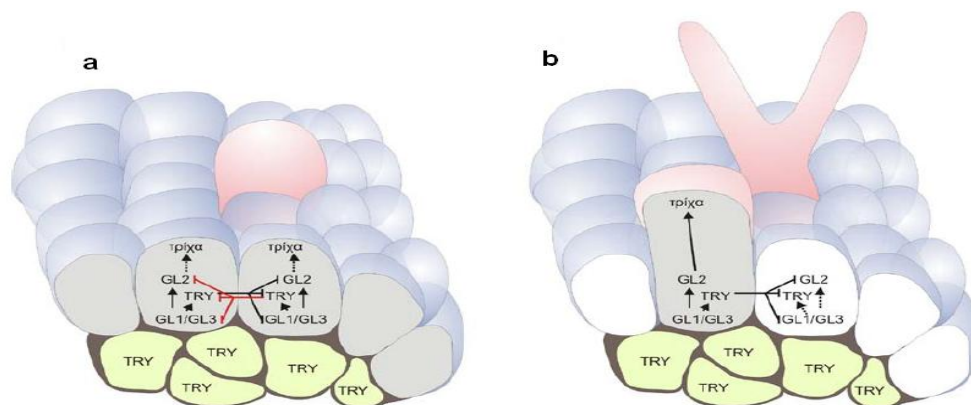
Το τρίχωμα του φυτού *Arabidopsis thaliana* και το πρότυπο διαφοροποίησης του αποτελεί μοντέλο. Η ανάπτυξη του στην προσαξονική επιφάνεια του φύλλου πραγματοποιείται βασιπεταλικά και διακρίνεται σε δύο στάδια. Το πρώτο περιλαμβάνει τον ενδοδιπλασιασμό του γενετικού υλικού του πρόδρομου κυττάρου της τρίχας και την δημιουργία μιας απόφυσης στην φυλλική επιφάνεια. Εν συνεχεία, η απόφυση αναπτύσσεται περαιτέρω ύστερα από δύο, τρεις ακόμη ενδοδιπλασιασμούς, οι οποίοι και καταλήγουν στην δημιουργία των πρώτων δύο διακλαδώσεων. Μετά την



Εικόνα 1.5. Μη αδενώδης τρίχα του *Arabidopsis* με SEM (TrichOME database)

πραγματοποίηση του τέταρτου ενδοδιπλασιασμού δημιουργείται η τρίτη διακλάδωση, με τη διαίρεση της ακραίας διακλάδωσης, κάθετα προς το επίπεδο των πρώτων διακλαδώσεων. Στο δεύτερο στάδιο συντελείται η ωρίμανση της τρίχας με την αύξηση του μεγέθους της τρίχας και την πάχυνση των κυτταρικών της τοιχωμάτων. Η έναρξη της τριχογένεσης επάγεται από ένα σύμπλοκο μεταγραφικών παραγόντων που συγκροτείται από μια πρωτεΐνη που διαθέτει μια περιοχή MYB τύπου R2R3, μια πρωτεΐνη με δομή του φερμουάρ λευκίνης, μια πρωτεΐνη με δομή bHLH και μια πρωτεΐνη που περιέχει WD-40 επαναλήψεις, οι οποίες κωδικοποιούνται από τα γονίδια GLABRA1 (GL1), GLABRA2 (GL2), GLABRA3 (GL3) και TRANSPARENT TESTA GLABRA (TTG) αντίστοιχα (Schellmann and Hulskamp, 2005). Η πρωτεΐνη TRY, η οποία επίσης διαθέτει μια περιοχή MYB τύπου R2R3 κωδικοποιείται από το γονίδιο TRYPTICHON (TRY) και είναι υπεύθυνη για την οριοθέτηση των αναπτυσσομένων τριχωμάτων, μέσω του φαινομένου της παράπλευρης αναστολής (Larkin et al., 2003). Η εξέλιξη ενός πρωτοδερμικού

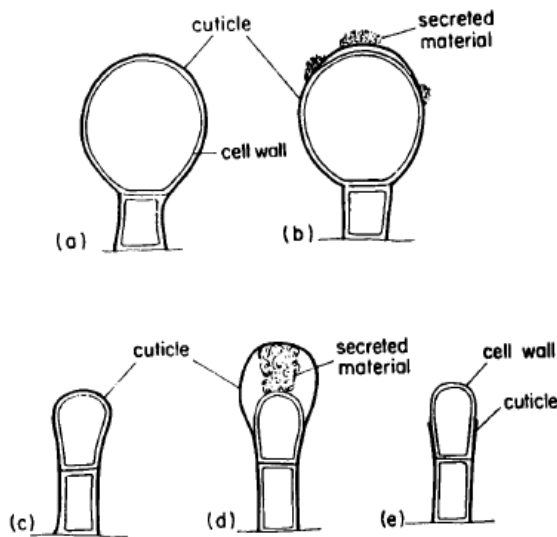
κυττάρου σε κύτταρο τρίχας ξεκινά με την παραγωγή της GL1 και πιθανώς των GL3 και TTG, από την αλληλεπίδραση των οποίων επάγεται η μεταγραφή των GL2 και TRY. Η GL2 ευθύνεται για την τελική διαφοροποίηση του κυττάρου σε τρίχα, ενώ η TRY εισερχόμενη στα γειτονικά κύτταρα ανταγωνίζεται την GL1 στην πρόσδεση της με την GL3, παρεμποδίζοντας την δημιουργία του συμπλόκου GL1/GL3, αναστέλλοντας έτσι, σε αυτά την τριχογένεση.



Εικόνα 1.6. Απεικονιστικό μοντέλο αλληλεπιδράσεων μεταγραφικών παραγόντων κατά την οντογένεση του τριχώματος στο Arabidopsis a) αμοιβαία αναστολή γειτονικών κυττάρων πριν την έναρξη της τριχογένεσης b) αύξηση των επιπέδων των GL1, GL2, GL3 στο αναπτυσσόμενο τριχίδιο & TRY για παράπλευρη αναστολή στα γειτονικά

1.2.4. Τα τριχώματα του φυτού *Salvia sclarea*

Στο φυτό *Salvia sclarea* απαντώνται τόσο αδενώδη, όσο και μη αδενώδη τριχώματα σε όλα τα εναέρια φυτικά τμήματα, με μεγαλύτερη πυκνότητα στα νεότερα φύλλα και στον κάλυκα του άνθους. Στο φύλλο εμφανίζονται τόσο στην απαξονική όσο και στην παραξονική επιφάνεια. Αναλυτικότερα, απαντώνται ποικίλοι τύποι αδενωδών τριχωμάτων (*Werker et al., 1985*), οι οποίοι κατατάσσονται στις ακόλουθες δύο μεγάλες κατηγορίες: στα τριχώματα με δομή οστού-«capitate glandular hairs», όπου η τρίχα αποτελείται από ένα κύτταρο βάσης, μονοκύτταρο, δικύτταρο, ή πολυκύτταρο μίσχο και 1 ή 2 εκκριτικά κύτταρα κεφαλής και στα ασπιδοειδή (με πεπλατυσμένη δισκοειδή κεφαλή) τριχώματα-«peltate glandular hairs», όπου η τρίχα αποτελείται από ένα κύτταρο βάσης, μονοκύτταρο μίσχο και πολυκύτταρη εκκριτική κεφαλή με 2 ή 4 κεντρικά εκκριτικά κύτταρα και 8 -12 περιφερειακά εκκριτικά κύτταρα. Στα τριχώματα της πρώτης κατηγορίας πραγματοποιείται η έκκριση των 3 βασικών συστατικών του αιθέριου ελαίου (τα μονοτερπένια λιναλοόλη και οξικός εστέρας της λιναλοόλης και το διτερπένιο σκλαρεόλη), ενώ στα ασπιδοειδή επιτελείται έκκριση κυρίως του σεσκιτερπενίου γερμακρένιο D. Στα πιο ώριμα φύλλα κυριαρχούν οι ασπιδοειδείς τρίχες, ενώ στα νεαρότερα εντοπίζονται και οι δύο κατηγορίες. Τέλος στον κάλυκα κυριαρχούν οι «capitate».

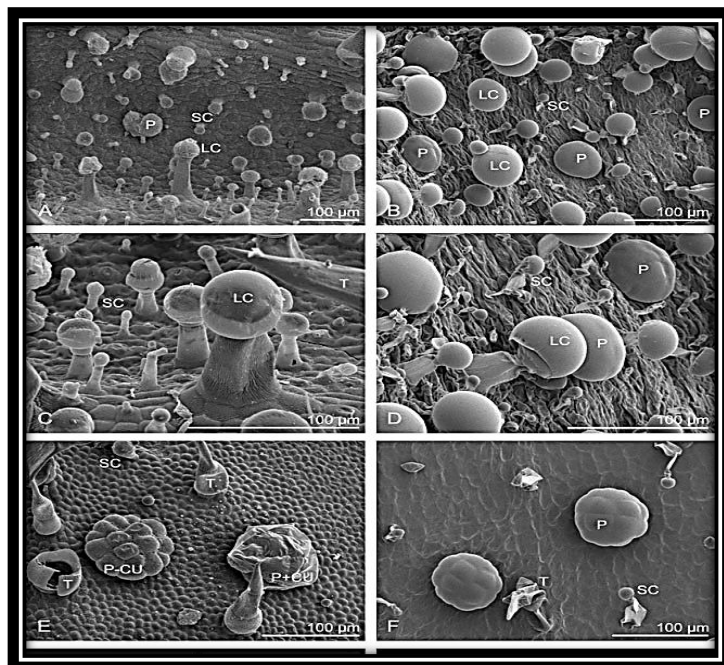


Εικόνα 1.7. Σχηματική απεικόνιση απελευθέρωσης εκκρίματος a), b) μέσω πόρων της εφυμενίδας c), d), αρχική συσσώρευση σε θύλακα & e) μέσω διάρρηξης της εφυμενίδας (Werker, 1993)

Με βάση τη χρονική στιγμή έναρξης και τον τρόπο της έκκρισης, οι αδενώδεις τρίχες διακρίνονται σε: βραχυπρόθεσμες-«short-term glandular hairs», οι οποίες αντιστοιχούν στις «capitate» τύπου, όπου η έκκριση λαμβάνει χώρα σε σύντομο χρονικό διάστημα από την σύνθεση του εκκρίματος και κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια του ιστού και σε μακροπρόθεσμες-«long-term glandular hairs», οι οποίες αντιστοιχούν στις «peltate» τύπου, όπου η έκκριση συντελείται σε μεταγενέστερο στάδιο και πριν την απελευθέρωση του εκκρίματος προηγείται μια μακρά περίοδος αποθήκευσης στον ιστό. Στις μακροπρόθεσμες τρίχες το έκκριμα αποθηκεύεται σε έναν ελεύθερο χώρο (θύλακα) μεταξύ της εφυμενίδας και

του τοιχώματος της κεφαλής και είτε υπό την πίεση της συνεχούς παροχής εκκρίματος, είτε λόγω κάποιου εξωγενούς παράγοντα (π.χ. τραυματισμό), ο όγκος του θύλακα αυξάνεται με αποτέλεσμα την διάρρηξη της εφυμενίδας και την διαφυγή του εκκρίματος στο περιβάλλον. Αντίθετα, στις βραχυπρόθεσμες το έκκριμα απελευθερώνεται στο περιβάλλον άμεσα κυρίως μέσω ειδικών πόρων της εφυμενίδας, είτε σπανιότερα με παρόμοιο τρόπο διάρρηξης, υπό την πίεση της συνεχούς παροχής εκκρίματος.

Εικόνα 1.8. Ποικίλοι τύποι τριχομάτων στο φυτό *Salvia sclarea* με SEM
 SC, small capitate
 LC, large capitate
 P, peltate
 T, non-glandular
 (Schmiderer, 2008)



1.3. ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ

1.3.1. Γενικά

Ο όρος δευτερογενής μεταβολισμός αποδίδεται στο σύνολο των βιοσυνθετικών οδών οι οποίες συμμετέχουν στην παραγωγή βιομορίων μη εμπλεκόμενων σε βασικές φυσιολογικές λειτουργίες των φυτικών ειδών, όπως η αύξηση και η ανάπτυξη. Τα μεταβολικά αυτά προϊόντα προέρχονται από ενδιάμεσες ενώσεις του πρωτογενούς μεταβολισμού, ενώ παράγονται σε επιμέρους ιστούς και σε καθορισμένα αναπτυξιακά στάδια. Εντούτοις, αναμφισβήτητο γεγονός αποτελεί σήμερα η στενή σύνδεση των δευτερογενών μεταβολιτών με την λειτουργία θεμελιωδών αλλά και επαγόμενων αμυντικών μηχανισμών, ζωτικής σημασίας για τη επιβίωση των φυτών, καθώς και με την ικανότητα διαφοροποίησης των επιμέρους κυτταρικών δομών, από τις οποίες προκύπτουν. Η εμφάνιση τέτοιων μηχανισμών θεωρείται αποτέλεσμα της συνεξέλιξης των φυτικών οργανισμών με τους εχθρούς τους, κατά την προσπάθεια προσαρμογής τους σε καταπονήσεις του βιοτικού και αβιοτικού περιβάλλοντος. Το χρονικό και τοπολογικό πρότυπο παραγωγής των μεταβολιτών εμφανίζει έντονη διαφοροποίηση για κάθε φυτό, ενώ σε συνδυασμό με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του και το είδος των μεταβολικών προϊόντων διαμορφώνουν την «ταυτότητα» του εκάστοτε είδους ή ακόμη και ποικιλίας. Όπως προαναφέρθηκε ένα από τα σημαντικότερα «εργοστάσια» παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών είναι το αδενώδες τρίχωμα των φυτικών ειδών.

Παράλληλα, ο ρόλος των δευτερογενών μεταβολιτών δεν περιορίζεται μόνο στη φυσιολογία των φυτών, αλλά συναντά πληθώρα εφαρμογών στην παραγωγή φαρμάκων, στην βιομηχανία τροφίμων ως αρωματικά, στην κοσμετολογία και στην αρωματοποιία, ως αντιοξειδωτικά και πρόσθετα, στη γεωργία καθώς και σε πολλούς ακόμη τομείς (*Lange and Croteau, 1999, Bouvier et al., 2003*). Τις τελευταίες δεκαετίες παρατηρείται ραγδαία εντατικοποίηση της έρευνας, όσον αφορά την πλήρη κατανόηση των βιοσυνθετικών μονοπατιών, την ταυτότητα και το ρόλο των ένζυμων ή των γονιδίων τους, τις χημικές ιδιότητες των ίδιων των βιομορίων, αλλά και τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς που ελέγχουν τον σχηματισμό τους. Επομένως, το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας για τον δευτερογενή μεταβολισμό των φυτών εντείνεται με στόχο την αύξηση της παραγωγής και την καλύτερη αξιοποίηση των προϊόντων, είτε με κλασσικές, είτε με βιοτεχνολογικές μεθόδους.

Με βάση τα πρόδρομα βιομόρια του πρωτογενούς μεταβολισμού από τα οποία συντίθενται οι δευτερογενείς μεταβολίτες κατατάσσονται σε τρεις βασικές ομάδες: τα τερπένια, τις φαινολικές ουσίες και τις αζωτούχες ενώσεις. (*Καραμπουρνιώτης, 2003*). Στην ομάδα των τερπενίων (ή αλλιώς και ισοπrenoειδών) κατατάσσονται βιομόρια που παράγονται από τη βασική μονάδα του ισοπεντανίου μέσω του μεβαλονικού μονοπατιού (MVA), με πρόδρομο μόριο το ακετυλο-συνένζυμο Α και του μονοπατιού της 4-φωσφορο-2-μεθυλο-D-ερυθρυτόλης (MEP), (*Aharoni et al., 2006*), όπως τα μονοτερπένια (C10), διτερπένια (C20), σεσκιτερπένια (C15), τετρατερπένια (C40) κ.λ.π. Στην ομάδα των φαινολικών συγκαταλέγονται μόρια που διαθέτουν έναν τουλάχιστον αρωματικό δακτύλιο με ένα ή περισσότερα υδροξύλια και συντίθενται κυρίως μέσω των βιοσυνθετικών οδών του σικιμικού ή/και μηλονικού οξέος, όπως είναι οι φαινόλες, τα φλαβονοειδή, τα φαινυλοπροπανοειδή κ.λ.π. Τέλος, η ομάδα

των αζωτούχων ενώσεων εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια, όπου και απαντώνται μόρια που προέρχονται κυρίως από αμινοξέα όπως τα αλκαλοειδή, οι μεταλαΐνες, οι αμίνες, τα κυανογόνα γλυκοζίδια, οι θειογλυκοζίτες αλλά και μη πρωτεϊνικά αμινοξέα (Croteau et al., 2000).

1.3.2. Τερπένια & Βιοσυνθετικά μονοπάτια στα φυτά

Τα τερπένια αποτελούν μια εξαιρετικά διαδεδομένη ομάδα λιπόφιλων δευτερογενών μεταβολιτών, (παραπάνω από 30.000 ενώσεις γνωστές έως σήμερα) με έντονη διαφοροποίηση ως προς τις χημικές και λειτουργικές τους ιδιότητες, οι οποίες απαντώνται σε όλα τα βασίλεια (McCaskill and Croteau, 1998). Βασικά παραδείγματα συνιστούν οι φυτικές ορμόνες κυτοκινίνες, γιββερελίνες, οι φωτοσυνθετικές χρωστικές φυτόλη και καροτενοειδή και οι στερόλες, βασικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών. Τερπένια όπως η ελαιορητήνη (μείγμα μονο- και δι-τερπενίων) των κωνοφόρων εμφανίζουν τοξικές ιδιότητες έναντι σε έντομα και αλλά παθογόνα., ενώ τα πυρεθροειδή αποτελούν πολύ ισχυρά εντομοκτόνα. Διάφορα καρδενολίδια δρουν ως καρδιοτονωτικά φάρμακα επηρεάζοντας την λειτουργία των αντλιών Na/K των καρδιακών μυών, ενώ η ταξόλη εμφανίζει αντικαρκινική δράση (Walker and Croteau, 2000).

Βιοσύνθεση τερπενίων

Οι βασικές μονάδες παραγωγής των τερπενίων είναι τα μόρια διφωσφορικό (ή πυροφωσφορικό) ισοπεντενύλιο (IPP) και το ισομερές του διφωσφορικό (ή πυροφωσφορικό) διμεθυλοαλλύλιο (DMAPP). Το IPP προέρχεται είτε από τη σταδιακή συμπίκνωση τριών μορίων ακετυλο-συνενζύμου Α, μέσω του μεβαλονικού μονοπατιού (MVA) που εδράζεται στο κυτταρόπλασμα, είτε από το πυροσταφυλικό οξύ και την 3-φωσφορική γλυκεριναλδεΐδη, μέσω του πλαστιδιακού μονοπατιού της 4-φωσφορο-2-μεθυλο- D-ερυθρυτόλης (MEP), ενώ εν συνεχεία ισομερίζεται σε DMAPP. (McGarvey and Croteau, 1995, Lichtenthaler, 2000, Eisenreich et al., 2004, Bouvier et al., 2005).

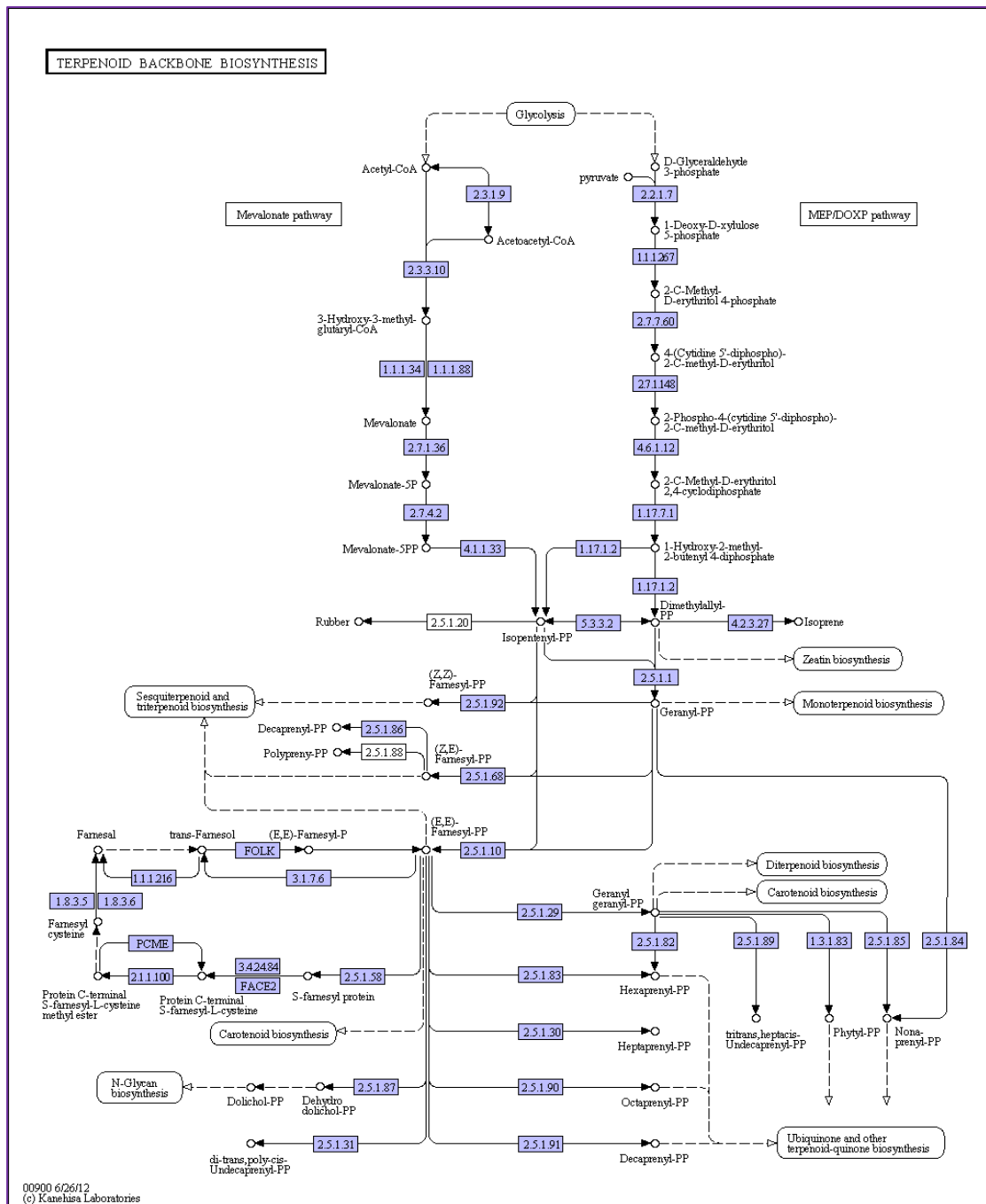
Το μονοπάτι MVA οδηγεί στην σύνθεση στερολών, σεσκιτερπενίων, μπρασσινοστεροειδών και πρενυλομάδων, ενώ το μονοπάτι MEP στη σύνθεση μονο- και δι-τερπενίων. Στα αρχαιοβακτήρια, στους μύκητες και στο ζωικό βασίλειο συναντάται αποκλειστικά το πρώτο μονοπάτι, ενώ στα πρωτόζωα και στα βακτήρια το δεύτερο. Αντίθετα, στους φυτικούς οργανισμούς είναι ενεργά και τα δύο μονοπάτια. Τα τελευταία χρόνια έχουν κλωνοποιηθεί και χαρακτηριστεί λειτουργικά διάφορα γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα και των δύο μονοπατιών.

Στην συνέχεια από την συμπίκνωση των μορίων IPP και DMAPP (C5), με τη δράση πρενυλτρανσφερασών προκύπτουν οι ενώσεις διφωσφορικό γερανύλιο (GPP, C10), διφωσφορικό γερανυλγερανύλιο (GGPP, C20) και διφωσφορικό φαρνεσύλιο (FPP, C15), τα πρόδρομα μόρια για την σύνθεση μονοτερπενίων, διτερπενίων και σεσκιτερπενίων αντίστοιχα (McGarvey and Croteau, 1995, Rodriguez-Concepcion, 2006). Συγκεκριμένα, η συνθετάση του πυροφωσφορικού γερανυλίου (GPPS) καταλύει τη συμπίκνωση ενός μορίου DMAPP και ενός IPP προς την παραγωγή του

GPP. Έπειτα μέσω της 1'-4'προσθήκης του IPP στο GPP από το ένζυμο συνθετάση του πυροφωσφορικού φαρνεσυλίου (FPPS) σχηματίζεται το FPP. Τέλος, μέσω δεύτερης 1'-4'προσθήκης του IPP αυτή τη φορά στο FPP από το ένζυμο συνθετάση του πυροφωσφορικού γερανυλγερανυλίου (GGPPS) συντίθεται το μόριο του GGPP.

Στο τελευταίο στάδιο πραγματοποιείται η κυκλοποίηση των μορίων GPP, GGPP και FPP για τον τελικό σχηματισμό των κυκλικών μονοτερπενίων, διτερπενίων και σεσκιτερπενίων αντίστοιχα, από τα ένζυμα συνθετάσες των τερπενίων (TPS, «terpene synthases»). Τα ένζυμα αυτά, βάση φυλογενετικής μελέτης 33 πρωτεϊνικών αλληλουχιών από 18 είδη (*Keeling et al., 1998*) διακρίνονται σε έξι υπο-οικογένειες, τις TPS-a έως TPS-f, με σημαντικότερους εκπροσώπους τις TPS-a, όπου κατατάσσονται συνθετάσες δι- και σεσκι τερπενίων των αγγειόσπερμων, και TPS-b, όπου κατατάσσονται συνθετάσες μονοτερπενίων των αγγειόσπερμων, οι οποίες και παρουσιάζουν σαφή φυλογενετική απομάκρυνση από την πρώτη οικογένεια (*Keeling and Bohlmann, 2006*). Ύστερα από τον παραπάνω διαχωρισμό διαπιστώθηκε και η ύπαρξη της υπο-οικογένειας TPS-g όπου κατατάσσονται συνθετάσες μονοτερπενίων με τελικά προϊόντα άκυκλα μόρια (*Martin et al., 2004*).

Επίσης, έντονη διαφοροποίηση εύρους 50- 100 kDa παρατηρείται και στο μέγεθος των ενζύμων αυτών. Μεγαλύτερου μεγέθους είναι οι TPS των διτερπενίων, λόγω ένθεσης στο αμινοτελικό τους άκρο, μετά το πεπτιδίο οδηγό που τις κατευθύνει στα πλαστίδια., αμέσως μικρότερες είναι οι TPS των μονοτερπενίων, ενώ το μικρότερο μέγεθος διαθέτουν οι TPS των σεσκιτερπενίων λόγω απουσίας του πεπτιδίου οδηγού. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι στις TPS των μονο- και διτερπενίων εμφανίζεται υψηλή εκλεκτικότητα ως προς το υπόστρωμα που χρησιμοποιούν (GPP και GGPP αντίστοιχα), γεγονός που δεν παρατηρείται στις TPS των σεσκιτερπενίων.



00900 6/26/12
(c) Kanehisa Laboratories

Εικόνα 1.9. Βιοσύνθεση τερπενίων:κυτταροπλασματικό μεβαλονικό μονοπάτι (MVA) & πλαστιδιακό μονοπάτι (MEP) (KEGG database)

Σύνθεση μονοτερπενίων

Η βιοσύνθεση των μονοτερπενίων επιτελείται σε δύο στάδια, αρχικά μέσω ισομερισμού του GPP σε ένα γενικό ενδιάμεσο προϊόν και στην συνέχεια πραγματοποιείται κυκλοποίηση και ο σχηματισμός των εκάστοτε μονοτερπενίων, ύστερα από περαιτέρω τροποποιήσεις και προσθήκες ομάδων. Οι TPS των μονοτερπενίων διαθέτουν την ικανότητα κατάλυσης και των δύο αυτών τύπων αντίδρασης.

Σύνθεση σεσκιτερπενίων

Στην περίπτωση της βιοσύνθεσης των σεσκιτερπενίων απαντάται παρόμοιος μηχανισμός με αυτόν των μονοτερπενίων, αρχικά με τον ισομερισμό του FPP να λαμβάνει χώρα, και ύστερα να ακολουθεί η τελική κυκλοποίηση. Ομοίως, οι TPS των σεσκιτερπενίων εμφανίζουν τις ίδιες ιδιότητες και καταλυτική ικανότητα με αυτές των μονοτερπενίων.

Σύνθεση διτερπενίων

Όσον αφορά τη βιοσύνθεση των διτερπενίων, η κυκλοποίηση του GGPP πραγματοποιείται με δύο μηχανισμούς. Ο πρώτος επιτελείται με τρόπο ανάλογο των μονο- και σεσκι-τερπενίων, ενώ σύμφωνα με το δεύτερο επιτελείται σύνθεση ενός ενδιάμεσου μορίου, του πυροφωσφορικού κοπαλλυλίου (CPP), μέσω πρωτονίωσης του τελευταίου διπλού δεσμού του GGPP. Ακολούθως από το CPP προκύπτει πληθώρα τρικυκλικών ή τετρακυκλικών διτερπενίων, μέσω ιονισμού του διφωσφορικού εστέρα του και επακόλουθων εσωτερικών τροποποιήσεων. Ως προς την ικανότητα κατάλυσης των αντιδράσεων οι TPS των διτερπενίων διακρίνονται σε εκείνες που καταλύουν και τα δύο στάδια και πρόκειται για διλειτουργικά ένζυμα, όπως είναι η συνθετάση του αμπιεταδιενίου και σε όσες στερούνται αυτή την ιδιότητα. Στην περίπτωση αυτή απαιτείται η ύπαρξη δύο διαφορετικών ενζύμων για την ολοκλήρωση των παραπάνω διαδικασιών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η διαδικασία βιοσύνθεσης της γιββερελίνης, κατά την οποία η συνθετάση A του καουρενίου καταλύει το σχηματισμό του CPP από το GGPP, ενώ η συνθετάση B του καουρενίου μετατρέπει το CPP σε καουρένιο.

1.4. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ

Στην ενότητα αυτή αναφέρονται ενδεικτικά δύο από τις πιο πρόσφατες μελέτες σε είδη του γένους *Salvia*.

«EST analysis and annotation of transcripts derived from a trichome-specific cDNA library from *Salvia fruticosa*»

Στην μελέτη των *Fani M. Chatzopoulou et al., 2010* πραγματοποιήθηκε η κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης από τα τριχώματα φύλλων του φυτού *Salvia fruticosa*, με στόχο την μελέτη του τρανσκριπτομικού προφίλ του ιστού. Στην συνέχεια ακολούθησε η αλληλούχιση 2,304 κλώνων και η ταυτοποίηση 1,615 υψηλής ποιότητας ESTs, σχετιζόμενων με μονοπάτια του δευτερογενούς μεταβολισμού, όπως είναι η βιοσύνθεση τερπενίων, διτερπενίων, φαινυλοπροπανοειδών και φλαβονοειδών. Εν συνεχεία μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης επιλεγμένων γονιδίων, εμπλεκόμενων στα μονοπάτια αυτά, σε τρεις διαφορετικούς ιστούς (φύλλα, τριχώματα και φύλλα απουσία τριχωμάτων). Σύμφωνα με τη μελέτη αυτή τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης παρατηρήθηκαν στα τριχώματα, γεγονός που συνάδει με το χαρακτηρισμό του ιστού, ως ένα από τα σημαντικότερα «εργοστάσια» παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών.

«Discovery and functional characterization of two diterpene synthases for sclareol biosynthesis in *Salvia sclarea* (L.) and their relevance for perfume manufacture»

Στην εργασία των *Caniard A et al., 2012* πραγματοποιήθηκε η κλωνοποίηση των γονιδίων και ο πλήρης χαρακτηρισμός της λειτουργίας δύο νέων συνθετασών διτερπενίων (diTPS), οι οποίες καταλύουν την σύνθεση της σκλαρεόλης στο φυτό *Salvia sclarea*. Το ένζυμο SsLPPS καταλύει την σύνθεση του ενδιάμεσου μορίου διφωσφορική λαβδα-13-εν-8-όλη από το διφωσφορικό γερανυλγερανύλιο (GGPP) μέσω πρωτονίωσης, ενώ στην συνέχεια, το ένζυμο SsSS καταλύει το σχηματισμό της σκλαρεόλης, από το ενδιάμεσο μόριο, μέσω ιονισμού. Πραγματοποιήθηκε *in vitro* έκφραση των πρωτεϊνών σε κύτταρα *E.coli* και διεξαγωγή ενζυμικών δοκιμασιών, με χρήση του GGPP ως υπόστρωμα, προς επιβεβαίωση της TPS καταλυτικής δράσης. Η παραγωγή της σκλαρεόλης επιτεύχθηκε *in vivo* με την συν-έκφραση των δύο πρωτεϊνών σε κύτταρα ζύμης (*Saccharomyces cerevisiae*). Παράλληλα, από πειράματα παροδικής έκφρασης σε φύλλα καπνού, με GFP κατασκευές προέκυψε ότι και τα δύο ένζυμα διαθέτουν στο N-άκρο μια ακολουθία οδηγό, που τις κατευθύνει στο χλωροπλάστη, το οργανίδιο όπου και επιτελείται η σύνθεση των διτερπενίων στα φυτά.

1.5. ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Λόγω της ευρύτατης χρήσης των ειδών του γένους *Salvia* σε πληθώρα εφαρμογών στην φαρμακοβιομηχανία, στην βιομηχανία τροφίμων, στην αρωματοποιία και στη γεωργία το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας συγκεντρώνεται και στην παραγωγή φυτών μέσω της ιστοκαλλιέργειας και ιδιαίτερα στην *in vitro* παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών.

1.5.1. Ορισμός & Ιστορική Αναδρομή

Με τον όρο ιστοκαλλιέργεια ή μικροπολλαπλασιασμό χαρακτηρίζεται η μέθοδος αγενούς πολλαπλασιασμού ενός φυτικού είδους, η οποία πραγματοποιείται σε εργαστηριακό χώρο, με την έννοια του *in-vitro* πολλαπλασιασμού. Βασίζεται στην μοναδική ιδιότητα της ολοδυναμικότητας («totipotency») των φυτικών κυττάρων, την ικανότητα αναγέννησης ολόκληρου του φυτού, από ένα αρχικό σωματικό κύτταρο, που διατυπώθηκε για πρώτη φορά το 1838 από τους *Schwan και Schleiden*. Η πρώτη έμπρακτη προσπάθεια καλλιέργειας φυτικών ιστών επιτελέστηκε το 1902, από τον *Haberlandt*, η οποία όμως δεν οδήγησε σε επιτυχή αποτέλεσμα. Στην συνέχεια, το 1939, ο *Nobecourt* προχώρησε στην δημιουργία ριζών από κάλλους καρότου, ενώ οι αρχές του μικροπολλαπλασιασμού («micropropagation») θεμελιώθηκαν από τους *Skoog και Miller*, το 1957. Το σημαντικότερο βήμα στην ανάπτυξη και καθιέρωση του μικροπολλαπλασιασμού σε εμπορικό επίπεδο έλαβε χώρα από τον *Morel* το 1964, με τον πρώτο επιτυχημένο πολλαπλασιασμό κλώνων ορχιδέας από κορυφαίους βλαστούς.

Η τεχνική της ιστοκαλλιέργειας δύναται να διαχωριστεί σε δύο επιμέρους μεγάλες κατηγορίες: α) την καλλιέργεια οργάνων και σπερμάτων, με σκοπό την παραγωγή ενός ολόκληρου φυτού και β) την *in vitro* καλλιέργεια κυττάρων, με

απώτερο στόχο τη δημιουργία αναγεννημένου φυτού. Η διακριτή διαφορά των δύο αυτών κατηγοριών έγκειται στο ότι στην πρώτη περίπτωση καθίσταται επιτρεπτή η ανάπτυξη και διαφοροποίηση των κυττάρων ή των ιστών, ενώ αντίθετα στη δεύτερη προηγείται η αποδιαφοροποίηση των κυττάρων (είτε αυτά βρίσκονται μέσα σε όργανα, είτε μέσα στους ιστούς) για τη δημιουργία κάλλου (άμορφης διαιρούμενης μάζας κυττάρων), ο οποίος εν συνεχεία, μέσω οργανογένεσης ή σωματικής εμβρυογένεσης θα οδηγήσει στην δημιουργία ολόκληρου του αναγεννημένου φυτού.

Όπως προαναφέρθηκε ο κάλλος είναι μια άμορφη μάζα διαιρούμενων κυττάρων. Οι διαιρέσεις αυτές δεν ακολουθούν κάποιο καθορισμένο πρότυπο, αλλά πραγματοποιούνται αλόγιστα με στόχο τη διαίωξη του γενετικού υλικού του κυττάρου. Ο ρυθμός καλλογένεσης και ο τύπος του παραγόμενου κάλλου βρίσκονται σε άμεση εξάρτηση από ποικίλους παράγοντες όπως, το είδος του φυτού, το γενότυπο της ποικιλίας, και τις συνθήκες καλλιέργειας, με τις αυξίνες να διαδραματίζουν το καθοριστικότερο ρόλο. Μέσα από συνεχείς ανακαλλιέργειες σε νέο θρεπτικό υπόστρωμα, ίδιων συνθηκών επιτυγχάνεται η επ' αόριστον διατήρηση του κάλλου. Αντίθετα, προχωρώντας στις διαδικασίες της βλαστογένεσης και της ριζοβολίας (σε κατάλληλα υποστρώματα τροποποιημένων συνθηκών) επιτυγχάνεται η λήψη αναγεννημένων φυτών. Στη φύση, ο σχηματισμός κάλλου είναι απόρροια της δράσης των ενδογενών ορμονών, αυξινών και κυτοκινινών, συνήθως σε απόκριση μόλυνσης από μικροοργανισμούς. Μία από τις σημαντικότερες εφαρμογές της καλλογένεσης είναι η παροχή υλικού για τη μελέτη, παραγωγή, σύνθεση και ανάλυση των βιοχημικών και γενετικών μονοπατιών των κυττάρων.

Ο συνηθέστερος τρόπος μικροπολλαπλασιασμού για την παραγωγή φυτών-κλώνων είναι η χρησιμοποίηση πλάγιων (βοηθητικών) οφθαλμών και η εγκατάστασή τους σε θρεπτικό μέσο. Ακολουθώς οι οφθαλμοί αυτοί αναπτύσσονται σε βλαστούς με πλάγιους οφθαλμούς που επίσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν αρχικό υλικό για την ανάπτυξη βλαστών. Έτσι, είναι φανερό ότι με τη διαδικασία αυτή είναι δυνατό να παραχθούν σε ένα σύντομο χρονικό διάστημα πολλά φυτά-κλώνοι. Η μεθοδολογία αυτή χρησιμοποιείται με επιτυχία για τα διακοσμητικά φυτά και τα άνθη.

Η διαδικασία που οδηγεί από την προετοιμασία των μητρικών φυτών στον εγκλιματισμό των νέων φυταρίων διαιρείται σε πέντε στάδια, ονομαζόμενα και ως στάδια του κύκλου μικροπολλαπλασιασμού (*Loreti and Morini, 1982*), και είναι τα ακόλουθα:

- ✓ 1^ο Στάδιο: Προετοιμασία πολλαπλασιαστικού υλικού.
- ✓ 2^ο Στάδιο: Απολύμανση εκφύτων και εγκατάσταση ασηπτικής καλλιέργειας.
- ✓ 3^ο Στάδιο: Πολλαπλασιασμός βλαστών.
- ✓ 4^ο Στάδιο: Ριζοβολία και προετοιμασία για ανάπτυξη in-vivo.
- ✓ 5^ο Στάδιο: Μεταφορά και εγκλιματισμός των νεαρών φυταρίων.

Στον ακόλουθο πίνακα παρατίθενται ορισμένες από τις τεχνικές ιστοκαλλιέργειας που διεξάγονται με επιτυχία σήμερα:

Τεχνική ιστοκαλλιέργειας	Έκφυτο	Τελικό αποτέλεσμα
καλλιέργεια ολόκληρων φυτών	σπέρματα ή/και απομονωμένα έμβρυα	ανάπτυξη φυτού
καλλιέργεια οργάνων	ακραία μεριστώματα βλαστού, ρίζας, ανθήρες κ.λπ.	ανάπτυξη και διατήρηση οργάνου
καλλιέργεια κάλλου	οποιοδήποτε φυτικό τμήμα	παραγωγή και διατήρηση κάλλου, αναγέννηση φυτού, δημιουργία καλλιέργειας μεμονωμένων κυττάρων
καλλιέργεια πρωτοπλαστών	πρωτοπλάστες	συντήρηση καλλιέργειας για πειραματικούς χειρισμούς

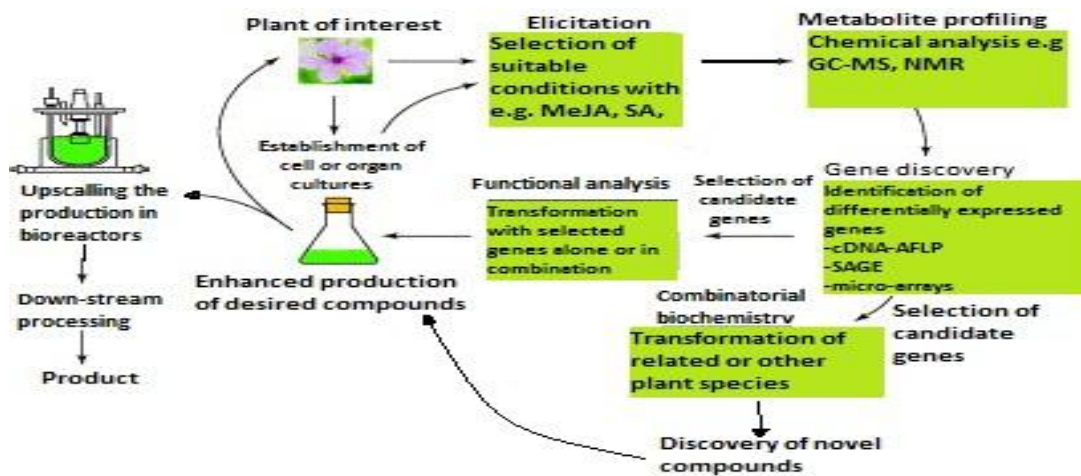
Πίνακας 1.4. Τεχνικές & στόχοι ιστοκαλλιέργειας (Χατζόπουλος, 2001)

1.5.2. Η αξιοποίηση της ιστοκαλλιέργειας σήμερα

Μέσω της ιστοκαλλιέργειας καθίσταται εφικτή η δημιουργία μεγάλου αριθμού κλώνων (με τη χρησιμοποίηση μεριστωμάτων), φυτών με το ίδιο γενετικό υπόβαθρο, από μικρή ποσότητα αρχικού υλικού, σε σύντομο χρονικό διάστημα. Ταυτόχρονα με χρήση οποιουδήποτε φυτικού τμήματος, μέσω των άμορφων μαζών του κάλλου, πραγματοποιείται η αναγέννηση ολοκληρωμένων φυτών. Παράλληλα, επιτυγχάνεται ο πολλαπλασιασμός ειδών και ποικιλιών με χαμηλή ικανότητα ριζοβολίας, ο οποίος στο παρελθόν ήταν ιδιαίτερα δύσκολος μέσω των κλασσικών μεθόδων, καθώς και η δημιουργία φυτών απαλλαγμένων από ασθένειες ή ιδιαίτερα ανθεκτικών σε αυτές (Loreti and Morini, 1982). Επίσης, μέσω της ιστοκαλλιέργειας πραγματοποιείται παραγωγή διαγονιδιακών φυτών (σε συνδυασμό με τον μετασχηματισμό των φυτών). Άλλωστε, δεδομένου ότι η διαδικασία της μεταφοράς του T-DNA στα φυτά εξαρτάται από κάποιο τραυματισμένο ιστό, η λήψη των εκφύτων από το μητρικό φυτό στην *in vitro* καλλιέργεια εμπεριέχει και την διαδικασία τραυματισμού του φυτικού ιστού, δηλαδή το αρχικό στάδιο αναγνώρισης του κυττάρου-στόχου από το *Agrobacterium* για τη μεταφορά και εισαγωγή του ξένου DNA. Σήμερα η *in vitro* καλλιέργεια χρησιμοποιείται για την παραγωγή πληθώρας μονοκότυλων και δικότυλων φυτών, μεγάλης εμπορικής αξίας. Τέλος, η ιστοκαλλιέργεια αξιοποιείται και στην *in vitro* παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών. Η αρχή στην οποία στηρίζεται η εφαρμογή αυτή είναι η δυνατότητα παραγωγής των μεταβολικών προϊόντων στα αδιαφοροποίητα φυτικά κύτταρα της ιστοκαλλιέργειας, με τρόπο παρόμοιο της *in vivo* σύνθεσης τους στα φυτικά όργανα. Μάλιστα με κατάλληλες τροποποιήσεις σήμερα καθίσταται εφικτή η *in vitro* παραγωγή μεταβολιτών ποσότητας, έως και 800 φορές μεγαλύτερης, από αυτήν με τις κλασσικές μεθόδους εκχύλισης και απόσταξης (π.χ. παραγωγή σικονίνης-αντιφλεγμονώδης). Ένα ακόμη πλεονέκτημα της *in vitro* παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών αποτελεί η ικανότητα λήψης προϊόντων, ανεξαρτήτως κλιματολογικών συνθηκών και εποχιακών διακυμάνσεων, αλλά και ελεγχόμενης χημικής σύστασης, ποιότητας και αξίας.

Στις μέρες μας η τεχνική αυτή αξιοποιείται κυρίως στην παραγωγή προϊόντων αρωματικών φυτών, μεγάλης οικονομικής σημασίας, χρήσιμων στη βιομηχανία τροφίμων, ως φυσική πηγή αρώματος και γεύσης, στην φαρμακοβιομηχανία, στην αρωματοποιία, στην κοσμετολογία και στην γεωργία. Ενόψει της ολοένα και αυξανόμενης ζήτησης των προϊόντων αυτών, η *in vitro* παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών αποτελεί σήμερα πρόκληση για τη βιοτεχνολογία, ειδικά με στόχο την

επέκταση της και σε μεταβολίτες στους οποίους δεν εφαρμόζεται ακόμα, λόγω ελλιπούς γνώσης σχετικά με τη ρύθμιση του βιοχημικού μονοπατιού τους.



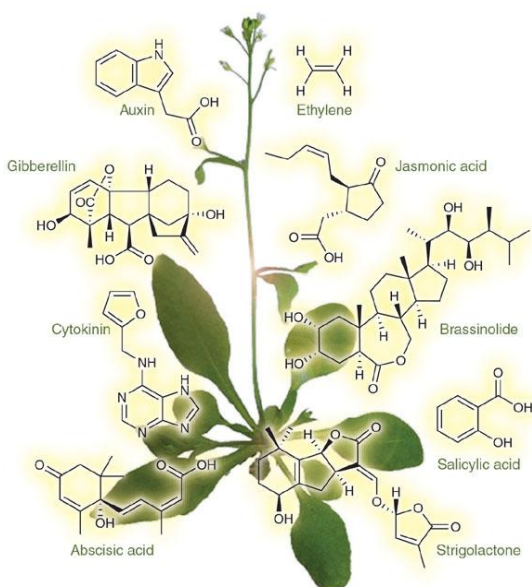
Εικόνα 1.10. Η ιστοκαλλιέργεια στην υπηρεσία της παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών (*Trends in plant science*, 2004)

1.5.3. Θρεπτικά υποστρώματα στην ιστοκαλλιέργεια

Κατά την ιστοκαλλιέργεια, τα διάφορα έκφυτα μετά την απολύμανση τους μεταφέρονται ή εμβαπτίζονται υπό ασηπτικές συνθήκες σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα. Η επιτυχία της ιστοκαλλιέργειας είναι άμεσα εξαρτώμενη από τον τύπο του θρεπτικού υποστρώματος που χρησιμοποιείται. Το υπόστρωμα περιέχει μικρο- και μακρο-στοιχεία, βιταμίνες, αμινοξέα, τα οποία είναι απαραίτητα για την ανόργανη θρέψη των φυτικών κυττάρων, διάφορες φυτορμόνες (αυξίνες, κυτοκίνες, γιββερελλίνες) ή ρυθμιστές αύξεσης, ώστε να επιτευχθεί η αποδιαφοροποίηση των κυττάρων και η επαγωγή της μορφογένεσης, καθώς και έναν στερεοποιητικό παράγοντα (άγαρ), με σκοπό την επίτευξη της συμπαγούς μορφής του υποστρώματος. Ακόμη, απαραίτητος κρίνεται και ο εμπλουτισμός του υποστρώματος με κάποια πηγή ενέργειας, όπως η σακχαρόζη, ώστε να αυξηθεί η περιορισμένη, λόγω του λιγοστού διαθέσιμου διοξειδίου του άνθρακα, φωτοσυνθετική ικανότητα, αλλά και με πηγή αζώτου. Δύο από τα πιο δημοφιλή και ευρέως χρησιμοποιούμενα θρεπτικά υποστρώματα είναι το MS medium (*Murashige and Skoog*) και το B5 (*Gamborg*). Η επιλογή του κατάλληλου θρεπτικού μέσου για κάθε τύπο έκφυτου δεν είναι εύκολο εγχείρημα, αφού η ανταπόκριση της κάθε καλλιέργειας εξαρτάται τόσο από το γενετικό υπόβαθρο, το είδος, το οντογενετικό και αναπτυξιακό στάδιο του εκφύτου, όσο και από εξωγενείς τεχνικούς παράγοντες, οι οποίοι ποικίλουν από εργαστήριο σε εργαστήριο. Επομένως, απαιτείται ποσοτική και ποιοτική προσαρμογή της σύστασης του υποστρώματος αναλόγως την απόκριση του εκάστοτε έκφυτου.

1.5.4. Ρόλος φυτορμονών & *in vitro* εφαρμογές

Για την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση κάθε κυττάρου απαιτείται η ύπαρξη του κατάλληλου σήματος και η μεταφορά του στο σημείο δράσης, ώστε να πραγματοποιηθεί η έκφραση των κατάλληλων γονιδίων. Τέτοια σήματα μπορεί να είναι είτε εξωγενή, όπως το φώς, η θερμοκρασία κ.ά., είτε ενδογενή, όπως οι ορμόνες.



Εικόνα 1.11. Χημική δομή φυτορμονών (Davies, 2004)

Για να χαρακτηριστεί ένα βιομόριο ως ορμόνη πρέπει να πληροί τις εξής προϋποθέσεις: να συντίθεται σε μικρές ποσότητες, σε ένα κύτταρο, ιστό, όργανο, να μεταφέρεται στα άλλα κύτταρα, ιστούς ή όργανα, όπου δρα, και να απαιτούνται μικρές συγκεντρώσεις για τη δράση της. Με βάση τη φυσιολογική δράση και τη χημική τους σύσταση, οι φυτορμόνες διακρίνονται σε πέντε βασικές κατηγορίες: στους αυξητικούς προωθητές, όπου υπάγονται οι τρεις πρώτες ομάδες (αυξίνες, γιββερελλίνες, κυτοκινίνες), στους αυξητικούς αναστολείς και στην πέμπτη ομάδα, όπου εντάσσεται το αιθυλένιο, η μοναδική ορμόνη σε αέρια κατάσταση.

Αναλυτικότερα, οι αυξίνες προάγουν την κυτταρική διαίρεση, αύξηση και διαφοροποίηση, συμμετέχοντας και στο μηχανισμό χαλάρωσης των κυτταρικών τοιχωμάτων για την επιμήκυνση των κυττάρων. Σε επίπεδο φυτού οι αυξίνες συμβάλλουν στη ριζοβολία, στον έλεγχο της επάκριας κυριαρχίας, μέσω της υποκατάστασης του ακραίου οφθαλμού, σε αντιδράσεις τροπισμού (φωτο/γεωτροπισμού), και στην αναστολή της γήρανσης. Στις *in vitro* καλλιέργειες επάγουν την καλλογένεση και την ριζογένεση. Όσον αφορά τις κυτοκινίνες συμμετέχουν και αυτές στην κυτταρική διαίρεση και αύξηση, σε συνέργεια με τις αυξίνες, στην αύξηση του ελάσματος των φύλλων, στην δημιουργία χλωροπλαστών, στην έκπτυξη και αύξηση των πλάγιων οφθαλμών, στη ρύθμιση του ανοίγματος των στοματίων, ενώ σε *in vitro* καλλιέργειες ή κάλλους επάγουν τη βλαστογένεση.

Οι πιο διαδεδομένες σε χρήση αυξίνες είναι οι ενδογενείς ινδολ-3-οξικό οξύ – IAA (με πρόδρομο μόριο την τρυπτοφάνη), και ινδολ-3-βουτυρικό οξύ – IBA, καθώς και οι συνθετικές 2,4 διχλωροφαινοξυ-οξικό οξύ και 1-ναφθαλινοξικό οξύ-NAA. Αντίστοιχα οι κυτοκινίνες, παράγωγα της αδενίνης στο N⁶, που χρησιμοποιούνται εκτενώς είναι οι ζεατίνη και οι συνθετικές βενζυλαδενίνη -BA και κινετίνη. Καθοριστικό παράγοντα στην εξέλιξη μιας καλλιέργειας διαδραματίζει ο λόγος των συγκεντρώσεων αυξίνης/κυτοκινίνης. Συγκεκριμένα, όταν ο λόγος αυξίνης/κυτοκινίνης είναι υψηλός επάγεται η δημιουργία κάλλου και ρίζας, ενώ όταν είναι χαμηλός επάγεται η βλαστογένεση.

1.5.5. Ιστοκαλλιέργεια & Το γένος *Salvia*

Στην ενότητα αυτή παρουσιάζονται επιγραμματικά ορισμένες εφαρμογές της ιστοκαλλιέργειας σε είδη του γένους *Salvia*.

Από τις πιο χαρακτηριστικές μελέτες είναι αυτή των *LIU W. et al (1999)*, όπου πραγματοποιήθηκε η λήψη αναγεννημένων φυτών *Salvia sclarea*, μέσω των διαδικασιών της καλλογένεσης και της οργανογένεσης. Ως έκφυτα χρησιμοποιήθηκαν κοτυληδόνες ζυγωτικών φυτικών εμβρύων. Η καλλογένεση επιτεύχθηκε με χρήση 2,4-D, η βλαστογένεση πραγματοποιήθηκε είτε μέσω κάλλου, είτε άμεσα από το έκφυτο, με την συνδυασμένη χρήση των IAA ή NAA, BA και γιβερελλινικού οξέος (GA₃), ενώ τέλος η ριζοβολία με την συνδυασμένη χρήση των IAA και BA. Έκτος από τον σχηματισμό κάλλου παρατηρήθηκε και η δημιουργία μιας σφαιρικής συμπαγούς, λείας δομής, παρόμοιας μορφολογικά με αρχικού σταδίου σωματικό έμβρυο. Ωστόσο ο ιστός αυτός δεν εμφάνισε εμβρυογενετικά χαρακτηριστικά, δηλαδή μετά από την μεταφορά του σε κατάλληλα θρεπτικά υποστρώματα δεν προέκυψαν ώριμα σωματικά έμβρυα. Αντίθετα εμφάνισε οργανογενετικές ιδιότητες («*organogenic tissue*») καθώς, η μεταφορά του σε υπόστρωμα βλαστογένεσης είχε ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό δομών όμοιων με οφθαλμούς («*shoot bud-like*»), από τους οποίους εν συνεχεία αναπτύχθηκαν βλαστοί. Ακολούθησε η επαγωγή ριζοβολίας και τελικά η λήψη πλήρως αναγεννημένων φυτών.

Ακόμη, με στόχο τη μελέτη του βαθμού επίδρασης του γενότυπου στην καλλογένεση και στον σχηματισμό του οργανογενετικού ιστού, τα έκφυτα που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονταν από τέσσερις σειρές. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το ποσοστό καλλογένεσης, η ταχύτητα σχηματισμού τόσο του κάλλου, όσο και του οργανογενετικού ιστού αλλά και ο ρυθμός οργανογένεσης διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των τεσσάρων σειρών. Επιπρόσθετα σημειώθηκε άμεση συσχέτιση του ρυθμού εμφάνισης του οργανογενετικού ιστού και των επιπέδων της χορηγούμενης αυξίνης, καθώς αύξηση της συγκέντρωσής της οδήγησε στη μείωση του ρυθμού, ενώ έδρασε επικουρικά στον σχηματισμό κάλλου. Έπειτα, σε μελέτη των *Kintzios et al. (1996, 1998)* όπου πραγματοποιήθηκε καλλογένεση και επαγωγή σωματικής εμβρυογένεσης από έκφυτα των φυτών *Salvia officinalis* και *Salvia fruticosa* καταδεικνύεται η διαφοροποίηση στην απόκριση μεταξύ των δύο ειδών. Αρχικά παρατηρήθηκε ότι μόνο έκφυτα από νεαρά φυτά ανταποκρίθηκαν στους χειρισμούς, ενώ η βέλτιστη επίδραση σημειώθηκε σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού. Παράλληλα για τις ίδιες συνθήκες καλλιέργειας και τους ίδιους χειρισμούς, η καλλογένεση ακολούθησε ταχύτερο ρυθμό στο φυτό *S.fruticosa*, και μάλιστα μόνο σε αυτό το ποσοστό καλλογένεσης έφτασε στο 95–100%. Ακόμη, στο φυτό *S. officinalis* ο σχηματισμός κάλλου επιτεύχθηκε αποκλειστικά και μόνο κατά την εφαρμογή ίσης συγκέντρωσης αυξίνης κυτοκινίνης, είτε στην μέγιστη (18μM), είτε στην ελάχιστη τιμή (1.8 μM). Ίδια εικόνα παρατηρήθηκε και κατά την διαδικασία της σωματικής εμβρυογένεσης.

Ακόμη, ιδιαίτερα σημαντική κρίνεται η επίτευξη της ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού πρωτοκόλλου για τον *in vitro* μικροπολλαπλασιασμό, με στόχο την λήψη φυτών «κλουσιότερων» σε αιθέριο έλαιο, σε σύγκριση με τα παραγόμενα με τις κλασσικές μεθόδους. Σε σχετική μελέτη στο φυτό *Salvia fruticosa* χρησιμοποιήθηκαν ως έκφυτα κορυφαίοι βλαστοί και γόνατα από *in vitro* ανεπτυγμένα φυτά, τα οποία μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα MS. Για την επίτευξη της βλαστογένεσης

στο θρεπτικό υπόστρωμα προστέθηκε η ορμόνη BA (0.75μM), ενώ για την ριζοβολία η ορμόνη IBA (2.7μM). Στη εργασία αυτή εκτελέστηκε συγκριτική μελέτη διαφόρων θρεπτικών υποστρωμάτων και ποικίλων ορμονών, σε διαφόρους συνδιασμούς, για να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι οι παραπάνω ήταν και οι καταλληλότεροι. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της αέριας χρωματογραφίας, τα ποσοστά των βασικότερων τερπενίων του αιθέριου ελαίου (1,8 κινεόλη, καμφορά, βορνεόλη, β-πιπένιο) στα *in vitro* φυτά εντοπίστηκαν σημαντικά υψηλότερα (Naser A. et al., 2003).

Παράλληλα, στην εργασία των *Banthorpe et al. (1990)* πραγματοποιήθηκε καλλογένεση και εγκαθίδρυση κυτταροκαλλιέργειας από έκφυτα βλαστού *Salvia sclarea*, με στόχο την μελέτη της *in vitro* συσσώρευσης της σκλαρεόλης. Η συσσώρευση της σκλαρεόλης στις κυτταροκαλλιέργειες, ύστερα από κατάλληλους χειρισμούς επιτεύχθηκε με ρυθμούς 0.2 - 6% (μg/g per day) των ρυθμών των πατρικών φυτών, με τη μέγιστη τιμή να καταγράφεται με την έναρξη της εκθετικής φάσης ανάπτυξης. Μάλιστα προσθήκη της ορμόνης 2,4-D οδήγησε τόσο στον ταχύτερο σχηματισμό κάλλου, όσο και σε μεγαλύτερες αποδόσεις του διτερπενίου, σε σύγκριση με την NAA. Στη μελέτη αυτή καταγράφεται μεν η σαφής δράση *in callo* των ενζύμων που ευθύνονται για την σύνθεση της σκλαρεόλης, ωστόσο το μειωμένο ποσοστό σε σχέση με τα πατρικά φυτά αποδίδεται στο γεγονός ότι η σύνθεση του μορίου ενδεχομένως να επιτελείται σε συγκεκριμένα φυτικά τμήματα. Πολυάριθμες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί και με στόχο την παραγωγή μετασχηματισμένων φυτών μέσω του *Agrobacterium tumefaciens*.

Αξιοσημείωτη είναι η καθιέρωση του πρώτου ολοκληρωμένου πρωτόκολλου μετασχηματισμού σε έκφυτα φύλλου *Salvia miltiorrhiza*, όπου αρχικά πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια σε υπόστρωμα εμπλουτισμένο με BAP και NAA, επιλογή μέσω καναμυκίνης και κεφοταξίμης και τέλος επιβεβαίωση του μετασχηματισμού μέσω PCR, ανάλυσης κατά Southern και ιστοχημικών δοκιμασιών GUS (*Ya-ping Yan et al., 2007*). Τέλος, τα τελευταία χρόνια εντείνεται όλο και περισσότερο το ενδιαφέρον για την *in vitro* παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών από φυτά του γένους *Salvia*, μέσω μετασχηματισμού με τη χρήση στελεχών του *Agrobacterium rhizogenes* («*hairy root cultures*»). Σε καλλιέργειες φυτών *S.sclarea* σε βιοαντιδραστήρες πραγματοποιήθηκε παραγωγή σημαντικά υψηλών ποσοτήτων διτερπενίων και τριτερπενίων αλλά και η περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσής τους, με χρήση παραγώγων του γιασμονικού οξέος (*Lukasz Kuz'ma et al., 2005, 2009*), ενώ σχετικά πρόσφατα σημειώθηκε και η πρώτη επιτυχής απόπειρα παραγωγής τριτερπενίων από ριζογεννή κάλλο (*Ya-ping Yan et al., 2007*).

1.6. ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας πειραματικής εργασίας είναι η συγκριτική μελέτη των επιπέδων έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται σε μονοπάτια του δευτερογενούς μεταβολισμού (βιοσύνθεση μονοτερπενίων, διτερπενίων, φλαβονοειδών) σε τέσσερεις διαφορετικούς ιστούς του φυτού *Salvia sclarea*: στο φύλλο, στα τριχώματα, στο φύλλο απουσία τριχωμάτων και σε κάλλο, μέσω των διαδικασιών της απομόνωσης ολικού RNA και της «*semiquantitative*» (ηπιποσοτικής) RT-PCR. Παράλληλα, με την χρήση κατάλληλων τεχνικών ιστοκαλλιέργειας, στόχος είναι η δημιουργία κάλλου και τελικά η λήψη αναγεννημένων φυτών.

2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Το υλικό που χρησιμοποιήθηκε προήλθε από φυτά του είδους *Salvia sclarea*, τα οποία στάλθηκαν από την ελληνική εταιρεία ΒΙΤΡΟ ΕΛΛΑΣ Α.Ε. και εν συνεχεία φυλάσσονταν σε θάλαμο ανάπτυξης σταθερών συνθηκών (θερμοκρασία 22⁰C και φωτοπερίοδο 16 ώρες φως/8 ώρες σκοτάδι) του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας. Η λειοτρίβιση των νεαρών φύλλων εκτελέστηκε με χρήση υγρού άζωτου και το συλλεγόμενο δείγμα RNA είναι προϊόν νέας κάθε φοράς απομόνωσης. Η απομόνωση του τριχωμάτος από τα νεαρά φύλλα πραγματοποιήθηκε με χρήση υγρού άζωτου και πινέλου ζωγραφικής, με ιδιαίτερη προσοχή προς αποφυγή λήψης και άλλων επιδερμικών κυττάρων. Για την πιστοποίηση της καθαρότητάς του, το δείγμα εξετάστηκε και με χρήση στερεοσκοπίου, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν προσμίξεις. Το υλικό του τριχωμάτος ήταν κάθε φορά αποτέλεσμα νέας λήψης και εκ νέου εκχύλισης RNA, ώστε το χρησιμοποιούμενο δείγμα να είναι πάντα φρέσκο.

2.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ & ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

2.2.1. Πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού RNA-*phenol/chloroform extraction*

1. Λειοτρίβιση ιστού σε υγρό άζωτο και μεταφορά σε eppendorf tube
2. Προσθήκη 500μl διαλύματος απομόνωσης στο eppendorf tube για κάθε 0,5g ιστού
3. Προσθήκη 500μl φαινόλης
4. Ισχυρή ανάδευση (vortex 1 λεπτό)
5. Φυγοκέντρηση στις 13.000 στρ/λεπτό για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
6. Μεταφορά υπερκειμένου σε καθαρό eppendorf tube
7. Προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης
8. Ισχυρή ανάδευση (vortex 1 λεπτό)
9. Φυγοκέντρηση στις 13.000 στρ/λεπτό για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
10. Μεταφορά υπερκειμένου σε καθαρό eppendorf tube
11. Προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος 1:1 (φαινόλης)/(SEVAG:(24:1) χλωροφόρμιου:ισοαμυλικής αλκοόλης)
12. Ισχυρή ανάδευση με το χέρι
13. Φυγοκέντρηση στις 13.000 στρ/λεπτό για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
14. Μεταφορά υπερκειμένου σε καθαρό eppendorf tube
15. Επανάληψη βημάτων 11-14
16. Προσθήκη ίσου όγκου SEVAG
17. Ισχυρή ανάδευση με το χέρι
18. Φυγοκέντρηση στις 13000 στρ/λεπτό για 3,5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου

19. Μεταφορά υπερκειμένου σε καθαρό eppendorf tube
20. Επανάληψη βημάτων 16-19
21. Προσθήκη 2.5 όγκων (παγωμένης) 100% αιθανόλης και 1/10 του όγκου CH₃COONa 3M (pH 4.8)
22. Ήπια ανάδευση με το χέρι 20-30 φορές
23. Φύλαξη δείγματος στους -20°C για 16-18 ώρες (overnight)
24. Φυγοκέντρηση στις 13.000 στρ/λεπτό στους 4°C για 30 λεπτά
25. Απόρριψη υπερκειμένου και στέγνωμα του ιζήματος
26. Επαναιώρηση του ιζήματος σε αποστειρωμένο ddH₂O
27. Φύλαξη δείγματος στους -80°C

2.2.2. Πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού RNA-CTAB extraction S(short)

Το εν λόγω πρωτόκολλο αποτελεί τροποποίηση του πρωτοκόλλου από την αναφορά των Banilas et al. , 2011.

1. Λειοτριβίση ιστού σε υγρό άζωτο και μεταφορά σε eppendorf tube
2. Προθέρμανση του ρυθμιστικού διαλύματος EB (RNA extraction buffer) σε υδατόλουτρο στους 65°C
3. Προσθήκη 500μl (EB) για κάθε 0,5g ιστού στο eppendorf tube
4. Έντονη ανάδευση και επώαση στους 65°C για 5 λεπτά
5. Προσθήκη ίσου όγκου (500μl) SEVAG (24:1) χλωροφόρμιου:ισοαμυλικής αλκοόλης)
6. Ισχυρή ανάδευση με το χέρι
7. Φυγοκέντρηση στις 13000 στρ/λεπτό για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
8. Μεταφορά υπερκειμένου σε καθαρό eppendorf tube
9. Προσθήκη ίσου όγκου SEVAG
10. Ισχυρή ανάδευση με το χέρι
11. Φυγοκέντρηση στις 13000 στρ/λεπτό για 3,5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
12. Μεταφορά υπερκειμένου σε καθαρό eppendorf tube
13. Προσθήκη ίσου όγκου SEVAG
14. Ισχυρή ανάδευση με το χέρι
15. Φυγοκέντρηση στις 13000 στρ/λεπτό για 3,5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
16. Μεταφορά υπερκειμένου σε καθαρό eppendorf tube
17. Προσθήκη ½ του όγκου 5M NaCl
18. Προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης
19. Ήπια ανάδευση με το χέρι 15-20 φορές
20. Επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
21. Φυγοκέντρηση στις 13000 στρ/λεπτό για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
22. Απόρριψη υπερκειμένου
23. Ξέπλυμα του ιζήματος με 75% αιθανόλη (παγωμένη)
24. Φυγοκέντρηση στις 13000 στρ/λεπτό για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
25. Απόρριψη αιθανόλης και στέγνωμα του ιζήματος
26. Επαναιώρηση του ιζήματος σε αποστειρωμένο ddH₂O
27. Φύλαξη δείγματος στους -80°C

2.2.3. Πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού RNA-CTAB extraction L(long)

1. Λειοτριβίση ιστού σε υγρό άζωτο και μεταφορά σε eppendorf tube
2. Προθέρμανση του ρυθμιστικού διαλύματος EB (RNA extraction buffer) σε υδατόλουτρο στους 65°C
3. Προσθήκη 500μl (EB) για κάθε 0,5g ιστού στο eppendorf tube
4. Έντονη ανάδευση και επώαση στους 65°C για 5 λεπτά
5. Προσθήκη ίσου όγκου (500μl) SEVAG (24:1) χλωροφόρμιου:ισοαμυλικής αλκοόλης)
6. Έντονη ανάδευση με το χέρι
7. Φυγοκέντρηση στις 13000 στρ/λεπτό για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
8. Μεταφορά υπερκειμένου σε καθαρό eppendorf tube
9. Προσθήκη 1/5 του όγκου διαλύματος 5% CTAB
10. Προσθήκη ίσου όγκου SEVAG
11. Ισχυρή ανάδευση με το χέρι
12. Φυγοκέντρηση στις 13000 στρ/λεπτό για 4 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
13. Μεταφορά υπερκειμένου σε καθαρό eppendorf tube
14. Προσθήκη 1,3 όγκων CTAB Precipitation buffer (1% w/v)
15. Ήπια ανάδευση με το χέρι
16. Φυγοκέντρηση στις 13000 στρ/λεπτό για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
17. Απόρριψη υπερκειμένου
18. Επαναιώρηση του ιζήματος σε 100μl CTAB Resuspension buffer
19. Προσθήκη 2 όγκων (παγωμένης) 100% αιθανόλης
20. Ήπια ανάδευση
21. Επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
22. Φυγοκέντρηση στις 13000 στρ/λεπτό για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
23. Απόρριψη υπερκειμένου και στέγνωμα του ιζήματος
24. Επαναιώρηση του ιζήματος σε 400μl αποστειρωμένο ddH₂O
25. Προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης και έντονη ανάδευση (vortex 1 λεπτό)
26. Φυγοκέντρηση στις 13.000 στρ/λεπτό για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
27. Μεταφορά υπερκειμένου σε καθαρό eppendorf tube
28. Προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος 1:1 (φαινόλης)/(SEVAG)
29. Ισχυρή ανάδευση με το χέρι
30. Φυγοκέντρηση στις 13.000 στρ/λεπτό για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
31. Μεταφορά υπερκειμένου σε καθαρό eppendorf tube
32. Προσθήκη ίσου όγκου SEVAG
33. Ισχυρή ανάδευση με το χέρι
34. Φυγοκέντρηση στις 13000 στρ/λεπτό για 3,5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
35. Μεταφορά υπερκειμένου σε καθαρό eppendorf tube
36. Προσθήκη 2,5 όγκων (παγωμένης) 100% αιθανόλης και 1/10 του όγκου CH₃COONa 3M (pH 4.8)
37. Ήπια ανάδευση με το χέρι 20-30 φορές
38. Φύλαξη δείγματος στους -20°C για 16-18 ώρες (overnight)
39. Φυγοκέντρηση στις 13.000 στρ/λεπτό στους 4°C για 30 λεπτά
40. Απόρριψη υπερκειμένου και στέγνωμα του ιζήματος
41. Επαναιώρηση του ιζήματος σε αποστειρωμένο ddH₂O
42. Φύλαξη δείγματος στους -80°C

2.3. ΑΝΑΛΥΣΗ & ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

2.3.1. Ανάλυση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτή (gel) αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι η ηλεκτροχημική μέθοδος διαχωρισμού ηλεκτρικά φορτισμένων μορίων από ένα μίγμα. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην ικανότητα μετακίνησης των μορίων αυτών διαμέσου ενός πορώδους υλικού (π.χ. πηκτή αγαρόζης), με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου. Η οπτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων επιτυγχάνεται με την χρήση του βρωμιούχου αιθιδίου, χάρη στην ιδιότητα φθορισμού της χρωστικής αυτής, παρουσία υπεριώδους φωτός, καθώς παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων.

- ✓ Τοποθέτηση της κατάλληλης ποσότητας αγαρόζης (ανάλογα με την επιθυμητή % σύσταση του gel), σε αντίστοιχο όγκο νερού (w/v)
- ✓ Σύντομη θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι την πλήρη διάλυση της αγαρόζης
- ✓ Προσθήκη ποσότητας πυκνού TAE τελικής συγκέντρωσης 1x
- ✓ Ήπια ανάδευση
- ✓ Προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου τελικής συγκέντρωσης 0.5μg/ml
- ✓ Τοποθέτηση σε κατάλληλο καλούπι της συσκευής ηλεκτροφόρησης (προηγείται η προσάρτηση της ανάλογης χτένας για τον σχηματισμό θέσεων προσθήκης διαλύματος νουκλεϊκών οξέων)
- ✓ Στερεοποίηση σε θερμοκρασία δωματίου
- ✓ Προσεκτική αφαίρεση της χτένας, τοποθέτηση του καλουπιού στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και πλήρωση της συσκευής με ρυθμιστικό διάλυμα 1X TAE
- ✓ Προσθήκη κατάλληλης χρωστικής (loading dye) στα προς ανάλυση δείγματα και τοποθέτηση της επιθυμητής, από αυτά, ποσότητας στις ειδικές θέσεις του gel αγαρόζης
- ✓ Εφαρμογή συνεχούς τάσης 50-120V
- ✓ Παρατήρηση του gel αγαρόζης παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας

Σύσταση πηκτής αγαρόζης 1%	
αγαρόζη	1g
πυκνό TAE	2ml
βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr)	5μl
H ₂ O	98 ml
Τελικός όγκος	100 ml

Πίνακας 2.1. Σύσταση πηκτής αγαρόζης

Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης	
πυκνό TAE	20ml
βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr)	50μl
H ₂ O	980 ml
Τελικός όγκος	1000 ml

Πίνακας 2.2. Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης

2.3.2. Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης νουκλεϊνικών οξέων

Αξιόπιστη και σχετικά απλή μέθοδο προσδιορισμού της συγκέντρωσης των νουκλεϊνικών οξέων, ενός δείγματος αποτελεί η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (Optical Density, O.D.). Τα νουκλεϊνικά οξέα, εξαιτίας των αζωτούχων βάσεων εμφανίζουν την μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 260nm. Αντίθετα, σε μήκος κύματος 280nm μέγιστη απορρόφηση επιδεικνύουν οι πρωτεΐνες, ενώ σε μήκος κύματος 240nm τα φαιολικά παράγωγα. Για την εκτίμηση της καθαρότητας του δείγματος, ως προς τις προσμίξεις από πρωτεΐνες και φαιολικά χρησιμοποιούνται οι λόγοι O.D.₂₆₀/O.D.₂₈₀ και O.D.₂₆₀/O.D.₂₄₀ αντίστοιχα. Ιδανικοί λόγοι θεωρούνται οι τιμές 1,8 για το DNA και 2 για το RNA. Για την διεξαγωγή των μετρήσεων χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο U-1100 της *Hitachi*.

Η συγκέντρωση των νουκλεϊνικών οξέων υπολογίζεται με βάση τον τύπο των Beer-Lambert:

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

Όπου:

- ως α ορίζεται η συγκέντρωση των νουκλεϊνικών οξέων, η οποία προκύπτει όταν $O.D._{260} = 1$. Για καθαρό δείγμα DNA, $\alpha = 50\mu\text{g/ml}$ και για καθαρό δείγμα RNA, $\alpha = 40\mu\text{g/ml}$.
- ως D.F. ορίζεται ο συντελεστής αραίωσης και ισοδυναμεί με την αραίωση του δείγματος που εφαρμόστηκε για τη λήψη των μετρήσεων.

2.4. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

2.4.1. Αντίδραση με DNase

Καθοριστικής σημασίας βήμα, το οποίο έπεται της απομόνωσης ολικού RNA ενός δείγματος είναι η καταστροφή του περιεχόμενου DNA, με στόχο την αποφυγή εσφαλμένης χρήσης του, ως μήτρα στις ακόλουθες αντιδράσεις PCR. Η διαδικασία αυτή επιτελείται με χρήση του ενζύμου *RQ1 RNase-Free DNase* (1u/μl).

Στον ακόλουθο πίνακα παρατίθενται τα συστατικά και οι απαιτούμενες ποσότητες όλων των αντιδράσεων που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Τα δείγματα εν συνεχεία χρησιμοποιήθηκαν σε αντιδράσεις (RT-PCR), με τους εκκινητές oligo dT, REV-sp1, REV-sp2 και REV-spTotal αντίστοιχα, οι οποίοι περιγράφονται στο παράρτημα 3, στο τέλος του κεφαλαίου.

Ιστός	ΦΥΛΛΟ (oligo dT, REV-sp1, REV-sp2)			ΚΑΛΛΟΣ (oligo dT)	ΤΡΙΧΑ (REV-spTotal)	ΦΥΛΛΟ (REV-spTotal)
<i>Συστατικά</i>	<i>Όγκος</i>					
Νουκλεϊνικά οξέα	14 μl (7,5μg)	18 μl (7,9μg)	17 μl (7,5μg)	9 μl (7,5μg)	13 μl (5μg)	13 μl (5μg)
Ρυθμιστικό Διάλυμα (RQ1 buffer 10x)	7 μl	7 μl	7 μl	7 μl	7 μl	7 μl
Ένζυμο RQ1 DNase	5 μl (1u/μl)	5 μl (1u/μl)	5 μl (1u/μl)	5 μl (1u/μl)	2,5 μl (2u/μl)	2,5 μl (2u/μl)
Ένζυμο αναστολέας RNase Out	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl
ddH ₂ O	43 μl	39 μl	40 μl	48 μl	46,5 μl	46,5 μl
Τελικός όγκος αντίδρασης	70 μl	70 μl	70 μl	70 μl	70 μl	70 μl

Πίνακας 2.3. Συστατικά αντίδρασης με DNAse

- ✓ Η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 37°C για 1 ώρα σε αποστειρωμένο eppendorf tube.
- ✓ Λίγο πριν την ολοκλήρωση της αντίδρασης (στα 55 λεπτά περίπου) προστίθενται 2 μl ενζύμου RQ1 DNase και η αντίδραση συνεχίζεται στις ίδιες συνθήκες για 20 λεπτά ακόμη.
- ✓ Μετά το πέρας της αντίδρασης, ο όγκος του δείγματος αυξάνεται στα 400μl με την προσθήκη αποστειρωμένου ddH₂O.
- ✓ Πραγματοποιείται καθαρισμός με φαινόλη/sevag, κατακρήμνιση του ολικού RNA, ελεύθερου πλέον από DNA, με αιθανόλη και CH₃COONa 3M, και επαναιώρηση του ιζήματος, όπως περιγράφεται στην ενότητα «phenol/chloroform extraction».
- ✓ Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση του δείγματος σε gel αгарόζης, προς επιβεβαίωση της καταστροφής του DNA και της διατήρησης της ακεραιότητας του RNA, καθώς και εκ νέου φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της τελικής συγκέντρωσης του RNA.
- ✓ Φύλαξη δείγματος στους -80°C

2.4.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφάση (RT-PCR)

Για τον προσδιορισμό, καθώς και την συγκριτική μελέτη των επιπέδων έκφρασης των επιθυμητών γονιδίων εφαρμόστηκε η τεχνική της RT-PCR (reverse transcription-PCR). Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην ικανότητα του ενζύμου αντιστροφή μεταγραφάση να συνθέσει cDNA μόρια, με μήτρα mRNA. Η διαδικασία ολοκληρώνεται σε δύο στάδια, με χρήση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση *Superscript II* (200u/μl). Ως μήτρα χρησιμοποιούνται 1,5μg ολικού RNA- DNA free, το οποίο προέκυψε από την προαναφερθείσα αντίδραση με DNase. Για την σύνθεση της πρώτης αλυσίδας χρησιμοποιούνται ανά περίπτωση, είτε ο *oligo dT* εκκινητής, είτε οι εξειδικευμένοι εκκινητές *REV-sp1*, *REV-sp2* και *REV-spTotal*, οι οποίοι περιγράφονται στο παράρτημα 3, στο τέλος του κεφαλαίου.

Διαδικασία πρώτου σταδίου

- ✓ Τοποθέτηση των παρακάτω συστατικών σε αποστειρωμένο eppendorf tube

Ιστός	ΦΥΛΛΟ			ΚΑΛΛΟΣ	ΤΡΙΧΑ	ΦΥΛΛΟ
Συστατικά	Όγκος					
Ολικό RNA-DNA free	11 μl	11 μl	11 μl	5 μl	10,5 μl	10,5 μl
Εκκινητές για αναστροφή μεταγραφάση	<i>oligo dT</i> (25μM) 4 μl	<i>REV-sp1</i> (12,5μM) 6 μl	<i>REV-sp2</i> (12,5μM) 6 μl	<i>oligo dT</i> (25μM) 4 μl	<i>REV-spTotal</i> (100μM) 8 μl	<i>REV-spTotal</i> (100μM) 8 μl
dNTPs (10mM)	1,5 μl	1,5 μl	1,5 μl	1,5 μl	1,6 μl	1,6 μl
ddH ₂ O	2 μl	-	-	8 μl	-	-
Όγκος πρώτου σταδίου	18,5 μl	18,5 μl	18,5 μl	18,5 μl	20,1 μl	20,1 μl

Πίνακας 2.4. Συστατικά 1^ο σταδίου RT-PCR

- ✓ Ήπια ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 13.000 στρ/λεπτό για 30 δευτερόλεπτα
- ✓ Επώαση στους 65°C για 5 λεπτά
- ✓ Μεταφορά του eppendorf tube σε πάγο για 2 λεπτά
- ✓ Φυγοκέντρηση στις 13.000 στρ/λεπτό για 30 sec
- ✓ Μεταφορά του eppendorf tube σε πάγο

Διαδικασία δεύτερου σταδίου

- ✓ Τοποθέτηση των παρακάτω συστατικών στο ίδιο eppendorf tube, κατά αντιστοιχία δειγμάτων

Ιστός	ΦΥΛΛΟ			ΚΑΛΛΟΣ	ΤΡΙΧΑ	ΦΥΛΛΟ
Συστατικά	Όγκος					
5x ρυθμιστικό διάλυμα (first strand buffer)	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl	6,4 µl	6,4 µl
DTT (100mM)	3 µl	3 µl	3 µl	3 µl	3,2 µl	3,2 µl
Αντίστροφη Μεταγραφάση Superscript II (200u/µl)	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl
Ένζυμο αναστολέας RNase Out (40u/µl)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Όγκος δεύτερου σταδίου	11,5 µl	11,5 µl	11,5 µl	11,5 µl	12,1 µl	12,1 µl
Τελικός όγκος αντίδρασης	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	32,2 µl	32,2 µl

Πίνακας 2.5. Συστατικά 2^ο σταδίου RT-PCR

- ✓ Ήπια ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 13.000 στρ/λεπτό 30 δευτερόλεπτα
- ✓ Επώαση στο 42°C για 1 ώρα
- ✓ Επώαση στους 70°C για 15 λεπτά
- ✓ Μεταφορά του eppendorf tube σε πάγο για τον τερματισμό της αντίδρασης
- ✓ Αραίωση του δείγματος στο 1/5
- ✓ Αποθήκευση δείγματος στους -20° C

2.4.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (*Polymerase Chain Reaction*) αποτελεί μια υψηλής ευαισθησίας, in-vitro ενζυμική μέθοδο εκθετικού πολλαπλασιασμού DNA αλληλουχιών. Η αντίδραση διεξάγεται με τη βοήθεια του ενζύμου *Taq DNA Polymerase*, το οποίο προέρχεται από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και διαθέτει την ικανότητα να διατηρεί την ενεργότητά του ακόμη και σε θερμοκρασία 95° C. Ακόμη στην αντίδραση απαιτείται ζευγάρι ειδικά σχεδιασμένων ολιγονουκλεοτιδίων-εκκινητών (*primers*), συμπληρωματικών στις αλληλουχίες των άκρων του προς ενίσχυση τμήματος DNA. Η διαδικασία πραγματοποιείται σε κατάλληλη συσκευή-θερμικό κυκλοποιητή.

PCR με μήτρα cDNA

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιείται το ένζυμο *DreamTaq DNA Polymerase* (5 u/µl), για την ενίσχυση των τμημάτων των επιθυμητών γονιδίων, ενώ ως μήτρα προστίθενται κάθε φορά 20 ng cDNA. Στις δοκιμές χρησιμοποιήθηκε cDNA από τις πέντε RT-PCR αντιδράσεις (με τους εκκινητές oligo dT, REV-sp1, REV-sp2, REV-spTotal).

Διαδικασία

Όλες^[1] οι αντιδράσεις εκτελούνται με βάση το παρακάτω πρωτόκολλο:

- ✓ Τοποθέτηση των παρακάτω συστατικών σε αποστειρωμένο eppendorf tube

Συστατικά	Όγκος
cDNA	2 μl
Ρυθμιστικό Διάλυμα (10X DreamTaq Buffer)	5 μl
dNTPs (2mM)	5 μl
Ευθύς εκκινητής (5μM)	5 μl
Ανάστροφος εκκινητής (5μM)	5 μl
DreamTaq DNA Polymerase (5 u/μl)	(1u) 0,2 μl
ddH ₂ O	27,8 μl
Τελικός όγκος αντίδρασης	50 μl

Πίνακας 2.6. Συστατικά της PCR με μήτρα cDNA

- ✓ Ήπια ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 13.000 στρ/λεπτό 30 δευτερόλεπτα
- ✓ Πραγματοποίηση της PCR

Οι συνθήκες και τα στάδια της PCR είναι τα εξής:

Στάδιο	Συνθήκες
1	Αποδιάταξη της μήτρας στους 94 ⁰ C για 2 λεπτά
2	Αποδιάταξη στους 94 ⁰ C για 0,30 λεπτά
3	Υβριδισμός εκκινητών σε κατάλληλο Tm ^[2] για 0,30 λεπτά
4	Επιμήκυνση στους 72 ⁰ C από 0,45 -1 ^[3] λεπτά
5	Τελική επιμήκυνση στους 72 ⁰ C για 7 λεπτά
6	Διατήρηση στους 12 ⁰ C για 0,50 λεπτά
Αριθμός κύκλων ^[4]	30-45

Πίνακας 2.7. Στάδια & συνθήκες της PCR

- ✓ Μεταφορά του eppendorf tube σε πάγο
- ✓ Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση του δείγματος σε gel αγαρόζης
- ✓ Αποθήκευση δείγματος στους -20^o C

Παρατηρήσεις

^[1] Οι αντιδράσεις διαφοροποιούνται ως προς τους εκκινητές (οι οποίοι περιγράφονται στο *παράρτημα 2* στο τέλος του κεφαλαίου), τις συνθήκες των σταδίων 3 & 4 και τον αριθμό των κύκλων, καθώς διαμορφώνονται από τις ανάγκες ενίσχυσης του εκάστοτε γονιδίου. Στην περίπτωση όπου ο αριθμός των δειγμάτων είναι μεγαλύτερος παρασκευάζεται κεντρικό μείγμα (master mix) με όλα τα κοινά συστατικά.

[2] Η θερμοκρασία υβριδισμού καθορίζεται από τη θερμοκρασία τήξης (T_m) των εκκινητών, όπως υπολογίζεται βάση του τύπου:

$$T_m = 69,3 + 0,42 \cdot (G-C\%) - 650 / \text{αριθμό βάσεων (μήκος) εκκινητή}$$

[3] Η χρονική διάρκεια του σταδίου επιμήκυνσης σχετίζεται με το μέγεθος του ενισχυόμενου τμήματος DNA, βάση των προδιαγραφών της *DreamTaq DNA Polymerase* (1 λεπτό για προϊόντα μεγέθους ως & 2kb).

[4] Ένας πλήρης κύκλος απαρτίζεται από τα στάδια 2-4. Ο αριθμός των κύκλων κάθε αντίδρασης διαμορφώνεται με βάση τις ανάγκες ενίσχυσης του εκάστοτε γονιδίου.

PCR REAMPLIFICATION & PCR με μήτρα γονιδιωματικό DNA

Παράλληλα εκτελέστηκαν δοκιμές PCR reamplification, με μήτρα προϊόντα αρχικών PCR, σε κατάλληλες αραιώσεις. Ακόμη, στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα και γονιδιωματικό DNA φύλλου *Salvia sclarea*, το οποίο απομονώθηκε με όμοιο τρόπο, με βάση το πρωτόκολλο *CTAB extraction L(long)*. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με το προαναφερθέν πρωτόκολλο (πίνακες 2.6 & 2.7) και με τα ίδια ζευγάρια εκκινητών για το εκάστοτε γονίδιο.

Γονίδιο - Μάρτυρας σταθερής έκφρασης

Για τον έλεγχο της ποιότητας του ολικού RNA που απομονώθηκε, ως προς την αποτελεσματικότητα της σύνθεσης του cDNA πραγματοποιείται αντίδραση PCR με κατάλληλους εκκινητές για το γονίδιο (μάρτυρα σταθερής έκφρασης) της ακτίνης. Οι εκκινητές είναι οι *ACTIN 3-REV* και *ACTIN 2-FOR* (παρατίθενται στο παράρτημα 1, στο τέλος του κεφαλαίου), ενώ το μέγεθος του αναμενόμενου προϊόντος είναι 637bp. Πραγματοποιείται έλεγχος των cDNA και των έξι RT-PCR αντιδράσεων (με τους εκκινητές *oligo dT,REV-sp1, REV-sp2, REV-spTotal*). Όλες οι αντιδράσεις εκτελούνται στις ίδιες συνθήκες, με τα αντιδραστήρια και σε σταθερές ποσότητες. Ως μήτρα χρησιμοποιούνται 20 ng cDNA.

Διαδικασία

- ✓ Τοποθέτηση των παρακάτω συστατικών σε αποστειρωμένο eppendorf tube

ΦΥΛΛΟ	
Συστατικά	Όγκος
cDNA	2 μl
Ρυθμιστικό Διάλυμα (10X DreamTaq Buffer)	5 μl
dNTPs (2mM)	5 μl
ACTIN 2-FOR (4μM)	5 μl
ACTIN 3-REV (4μM)	5 μl
DreamTaq DNA Polymerase (5 u/μl)	(1u) 0,2 μl
ddH ₂ O	27,8 μl
Τελικός όγκος αντίδρασης	50 μl

Πίνακας 2.8. Συστατικά της PCR για το γονίδιο της ακτίνης

- ✓ Ήπια ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 13.000 στρ/λεπτό 30 δευτερόλεπτα
- ✓ Πραγματοποίηση της PCR

Οι συνθήκες και τα στάδια της PCR είναι τα εξής:

Στάδιο	Συνθήκες
1	Αποδιάταξη της μήτρας στους 94 ⁰ C για 2 λεπτά
2	Αποδιάταξη στους 94 ⁰ C για 0,30 λεπτά
3	Υβριδισμός εκκινητών σε Tm= 57⁰C για 0,30 λεπτά
4	Επιμήκυνση στους 72 ⁰ C για 1 λεπτό
5	Τελική επιμήκυνση στους 72 ⁰ C για 7 λεπτά
6	Διατήρηση στους 12 ⁰ C για 0,50 λεπτά
Αριθμός κύκλων	30

Πίνακας 2.9. Στάδια & συνθήκες της PCR για το γονίδιο της ακτίνης

- ✓ Μεταφορά του eppendorf tube σε πάγο
- ✓ Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση του δείγματος σε gel αγαρόζης
- ✓ Αποθήκευση δείγματος στους -20⁰ C

2.4.4. Σχεδιασμός εκκινητών επιθυμητών γονιδίων

Όπως προαναφέρθηκε στόχος της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη των επιπέδων έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων, τα οποία εμπλέκονται σε μονοπάτια του δευτερογενούς μεταβολισμού, στο φυτό *Salvia sclarea*. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκαν αλληλουχίες γονιδίων του φυτού *Salvia sclarea*^[1] (Caniard A. et al., 2012), αλλά και αλληλουχίες γνωστών γονιδίων του συγγενικού είδους *Salvia fruticosa*^[2] (Fani M. Chatzopoulou et al., 2010) και του φυτού *Valeriana officinalis*^[3] (Pyle B.W. et al., 2012). Ακολούθησε ευθυγράμμιση των αλληλουχιών και σχεδιασμός των εκκινητών σε συντηρημένες περιοχές. Στο ακόλουθο πίνακα παρατίθενται τα εν λόγω γονίδια, καθώς και το βιοσυνθετικό μονοπάτι στο οποίο απαντώνται.

<i>ΟΝΟΜΑ ΓΟΝΙΔΙΟΥ</i>	<i>ACCESSION NUMBER</i>	<i>ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΕΝΖΥΜΟΥ</i>	<i>KEGG PATHWAY</i>
SfLTP ^[2]	FE537054	lipid transfer protein	transfer phospholipids & galactolipids across membranes possible role in cutin deposition in the cell walls of certain secretory tissue
SfCinSin1 ^[2]	DQ785793	terpene synthase	Monoterpenoid biosynthesis
SfCinSin2 ^[2]	FJ618810	terpene synthase	Monoterpenoid biosynthesis
SfBPPS1 ^[2]	FE537328	bornyl diphosphate synthase	Monoterpenoid biosynthesis
SfIFR ^[2]	GU479926	phenylcoumaran benzylic ether reductase	Flavonoid biosynthesis
SfTPI ^[2]	FE536366	triose-phosphate isomerase	Glycolysis / Gluconeogenesis Fructose & mannose metabolism Carbon fixation in photosynthetic organism
SsLPPS ^[1]	JQ478434	sclareol synthase	Diterpenoid biosynthesis
SsSS ^[1]	JQ478435	sclareol synthase	Diterpenoid biosynthesis
Valeriana officinalis germacrene B/C/D ^[3]	JQ437839	germacrene synthase	Sesquiterpenoid biosynthesis

Πίνακας 2.10. Γονίδια & Μονοπάτια του Δευτερογενούς Μεταβολισμού (KEGG database)

Η κατασκευή των εκκινητών πραγματοποιήθηκε με τρόπο ώστε να πληρούνται οι παρακάτω προϋποθέσεις:

- i. Μήκος εκκινητών: το μήκος κάθε εκκινητή κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 18-32 νουκλεοτιδίων.
- ii. Περιεχόμενο G-C: αποφυγή επιλογής αλληλουχιών «πλούσιων» σε G-C. Μέση προτιμώμενη περιεκτικότητα 55% (50-60%).
- iii. Συμβατότητα στα Tm των εκκινητών: Το Tm υπολογίζεται βάση του τύπου: $Tm = 69,3 + 0,42 \cdot (G-C\%) - 650 / (\text{μήκος})$ εκκινητή. Απαιτείται ίδια περιεκτικότητα στα περιεχόμενα G-C, ώστε να εξασφαλίζεται η λειτουργικότητά τους σε ίδιες συνθήκες.

- iv. Αποφυγή εσωτερικών δομών: αποφυγή συμπληρωματικότητας αλληλουχιών των εκκινητών μεταξύ τους, ώστε να παρεμποδιστεί ο μεταξύ τους υβριδισμός και ο σχηματισμός φουρκέτας ή ομοδιμερών.
- v. Ειδικότητα πρόσδεσης: ύπαρξη ενός μόνο στόχου πρόσδεσης στη μήτρα για κάθε ζευγάρι εκκινητών, ώστε να διασφαλιστεί η ενίσχυση αποκλειστικά του επιθυμητού γονιδίου.

Για τον σχεδιασμό των εκκινητών χρησιμοποιήθηκαν τα εξής προγράμματα:

- **EditSeq (DNASTAR)** : sequence editor & import/export tool
- **Clustalx (v1.83)** : multiple sequence alignment
- **PrimerSelect (DNASTAR)** : primer design application/ adjusting mispriming parameters
- **GENEdoc** : featured multiple sequence alignment editor/ data analysis & visualization

καθώς και οι παρακάτω ιστοσελίδες/βάσεις δεδομένων:

- **PubMed** : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
- **NCBI/BLAST (blastn & blastx)** : <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- **NCBI Primer BLAST** : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
- **KEGG PATHWAY Database**:<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>
- **Gene Ontology** : <http://www.geneontology.org/>
- **TrichOME database**: <http://www.plantrichome.org/trichomedb/>

2.5. ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

2.5.1. Παρασκευή βασικού θρεπτικού υποστρώματος για στερεή καλλιέργεια

Στην παρούσα μελέτη, ως θρεπτικό υπόστρωμα όλων των χειρισμών χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό διάλυμα (MS) των *Murashige & Skoog, 1962*. Στον ακόλουθο πίνακα παρατίθεται η σύσταση του θρεπτικού διαλύματος MS (*Duchefa*)

Συστατικά Διαλύματος	Σύσταση	Ποσότητα σε mg/l	Συγκέντρωση διαλύματος σε μM
Μακροστοιχεία	KNO ₃	1900.00	18.79
	NH ₄ NO ₃	1650.00	20.61
	CaCl ₂	332.02	2.99
	MgSO ₄	180.54	1.50
	KH ₂ PO ₄	170.00	1.25
Μικροστοιχεία	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.11
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.10
	FeNaEDTA	36.70	100.00
	H ₃ BO ₃	6.20	100.27
	KI	0.83	5.00
	MnSO ₄ ·H ₂ O	16.90	100.00
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	1.03
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.60	29.91
Βιταμίνες	Glycine	2.00	26.64
	Myo-Inositol	100.00	554.94
	Thiamine HCl	0.10	0.30
	Pyridoxine HCl	0.50	2.43
	Nicotinic acid	0.50	4.06
Συνολική συγκέντρωση διαλύματος: 4405.19 mg/l			

Πίνακας 2.11. Σύσταση βασικού θρεπτικού υποστρώματος MS της εταιρείας *Duchefa*

Διαδικασία

- ✓ Για την παρασκευή 100 ml θρεπτικού υποστρώματος πραγματοποιήθηκε προσθήκη των παρακάτω συστατικών σε ποτήρι ζέσεως, το οποίο βρίσκεται υπό συνεχή ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα:
 - i. προσθήκη 100ml ddH₂O με χρήση ογκομετρικού κυλίνδρου
 - ii. ζύγιση σε ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας και προσθήκη:

Σακχαρόζης : 2g

MS : 0,44g

MES : 0,05g

- ✓ μέτρηση και ρύθμιση του pH με προσθήκη KOH 1N, ώστε να κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 5,6 με 5,8
- ✓ προσθήκη σε γυάλινη κωνική φιάλη των 250ml 0,6g αγαρόζης

- ✓ μεταφορά των συστατικών στη κωνική φιάλη
- ✓ σφράγισμα της φιάλης με διπλό φύλλο αλουμινίου
- ✓ αποστείρωση του υποστρώματος και των tips που θα χρησιμοποιηθούν. Η αποστείρωση λαμβάνει χώρα σε αυτόκαυστο σε συνθήκες 121°C, πίεσης 1,5 atm για 20min.

Σημείωση: Κρίνεται απαραίτητη η πλύση όλων των σκευών με απιονισμένο νερό πριν τη χρήση τους.

2.5.2. Παρασκευή stock διαλυμάτων φυτορμονών

Η σύσταση των stock διαλυμάτων, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζεται στον πίνακα που ακολουθεί.

Διάλυμα φυτορμόνης	Σύσταση
2,4D	10mg 2,4D + 5 ml DMSO (Dimethyl sulfoxide)
NAA	10mg NAA + 5 ml ddH ₂ O+ (5-6 σταγόνες) NaOH1N
BA	7,5mg BA + 7,5 ml DMSO (Dimethyl sulfoxide)
Kinetin	7,5mg Kinetin + 7,5 ml DMSO (Dimethyl sulfoxide)

Πίνακας 2.12. Σύσταση stock διαλυμάτων φυτορμονών

Εν συνεχεία τα διαλύματα αποστειρώθηκαν με χρήση φίλτρου και διαμοιράστηκαν σε erpendorf tubes, τα οποία αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

2.5.3. Παρασκευή τελικών θρεπτικών υποστρωμάτων

Η διαδικασία παρασκευής των υποστρωμάτων εκτελείται κάτω από αυστηρά ασηπτικές συνθήκες, σε θάλαμο νηματικής ροής (ESCO HOOD CLASS II).

- ✓ Αποστείρωση πιπέτας των 200μl και των 20 μl στο θάλαμο νηματικής ροής με χρήση UV ακτινοβολίας για 25 λεπτά
- ✓ Μεταφορά των αποστειρωμένων θρεπτικών υποστρωμάτων στον θάλαμο νηματικής ροής
- ✓ Καύση του στομίου της κωνικής φιάλης και απομάκρυνση των φύλλων αλουμινίου
- ✓ Προσθήκη αντίστοιχων φυτορμονών^[1] με χρήση κατάλληλης πιπέτας και αποστειρωμένων tips
- ✓ Ήπια ανάδευση
- ✓ Μεταφορά υποστρωμάτων σε αποστειρωμένα τρυβλία (petri disks): 20ml/τρυβλίο

✓ Σφράγισμα και αποθήκευση των τρυβλίων στους 4°C

^[1] Στην εν λόγω εργασία χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικής σύστασης θρεπτικά υποστρώματα, τα οποία περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

Με σκοπό την δημιουργία κάλλου («*callus induction medium*», CI) παρασκευάστηκαν τα εξής:

Υπόστρωμα	Σύσταση
MS-CI 1	100 ml βασικό MS + 100μl 2,4 D
MS-CI 2	100 ml βασικό MS + 50μl 2,4 D + 10μl BA
MS-CI 3	100 ml βασικό MS + 100μl 2,4 D + 20μl BA
MS-CI 4	100 ml βασικό MS + 100μl NAA
MS-CI 5	100 ml βασικό MS + 50μl NAA + 10μl BA
MS-CI 6	100 ml βασικό MS + 100μl NAA + 20μl BA

Πίνακας 2.13. Σύσταση θρεπτικών υποστρωμάτων καλλογένεσης

Με σκοπό τη βλαστογένεση («*shoot induction medium*», SI) παρασκευάστηκαν τα εξής:

Υπόστρωμα	Σύσταση
MS-SI 1	100 ml βασικό MS + 200μl BA
MS-SI 2	100 ml βασικό MS + 500μl BA
MS-SI 3	100 ml βασικό MS + 100μl BA + 5μl 2,4 D
MS-SI 4	100 ml βασικό MS + 100μl BA + 5μl NAA
MS-SI 5	100 ml βασικό MS + 500μl BA + 25μl 2,4 D
MS-SI 6	100 ml βασικό MS + 500μl BA + 50μl 2,4 D
MS-SI 7	100 ml βασικό MS + 500μl BA + 25μl NAA
MS-SI 8	100 ml βασικό MS + 500μl Kinetin + 25μl 2,4 D
MS-SI 9	100 ml βασικό MS + 500μl Kinetin + 50μl 2,4 D
MS-SI 10	100 βασικό MS + 500μl Kinetin + 25μl NAA

Πίνακας 2.14. Σύσταση θρεπτικών υποστρωμάτων βλαστογένεσης

2.5.4. Εγκατάσταση της καλλιέργειας

Απολύμανση έκφυτων

Ως έκφυτα στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν «leaf disks» του φυτού *Salvia sclarea*. Όλοι οι χειρισμοί (λήψη, απολύμανση, μεταφορά, ανακαλλιέργεια έκφυτων) πραγματοποιήθηκαν στο θάλαμο νηματικής ροής, ενώ όλα τα σκεύη αποστειρώθηκαν με χρήση UV ακτινοβολίας για 25 λεπτά.

Η απολύμανση των έκφυτων διεξήχθη υπό ασηπτικές συνθήκες, με διαδοχικές εμβαπτίσεις στα παρακάτω διαλύματα:

- ✓ 70% v/v αιθανόλης για 30 δευτερόλεπτα
- ✓ 10% χλωρίνης εμπορίου (2,4% υποχλωριώδους νατρίου) + 0.01% Tween20 για 15 λεπτά
- ✓ αποστειρωμένου dd H₂O για 2 λεπτά (x5 επαναλήψεις)

Εγκατάσταση καλλιέργειας για καλλογένεση

Μετά το πέρας της απολύμανσης ακολούθησε μεταφορά, με χρήση λαβίδας, των έκφυτων στα τρυβλία με τα αντίστοιχα θρεπτικά υποστρώματα καλλογένεσης (πίνακας 2.13) και σφράγισμα των τρυβλίων με parafilm™. Τέλος, τα τρυβλία μεταφέρθηκαν σε ειδικό θάλαμο επώασης ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία 22°C και φωτοπερίοδο 16 ώρες φως/8 ώρες σκοτάδι). Σε κάθε περίπτωση εκτελέστηκε αρχικά, μεταφορά των κάλλων σε νέο υπόστρωμα κάθε μια εβδομάδα, για το διάστημα του πρώτου μήνα, και στην συνέχεια τεμαχισμός των κάλλων και ανακαλλιέργεια κάθε δύο εβδομάδες, με εξαίρεση τους κάλλους που χρησιμοποιήθηκαν για μέτρηση νωπού βάρους, οι οποίοι και διατηρήθηκαν ακέραιοι μέχρι και την όγδοη εβδομάδα.

Εγκατάσταση καλλιέργειας για βλαστογένεση

Παρόμοιες διαδικασίες ακολουθήθηκαν και για την εγκατάσταση καλλιέργειας για βλαστογένεση, όπου τα έκφυτα εμφυτεύτηκαν στα αντίστοιχα θρεπτικά υποστρώματα (πίνακας 2.14), ενώ διατηρήθηκαν στο θάλαμο επώασης στις ίδιες συνθήκες. Παράλληλα με τη χρήση των «leaf disks» εκτελέστηκαν και δοκιμές μεταφοράς κάλλων, στα υποστρώματα βλαστογένεσης.

Παρατηρήσεις

- ❖ Κατά την μεταφορά των έκφυτων καθώς και το τεμαχισμό των κάλλων η λαβίδα και το νυστέρι εμβαπτίζονταν και καιγόταν εκ νέου στη φλόγα λύχνου Bunsen.
- ❖ Με στόχο την εύρεση της καταλληλότερης μεθόδου απολύμανσης έλαβε χώρα πληθώρα δοκιμών, ως προς τους χρόνους και τη σύσταση των διαλυμάτων.

2.5.5. Ποσοτικές & Ποιοτικές μετρήσεις

Με σκοπό τη μελέτη της εξέλιξης της καλλογένεσης καθώς και της βλαστογένεσης διεξήχθησαν μετρήσεις όσον αφορά το χρονικό διάστημα εμφάνισης των κάλλων, το νωπό βάρος τους, το ποσοστό καλλογένεσης και βλαστογένεσης. Ταυτόχρονα καταγράφηκαν και ποιοτικά χαρακτηριστικά, όπως είναι η ευρωστία και το χρώμα των κάλλων. Ακολούθησε καταγραφή και στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Η παρακολούθηση της πορείας, τόσο της καλλογένεσης, όσο και της βλαστογένεσης πραγματοποιήθηκε μέσω της συνεχούς λήψης φωτογραφιών.

2.6. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ & ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

2.6.1. Αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφάση (RT-PCR)

- ◆ **Superscript™ II Reverse Transcriptase (200u/μl) : INVITROGEN**
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 : INVITROGEN**
250 mM Tris -HCl (pH 8.3), 15mM MgCl₂, 375 mM KCl, 0.1M DTT (dithiothreitol)
- ◆ **RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40u/μl) : INVITROGEN**
Storage Buffer: 20mM Tris-HCl (pH8.0), 50mM KCl, 0.5mM EDTA, 8mM DTT, 50% (v/v) glycerol
- ◆ **RQ1 RNase-Free DNase (1u/μl & 2u/μl) : PROMEGA**
Storage Buffer: 10mM HEPES (pH 7.5), 50% (v/v) glycerol, 10mM CaCl₂, 10mM MgCl₂
- ◆ **RQ1 DNase (10x) Reaction Buffer : PROMEGA**
400mM Tris-HCl (pH 8.0), 100mM MgSO₄, 10mM CaCl₂

2.6.2. Αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

- ◆ **DreamTaq DNA Polymerase (5 u/μl): THERMO SCIENTIFIC**
Storage Buffer: 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 100 mM KCl, 0.5% (v/v) Nonidet P40, 0.5% (v/v) Tween 20, 50% (v/v) glycerol
- ◆ **10X DreamTaq Buffer: THERMO SCIENTIFIC**
DreamTaq Buffer is a proprietary formulation which contains KCl and (NH₄)₂SO₄ at a ratio optimized for robust performance of DreamTaq DNA Polymerase in PCR applications. DreamTaq Buffer also includes 20 mM MgCl₂

2.6.3. Απομόνωσης ολικού RNA-phenol/chloroform extraction

- ◆ **RNA extraction Buffer:** 100mM Tris-HCl (pH=9.5), 0.5% w/v SDS
- ◆ **SEVAG:** (24:1 χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη)
- ◆ **Φαινόλη** (pH 8.0)

2.6.4. Απομόνωσης ολικού RNA-CTAB extraction S(short)

- ◆ **RNA Extraction buffer (EB):** 20 mM EDTA pH 8.00, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1.4 M NaCl, 2.0 % (w/v) CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), 1% (w/v) PVP (πολυβινυλ-πυρρολιδόνη), 0.2 % β-mercaptoethanol (προσθήκη πριν την χρήση)
- ◆ **SEVAG:** (24:1 χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη)

2.6.5. Απομόνωσης ολικού RNA-CTAB extraction L(long)

- ◆ **RNA Extraction buffer (EB):** 20 mM EDTA pH 8.00, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1.4 M NaCl, 2.0 % (w/v) CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), 1% (w/v) PVP (πολυβινυλ-πυρρολιδόνη), 0.2 % β-mercaptoethanol (προσθήκη πριν την χρήση)
- ◆ **Precipitation buffer:** 1% (w/v) CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), 50 mM Tris-HCl pH 8.00, 10mM EDTA pH 8.00
- ◆ **Resuspension buffer:** 10 mM Tris-HCl pH7.4, 1mM EDTA pH 8.00, 1M NaCl
- ◆ **5% CTAB:** 5% (w/v) CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), 0,35 M NaCl
- ◆ **SEVAG:** (24:1 χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη)
- ◆ **Φαινόλη** (pH 8.0)

2.6.6. Ηλεκτροφόρησης νουκλεϊκών οξέων

- ◆ **Ρυθμιστικό διάλυμα TAE (50x):** 242g/l Tris base, 100ml/l 0.5M EDTA pH=8, 57ml/l CH₃COOH
- ◆ **EtBr :** 10mg/ml σε dH₂O (διατήρηση σε σκουρόχρωμο δοχείο σε θερμοκρασία δωματίου)
- ◆ **Loading dye:** 0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης (bromophenol blue), 0,25% κυανολοξυλένιο (xylene cyanol FF), 40% (w/v) σουκρόζη (sucrose)
- ◆ **TopVision Agarose :** Thermo SCIENTIFIC

2.6.7. Χειρισμών Ιστοκαλλιέργειας

- ◆ **Murashige & Skoog (MS) medium micro & macro elements including vitamins:** Duchefa
- ◆ **MES monohydrate Buffer grade:** AppliChem
- ◆ **Σακχαρόζη:** SIGMA-ALDRICH
- ◆ **TopVision Agarose :** Thermo SCIENTIFIC
- ◆ **2,4-Dichlorophenoxyacetic(2,4D) acid plant cell culture tested:** SIGMA-ALDRICH
- ◆ **1-Naphthaleneacetic acid (NAA) plant cell culture tested:** SIGMA-ALDRICH
- ◆ **6-Benzylaminopurine (BA) plant cell culture tested:** SIGMA-ALDRICH
- ◆ **Kinetin plant cell culture tested:** SIGMA-ALDRICH

2.6.8. Μοριακά βάρη φυτορμονών

- ◆ **2,4D:** 221,04 g/mol
- ◆ **NAA:** 186,2066 g/mol
- ◆ **BA:** 225,24924 g/mol
- ◆ **KINETIN:** 215,21 g/mol

2.7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ

2.7.1. Αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

Παράρτημα 1: Γονιδίου - Μάρτυρα σταθερής έκφρασης

ΟΝΟΜΑ ΕΚΚΙΝΗΤΗ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ
ACTIN 3-REV	5'- ACGACCTTGATCTTCATGCTGC -3'
ACTIN 2-FOR	5'-AAGATGACCCAAATCATGTTTGAGAC-3'

Παράρτημα 2: Επιθυμητών γονιδίων

ΟΝΟΜΑ ΕΚΚΙΝΗΤΗ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ	ACCESSION NUMBER	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ- KEGG PATHWAY
LTP-REV	5'- GATTGGGTAGCCGACATTAACC -3'	FE537054	<i>lipid transfer protein</i> transfer phospholipids & galactolipids across membranes possible role in cutin deposition in the cell walls of certain secretory tissue
LTP-FOR	5'- ACGACCGCGAAGAAGAGGCAA-3'		
CinSyn1-REV	5-'TTCGTAGGTCATCAATCAACTCCA-3'	DQ785793	<i>terpene synthase</i> Monoterpenoid biosynthesis
CinSyn1-FOR	5'-TCAGCTTGTCTTCAAACGACATC-3'		
CinSyn2-REV	5'-TCCGATTGAGATCCATGAGGTATT-3'	FJ618810	<i>terpene synthase</i> Monoterpenoid biosynthesis
CinSyn2-FOR	5'-GAACTGGAACAATTCACAGACGTG-3'		
BPPS-REV	5'- CTAGCCTCTAGTCCTTGAATCCTC -3'	FE537328	<i>bornyl diphosphate synthase</i> Monoterpenoid biosynthesis
BPPS-FOR	5'- GCTCTTGGATTTAGAATTCTCAGAC -3'		
IFR-REV	5'- ATCAGGATAGAGCTCGGAAGCCTC-3'	GU479926	<i>phenylcoumaran benzylic ether reductase</i> Flavonoid biosynthesis
IFR-FOR	5'-GACAAAATTGTTATTCCCGGAGATGG-3'		
TPI-REV	5'-GTACTTCTTGAGCCTGAGCAGGAG-3'	FE536366	<i>triose-phosphate isomerase</i> Glycolysis / Gluconeogenesis Fructose & mannose metabolism Carbon fixation in photosynthetic organism
TPI-FOR	5'-GGTCACTCTGAGAGGAGAGCTTTG-3'		
LPPS-REV	5'- GTACATTGGAGATGCAGACTCGAC -3'	JQ478434	<i>sclareol synthase</i> Diterpenoid biosynthesis
LPPS-FOR	5'- GAGGAGCACCACATACTTATCCAG-3'		
SS-REV	5'-AGCCTCTTGTTACCATATGGAGC-3'	JQ478435	<i>sclareol synthase</i> Diterpenoid biosynthesis
SS-FOR	5'-GTCCAAGGATTCCTGTGACCA-3'		
GERM-REV	5'- GTTCTTCAAAGGTGCCATACGAGTC -3'	JQ437839	<i>germacrene synthase</i> Sesquiterpenoid biosynthesis
GERM-FOR	5'-AAGAGCTTAACACGACTAGAGGC-3'		

2.7.2. Αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφάση (RT-PCR)

Παράρτημα 3

<i>ΟΝΟΜΑ ΕΚΚΙΝΗΤΗ</i>	<i>ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ</i>
Oligo dT (25μM) : T17XHO	5'-GTCGACCTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
<i>REV-sp1</i> (12,5μM)	LTP-REV CinSyn1-REV BPPS-REV IFR-REV TPI-REV LPPS-REV SS-REV ACTIN 3-REV
<i>REV-sp2</i> (12,5μM)	CinSyn2-REV GERM-REV ACTIN 3-REV
<i>REV-spTotal</i> (100μM)	LTP-REV CinSyn1-REV BPPS-REV IFR-REV TPI-REV LPPS-REV SS-REV CinSyn2-REV GERM-REV ACTIN 3-REV

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΡΙΧΑΣ

Η απομόνωση επαρκούς ποσότητας τρίχας από τα φύλλα του φυτού *Salvia sclarea* αποδείχθηκε ιδιαίτερα δύσκολη και απαιτητική. Παρά το γεγονός της ύπαρξης μεγάλης ποσότητας τρίχας στην φυλλική επιφάνεια, η διαδικασία της συλλογής παρεμποδίζεται πρωτίστως από τα ίδια τα τριχώματα. Στο φυτό, όπως προαναφέρθηκε απαντώνται αδενώδη τριχώματα, πλούσια σε δευτερογενείς μεταβολίτες, στα οποία η εφυμενίδα διαρρηγνύεται σχετικά εύκολα, σε περίπτωση μηχανικής πίεσης. Αποτέλεσμα αυτού είναι η διαφυγή των μεταβολιτών στο περιβάλλον κατά τη διαδικασία της απομόνωσης, υπό τη μορφή κολλώδους ουσίας εμποδίζοντας τη λήψη των τριχωμάτων. Ως αποτελεσματικότερος τρόπος λήψης της τρίχας κρίθηκε η συνδυασμένη χρήση υγρού άζωτου και ενός πινέλου ζωγραφικής. Αναλυτικότερα πραγματοποιείται εμβάπτιση του φύλλου σε υγρό άζωτο και εν συνεχεία απομάκρυνση των τριχών με το πινέλο και μεταφορά σε υγρό άζωτο. Κατά τη διαδικασία της απομόνωσης απαιτείται αυξημένη ταχύτητα χειρισμών, καθώς η γρήγορη ενυδάτωση του φύλλου καθιστά αδύνατη τη συλλογή, αλλά και προσοχή προς αποφυγή λήψης και άλλων επιδερμικών κυττάρων. Για την εξασφάλιση της μέγιστης δυνατής καθαρότητας, το δείγμα εξετάστηκε και με χρήση στερεοσκοπίου προς απομάκρυνση πιθανών προσμίξεων.



Εικόνα 3.1. Φύλλο από το φυτό *Salvia sclarea* πριν την αφαίρεση των τριχωμάτων



Εικόνα 3.2. Το ίδιο φύλλο μετά την απομόνωση των τριχωμάτων

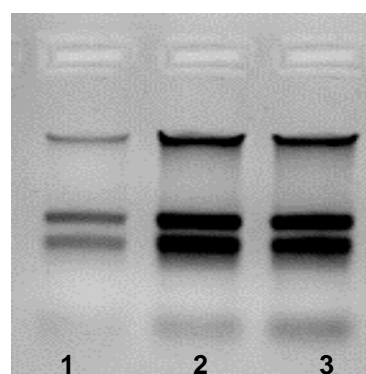
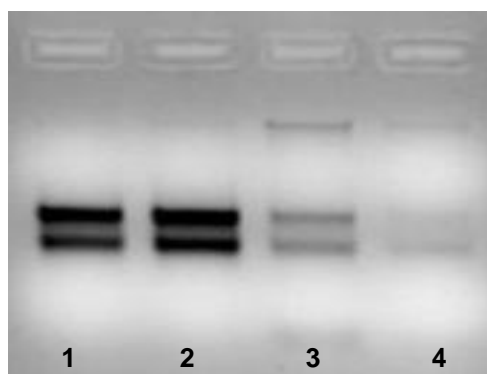
3.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ & ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ RNA

3.2.1. Απομόνωση & καθαρισμός RNA φύλλων

Για την απομόνωση του ολικού RNA από τα φύλλα του φυτού *Salvia sclarea* χρησιμοποιήθηκε αρχικά το πρωτόκολλο *phenol/chloroform extraction*. Ωστόσο η καθαρότητα των δειγμάτων, ως προς τις προσμίξεις από πρωτεΐνες και φαινολικά δεν ήταν υψηλή, καθώς οι λόγοι O.D.₂₆₀/O.D.₂₈₀ και O.D.₂₆₀/O.D.₂₄₀ αντίστοιχα, σημείωναν σχετικά χαμηλές τιμές, σε μεγάλο αριθμό ανεξάρτητων δοκιμών. Επομένως, με στόχο τη λήψη δειγμάτων, όσο το δυνατόν, μεγαλύτερης καθαρότητας εφαρμόστηκαν εν συνεχεία τα πρωτόκολλα *CTAB extraction S(short)* και *CTAB extraction L(long)*. Σε κάθε περίπτωση χρησιμοποιούνταν περίπου 100-150mg/eppendorf λειοτριβιμένου με υγρό άζωτο, ιστού. Μετά την ολοκλήρωση της απομόνωσης πραγματοποιούνταν ηλεκτροφόρηση (2μl/πηγαδάκι) και φωτομέτρηση (5μl/eppendorf) των δειγμάτων. Στους παρακάτω πίνακες παρατίθενται τα αποτελέσματα ορισμένων απομονώσεων, τα οποία αντικατοπτρίζουν ανά περίπτωση την γενικότερη εικόνα των δειγμάτων.

Phenol/chloroform extraction

Με το πρωτόκολλο *phenol/chloroform extraction* απομονώθηκε ολικό RNA από 40 ανεξάρτητα δείγματα, ενώ αρκετές φορές εκτελέστηκαν ομογενοποιήσεις δειγμάτων και εκ νέου καθαρισμοί, χωρίς όμως να επιτευχθεί σημαντική βελτιστοποίηση των αποτελεσμάτων.



Εικόνες 3.3. & 3.4. Απομονώσεις νουκλεϊκών οξέων από φύλλα με *phenol/chloroform extraction*

ΔΕΙΓΜΑ	D.F.	260/240	260/280	C (μg/ml)
1	1/100	0,941	0,68	192
2	1/100	0,756	1,40	472
3	1/100	0,639	1,19	1340
4	1/100	0,650	1,18	604

ΔΕΙΓΜΑ	D.F.	260/240	260/280	C (μg/ml)
1	1/100	0,585	1,10	2064
2	1/100	0,654	1,15	1580
3	1/100	0,615	1,15	2176

Πίνακες 3.1.& 3.2 Μετρήσεις οπτικής πυκνότητας των αντίστοιχων δειγμάτων φύλλων με *phenol/chloroform extraction*



ΔΕΙΓΜΑ	D.F.	260/240	260/280	C ($\mu\text{g/ml}$)
1	1/100	0,755	1,43	456

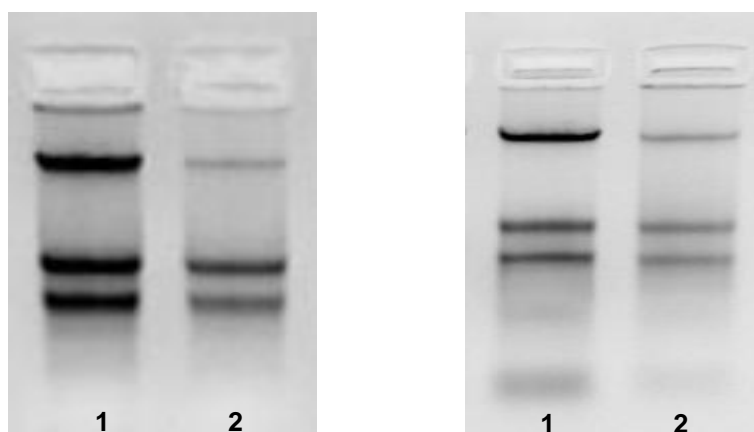
Πίνακας 3.3 Μετρήσεις οπτικής πυκνότητας του δειγμάτος φύλλον με phenol/chloroform extraction

Εικόνα 3.5. Απομονώση νουκλεϊκών οξέων από φύλλα με phenol/chloroform extraction. Το δείγμα είναι αποτέλεσμα ομογενοποίησης και εκ νέου καθαρισμού των δειγμάτων 3 & 4 (εικόνα 3.3) και 1 & 2 (εικόνα 3.4)

Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι η ακεραιότητα του RNA που απομονώνεται είναι διασφαλισμένη καθώς δεν παρατηρείται καμία ένδειξη αποδόμησης, ωστόσο οι λόγοι $O.D._{260}/O.D._{280}$ και $O.D._{260}/O.D._{240}$ είναι ιδιαίτερα χαμηλοί συγκρινόμενοι με την ιδανική τιμή 2. Η εικόνα αυτή συντηρείται ακόμα και στην περίπτωση ενοποίησης και επανάληψης του καθαρισμού των δειγμάτων, όπου σημειώνεται μικρή βελτίωση μόνο του λόγου $O.D._{260}/O.D._{280}$. Επομένως εξάγεται το συμπέρασμα ότι στα δείγματα του ολικού RNA εμπεριέχονται υψηλά επίπεδα πρωτεϊνικών και φαινολικών προσμίξεων. Παράλληλα τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης δεν συμβαδίζουν με αυτά της φωτομέτρησης, όσον αφορά τον προσδιορισμό της ποσότητας του ολικού RNA (εικόνες 3.3,3.4 & πίνακες 3.1,3.2). Για δείγματα τα οποία στην ηλεκτροφόρηση φαίνεται να έχουν μικρή συγκέντρωση, η φωτομέτρηση δίνει μεγαλύτερες τιμές, δηλαδή εμφανίζουν μεγαλύτερη τιμή $O.D._{260}$. Το γεγονός αυτό ενδεχομένως να οφείλεται στις υψηλές τιμές $O.D._{240}$, λόγω των πολλών φαινολικών τα οποία μετατοπίζουν όλο το φάσμα απορρόφησης. Επομένως καθίσταται ανέφικτος ο ασφαλής προσδιορισμός της συγκέντρωσης των δειγμάτων, καθώς υπάρχει ο κίνδυνος υπερεκτίμησής της.

CTAB extraction S(short) & L(long)

Ομοίως, με τα πρωτόκολλα *CTAB extraction S & L* απομονώθηκε ολικό RNA από 20 και 18 ανεξάρτητα δείγματα, αντίστοιχα.



Εικόνες 3.6. & 3.7. Απομονώσεις νουκλεϊκών οξέων από φύλλα με *CTAB extraction S* (αριστερά) & *CTAB extraction L* (δεξιά)

ΔΕΙΓΜΑ	D.F.	260/240	260/280	C ($\mu\text{g/ml}$)
1	1/100	1,51	2,08	440
2	1/100	1,02	2,09	184

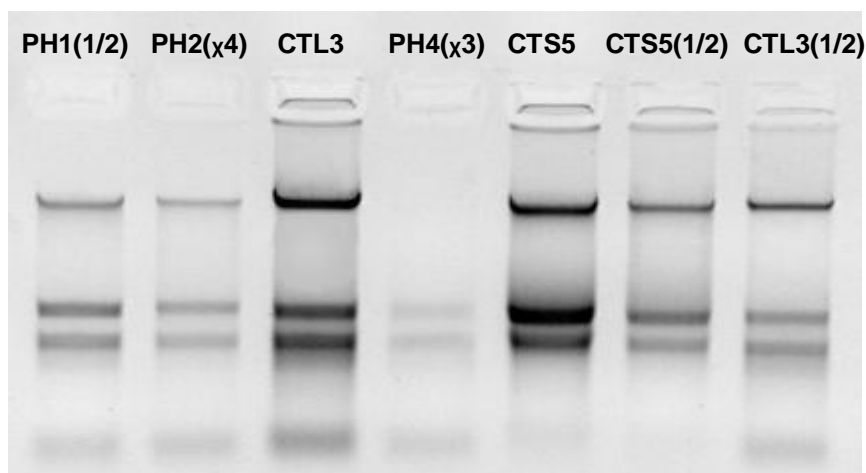
Πίνακας 3.4. Μετρήσεις οπτικής πυκνότητας του δειγμάτος φύλλου με CTAB extraction S

ΔΕΙΓΜΑ	D.F.	260/240	260/280	C ($\mu\text{g/ml}$)
1	1/100	1,89	1,83	484
2	1/100	1,55	2,00	304

Πίνακας 3.5. Μετρήσεις οπτικής πυκνότητας του δειγμάτος φύλλου με CTAB extraction L

Σύμφωνα με τις παραπάνω μετρήσεις, το RNA που απομονώνεται διατηρείται ακέραιο και με τα δύο πρωτόκολλα. Σε αντίθεση όμως με τα προηγούμενα αποτελέσματα σημειώνεται σημαντική αύξηση στις τιμές των λόγων O.D.₂₆₀/O.D.₂₈₀ και O.D.₂₆₀/O.D.₂₄₀, και στις δύο περιπτώσεις. Ειδικότερα ο λόγος O.D.₂₆₀/O.D.₂₈₀ ταυτίζεται στο σύνολο των δοκιμών με την ιδανική τιμή. Ταυτόχρονα δεν παρατηρείται η προαναφερθείσα ασυμβατότητα μεταξύ των αποτελεσμάτων ηλεκτροφόρησης και φωτομέτρησης. Επομένως στην παρούσα μελέτη τα δύο αυτά πρωτόκολλα κρίνονται καταλληλότερα για την απομόνωση ολικού RNA από τα φύλλα του αρωματικού φυτού *Salvia sclarea*.

Μάλιστα, στην φωτογραφία 3.8. απεικονίζεται το αποτέλεσμα της ταυτόχρονης ηλεκτροφόρησης δειγμάτων και από τα τρία πρωτόκολλα, με σκοπό την ολοκληρωμένη συγκριτική μελέτη τους. Με PH συμβολίζονται τα δείγματα από το phenol/chloroform extraction, ενώ με CTS και CTL από τα CTAB extraction S & L, αντίστοιχα.



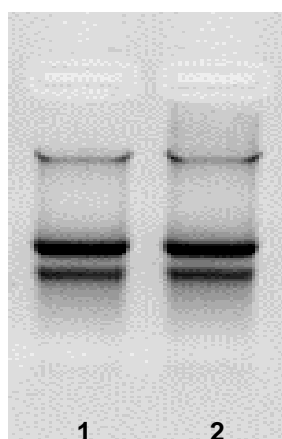
Εικόνα 3.8. Απομονώσεις νουκλεϊκών οξέων από φύλλα και με τα τρία πρωτόκολλα

ΔΕΙΓΜΑ	D.F.	260/240	260/280	C ($\mu\text{g/ml}$)
PH1	1/100	0,615	1,15	2176
PH2	1/100	0,793	1,53	92
CTL3	1/100	1,89	1,83	484
PH4	1/100	0,71	1,32	90
CTS5	1/100	1,51	2,08	440

Πίνακας 3.6. Μετρήσεις οπτικής πυκνότητας των αντίστοιχων δειγμάτων φύλλου της εικόνας 3.8.

3.2.2. Απομόνωση & καθαρισμός RNA κάλλου

Η απομόνωση του ολικού RNA από κάλλους του φυτού *Salvia sclarea* (η ανάπτυξη των οποίων περιγράφεται σε ακόλουθη ενότητα) επετεύχθη με τη χρήση του *CTAB extraction S* πρωτόκολλου. Κάθε απομόνωση ξεκινούσε με 250-350mg/εppendorf κάλλων, ενώ στο τέλος πραγματοποιούνταν ηλεκτροφόρηση (2μl/πηγαδάκι) και φωτομέτρηση (5μl/εppendorf) των δειγμάτων. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 12 ανεξάρτητες απομονώσεις, τρεις από τις οποίες παρατίθενται στους πίνακες που ακολουθούν.



Εικόνες 3.9. (αριστερά) & 3.10. (δεξιά)
Απομονώσεις νουκλειικών οξέων από κάλλο με
CTAB extraction S



ΔΕΙΓΜΑ	D.F.	260/240	260/280	C (μg/ml)
1	1/100	1,48	1,92	800
2	1/100	1,63	1,86	1092

Πίνακας 3.7. Μετρήσεις οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων κάλλου της εικόνας 3.9.

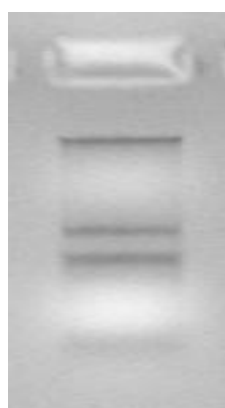
ΔΕΙΓΜΑ	D.F.	260/240	260/280	C (μg/ml)
1	1/100	1,57	2,02	856

Πίνακας 3.8. Μετρήσεις οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων κάλλου της εικόνας 3.10.

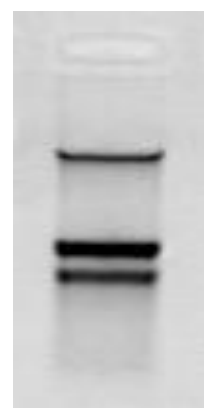
Όπως φαίνεται και στις παραπάνω μετρήσεις, η εφαρμογή του *CTAB extraction S* πρωτοκόλλου είναι αποτελεσματική και για την απομόνωση ολικού RNA κάλλων από το φυτό *Salvia sclarea*.

3.2.3. Απομόνωση & καθαρισμός RNA τρίχας

Παρόμοια διαδικασία δοκιμών έλαβε χώρα και για την απομόνωση ολικού RNA από τα τριχώματα του φυτού *Salvia sclarea*. Λαμβάνοντας υπ' όψιν και τα παραπάνω αποτελέσματα, με το πρωτόκολλο *phenol/chloroform extraction* απομονώθηκε ολικό RNA από 7 ανεξάρτητα δείγματα, ενώ με το *CTAB extraction S* από 12. Σε κάθε περίπτωση διανέμονταν 700-850mg/eppendorf τρίχας, και μετά το πέρας της απομόνωσης ακολουθούσε ηλεκτροφόρηση (3μl/πηγαδάκι) και φωτομέτρηση (5μl/eppendorf) των δειγμάτων. Ομοίως, στους παρακάτω πίνακες παρατίθενται τα αποτελέσματα ορισμένων απομονώσεων, ενδεικτικά της γενικότερης εικόνας των δειγμάτων.



Εικόνες 3.11 (αριστερά) & 3.12. (δεξιά)
Απομονώσεις νουκλεϊκών οξέων από ιστό τρίχας
με *phenol/chloroform extraction* (αριστερά) και με
CTAB extraction S (δεξιά)



ΔΕΙΓΜΑ	D.F.	260/240	260/280	C (μg/ml)
1	1/100	0,76	1,22	200

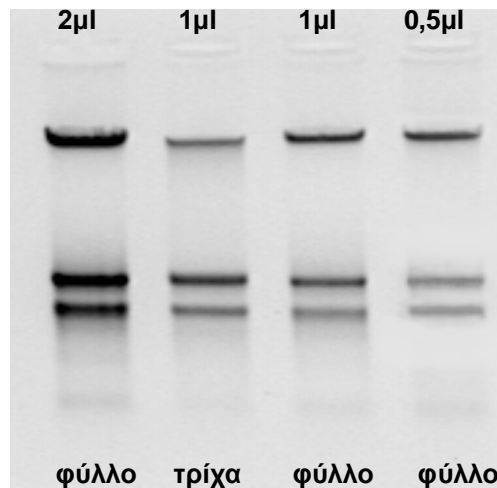
Πίνακας 3.9. Μετρήσεις οπτικής πυκνότητας του δείγματος τρίχας με *phenol/chloroform extraction* της εικόνας 3.11.

ΔΕΙΓΜΑ	D.F.	260/240	260/280	C (μg/ml)
1	1/100	1,35	2,4	108

Πίνακας 3.10. Μετρήσεις οπτικής πυκνότητας του δείγματος τρίχας με *CTAB extraction S* της εικόνας 3.12.

Όσον αφορά τα δείγματα που προκύπτουν με το πρωτόκολλο *phenol/chloroform extraction*, για ακόμα μια φορά οι λόγοι $O.D._{260}/O.D._{280}$ και $O.D._{260}/O.D._{240}$ κυμαίνονται σε ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα, με τις φαινολικές προσμίξεις σε αφθονία. Αντίθετα, μετά την εφαρμογή του *CTAB extraction S*, σημειώνεται σημαντική βελτίωση της καθαρότητας του RNA. Συμπερασματικά, στην εν λόγω εργασία το πρωτόκολλο *CTAB extraction S* επιλέγεται ως καταλληλότερο και για την απομόνωση ολικού RNA τρίχας του φυτού *Salvia sclarea*. Λόγω της προαναφερθείσας δυσκολίας κατά τη συλλογή των τριχωμάτων, αλλά και της μικρής ποσότητας RNA που προέκυπτε μετά την απομόνωση πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση των δειγμάτων από τις 12 ανεξάρτητες απομονώσεις και εκ νέου κατακρήμνιση του ολικού RNA. Αναλυτικότερα, μετά την ομογενοποίηση προστέθηκαν 83μl ddH₂O (τελικός όγκος 300μl). Ακολούθησε κατακρήμνιση στους -80°C για μισή ώρα, με χρήση 2.5 όγκων (παγωμένης) 100% αιθανόλης και 1/10 του

όγκου CH_3COONa 3M (pH 4.8). Τέλος εκτελέστηκε φυγοκέντρηση στις 13.000 στρ/λεπτό στους 4°C για 30 λεπτά, ενώ το ιζήμα επαναδιαλύθηκε σε 30μl ddH₂O. Η ποσότητα του ολικού RNA της τρίχας προσδιορίστηκε βάση κατάλληλων αραιώσεων γνωστής ποσότητας RNA φύλλου (416ng/μl), το οποίο είχε απομονωθεί με το ίδιο πρωτόκολλο, μέσω των οποίων προέκυψε ότι και η συγκέντρωση του δείγματος της τρίχας είναι κατά προσέγγιση 416ng/μl (Total: 12,48μg).



Εικόνα 3.13. Απομονώσεις νουκλεϊκών οξέων από τρίχα και φύλλο με CTAB extraction S

3.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΩΝ

3.3.1. Αντίδραση με DNase

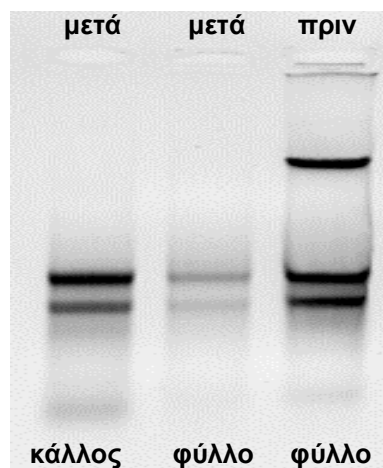
Στην συνέχεια στα δείγματα ολικού RNA, τα οποία είχαν προκύψει με το πρωτόκολλο *CTAB extraction S* και επιλέχθηκαν ως καταλληλότερα πραγματοποιήθηκε αντίδραση με DNase, με σκοπό την καταστροφή του περιεχόμενου DNA πριν την σύνθεση του cDNA. Εκτελέστηκαν συνολικά 6 αντιδράσεις (αναλυτική περιγραφή στο κεφάλαιο 2), των οποίων τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν ακολούθως σε διαφορετικές RT-PCR. Σε όλες τις περιπτώσεις η καταστροφή του περιεχόμενου DNA ήταν πλήρης, ενώ διατηρούταν πλήρως τόσο η ακεραιότητα, όσο και η καθαρότητα του RNA.

1^η & 2^η πέψη με DNase

Ως μήτρα στις αντιδράσεις αυτές χρησιμοποιήθηκαν 7,5 μg ολικού RNA φύλλου και κάλλου αντιστοίχως. Τα δείγματα επαναδιαλύθηκαν σε 25μl ddH₂O, εκ των οποίων 3μl ηλεκτροφορήθηκαν και 5μl φωτομετρήθηκαν. Παράλληλα, ηλεκτροφορήθηκαν και 2μl δείγματος του φύλλου, στο οποίο δεν έγινε χειρισμός με DNase, ως μάρτυρας. Με τα δείγματα αυτά εκτελέστηκαν οι αντίστοιχες RT-PCR με τον εκκινητή oligo dT.

	ΠΡΙΝ ΤΗΝ DNase		ΜΕΤΑ ΤΗΝ DNase	
	ΦΥΛΛΟ	ΚΑΛΛΟΣ	ΦΥΛΛΟ	ΚΑΛΛΟΣ
260/240	1,72	1,57	1,03	1,23
260/280	2,16	2,02	1,79	1,97
C (μg/ml)	536	856	136	260
TOTAL μg	7,5	7,5	3,4	6,5
RECOVERY	-	-	45,33%	86,6%

Πίνακας 3.11. Μετρήσεις οπτικής πυκνότητας δειγμάτων RNA πριν & μετά την αντίδραση με DNase



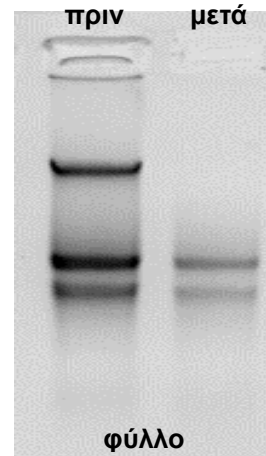
Εικόνα 3.14. Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων RNA πριν & μετά την αντίδραση με DNase

3^η πέψη με DNase

Ως μήτρα χρησιμοποιήθηκαν 7,9 μg ολικού RNA φύλλου. Η επαναδιάλυση έγινε σε 25μl ddH₂O, από τα οποία 3μl ηλεκτροφορήθηκαν και 5μl φωτομετρήθηκαν. Ομοίως, ως μάρτυρας ηλεκτροφορήθηκαν 2μl δείγματος φύλλου πριν την αντίδραση. Με το δείγμα πραγματοποιήθηκε RT-PCR με τον εκκινητή REV-sp1.

	ΠΡΙΝ ΤΗΝ DNase	ΜΕΤΑ ΤΗΝ DNase
ΦΥΛΛΟ		
260/240	1,51	1,03
260/280	2,08	1,79
C (µg/ml)	440	136
TOTAL µg	7,9	3,4
RECOVERY	-	43,04%

Πίνακας 3.12. Μετρήσεις οπτικής πυκνότητας δείγματος RNA πριν & μετά την αντίδραση με DNase



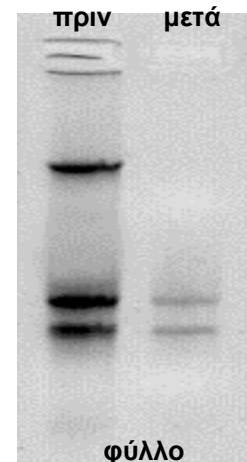
Εικόνα 3.15. Ηλεκτροφόρηση δείγματος RNA πριν & μετά την αντίδραση με DNase

4^η πέψη με DNase

Μήτρα για την αντίδραση αποτέλεσαν 7,5 µg ολικού RNA φύλλου. Πραγματοποιήθηκε επαναδιάλυση σε 25µl ddH₂O, από τα οποία 3µl ηλεκτροφορήθηκαν και 5µl φωτομετρήθηκαν. Ταυτόχρονα έγινε ηλεκτροφόρηση 2µl δείγματος φύλλου, στο οποίο δεν εφαρμόστηκε η πέψη, για να λειτουργήσει ως μάρτυρας. Το δείγμα χρησιμοποιήθηκε σε RT-PCR με τον εκκινητή REV-sp2

	ΠΡΙΝ ΤΗΝ DNase	ΜΕΤΑ ΤΗΝ DNase
ΦΥΛΛΟ		
260/240	1,27	1,06
260/280	1,70	2
C (µg/ml)	448	136,2
TOTAL µg	7,5	3,405
RECOVERY	-	45,4%

Πίνακας 3.13. Μετρήσεις οπτικής πυκνότητας δείγματος RNA πριν & μετά την αντίδραση με DNase

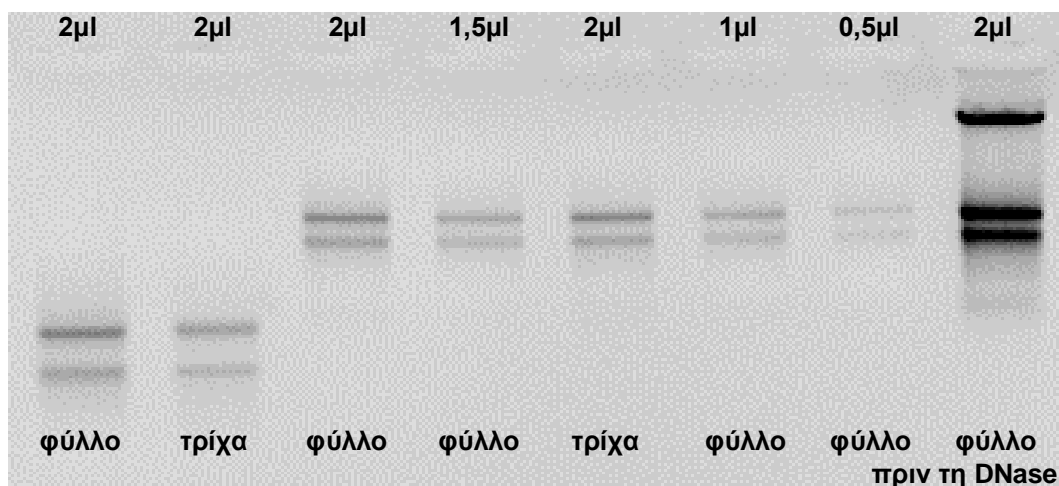


Εικόνα 3.16. Ηλεκτροφόρηση δείγματος RNA πριν & μετά την αντίδραση με DNase

5^η & 6^η πέψη με DNase

Ως μήτρα στις αντιδράσεις αυτές χρησιμοποιήθηκαν 5 µg ολικού RNA τρίχας και φύλλου αντίστοιχα. Τα δείγματα επαναδιαλύθηκαν σε 25µl ddH₂O. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση 2µl δείγματος του φύλλου, στο οποίο δεν έγινε χειρισμός με DNase, ως μάρτυρας. Με τα δείγματα αυτά εκτελέστηκαν οι αντίστοιχες RT-PCR με τον εκκινητή REV-spTotal. Ο υπολογισμός της ποσότητας του ολικού RNA της τρίχας μετά την αντίδραση με DNase πραγματοποιήθηκε με βάση την ποσότητα του φύλλου. Αναλυτικότερα έλαβε χώρα φωτομέτρηση 5µl δείγματος

φύλλου, από την οποία η συγκέντρωσή του υπολογίστηκε στα 160ng/μl. Ταυτόχρονα ηλεκτροφορήθηκαν οι ποσότητες των 2μl, 1,5μl, 1μl, 0,5μl δείγματος φύλλου και 2μl δείγματος τρίχας, όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 3.17. Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων RNA πριν & μετά την αντίδραση με DNase

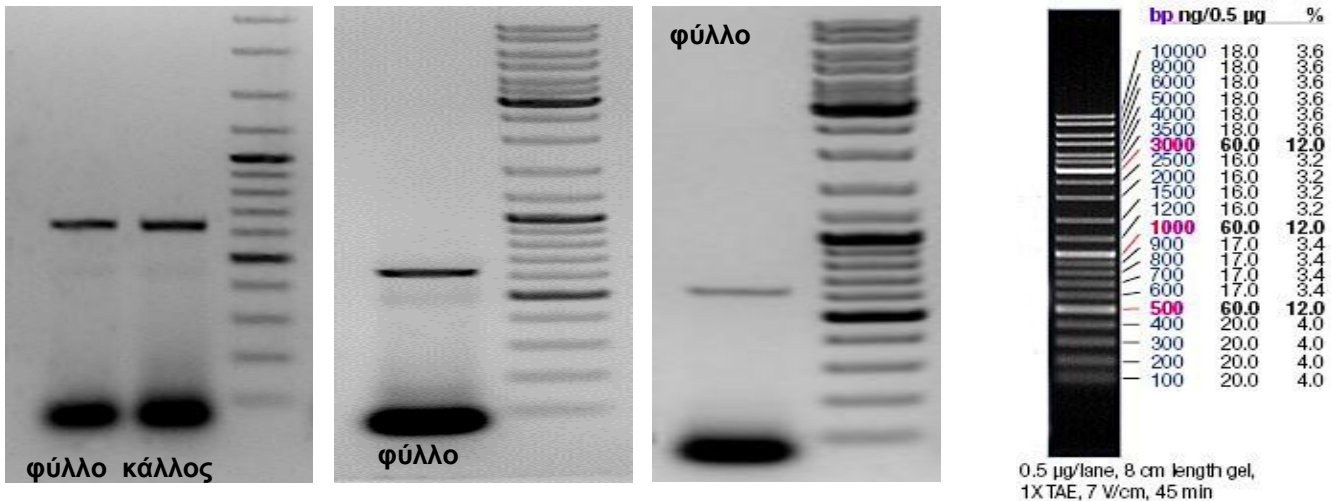
Από τα παραπάνω δεδομένα προκύπτει ότι: $120\text{ng}/\mu\text{l} \leq C_{\text{trich}} \leq 160\text{ng}/\mu\text{l}$, όπου C_{trich} η συγκέντρωση του δείγματος της τρίχας. Επομένως εξάγεται το συμπέρασμα ότι η συγκέντρωση του δείγματος της τρίχας είναι κατά προσέγγιση περίπου 140ng/μl (Total: 3,5μg, Recovery: 70 %).

3.3.2. Σύνθεση cDNA

Επόμενο στάδιο της πειραματικής μας προσέγγισης ήταν η πραγματοποίηση της RT-PCR για την σύνθεση cDNA και από τους τρεις ιστούς. Συνολικά έγιναν 6 αντιδράσεις, με μήτρα 1,5μg ολικού RNA-DNA free φύλλου, τρίχας και κάλλου (τα οποία προέκυψαν από τις προαναφερθείσες πέψεις με DNase), και τους εκκινητές *oligo dT*, *REV-sp1*, *REV-sp2* και *REV-spTotal*. Μετά το πέρας των αντιδράσεων όλα τα δείγματα αραιώθηκαν στο 1/5 του όγκου.

3.3.3. PCR για το γονίδιο της ακτίνης

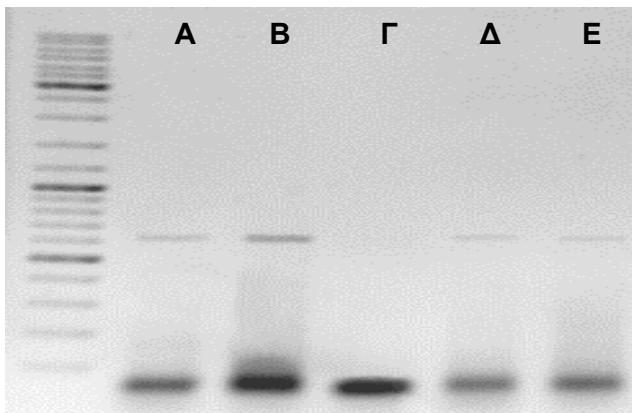
Ιδιαίτερα σημαντικό βήμα αποτελεί ο έλεγχος της αποτελεσματικότητας της σύνθεσης του cDNA. Για το λόγο αυτό, με μήτρα 20 ng κάθε φορά από τα 6 cDNA που συντέθηκαν πραγματοποιήθηκαν κατά αντιστοιχία αντιδράσεις PCR για το γονίδιο της ακτίνης (μάρτυρα σταθερής έκφρασης), σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στο κεφάλαιο 2 (T_m 57 °C, 30 κύκλοι). Ηλεκτροφορήθηκαν 15μl προϊόντος, από τη εκάστοτε αντίδραση και 2 μl DNA ladder. Το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος είναι 637bp. Σε όλες τις περιπτώσεις η σύνθεση του cDNA ήταν επιτυχής.



Εικόνες 3.18. 3.19 & 3.20. Ηλεκτροφόρησεις προϊόντων PCR ακτίνης, με μήτρα cDNA που συντέθηκαν με τους εκκινητές oligodT (αριστερά), REV-sp1 (κέντρο) & REV-sp2 (δεξιά)

Εικόνα 3.21. GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas

Για την περίπτωση της σύνθεσης του cDNA με τον εκκινητή REV-spTotal από το δείγμα της τρίχας εκτελέστηκαν 4 αντιδράσεις PCR για το γονίδιο της ακτίνης, με μόνη διαφοροποίηση την αρχική ποσότητα μήτρας. Χρησιμοποιήθηκαν 20ng, 30ng, 40ng και 50ng (πίνακας 3.14.). Με τον τρόπο αυτό έγινε και μια εκτίμηση της πυκνότητας του δείγματος της τρίχας, συγκρινόμενο με αυτό του φύλλου, για την οποία ως τότε δεν υπήρχε εικόνα.

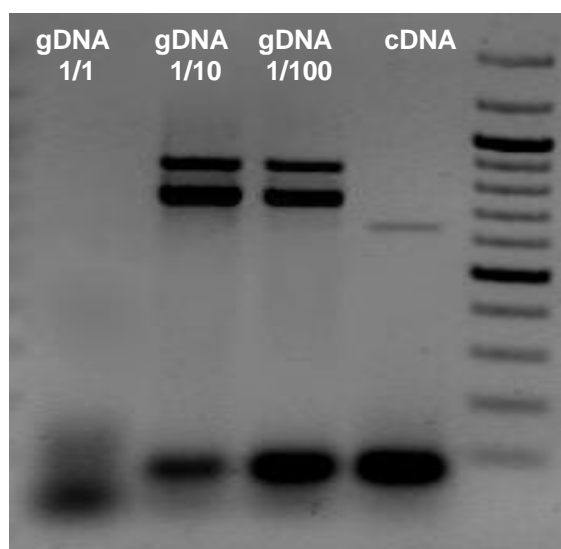


Εικόνα 3.22. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR ακτίνης, με μήτρα cDNA που συντέθηκε με τον εκκινητή REV-spTotal

Δείγμα	Ιστός	Ποσότητα μήτρας (ng)
A	Φύλλο	20
B	Τρίχα	20
Γ	Τρίχα	30
Δ	Τρίχα	40
E	Τρίχα	50

Πίνακας 3.14. Οι ποσότητες των δειγμάτων της εικόνας 3.21. που χρησιμοποιήθηκαν για τα PCR ακτίνης

Τέλος εκτελέστηκε PCR για το γονίδιο της ακτίνης με μήτρα 2μl γονιδιωματικό DNA φύλλου *Salvia sclarea* από διαφορετικές αραιώσεις, ώστε να γίνει επιλογή των καταλληλότερων για να χρησιμοποιηθούν στις PCR για τη μελέτη των επιθυμητών γονιδίων. Η συγκέντρωση του gDNA, από το οποίο έγιναν οι αραιώσεις ήταν 484ng/μl. Ηλεκτροφορήθηκαν 15μl προϊόντος, από τη εκάστοτε αντίδραση, καθώς και 15μl προϊόντος PCR ακτίνης με μήτρα cDNA φύλλου. Το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος είναι 724bp. Από την παρακάτω εικόνα (3.22.) προέκυψε ότι οι αραιώσεις που είναι κατάλληλες να χρησιμοποιηθούν στις μετέπειτα δοκιμές είναι οι 1/10 και 1/100.



Εικόνα 3.23. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR ακτίνης, με μήτρα gDNA σε διαφορετικές αραιώσεις & cDNA

3.3.4. Σχεδιασμός εκκινήτων

Με στόχο λοιπόν την μελέτη των επιπέδων έκφρασης γονιδίων, τα οποία συμμετέχουν σε μονοπάτια του δευτερογενούς μεταβολισμού, στο φυτό *Salvia sclarea* πραγματοποιήθηκε αρχικά βιβλιογραφική μελέτη και βιοπληροφορική αναζήτηση των επιθυμητών αλληλουχιών στις βάσεις δεδομένων *PubMed*, *KEGG PATHWAY Database*, *TrichOME database*, *Gene Ontology*. Όπως προαναφέρθηκε ένα από τα βασικά συστατικά του αιθέριου ελαίου του φυτού είναι το διτερπένιο σκλαρεόλη, πολύτιμη χημική ουσία κυρίως για το τομέα της αρωματοποιίας η σημασία της οποίας περιγράφεται εκτενώς στο κεφάλαιο της εισαγωγής. Επομένως, στα προς μελέτη γονίδια δε θα μπορούσαν να μην συμπεριληφθούν δύο, πρόσφατα χαρακτηρισμένες ως προς τη λειτουργία τους, συνθετάσες διτερπενίων (diTPS), οι οποίες καταλύουν την σύνθεση της σκλαρεόλης (Caniard A et al., 2012).

Στην παρούσα εργασία επιλέχθηκαν τελικά και αλληλουχίες συγγενικών ειδών, λόγω της περιορισμένης παράθεσης κατάλληλων δεδομένων για το συγκεκριμένο φυτικό είδος, καθώς ο αριθμός των σχετικών μελετών δεν είναι μεγάλος. Συγκεκριμένα επιλέχθηκαν γονίδια από το συγγενικό είδος *Salvia fruticosa*, τα οποία συμμετέχουν στη βιοσύνθεση μονοτερπενίων, διτερπενίων, φαινυλοπροπανοειδών και φλαβονοειδών, βάση της μελέτης των Fani M. Chatzopoulou et al., 2010. Τα γονίδια αυτά ενώ απαντώνται τόσο στο φύλλο, όσο και στα τριχώματα, στην εν λόγω μελέτη εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στα τριχώματα. Αναλυτικότερη περιγραφή της πειραματικής εργασίας παρατίθεται στην ενότητα 1.4. Περιγραφή όλων των γονιδίων και των βιοσυνθετικών μονοπατιών στα οποία εμπλέκονται πραγματοποιείται στην ενότητα 2.4.4., πίνακας 2.10.

Για το σχεδιασμό των εκκινήτων για τα γονίδια των δύο συνθετασών της σκλαρεόλης (SsLPPS & SsSS), οι αντίστοιχες αλληλουχίες επεξεργάστηκαν με τα προγράμματα *EditSeq* (DNASTAR) και *PrimerSelect* (DNASTAR), έτσι ώστε ο σχεδιασμός να πληρεί τις κατάλληλες προϋποθέσεις (ενότητα 2.4.4.). Με τα προγράμματα αυτά επιτυγχάνεται η δοκιμή μεγάλου αριθμού πιθανών ζευγαριών, με

μεγάλη ταχύτητα και ευκολία, διευκολύνοντας έτσι τον έλεγχο όλων των παραμέτρων. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε στοίχιση των δύο αλληλουχίων των συνθετασών με κάθε εκκινητή, και οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων με τα προγράμματα *Clustalx* (v1.83) και *GENEdoc*. Στόχος ήταν η διασφάλιση της ειδικότητας πρόσδεσης του εκάστοτε ζευγαριού στο επιθυμητό γονίδιο, για τη αποφυγή της ταυτόχρονης ενίσχυσης και των δύο γονιδίων. Ακόμη, όσον αφορά τη διασφάλιση της ειδικότητας των εκκινητών, σε ευρύτερο επίπεδο πραγματοποιήθηκε επεξεργασία του ζεύγους των εκκινητών με τον αλγόριθμο αναζήτησης *NCBI Primer BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*), από τον οποίο προκύπτουν όλοι οι πιθανοί στόχοι πρόσδεσης.

Όσον αφορά τα υπόλοιπα γονίδια, αρχικά πραγματοποιήθηκε για το καθένα αναζήτηση των ακολουθιών που εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα με αυτό, μέσω του ευρετικού αλγορίθμου *BLAST*, όπου επιτυγχάνεται η στοίχιση της γνωστής σε μας ακολουθίας έναντι όλων των ακολουθιών που είναι διαθέσιμες στις βάσεις *GenBank*, *DDJB*, *EMBL* και *PDB*. Για κάθε γονίδιο επιλέχτηκαν οι επτά πρώτες αλληλουχίες με την ίδια λειτουργία και με το μικρότερο E Value (Expect Value). Χαμηλότερες τιμές αντικατοπτρίζουν μεγαλύτερη ομοιότητα, καθώς το E Value αποτελεί μια παράμετρο εκτίμησης του αριθμού των τυχαίων αποτελεσμάτων σε ένα BLAST. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε πολλαπλή ευθυγράμμιση των επιλεγμένων ανα περίπτωση ακολουθιών κατά το πλήρες μήκος τους και οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων, με στόχο τον σχεδιασμό των εκκινητών σε συντηρημένες περιοχές. Η κατασκευή των εκκινητών σύμφωνα με τα απαραίτητα κριτήρια, αλλά και η διασφάλιση της ειδικότητάς τους διεξήχθησαν με τον ίδιο τρόπο που περιγράφεται στην παραπάνω παράγραφο.

Τα αποτελέσματα της στοίχισης των ακολουθιών για κάθε γονίδιο παρατίθενται αναλυτικά στο παράρτημα. Στους παρακάτω πίνακες (3.15 & 3.16) παρουσιάζονται τα Tm για κάθε ζευγάρι εκκινητών, καθώς και το αναμενόμενο μέγεθος του εκάστοτε προϊόντος αντίστοιχα.

Όνομα Εκκινητή	Tm Εκκινητή
LTP-REV	60,76 °C
LTP-FOR	62,23 °C
CinSyn1-REV	59,72 °C
CinSyn1-FOR	59,72 °C
CinSyn2-REV	59,72 °C
CinSyn2-FOR	61,46 °C
BPPS-REV	63,21 °C
BPPS-FOR	60,1 °C
IFR-REV	62,98 °C
IFR-FOR	62,07 °C
TPI-REV	64,97 °C
TPI-FOR	64,97 °C
LPPS-REV	63,21 °C
LPPS-FOR	63,21 °C
SS-REV	63,22 °C
SS-FOR	60,76 °C
GERM-REV	63,46 °C
GERM-FOR	61,1 °C

Πίνακας 3.15.

Γονίδιο	Αναμενόμενο Μέγεθος Προϊόντος
SfLTP	134 bp
SfCinSin1	284 bp
SfCinSin2	275 bp
SfBPPS	316 bp
SfIFR	362 bp
SfTPI	273 bp
SsLPPS	322 bp
SsSS	377 bp
Valeriana officinalis germacrene B/C/D	336 bp

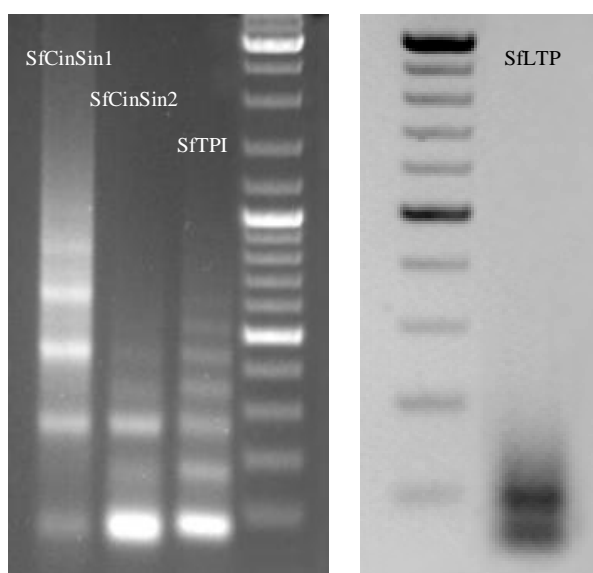
Πίνακας 3.16.

3.3.5. PCR επιθυμητών γονιδίων με μήτρα cDNA & gDNA Φύλλου

PCR με μήτρα cDNA

Για την ενίσχυση των επιθυμητών γονιδίων στο φύλλο εκτελέστηκαν πληθώρα PCR δοκιμών, με μήτρα cDNA που συντέθηκαν με τον εκκινητή *oligo dT*, αλλά και με τους εξιδικευμένους εκκινητές *REV-sp1* και *REV-sp2*, ανά περίπτωση. Το πρωτόκολλο και τα στάδια της αντίδρασης περιγράφονται στην ενότητα 2.4.3 και διαφοροποιήθηκαν ανά γονίδιο, ως προς το T_m , το χρόνο παραμονής στο στάδιο της επιμήκυνσης στους 72°C και των αριθμό των κύκλων. Σε κάθε περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν 20ng cDNA (ή αραιώσεις του αρχικού δείγματος της μήτρας) και μετά το πέρας της εκάστοτε αντίδρασης πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση 15 μl προϊόντος και 2 μl DNA ladder. Στην συνέχεια παρατίθενται ενδεικτικά ορισμένα αποτελέσματα δοκιμών.

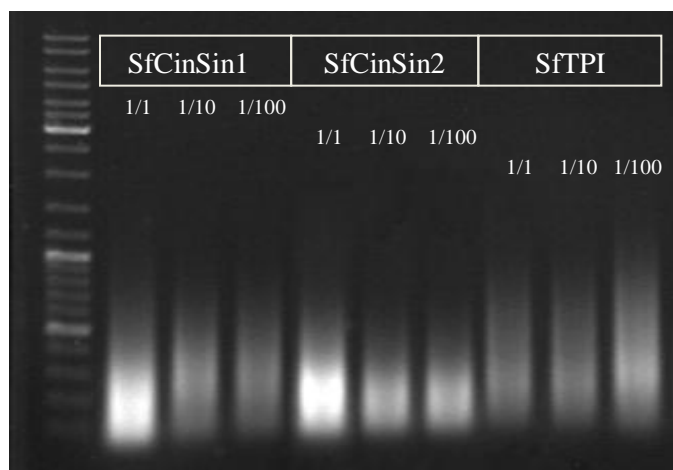
cDNA μήτρα (σύνθεση με oligo dT)



Εικόνα 3.24. & 3.25. Ηλεκτροφορήσεις προϊόντων PCR για τα *SfCinSin1*, *SfCinSin2*, *SfTPI* (αριστερά) & *SfLTP* (δεξιά)

	SfCinSin1, SfCinSin2	SfTPI	SfLTP
Στάδιο	Συνθήκες		
1	94°C για 2 min		
2	94°C για 0,30 min		
3	57°C για 0,30 min	61°C για 0,30 min	63°C για 0,30 min
4	72°C για 0,45 min		72°C για 1 min
5	72°C για 7 min		
6	12°C για 0,50 min		
Αριθμός κύκλων	40		

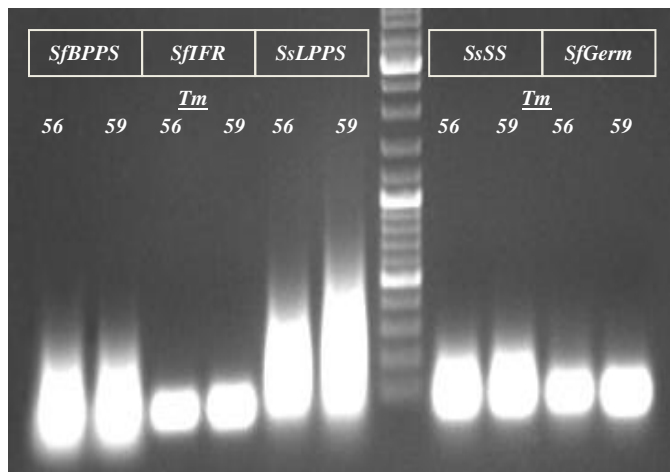
Πίνακας 3.17. Συνθήκες & Στάδια των PCR για τα γονίδια των εικόνων 3.24 & 3.25.



Εικόνα 3.26. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR για τα *SfCinSin1*, *SfCinSin2*, *SfTPI*

	SfCinSin1, SfCinSin2	SfTPI
Στάδιο	Συνθήκες	
1	94°C για 2 min	
2	94°C για 0,30 min	
3	58°C για 0,30 min	62°C για 0,30 min
4	72°C για 0,45 min	
5	72°C για 7 min	
6	12°C για 0,50 min	
Αριθμός κύκλων	40	

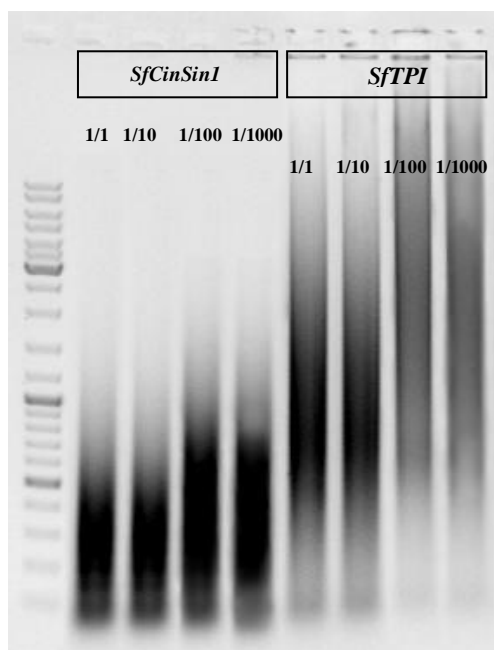
Πίνακας 3.18. Συνθήκες & Στάδια των PCR για τα γονίδια της εικόνας 3.26.



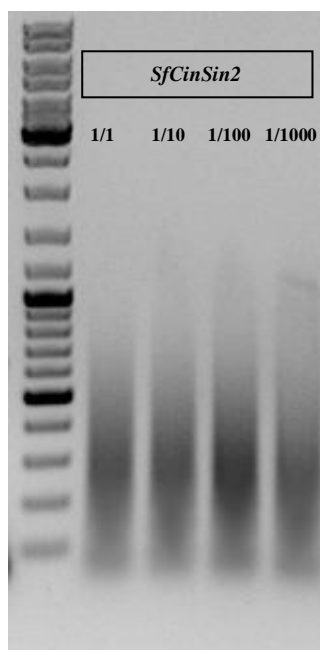
Εικόνα 3.27. Ηλεκτροφορήση προϊόντων PCR για τα SfBPPS, SfIFR, SsLPPS, SsSS, SfGerm

SfBPPS, SfIFR, SsLPPS, SsSS, SfGerm	
Στάδιο	Συνθήκες
1	94°C για 2 min
2	94°C για 0,30 min
3	56°C για 0,30 min 59°C για 0,30 min
4	72°C για 1 min
5	72°C για 7 min
6	12°C για 0,50 min
Αριθμός κύκλων	40

Πίνακας 3.19. Συνθήκες & Στάδια των PCR για τα γονίδια της εικόνας 3.27.

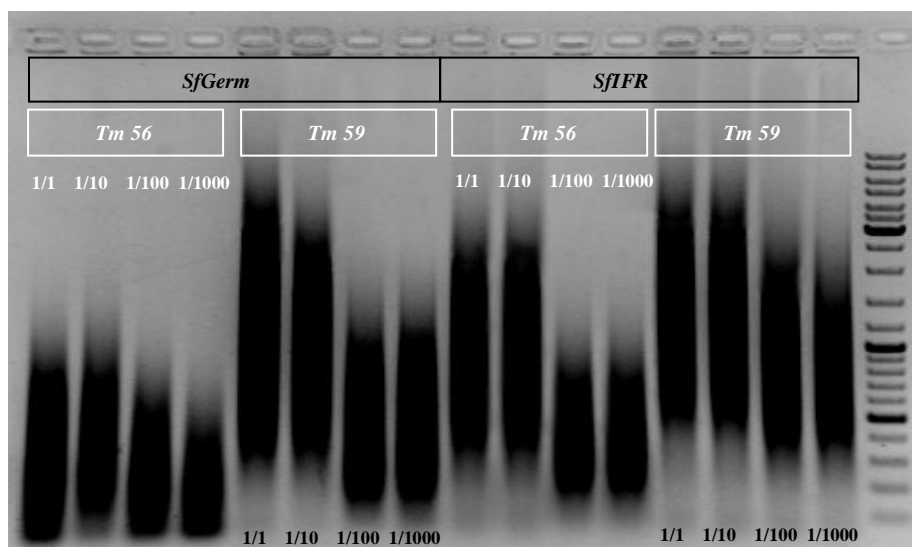


Εικόνα 3.28. Ηλεκτροφορήση προϊόντων PCR reamplification για τα SfCinSin1 & SfTPI



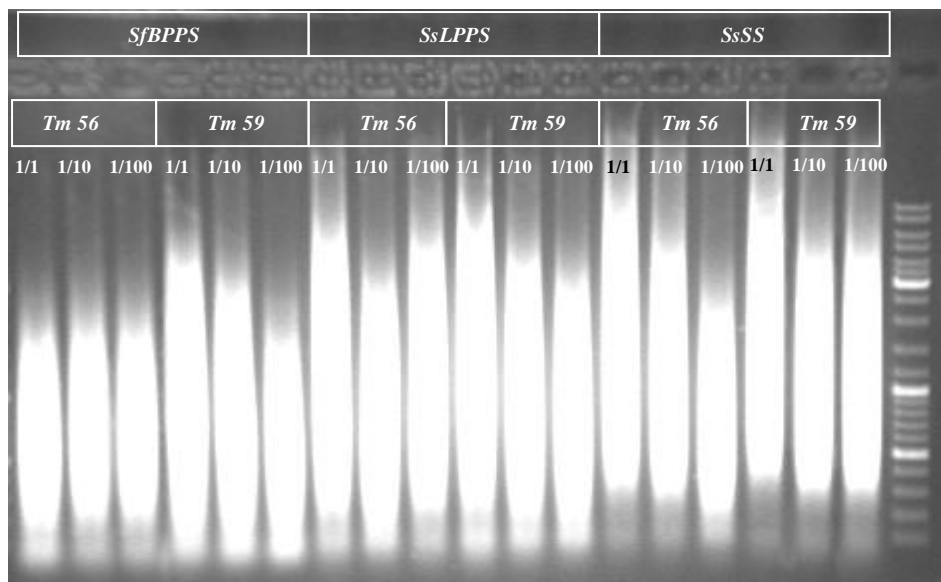
Εικόνα 3.29. Ηλεκτροφορήση προϊόντων PCR reamplification για το SfCinSin2

Για τα γονίδια SfCinSin1, SfCinSin2 και SfTPI εκτελέστηκαν επίσης δοκιμές PCR reamplification, με μήτρα προϊόντα αρχικών PCR, σε κατάλληλες αραιώσεις. Συγκεκριμένα, στα προϊόντα που προέκυψαν από τις PCR που περιγράφονται κατ'αντιστοιχία στον πίνακα 3.17. πραγματοποιήθηκαν οι αραιώσεις 1/10, 1/100, 1/1000, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα (2λ/αντίδραση) για την εκτέλεση νέων PCR τηρώντας τις ίδιες συνθήκες



Εικόνα 3.30. Ηλεκτροφορήση προϊόντων PCR reamplification για τα SfGerm & SfIFR

Ομοίως δοκιμές PCR reamplification, υπό τις ίδιες συνθήκες για κάθε γονίδιο πραγματοποιήθηκαν και για τα γονίδια SfGerm και SfIFR με μήτρα τα προϊόντα των PCR που παρουσιάζονται στο πίνακα 3.19. Χρησιμοποιήθηκαν και πάλι οι αραιώσεις 1/10, 1/100, 1/1000 (2λ/αντίδραση).



Τέλος, αντιδράσεις PCR reamplification έλαβαν χώρα και για τα γονίδια SsLPPS, SsSS και SfBPPS, με μήτρα τα προϊόντα των PCR που παρατίθενται στο πίνακα 3.19. Πραγματοποιήθηκε εκ νέου χρήση των αραιώσεων 1/10 και 1/100 (2λ/αντίδραση).

Εικόνα 3.31. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR reamplification για τα SfBPPS, SsLPPS & SsSS

Όπως προκύπτει και από τα παραπάνω αποτελέσματα δεν κατέστη σε καμία περίπτωση δυνατή η επιτυχημένη ενίσχυση των επιθυμητών γονιδίων, παρά τον σημαντικό αριθμό δοκιμών που διεξήχθησαν στην προσπάθεια βελτίωσης των προσεγγίσεών μας.

Αναλυτικότερα, για το γονίδιο *SfCinSin1*, το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος είναι 284 bp. Αντίδραση με συνθήκες: Tm 57 °C, επιμήκυνση στους 72°C για 0,45 min και 40 κύκλους είχε ως αποτέλεσμα τη λήψη πολλαπλών προϊόντων, ένα εκ των οποίων φαίνεται να προσεγγίζει το επιθυμητό (εικόνα 3.24.). Ωστόσο αντίδραση υπό τις ίδες συνθήκες και με Tm 58°C οδήγησε στη λήψη gel με έντονο smear (εικόνα 3.26.). Η ίδια εικόνα έντονου smear διατηρήθηκε στο σύνολο των δοκιμών που εκτελέστηκαν, στις οποίες υπήρχε μεταβολή μόνο του Tm (54°C, 56°C, 59°C, 61°C, 63°C), αλλά και στις αντιδράσεις PCR reamplification (εικόνα 3.28.).

Παρόμοια εικόνα προέκυψε και για το γονίδιο *SfCinSin2*, με αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος 275 bp. Αντίδραση με συνθήκες: Tm 57 °C, επιμήκυνση στους 72°C για 0,45 min και 40 κύκλους είχε ως αποτέλεσμα τη λήψη και πάλι πολλαπλών προϊόντων, ένα εκ των οποίων φαίνεται να προσεγγίζει το επιθυμητό (εικόνα 3.24.). Παράλληλα, ομοίως με το προηγούμενο PCR υπό τις ίδες συνθήκες και με Tm 58°C οδήγησε στη λήψη gel με έντονο smear (εικόνα 3.26.). Ίδιο αποτέλεσμα εμφανίστηκε και στις υπόλοιπες δοκιμές που έλαβαν χώρα (Tm 54°C, 55°C, 56°C, 61°C, 63°C), καθώς και στις αντιδράσεις PCR reamplification (εικόνα 3.29.).

Ομοίως με τα προηγούμενα, το αποτέλεσμα της PCR με συνθήκες: Tm 61 °C, επιμήκυνση στους 72°C για 0,45 min και 40 κύκλους για το γονίδιο *SfTPI*, ήταν η εμφάνιση περισσότερων του ενός προϊόντων (εικόνα 3.24.), με το αναμενόμενο να διαθέτει μέγεθος 273 bp. Ακόμη, ως προϊόν της αντίδραση με τις ίδιες συνθήκες και Tm 62°C προέκυψε smear, όπως και στις υπόλοιπες αντιδράσεις που διεξήχθησαν (Tm 54°C, 55°C, 59°C, 65°C, 68°C), καθώς και στις αντιδράσεις PCR reamplification (εικόνα 3.28.).

Για το γονίδιο *SfLTP*, με αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος 134 bp, αντίδραση με συνθήκες: Tm 63 °C, επιμήκυνση στους 72°C για 1 min και 40 κύκλους οδήγησε

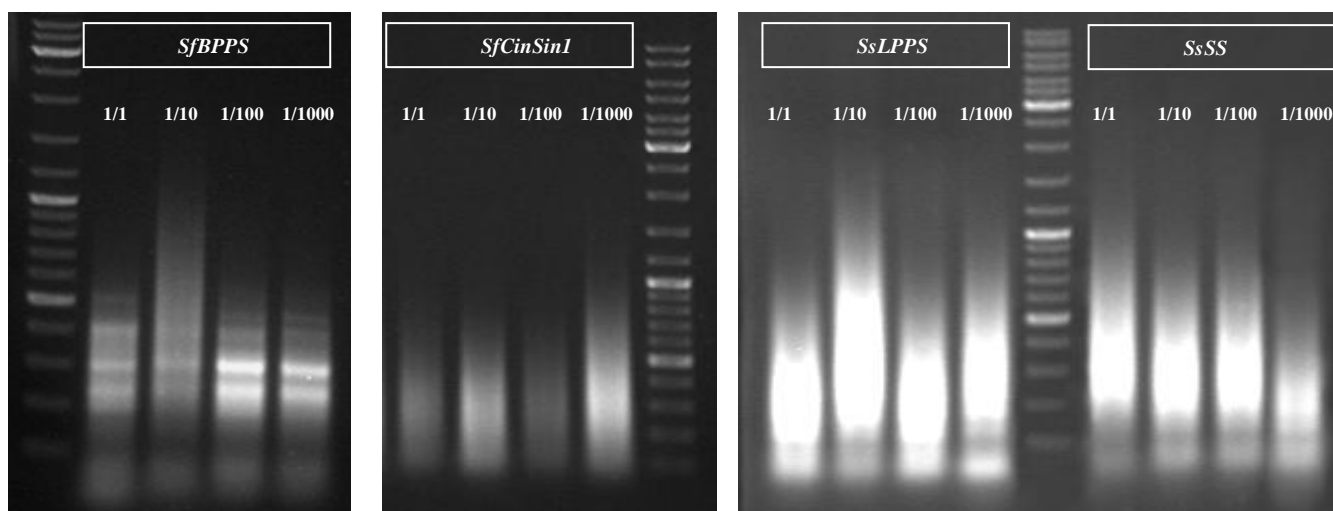
στη λήψη ένος προϊόντος (εικόνα 3.25), ενώ στις υπόλοιπες δοκιμές (Tm 56⁰C, 59⁰C, 61⁰C, 64⁰C) δεν προέκυψε κανένα προϊόν.

Για τα γονίδια **SfIFR** και **SfGerm**, με αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος 362 bp και 336 bp αντίστοιχα, δεν υπήρξε κάποιο προϊόν, σε καμία από τις αντιδράσεις που εκτελέστηκαν (SfIFR: Tm 56⁰C, 59⁰C, 61⁰C, 65⁰C, 66⁰C) και (SfGerm: Tm 56⁰C, 59⁰C, 62⁰C, 65⁰C). Διατηρήθηκε δηλαδή το αποτέλεσμα της εικόνας 3.27. Αντίθετα στις PCR reamplification δοκιμές εμφανίστηκαν και για τα δύο γονίδια διάχυτης μορφής smear (εικόνα 3.30).

Για το γονίδιο **SfBPPS**, με αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος 316 bp η εικόνα 3.27. αντικατοπτρίζει το αποτέλεσμα όλων των δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν (Tm 56⁰C, 59⁰C, 65⁰C, 66⁰C). Παράλληλα εκτελέστηκαν PCR reamplification με Tm 56⁰C, 59⁰C, 62⁰C και 65⁰C, ωστόσο σε όλες τις περιπτώσεις παρουσιάστηκε smear (εικόνα 3.31).

Τέλος για τα γονίδια **SsLPPS** και **SsSS**, με αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος 322 bp και 377 bp αντίστοιχα, το αποτέλεσμα της εικόνας 3.27. είναι ενδεικτικό του συνόλου των gels που προέκυψαν (SsLPPS: Tm 56⁰C, 59⁰C, 61⁰C, 66⁰C) και (SsSS: Tm 56⁰C, 59⁰C, 61⁰C, 65⁰C). Ταυτόχρονα διεξήχθησαν και δοκιμές PCR reamplification με Tm 56⁰C, 59⁰C, 62⁰C και 65⁰C, χωρίς να βελτιώνεται σε καμία περίπτωση το αποτέλεσμα του smear (εικόνα 3.31).

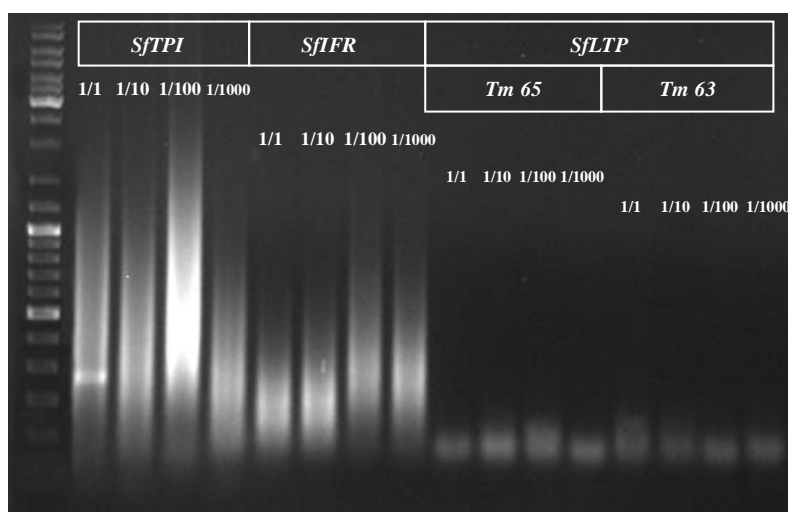
cDNA μήτρα (σύνθεση με REV-sp1 & REV-sp2)



Εικόνα 3.31., 3.32 & 3.33 Ηλεκτροφορήσεις προϊόντων PCR για τα SfBPPS (αριστερά), SfCinSin1 (κέντρο), SsLPPS & SsSS (δεξιά)

	SfBPPS	SfCinSin1	SsLPPS, SsSS
Στάδιο	Συνθήκες		
1	94 ⁰ C για 2 min		
2	94 ⁰ C για 0,30 min		
3	66 ⁰ C για 0,30 min	57 ⁰ C για 0,30 min	58 ⁰ C για 0,30 min
4	72 ⁰ C για 1 min		
5	72 ⁰ C για 7 min		
6	12 ⁰ C για 0,50 min		
Αριθμός κύκλων	40		

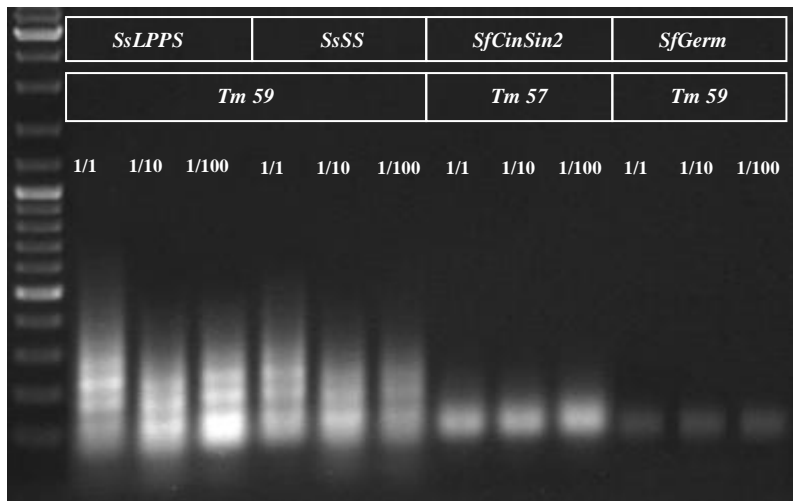
Πίνακας 3.20. Συνθήκες & Στάδια των PCR για τα γονίδια των εικόνων 3.31., 3.32 & 3.33.



	SfTPI, SfLTP	SfIFR, SfLTP
Στάδιο	Συνθήκες	
1	94 ⁰ C για 2 min	
2	94 ⁰ C για 0,30 min	
3	65 ⁰ C για 0,30 min	63 ⁰ C για 0,30 min
4	72 ⁰ C για 1 min	
5	72 ⁰ C για 7 min	
6	12 ⁰ C για 0,50 min	
Αριθμός κύκλων	40	

Πίνακας 3.21. Συνθήκες & Στάδια των PCR για τα γονίδια της εικόνας 3.34.

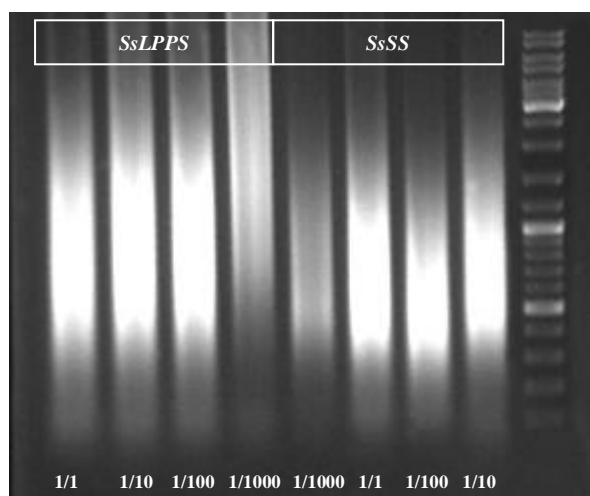
Εικόνα 3.34. Ηλεκτροφορήση προϊόντων PCR για τα SfTPI, SfIFR & SfLTP



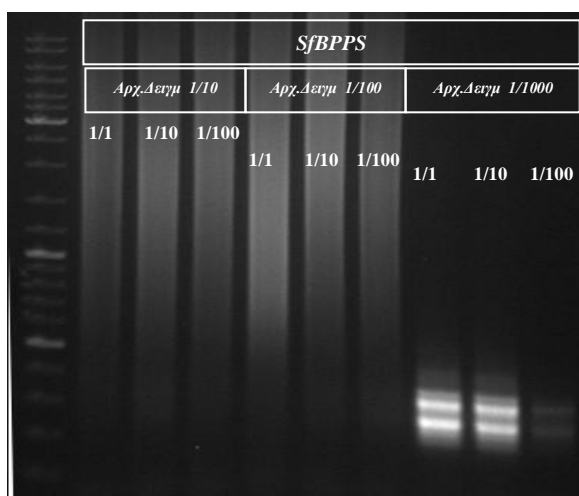
Εικόνα 3.35. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR για τα *SsLPPS*, *SsSS*, *SfCinSin2* & *SfGerm*

	<i>SsLPPS</i> , <i>SsSS</i> , <i>SfGerm</i>	<i>SfCinSin2</i>
Στάδιο	Συνθήκες	
1	94°C για 2 min	
2	94°C για 0,30 min	
3	59°C για 0,30 min	57°C για 0,30 min
4	72°C για 1 min	
5	72°C για 7 min	
6	12°C για 0,50 min	
Αριθμός κύκλων	40	

Πίνακας 3.22. Συνθήκες & Στάδια των PCR για τα γονίδια της εικόνας 3.35.



Εικόνα 3.36. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR reamplification για τα, *SsLPPS* & *SsSS*



Εικόνα 3.37. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR reamplification για το *SfBPPS*, όπου Αρχ. Δεγμ., το αρχικό δείγμα μήτρας που χρησιμοποιήθηκε στο πρώτο PCR

Παράλληλα εκτελέστηκαν δοκιμές PCR reamplification, για τα γονίδια *SsLPPS*, *SsSS* και *SfBPPS* με μήτρα προϊόντα αρχικών PCR, σε κατάλληλες αραιώσεις. Αναλυτικότερα όσον αφορά τα γονίδια *SsLPPS* και *SsSS*, στα προϊόντα τα οποία προέκυψαν από τις PCR που περιγράφονται στον πίνακα 3.22. πραγματοποιήθηκαν οι αραιώσεις 1/10, 1/100, 1/1000, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα (2λ/αντίδραση) για την εκτέλεση νέων PCR, διατηρώντας σταθερές τις συνθήκες της αντίδρασης για κάθε γονίδιο (εικόνα 3.36). Αντίθετα στην περίπτωση του *SfBPPS*, στο αρχικό δείγμα της μήτρας έλαβαν χώρα οι αραιώσεις 1/10, 1/100 και 1/1000, με τις οποίες διεξήχθησαν PCR (2λ/αντίδραση), με τις συνθήκες που περιγράφονται στον πίνακα 3.20. Στην συνέχεια τα προϊόντα κάθε αντίδρασης αραιώθηκαν εκ νέου (1/10 και 1/100), ώστε να πραγματοποιηθούν τελικά οι PCR reamplification, υπό τις ίδιες συνθήκες (εικόνα 3.37).

Όπως φαίνεται και από τα παραπάνω τα αποτελέσματα των δοκιμών με χρήση των εξειδικευμένων εκκινητών *REV-sp1* και *REV-sp2*, για ορισμένα γονίδια είναι εμφανώς διαφοροποιημένα, σε σχέση με αυτά του *oligo dT*. Αρχικά, αντίδραση με συνθήκες: Tm 66 °C, επιμήκυνση στους 72°C για 1 min και 40 κύκλους, για το γονίδιο *SfBPPS* οδήγησε στη λήψη πολλαπλών προϊόντων, ένα εκ των οποίων φαίνεται να προσεγγίζει το ζητούμενο, μεγέθους 316 bp, κυρίως στις αραιώσεις 1/100

και 1/1000 (εικόνα 3.31.). Ωστόσο οι υπόλοιπες αντιδράσεις που διεξήχθησαν με στόχο τη βελτίωση αυτής της εικόνας είτε δεν απέδωσαν κάποιο αποτέλεσμα (T_m 67⁰C, 68⁰C), είτε έδωσαν έντονο smear (T_m 63⁰C, 64⁰C, 65⁰C). Ελαφρώς βελτιωμένη εικόνα παρατηρήθηκε στα αποτελέσματα των PCR reamplification, με χρήση της αραιώσης 1/1000 του αρχικού δείγματος (εικόνα 3.37.).

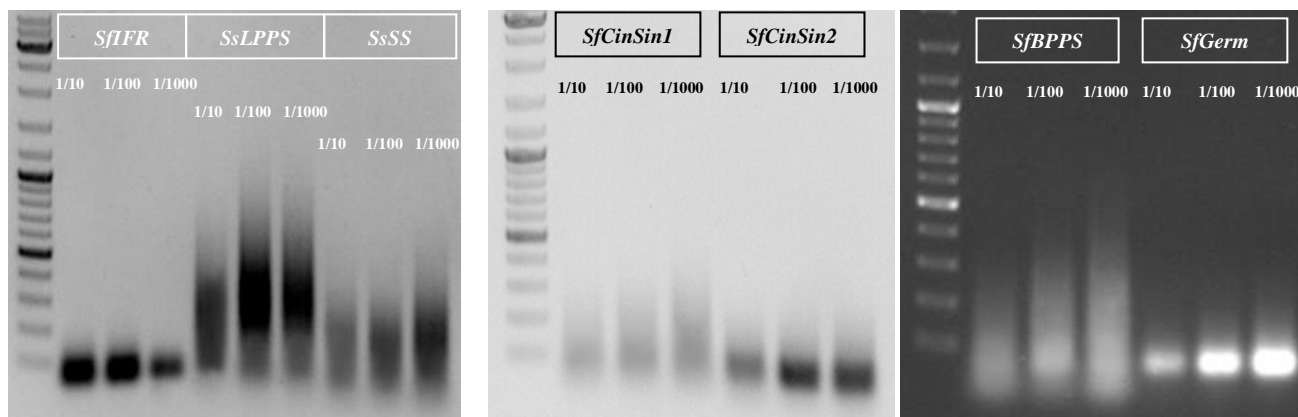
Για το γονίδιο **SfTPI**, στην αραιώση 1/1 PCR με συνθήκες: T_m 65 ⁰C, επιμήκυνση στους 72⁰C για 1 min και 40 κύκλους, είχε ως αποτέλεσμα τη λήψη μοναδικού προϊόντος, με το αναμενόμενο να διαθέτει μέγεθος 273 bp (εικόνα 3.34.). Αντίθετα, σε επόμενες αντιδράσεις (T_m 64⁰C, 66⁰C) προέκυψε σε όλες τις αραιώσεις διάχυτο smear.

Όσον αφορά τα γονίδια **SsLPPS** και **SsSS**, με αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος 322bp και 377 bp αντίστοιχα, χαρακτηριστικό ήταν το αποτέλεσμα της εικόνα 3.35. με τα πολλαπλά προϊόντα. Παρόλα αυτά δεν υπήρξε βελτίωση του αποτελέσματος σε καμία από τις λοιπές κοινές δοκιμές, (T_m 58⁰C, 60⁰C, 62⁰C, 65⁰C, 67⁰C), όπου διατηρήθηκε η εικόνα του έντονου smear (εικόνα 3.33.). Παράλληλα, ενώ διεξήχθησαν και δοκιμές PCR reamplification δεν παρατηρήθηκε βελτίωση του προϊόντος στο gel (εικόνα 3.36.).

Για τα γονίδια **SfLTP** και **SfCinSin2**, **SfGerm** οι εικόνες 3.34. και 3.35. αντίστοιχα είναι ενδεικτικές του αποτελέσματος του συνόλου των δοκιμών που έλαβαν χώρα (SfLTP: T_m 63⁰C, 64⁰C, 65⁰C, 66⁰C), (SfCinSin2: T_m 57⁰C, 60⁰C, 62⁰C, 65⁰C) και (SfGerm: T_m 59⁰C, 62⁰C, 65⁰C). Ομοίως για τα γονίδια **SfIFR** και **SfCinSin1** οι εικόνες 3.34. και 3.32. αντικατοπτρίζουν το αποτέλεσμα όλων των επιμέρους δοκιμών (SfIFR: T_m 63⁰C, 64⁰C, 66⁰C) και (SfCinSin1: T_m 57⁰C, 62⁰C).

PCR με μήτρα γονιδιωματικό DNA

Παράλληλα, για όλα τα γονίδια εκτελέστηκαν πολυάριθμες PCR δοκιμές με μήτρα γονιδιωματικό DNA φύλλου σε διαφορετικές αραιώσεις (1/10, 1/100, 1/1000). Όπως προαναφέρθηκε η αρχική συγκέντρωση του gDNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν 484ng/μl. Οι αντιδράσεις διαφοροποιήθηκαν ως προς το T_m, ανάλογα με το εκάστοτε γονίδιο, ενώ σε όλες τις αντιδράσεις ο χρόνος επιμήκυνσης στους 72°C ήταν 1 λεπτό και ο αριθμός των κύκλων ήταν 30. Τέλος έλαβε χώρα ηλεκτροφόρηση 15μl προϊόντος κάθε αντίδρασης και 2 μl DNA ladder.



Εικόνα 3.38., 3.39 & 3.40. Ηλεκτροφορήσεις προϊόντων PCR για τα *SfIFR*, *SsLPPS*, *SsSS* (αριστερά), *SfCinSin1*, *SfCinSin2* (κέντρο) & *SfBPPS*, *SfGerm* (δεξιά)

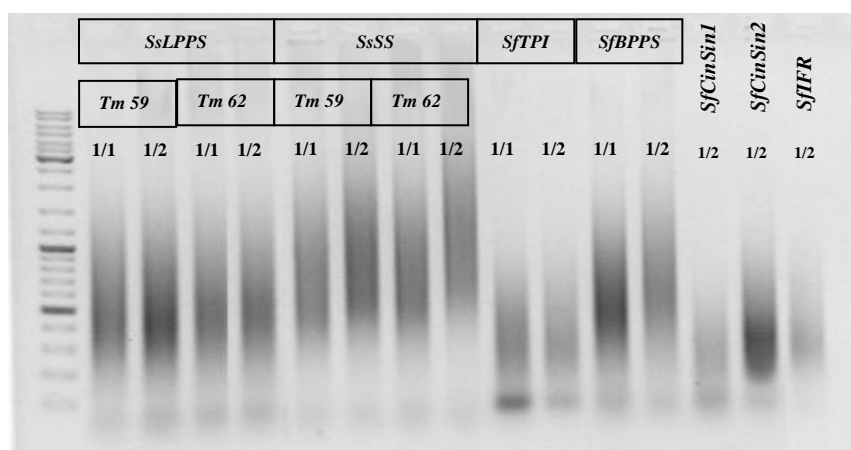
	<i>SfIFR</i>	<i>SsLPPS</i> , <i>SsSS</i>	<i>SfCinSin1</i> , <i>SfCinSin2</i>	<i>SfBPPS</i> , <i>SfGerm</i>
Στάδιο	Συνθήκες			
1	94°C για 2 min			
2	94°C για 0,30 min			
3	57°C για 0,30 min	65°C για 0,30 min	59°C για 0,30 min	61°C για 0,30 min
4	72°C για 1 min			
5	72°C για 7 min			
6	12°C για 0,50 min			
Αριθμός κύκλων	30			

Πίνακας 3.23. Συνθήκες & Στάδια των PCR για τα γονίδια των εικόνων 3.38., 3.39 & 3.40.

Και σε αυτή την περίπτωση δεν παρατηρήθηκε επιτυχημένη ενίσχυση των ζητούμενων γονιδίων. Συγκεκριμένα τα γονίδια *SfCinSin1*, *SfCinSin2* και *SfBPPS* παρουσίασαν όμοια εικόνα με αυτή των 3.39. και 3.40. αντίστοιχα, σε όλες τις αντιδράσεις που διεξήχθησαν (*SfCinSin1* & *SfCinSin2*: T_m 57°C, 59°C, 61°C) και (*SfBPPS*: T_m 59°C, 61°C). Παρόμοια εικόνα με αυτή της 3.38 επικράτησε και για τα γονίδια *SsLPPS*, *SsSS* και *SfIFR* στο σύνολο των δοκιμών τους (*SsLPPS*: T_m 59°C, 63°C, 65°C), (*SsSS*: T_m 62°C, 65°C) και (*SfIFR*: T_m 57°C, 59°C, 62°C). Τέλος όσον αφορά τα γονίδια *SfTPI* και *SfLTP* εκτελέστηκαν για το καθένα, αντιδράσεις με T_m 61°C και 63°C, από τις οποίες δεν προέκυψε κανένα προϊόν (κενό gel).

3.3.6. PCR επιθυμητών γονιδίων με μήτρα cDNA Τρίχας

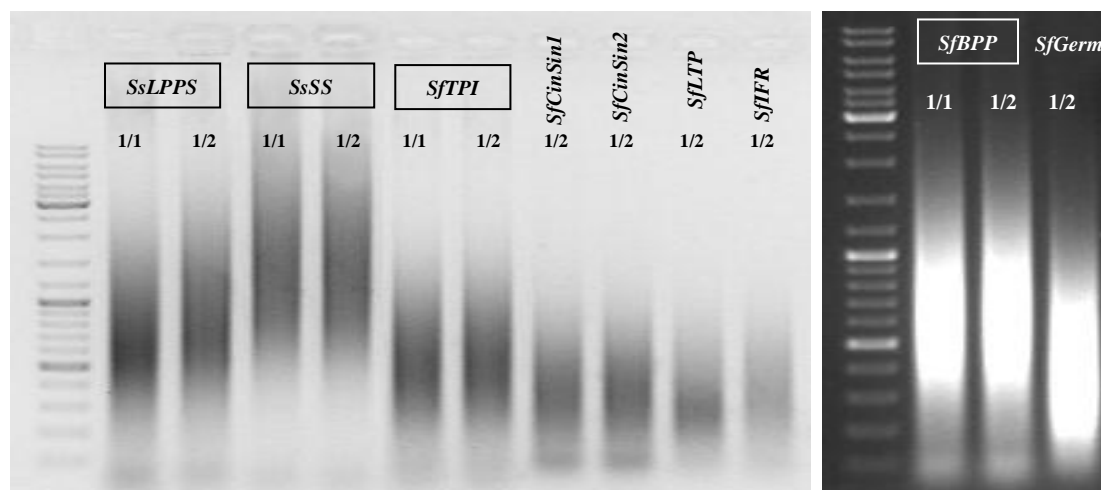
Τέλος, παρόλο που οι παραπάνω δοκιμές δεν απέδωσαν κάποια σαφή αποτελέσματα κρίθηκε σκόπιμο, να προχωρήσει η προσπάθεια μελέτης των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων και στη τρίχα του φυτού *Salvia sclarea*. Ως μήτρα στις PCR αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν 20ng cDNA (ή κατάλληλες αραιώσεις της μήτρας), το οποίο συντέθηκε με το εκκινητή *REV-sp Total*. Ομοίως, οι συνθήκες κάθε αντίδρασης (όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.4.3) καθορίστηκαν από το εκάστοτε γονίδιο, ενώ μετά την ολοκλήρωση κάθε αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν 15 μl προϊόντος και 2 μl DNA ladder. Σε όλες τις αντιδράσεις ο χρόνος επιμήκυνσης στους 72°C ήταν 1 λεπτό.



Στάδιο	Συνθήκες	
	1	94°C για 2 min
2	94°C για 0,30 min	
3	59°C για 0,30 min	62°C για 0,30 min
4	72°C για 1 min	
5	72°C για 7 min	
6	12°C για 0,50 min	
Αριθμός κύκλων	45	

Πίνακας 3.24. Συνθήκες & Στάδια των PCR για τα γονίδια της εικόνας 3.41.

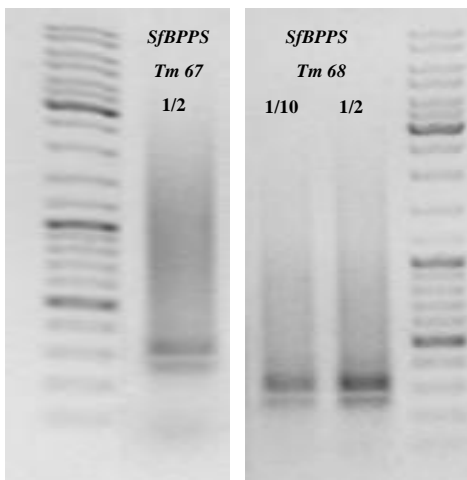
Εικόνα 3.41. Ηλεκτροφορήση προϊόντων PCR για τα *SsLPPS*, *SsSS*, *SfTPI*, *SfBPPS*, *SfCinSin1*, *SfCinSin2*, *SfIFR*



Εικόνα 3.42. & 3.43. Ηλεκτροφορήσεις προϊόντων PCR για τα *SsLPPS*, *SsSS*, *SfTPI*, *SfCinSin1*, *SfCinSin2*, *SfLTP*, *SfIFR* (αριστερά) & *SfBPPS*, *SfGerm* (δεξιά)

Στάδιο	SfCinSin1, SfCinSin2, SfLTP	SsLPPS, SsSS, SfTPI, SfIFR	SfBPPS, SfGerm
		Συνθήκες	
1	94°C για 2 min		
2	94°C για 0,30 min		
3	57°C για 0,30 min	65°C για 0,30 min	66°C για 0,30 min
4	72°C για 1 min		
5	72°C για 7 min		
6	12°C για 0,50 min		
Αριθμός κύκλων	45		

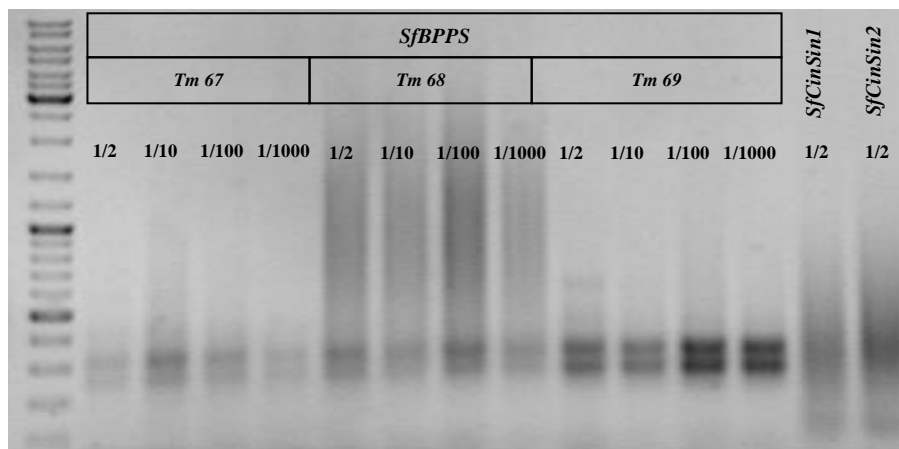
Πίνακας 3.25. Συνθήκες & Στάδια των PCR για τα γονίδια των εικόνων 3.42 & 3.43.



Εικόνα 3.44. & 3.45. Ηλεκτροφορήσεις προϊόντων PCR για το *SfbPPS*

Στάδιο	SfbPPS	
	Συνθήκες	
1	94°C για 2 min	
2	94°C για 0,30 min	
3	68°C για 0,30 min	67°C για 0,30 min
4	72°C για 1 min	
5	72°C για 7 min	
6	12°C για 0,50 min	
Αριθμός κύκλων	45	

Πίνακας 3.26. Συνθήκες & Στάδια των PCR για τα γονίδια των εικόνων 3.44. & 3.45.



Εικόνα 3.46. Ηλεκτροφορήση προϊόντων PCR για τα *SfbPPS*, *SfCinSin1*, *SfCinSin2*

Στάδιο	SfbPPS				SfCinSin1, SfCinSin2	
	Συνθήκες					
1	94°C για 2 min					
2	94°C για 0,30 min					
3	67°C για 0,30 min	68°C για 0,30 min	69°C για 0,30 min	65°C για 0,30 min		
4	72°C για 1 min					
5	72°C για 7 min					
6	12°C για 0,50 min					
Αριθμός κύκλων	40				45	

Πίνακας 3.27. Συνθήκες & Στάδια των PCR για τα γονίδια της εικόνας 3.46.

Όπως και στα προηγούμενα πειράματα στο φύλλο του φυτού, έτσι και στην περίπτωση της τρίχας δεν κατέστη τελικά εφικτή η επιτυχημένη ενίσχυση των επιθυμητών γονιδίων.

Πιο συγκεκριμένα, για το γονίδιο *SfbPPS* αντίδραση με συνθήκες: Tm 66 °C και 45 κύκλους, είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση έντονου smear (εικόνα 3.43.), σε αντίθεση με το αποτέλεσμα της αντίδρασης στο φύλλο, με το εκκινητή *REV-sp1*. Ωστόσο, οι αντιδράσεις με συνθήκες: Tm 67 °C, 45 κύκλους (εικόνα 3.44.) και Tm 68 °C, 45 κύκλους (εικόνα 3.45.) οδήγησαν στην λήψη δύο προϊόντων, ένα εκ των οποίων προσεγγίζει άριστα το αναμενόμενο, μεγέθους 316 bp. Με στόχο την

βελτίωση των αποτελεσμάτων για τη λήψη του ως μοναδικού προϊόντος, εκτελέστηκε αντίδραση με συνθήκες: Tm 69 °C και 45 κύκλους, αποτέλεσμα της οποίας ήταν και πάλι η εμφάνιση smear. Στην συνέχεια διεξήχθησαν αντιδράσεις στις ίδιες θερμοκρασίες (Tm 67 °C, Tm 68 °C, Tm 69 °C), αλλά στους 40 κύκλους, χωρίς όμως να υπάρξει σημαντική βελτίωση των αποτελεσμάτων (εικόνα 3.46.). Τέλος έλαβαν χώρα εκ νέου αντιδράσεις με τις ίδιες θερμοκρασίες στους 35 κύκλους, από τις οποίες δεν προέκυψε κανένα απολύτως προϊόν.

Σχετικά με τα γονίδια *SsLPPS* και *SsSS*, οι εικόνες 3.41. και 3.42. χαρακτηρίζουν τα αποτελέσματα του συνόλου των δοκιμών που έλαβαν χώρα, κοινές και για τα δύο (Tm 57 °C, Tm 59 °C, Tm 62 °C, Tm 65 °C, Tm 67 °C, Tm 69 °C). Ομοίως στις ίδιες φωτογραφίες απεικονίζεται η γενικότερη εικόνα όλων των αποτελεσμάτων και για τα γονίδια *SfCinSin1* και *SfCinSin2* (*SfCinSin1* & *SfCinSin2*: Tm 57 °C, Tm 59 °C, Tm 62 °C, Tm 65 °C). Στις εικόνες αυτές παρατίθεται ακόμη, η συνολική εικόνα των προϊόντων των αντιδράσεων των γονιδίων *SfTPI* και *SfIFR* (*SfTPI*: Tm 57 °C, 59 °C, Tm 62°C, Tm 65 °C, Tm 67 °C, Tm 68°C) και (*SfIFR*: Tm 57 °C, 59 °C, Tm 62°C, Tm 65 °C, Tm 67 °C). Παράλληλα, για το γονίδιο *SfTPI* εκτελέστηκε αντίδραση με Tm 65 °C και 40 κύκλους, το αποτέλεσμα της οποίας είχε τη μορφή smear, ενώ στο φύλλο αντίδραση με τις ίδιες συνθήκες είχε ως αποτέλεσμα τη λήψη μοναδικού προϊόντος.

Για το γονίδιο *SfGerm* αντίδραση με συνθήκες: Tm 66 °C και 45 κύκλους οδήγησε στην λήψη της εικόνας 3.43. Παρόμοια εικόνα προέκυψε και στις υπόλοιπες αντιδράσεις (Tm 59 °C, Tm 62°C, Tm 67 °C). Τέλος, ομοίως για το γονίδιο *SfLTP*, το αποτέλεσμα της εικόνας 3.42. είναι ενδεικτικό όλων των αντιδράσεων που πραγματοποιήθηκαν (Tm 57 °C, 59 °C, Tm 62°C, Tm 65 °C, Tm 67 °C).

3.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

3.4.1. Ποιοτικές μετρήσεις

Με σκοπό την αποτελεσματικότερη παρακολούθηση της εξέλιξης της ιστοκαλλιέργειας, αλλά και την συγκριτική μελέτη της επίδρασης των διαφορετικών χειρισμών στα έκφυτα πραγματοποιήθηκε διαρκής λήψη φωτογραφιών. Με το τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η παρατήρηση χαρακτηριστικών όπως είναι το χρονικό διαστήμα εμφάνισης, το μέγεθος και το χρώμα των κάλλων, μεταξύ των χειρισμών. Οι φωτογραφίες που παρατίθενται στην συνέχεια απεικονίζουν την πορεία τόσο της καλλογένεσης, όσο και της βλαστογένεσης, ανα βδομάδα και ανα χειρισμό.

Καλλογένεση

Όσον αφορά την καλλογένεση με χρήση «leaf disks» από το φυτό *Salvia sclarea* καταλληλότερα αποδόθηκαν τα υποστρώματα MS-C12 (1mg/L 2,4 D + 0,1mg/L BA) και MS-C15 (1mg/L NAA + 0,1mg/L BA), όπου παρατηρήθηκαν και τα μεγαλύτερα ποσοστά καλλογένεσης, 35,83% και 31,19% αντίστοιχα. Παράλληλα, και στους δύο αυτούς χειρισμούς η εξέλιξη της καλλογένεσης ακολουθεί παρόμοια πορεία στο χρόνο, με μόνη διαφοροποίηση την εμφάνιση εκτεταμένων νεκρωτικών «σημείων» («brown necrotic areas») στους κάλλους του υποστρώματος MS-C15 την 6^η εβδομάδα. Το φαινόμενο αυτό ωστόσο δεν φαίνεται να δρα ανασταλτικά στην καλλογένεση, καθώς η αύξηση του κάλλου συνεχίζεται με σταθερό ρυθμό. Και στους δύο χειρισμούς απαντώνται εύρωστοι κάλλοι, έντονου πράσινου χρώματος και αρκετά συμπαγείς, ενώ η ίδια εικόνα διατηρείται και στην περίπτωση τεμαχισμού και ανακαλλιέργειας των κάλλων. Σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά καλλογένεσης προκύπτουν στα υποστρώματα MS-C11 (2mg/L 2,4 D) και MS-C14 (2mg/L NAA), 29,17% και 26,08% αντίστοιχα, όπου η ανάπτυξη κάλλου πραγματοποιείται σχεδόν 10 ημέρες αργότερα σε σύγκριση με τα προηγούμενα.

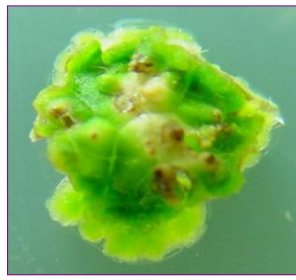
Παράλληλα, οι κάλλοι που προκύπτουν είναι μικρότερου μεγέθους, κιτρινωπού χρώματος και η εμφάνιση νεκρωτικών σημείων σε αυτούς γίνεται ταχύτερα, κυρίως στο υπόστρωμα MS-C14. Μάλιστα στο χρονικό διάστημα των 8-9 εβδομάδων οι κάλλοι των υποστρωμάτων MS-C11 και MS-C14 παρουσιάζουν πλήρη νέκρωση («total browning»), σε αντίθεση με αυτούς των MS-C12 και MS-C15, οι οποίοι αναπτύσσονται κανονικά, και το μέγεθος των «σημείων» διατηρείται σταθερό. Τέλος μηδενικό ποσοστό καλλογένεσης σημειώνεται για τα υποστρώματα MS-C13 (2mg/L 2,4 D + 0,2mg/L BA) και MS-C16 (2mg/L NAA + 0,2mg/L BA), όπου πραγματοποιείται σταδιακά πλήρη νέκρωση των εκφύτων στις 37 ημέρες περίπου, πριν την τελική αποδιαφοροποίηση και την αναπύξιν κάλλου. Την πρώτη εβδομάδα η πορεία των εκφύτων είναι κοινή με τους άλλους χειρισμούς, (διόγκωση ελαφρώς μικρότερου μεγέθους), την 2^η εβδομάδα ωστόσο ξεκινάει η εμφάνιση νεκρωτικών περιοχών στην περιφέρεια των εκφύτων.



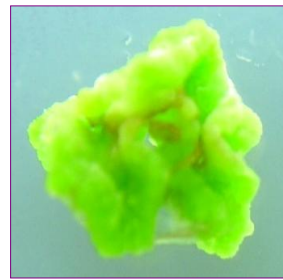
Εικόνα 3.47.



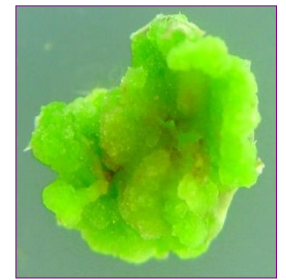
Εικόνα 3.48.



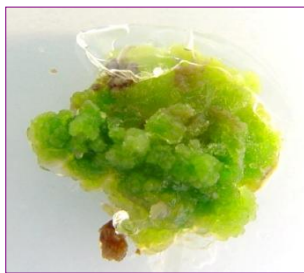
Εικόνα 3.49.



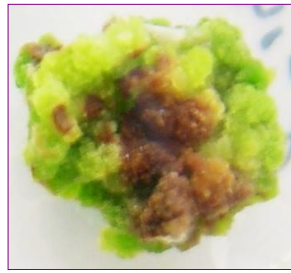
Εικόνα 3.50.



Εικόνα 3.51.



Εικόνα 3.52.



Εικόνα 3.53.



Εικόνα 3.54.



Εικόνα 3.55.

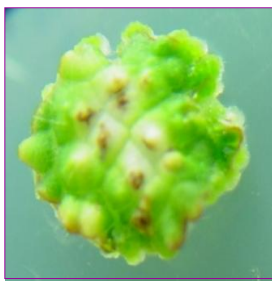
Εικόνες 3.47.- 3.55. Απεικόνιση της πορείας της ιστοκαλλιέργειας έκφυτων φύλλου *Salvia sclarea* στα θρεπτικά υποστρώματα MS-CL2 & MS-CL5

Χρόνος σε ημέρες	Εικόνα	Παρατηρήσεις
Ημέρα 0	Εικόνα 3.47.	Leaf disk-Εγκατάσταση ιστοκαλλιέργειας στα θρεπτικά υποστρώματα MS-CL2 & MS-CL5*
Ημέρα 7 ^η	Εικόνα 3.48.	Έντονη διόγκωση του έκφυτου*
Ημέρα 14 ^η	Εικόνα 3.49.	Έναρξη αποδιαφοροποίησης από την βάση*
Ημέρα 30 ^η	Εικόνα 3.50.	Σχηματισμός κάλλου*
Ημέρα 37 ^η	Εικόνα 3.51.	Αύξηση μεγέθους κάλλου, συμπαγούς μορφής*
Ημέρα 45 ^η	Εικόνα 3.52.	Αυξημένος σε μέγεθος κάλλος, πράσινου χρώματος, στο υπόστρωμα MS-CL2
	Εικόνα 3.53.	Αυξημένος σε μέγεθος κάλλος, πράσινου χρώματος, στο υπόστρωμα MS-CL5 Υπαρξη εκτεταμένων «νεκρωτικών σημείων»
Ημέρα 56 ^η	Εικόνα 3.54.	Σταθεροποίηση αύξησης κάλλου, πράσινου χρώματος (υπόστρωμα MS-CL2)
	Εικόνα 3.55.	Αύξηση κάλλου παράλληλα με την αύξηση των «νεκρωτικών σημείων», μέχρι την σταθεροποίηση του (υπόστρωμα MS-CL5)
*Σημείωση: Η εξέλιξη της καλλογένεσης & η μορφολογία των έκφυτων ήταν παρόμοια στα δύο υποστρώματα, μέχρι το τέλος της 5 ^{ης} εβδομάδας		

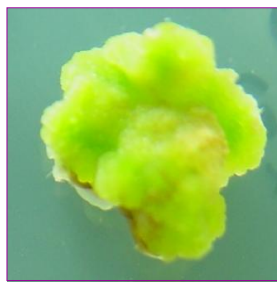
Πίνακας 3.28. Συνοπτική περιγραφή της πορείας της ιστοκαλλιέργειας στα θρεπτικά υποστρώματα MS-CL2 & MS-CL5



Εικόνα 3.56.



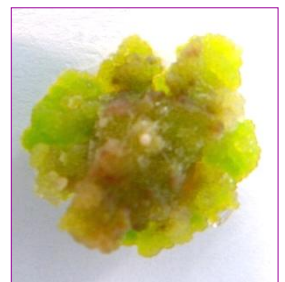
Εικόνα 3.57.



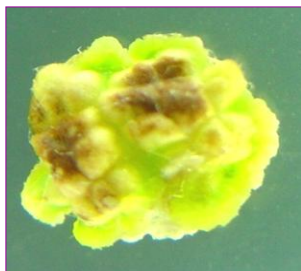
Εικόνα 3.58.



Εικόνα 3.59.



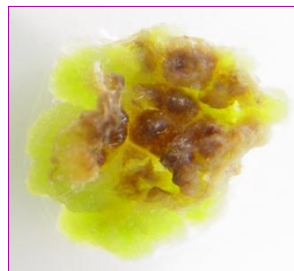
Εικόνα 3.60.



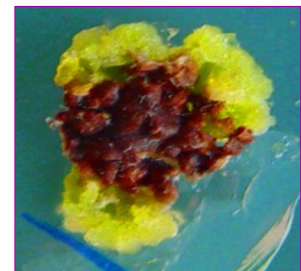
Εικόνα 3.61.



Εικόνα 3.62.



Εικόνα 3.63.



Εικόνα 3.64.

Εικόνες 3.56.- 3.64. Απεικόνιση της πορείας της ιστοκαλλιέργειας έκφυτων φύλλων *Salvia sclarea* στα θρεπτικά υποστρώματα MS-CL1 & MS-CL4

Χρόνος σε ημέρες	Εικόνα	Παρατηρήσεις
Ημέρα 14 ^η	Εικόνα 3.56.	Έναρξη διόγκωσης του έκφυτου**
Ημέρα 25 ^η	Εικόνα 3.57.	Αύξηση του βαθμού διόγκωσης, μικρή αποδιαφοροποίηση στη βάση, στο υπόστρωμα MS-CL1
	Εικόνα 3.61.	Μεγαλύτερη αποδιαφοροποίηση, κιτρίνισμα έκφυτου με ταυτόχρονη ύπαρξη εκτεταμένων «νεκρωτικών σημείων», στο υπόστρωμα MS-CL4
Ημέρα 40 ^η	Εικόνα 3.58.	Σχηματισμός κίτρινοπράσινου κάλλου, μικρού μεγέθους, στο υπόστρωμα MS-CL1
	Εικόνα 3.62.	Σχηματισμός κίτρινου κάλλου, μικρού μεγέθους, στο υπόστρωμα MS-CL4
Ημέρα 47 ^η	Εικόνα 3.59.	Αύξηση μεγέθους κάλλου, συμπαγούς μορφής στο υπόστρωμα MS-CL1
	Εικόνα 3.63.	Αύξηση μεγέθους κάλλου, ταχύρυθμη επέκταση των «νεκρωτικών σημείων» στο υπόστρωμα MS-CL4
Ημέρα 53 ^η	Εικόνα 3.60.	Σταδιακό κιτρίνισμα κάλλου, σταθεροποίηση μεγέθους, εμφάνιση «νεκρωτικών σημείων» στο υπόστρωμα MS-CL1
	Εικόνα 3.64.	Σταθεροποίηση μεγέθους κάλλου, σχεδόν πλήρης νέκρωση του ιστού

**Σημείωση: Δεν σημειώθηκαν αλλαγές στα έκφυτα, σε κανένα από τα δύο υποστρώματα νωρίτερα από την 2^η εβδομάδα. Πλήρης νέκρωση των κάλλων παρατηρείται περίπου στις 60 ημέρες, τόσο στο MS-CL1 όσο και στο MS-CL4

Πίνακας 3.29. Συνοπτική περιγραφή της πορείας της ιστοκαλλιέργειας στα θρεπτικά υποστρώματα MS-CL1 & MS-CL4



Εικόνα 3.65.



Εικόνα 3.66.



Εικόνα 3.67.

Εικόνες 3.41.- 3.43. Απεικόνιση της κοινής πορείας της ιστοκαλλιέργειας έκφυτων φύλλων *Salvia sclarea* στα θρεπτικά υποστρώματα MS-CL3 & MS-CL6

Χρόνος σε ημέρες	Εικόνα	Παρατηρήσεις
Ημέρα 14 ^η	Εικόνα 3.65.	Έκφυτα φύλλων ελαφρώς διογκωμένα, εμφάνιση «νεκρωτικών περιοχών» στην περιφέρεια των έκφυτων***
Ημέρα 30 ^η	Εικόνα 3.66.	Χαμηλή αποδιαφοροποίηση, επέκταση «νεκρωτικών περιοχών» παράλληλα με την αύξηση του μεγέθους των έκφυτων***
Ημέρα 37 ^η	Εικόνα 3.67.	Πλήρης νέκρωση έκφυτων, δεν σχηματίζεται κάλλος***
***Σημείωση: Μεταξύ των δύο χειρισμών MS-CL3 & MS-CL6, καθόλη τη διάρκεια της ιστοκαλλιέργειας δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην ανταπόκριση των έκφυτων		

Πίνακας 3.30. Συνοπτική περιγραφή της κοινής πορείας της ιστοκαλλιέργειας στα θρεπτικά υποστρώματα MS-CL3 & MS-CL6

Βλαστογένεση

Όσον αφορά την βλαστογένεση, ως αρχικό φυτικό υλικό χρησιμοποιήθηκαν τόσο έκφυτα φύλλου, όσο και κάλλοι του φυτού *Salvia sclarea*. Για το σκοπό αυτόν έλαβαν χώρα πολυάριθμες δοκιμές με 10 διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα, ωστόσο η επίτευξη της δεν κατέστη δυνατή σε καμία περίπτωση. Αντίθετα, σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις σημειώθηκε ανάπτυξη κάλλου ή αύξηση του μεγέθους του ήδη υπάρχοντος, με εξαίρεση τα θρεπτικά υποστρώματα MS-S17 (5mg/L BA + 0,5mg/L NAA) και MS-S110 (5mg/L Kinetin + 0,5mg/L NAA) όπου δεν παρατηρήθηκε κανένα ίχνος αποδιαφοροποίησης. Ιδιαίτερα ενδιαφέρονσα κρίνεται η ανάπτυξη κάλλου από τα «leaf disks», στα υποστρώματα MS-S11 (2mg/L BA) και MS-S12 (5mg/L BA), όπου δεν υπήρχε προσθήκη αυξινών. Το γεγονός αυτό ενδεχομένως να υποδηλώνει αυξημένα επίπεδα ενδογενών αυξινών. Παράλληλα σημειώθηκε πλήρης νέκρωση των κάλλων που μεταφέρθηκαν σε αυτά. Μάλιστα, στα υποστρώματα MS-S13 (1mg/L BA + 0,1mg/L 2,4 D) και MS-S14 (1mg/L BA + 0,1mg/L NAA) είτε μετά την μεταφορά κάλλων, είτε με χρήση leaf disks ως έκφυτα, απαντώνται εύρωστοι, ευμεγέθεις κάλλοι, πράσινου χρώματος, παρόμοιας μορφολογίας με αυτούς των υποστρωμάτων MS-C12 και MS-C15 αντίστοιχα.



Εικόνα 3.68. Σχηματισμός κάλλου από leaf disk στο MS-S11 (2mg/L BA), την 8^η εβδομάδα



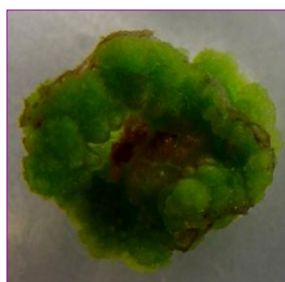
Εικόνα 3.69. Νέκρωση κάλλου, ο οποίος μεταφέρθηκε στο MS-S11 (2mg/L BA), την 8^η εβδομάδα



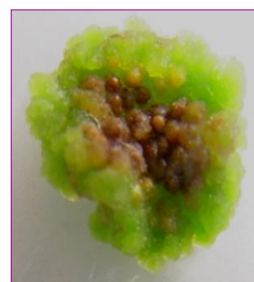
Εικόνα 3.70. Σχηματισμός κάλλου από leaf disk στο MS-S12 (5mg/L BA), την 6^η εβδομάδα



Εικόνα 3.71. Νέκρωση σε leaf disk στο MS-S110, χωρίς εμφανή αποδιαφοροποίηση την 2^η εβδομάδα



Εικόνα 3.72. Σχηματισμός πράσινου κάλλου από leaf disk στο MS-S13, την 8^η εβδομάδα



Εικόνα 3.73. Σχηματισμός κάλλου με «νεκρωτικά σημεία» από leaf disk στο MS-S14, την 7^η εβδομάδα

3.4.2. Ποσοτικές μετρήσεις

Παράλληλα με τις ποιοτικές μετρήσεις διεξήχθησαν και μετρήσεις όσον αφορά το χρονικό διάστημα εμφάνισης των κάλλων, το νωπό βάρος τους, καθώς και τα ποσοστά καλλογένεσης και βλαστογένεσης, καθόλη τη διάρκεια των πειραμάτων. Επιπρόσθετα, μια ακόμη παράμετρος που χρησιμοποιείται συχνά για την αξιολόγηση της εξέλιξης της καλλογένεσης είναι ο «δείκτης ανάπτυξης-growth index». Το νωπό βάρος ως μέτρηση υποδηλώνει την απόλυτη βιομάζα ενός ιστού μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή, όχι όμως και το δυναμικό ανάπτυξής του, το οποίο αντιπροσωπεύεται από τον «δείκτη ανάπτυξης». Αναλυτικότερα, ο «growth index» συσχετίζει την βιομάζα μιας δεδομένης χρονικής στιγμής, με την αρχική και υπολογίζεται από τον τύπο:

$$GI = (W_T - W_0) / W_0$$

όπου: ως GI ορίζεται ο «growth index», ως W_T το νωπό βάρος για τη δεδομένη χρονική στιγμή της μέτρησης, και W_0 το αρχικό βάρος.

Αποτελέσματα καλλογένεσης

Με σκοπό την λήψη των ποσοτικών μετρήσεων μελετήθηκε η πορεία της καλλογένεσης 15 έκφυτων από κάθε χειρισμό. Πραγματοποιήθηκε καταγραφή του νωπού τους βάρους, σε ζυγό ακριβείας, ανά εβδομάδα και υπολογίστηκε ο μέσος όρος και «ο δείκτης ανάπτυξης». Το ποσοστό καλλογένεσης αναφέρεται στο συνολικό αριθμό των κάλλων που σχηματίστηκαν σε κάθε χειρισμό. Ακολουθεί συνοπτική παράθεση όλων των δεδομένων στους πίνακες 3.31-3.36 και στα διαγράμματα 3.1-3.3.

ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ	ΧΡΟΝΟΣ (σε ημέρες)	ΝΩΠΟ ΒΑΡΟΣ (σε g)	ΠΟΣΟΣΤΟ ΚΑΛΛΟΓΕΝΕΣΗΣ	GI
2,4 D /BA (1mg/L/0,1mg/L)	0	0,0188	35,83%	0
	7	0,0639		2,39
	14	0,1297		5,89
	21	0,3461		17,40
	28	0,4043		20,50
	35	0,513		26,28
	42	0,5982		30,81
	49	0,6032		31,08
	56	0,5997		30,89

Πίνακας 3.31. Παράθεση των μετρήσεων για το υπόστρωμα MS-CL 2

ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ	ΧΡΟΝΟΣ (σε ημέρες)	ΝΩΠΟ ΒΑΡΟΣ (σε g)	ΠΟΣΟΣΤΟ ΚΑΛΛΟΓΕΝΕΣΗΣ	GI
ΝΑΑ/ΒΑ (1mg/L/0,1mg/L)	0	0,0182	31,19%	0
	7	0,06122		2,36
	14	0,1039		4,70
	21	0,2677		13,70
	28	0,3991		20,92
	35	0,5093		26,98
	42	0,5642		30
	49	0,5918		31,51
	56	0,5802		30,87

Πίνακας 3.32. Παράθεση των μετρήσεων για το υπόστρωμα MS-CL 5

ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ	ΧΡΟΝΟΣ (σε ημέρες)	ΝΩΠΟ ΒΑΡΟΣ (σε g)	ΠΟΣΟΣΤΟ ΚΑΛΛΟΓΕΝΕΣΗΣ	GI
2,4 D /BA (2mg/L/0,2mg/L)	0	0,0183	0%	0
	7	0,0321		0,75
	14	0,0625		2,41
	21	0,1173		5,40
	28	0,1039		4,67
	35	0,0996		4,44

Πίνακας 3.33 Παράθεση των μετρήσεων για το υπόστρωμα MS-CL 3

ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ	ΧΡΟΝΟΣ (σε ημέρες)	ΝΩΠΟ ΒΑΡΟΣ (σε g)	ΠΟΣΟΣΤΟ ΚΑΛΛΟΓΕΝΕΣΗΣ	GI
NAA/BA (2mg/L/0,2mg/L)	0	0,0187	0%	0
	7	0,0203		0,08
	14	0,0321		0,71
	21	0,0689		2,68
	28	0,0724		2,87
	35	0,0709		2,79

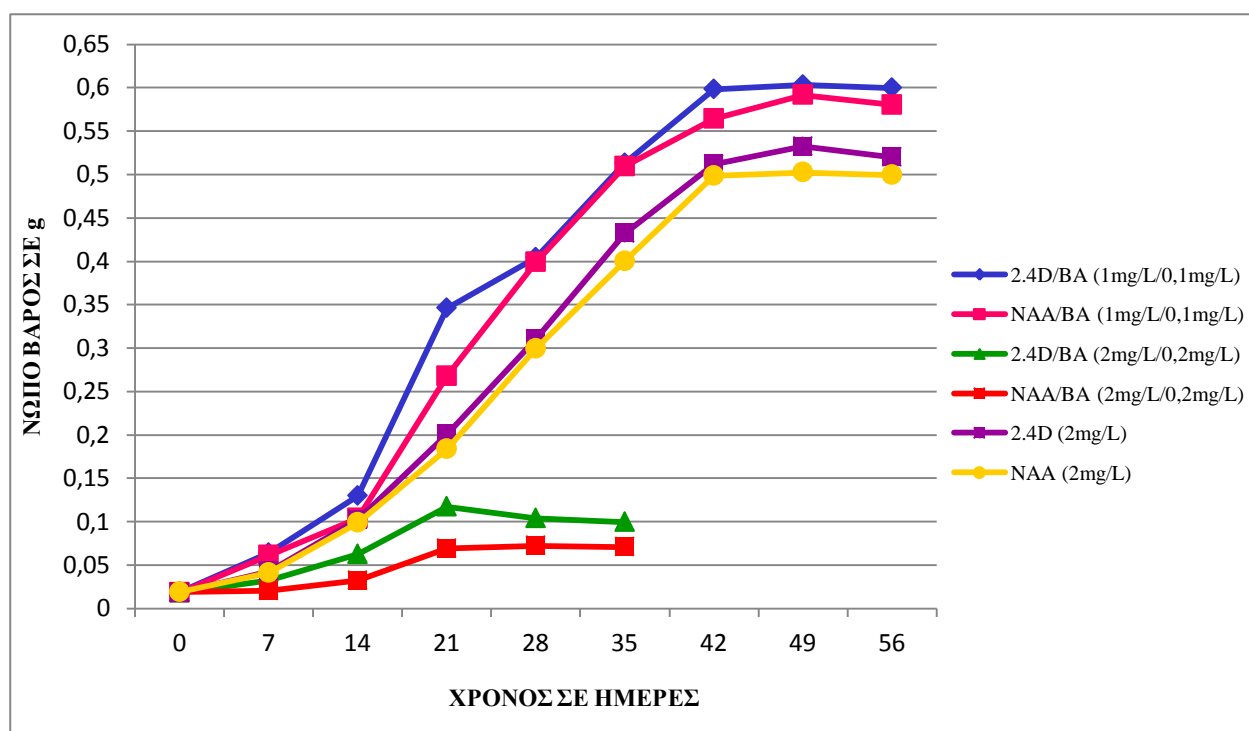
Πίνακας 3.34. Παράθεση των μετρήσεων για το υπόστρωμα MS-CL 6

ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ	ΧΡΟΝΟΣ (σε ημέρες)	ΝΩΠΟ ΒΑΡΟΣ (σε g)	ΠΟΣΟΣΤΟ ΚΑΛΛΟΓΕΝΕΣΗΣ	GI
2.4D (2mg/L)	0	0,018	29,17%	0
	7	0,0429		1,38
	14	0,1023		4,68
	21	0,2007		10,15
	28	0,3102		16,23
	35	0,4321		23
	42	0,5116		27,42
	49	0,5323		28,57
	56	0,52		27,88

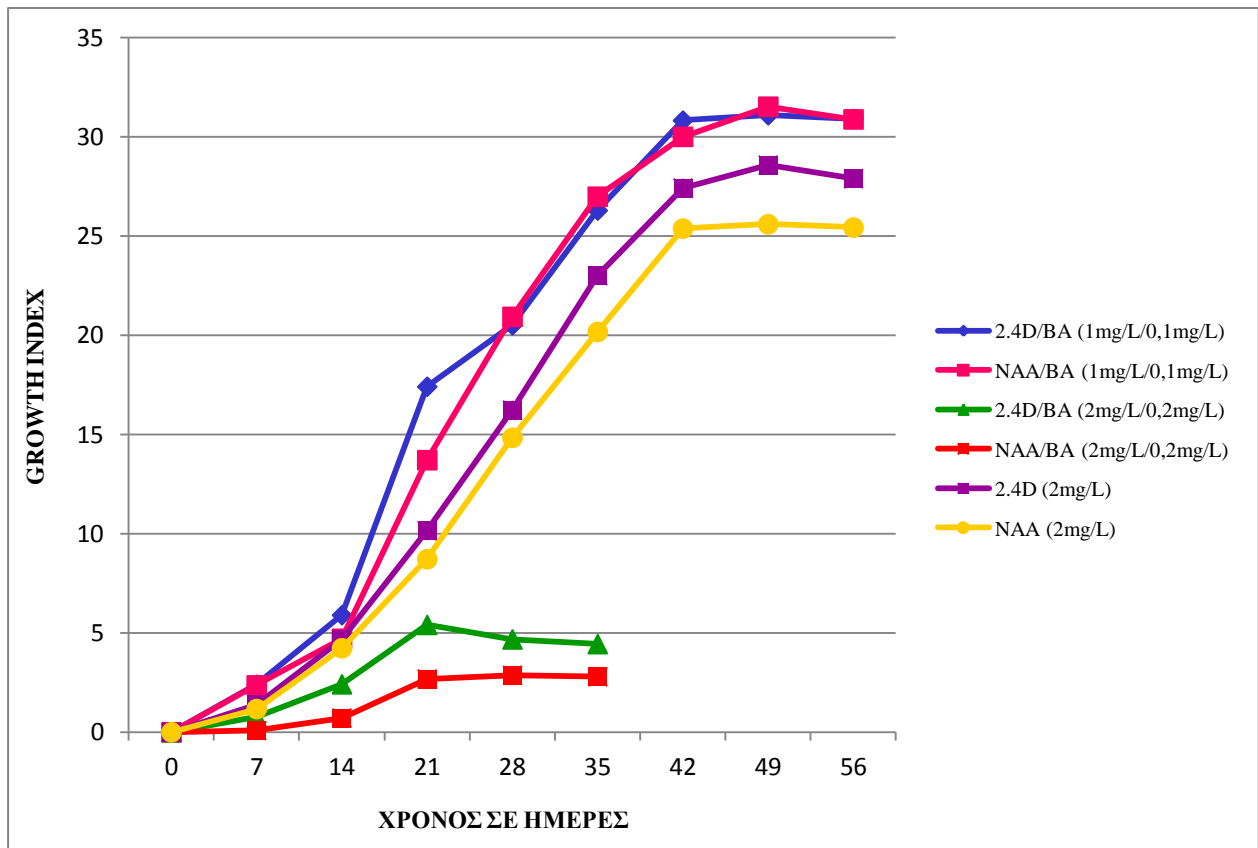
Πίνακας 3.35. Παράθεση των μετρήσεων για το υπόστρωμα MS-CL 1

ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ	ΧΡΟΝΟΣ (σε ημέρες)	ΝΩΠΟ ΒΑΡΟΣ (σε g)	ΠΟΣΟΣΤΟ ΚΑΛΛΟΓΕΝΕΣΗΣ	GI
NAA (2mg/L)	0	0,0189	26,08%	0
	7	0,041		1,16
	14	0,0989		4,23
	21	0,1837		8,71
	28	0,2993		14,83
	35	0,4001		20,16
	42	0,4985		25,37
	49	0,5026		25,59
	56	0,4995		25,42

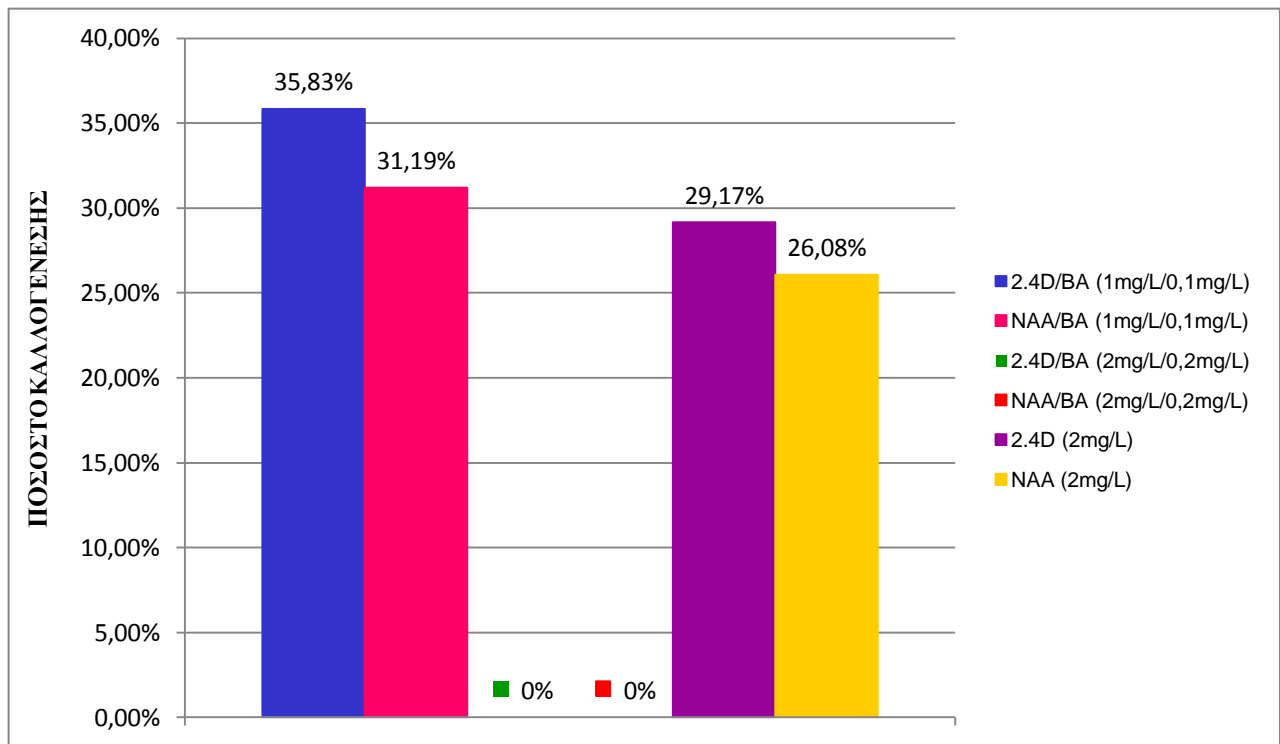
Πίνακας 3.36. Παράθεση των μετρήσεων για το υπόστρωμα MS-CL 4



Διάγραμμα 3.1. Διάγραμμα νωπού βάρους σε σχέση με το χρόνο, ανά χειρισμό



Διάγραμμα 3.2. Διάγραμμα του δείκτη ανάπτυξης σε σχέση με το χρόνο, ανά χειρισμό



Διάγραμμα 3.3. Ποσοστά καλλογένεσης ανά χειρισμό

3.4.3. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων καλλογένεσης

Με σκοπό την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (one way Anova) και στην συνέχεια το test Tukey (Tukey's honestly significant difference test). Από τις παραπάνω διαδικασίες εξαιρέθηκαν οι μετρήσεις για τα υποστρώματα MS-CL 3 & MS-CL 6, λόγω του μηδενικού ποσοστού καλλογένεσης.

Αποτελέσματα μετρήσεων νοπού βάρους

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	0,03416	3	0,01138715	60,91095	5,67E-09	3,238871
Μέσα στις ομάδες	0,00299	16	0,00018694			
Σύνολο	0,03715	19				

Πίνακας 3.37. Αποτελέσματα ANOVA για το νοπό βάρος των κάλλων

Από την ανάλυση διακύμανσης των μετρήσεων προκύπτει ότι η επίδραση των διαφορετικών χειρισμών στο νοπό βάρος των κάλλων ήταν στατιστικά σημαντική ($F >$ κριτήριο F).

MS-CI 2	0,599a
MS-CI 5	0,58a
MS-CI 1	0,52b
MS-CI 4	0,499c

Πίνακας 3.38. Αποτελέσματα νοπού βάρους με Tukey's test

Αναλυτικότερα, από τον παραπάνω πίνακα (test Tukey) διακρίνεται μεταξύ ποιών χειρισμών υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι μέσοι όροι που χαρακτηρίζονται με το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σε επίπεδο σημαντικότητας $P < 0,05$.

Αποτελέσματα μετρήσεων GI

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	104,6110	3	34,87033	63,2510	4,30E-09	3,238871
Μέσα στις ομάδες	8,82080	16	0,55130			
Σύνολο	113,4318	19				

Πίνακας 3.39. Αποτελέσματα ANOVA για το δείκτη ανάπτυξης των κάλλων

Από την ανάλυση διακύμανσης των μετρήσεων προκύπτει ότι η επίδραση των διαφορετικών χειρισμών στον δείκτη ανάπτυξης των κάλλων ήταν στατιστικά σημαντική ($F >$ κριτήριο F).

MS-CI 2	30,89a
MS-CI 5	30,87a
MS-CI 1	27,88b
MS-CI 4	25,42c

Πίνακας 3.40. Αποτελέσματα δείκτη ανάπτυξης με Tukey's test

Ομοίως, από τον παραπάνω πίνακα (test Tukey) επισημαίνεται μεταξύ ποιών χειρισμών υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι μέσοι όροι που χαρακτηρίζονται με το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σε επίπεδο σημαντικότητας $P < 0,05$. Τα αποτελεσμάτα για το δείκτη ανάπτυξης συμβαδίζουν απόλυτα με αυτά του νωπού βάρους.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το γένος *Salvia* ανήκει στην οικογένεια *Lamiaceae* (ή αλλιώς και *Labiatae*) και περιλαμβάνει περίπου 900 είδη ποωδών και ξυλωδών αρωματικών φυτών. Το αρωματικό φυτό *Salvia sclarea* αποτελεί έναν από τους πιο δημοφιλείς εκπροσώπους του γένους, καθώς αξιοποιείται ευρέως στην αρωματοποιία, στην κοσμετολογία, στη βιομηχανία τροφίμων, αλλά και στην παραγωγή φυτοθεραπευτικών σκευασμάτων. Ένα από τα κυρίαρχα συστατικά του αιθέριου ελαίου του φυτού είναι το λαβδανικό διτερπένιο σκλαρεόλη, χημική ουσία εξαίχουσας σημασίας για το τομέα της αρωματοποιίας, όπου χρησιμοποιείται για την σύνθεση πληθώρας ενώσεων, υποκατάστατων της άμβρας. Μάλιστα, βάση πρόσφατων μελέτων η σκλαρεόλη φαίνεται να διαθέτει αντιμικροβιακές και αντιμυκητιακές ιδιότητες, να συμμετέχει επικουρικά στην δράση αντικαρκινικών φαρμάκων, αλλά και να επάγει την απόπτωση ανθρώπινων λευχαιμικών κυττάρων. Αξίζει να σημειωθεί ότι στη φύση η σκλαρεόλη απαντάται μόνο σε τρία ακόμη φυτικά είδη (*Cistus creticus*, *Nicotiana glutinosa*, *Cleome spinosa*), με τα άνθη και τα φύλλα του φυτού *Salvia sclarea* να αποτελούν την μεγαλύτερη πηγή του διτερπενίου. Η έκκριση της σκλαρεόλης, όπως και των δύο ακόμη βασικών συστατικών του ελαίου, των μονοτερπενίων λιναλοόλη και οξικό εστέρα της λιναλοόλης πραγματοποιείται από τα αδενώδη τριχώματα με δομή οστού («capitate glandular hairs»), ενώ από τα ασπιδοειδή αδενώδη τριχώματα («peltate glandular») εκκρίνεται το σεσκιτερπένιο γερμακρένιο D. Στο φυτό απαντώνται σε αφθονία και μη αδενώδη τριχώματα.

Μια από τις αρχικές δυσκολίες που παρουσιάστηκε στην παρούσα εργασία ήταν η λήψη επαρκούς ποσότητας τρίχας από τα φύλλα του φυτού. Κατά τη διαδικασία της απομόνωσης, στο σύνολο των τεχνικών που εφαρμόστηκαν παρατηρήθηκε διάρρηξη της εφυμενίδας των αδενωδών τριχωμάτων, λόγω τριβής και διαφυγή των περιεχόμενων μεταβολιτών υπό τη μορφή παχύρρευστης κολλώδους ουσίας δυσχεραίνοντας την συλλογή. Μετά από αρκετές δοκιμές ως αποτελεσματικότερος τρόπος συλλογής κρίθηκε η συνδυασμένη χρήση υγρού αζώτου και πινέλου ζωγραφικής. Ταυτόχρονα απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή προς αποφυγή λήψης και άλλων επιδερμικών κυττάρων, γεγονός που περιορίζει την αυξημένη ταχύτητα στους χειρισμούς. Επομένως, με στόχο τη διασφάλιση της ποιότητας του συλλεγόμενου ιστού, κάθε φορά λάμβανε χώρα λήψη μικρής ποσότητας.

Ιδιαίτερα απαιτητικές διαδικασίες αποδείχθηκαν επίσης, η απομόνωση και ο καθαρισμός του ολικού RNA από το φυτό. Εφαρμογή του διαδεδομένου σε χρήση πρωτόκολλου *phenol/chloroform extraction* οδήγησε στην απόκτηση δειγμάτων χαμηλής καθαρότητας, ως προς τις προσμίξεις με πρωτεΐνες και φαινολικά, καθώς οι λόγοι O.D.₂₆₀/O.D.₂₈₀ και O.D.₂₆₀/O.D.₂₄₀ αντίστοιχα, δεν σημείωσαν ιδιαίτερα υψηλές τιμές, σε σημαντικό αριθμό ανεξάρτητων δοκιμών. Οι χαμηλοί λόγοι διατηρήθηκαν και στις δοκιμές ενοποίησης και επανάληψης του καθαρισμού των δειγμάτων. Επιπρόσθετα παρατηρήθηκε άποκλιση αποτελεσμάτων ηλεκτροφόρησης και φωτομέτρησης, όσον αφορά τον προσδιορισμό της ποσότητας του ολικού RNA. Συγκεκριμένα, δείγματα των οποίων η συγκέντρωση προσδιορίζεται χαμηλή βάση ηλεκτροφόρησης, κατά τη φωτομέτρηση παρουσιάζουν υψηλές τιμές O.D.₂₆₀. με αποτέλεσμα, και η συγκέντρωση που προκύπτει να είναι αρκετά μεγαλύτερη. Απόρροια αυτού είναι η αδυναμία διεξαγωγής ασφαλούς προσδιορισμού της

συγκέντρωσης των δειγμάτων, καθώς εμπεριέχεται ο κίνδυνος υπερεκτίμησής της. Το γεγονός αυτό πιθανώς να σχετίζεται με την ύπαρξη υψηλών επιπέδων φαινολικών προσμίξεων, οι οποίες μετατοπίζουν όλο το φάσμα απορρόφησης.

Παρόμοια προβλήματα κατά την απομόνωση ολικού RNA άριστης καθαρότητας είναι αρκετά συχνά σε ιστούς πλούσιους σε πολυφαινόλες και πολυσακχαρίτες, όπως είναι τα αρωματικά φυτά και το αμπέλι. Λόγω της σημαίνουσας ερευνητικής και εμπορικής αξίας των φυτών αυτών, όλοένα και αυξάνεται η προσπάθεια βελτιστοποίησης των πρωτόκολλων που εφαρμόζονται σήμερα. Στόχος είναι η εύρεση μεθόδων που διασφαλίζουν την ακεραιότητα, την υψηλή καθαρότητα, αλλά και την λήψη μεγάλης ποσότητας του RNA των δειγμάτων, σε σύντομο χρονικό διάστημα και με μικρό κόστος.

Με γνώμονα όλα τα προαναφερθέντα δεδομένα, και κυρίως την ανάγκη βελτίωσης της καθαρότητας των δειγμάτων αναζητήθηκαν τα καταλληλότερα πρωτόκολλα απομόνωσης. Από την εφαρμογή των *CTAB extraction S(short)*, το οποίο αποτελεί τροποποίηση του πρωτοκόλλου των *Banilas et al.*, 2011 και *CTAB extraction L(long)* προέκυψαν δείγματα διασφαλισμένης ακεραιότητας και υψηλής καθαρότητας, με το λόγο O.D.₂₆₀/O.D.₂₈₀ να σημειώνει την ιδάνικη τιμή. Παράλληλα, τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης συνάδουν πλήρως με αυτά της φωτομέτρησης. Συμπερασματικά, στην εν λόγω μελέτη τα πρωτόκολλα *CTAB extraction S(short)* και *CTAB extraction L(long)* κρίθηκαν καταλληλότερα για την απομόνωση ολικού RNA από τους ιστούς του αρωματικού φυτού *Salvia sclarea*.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η συγκριτική μελέτη των επιπέδων έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται σε μονοπάτια του δευτερογενούς μεταβολισμού (βιοσύνθεση μονοτερπενίων, διτερπενίων, φλαβονοειδών) στο φύλλο, στα τριχώματα, στο φύλλο απουσία τριχωμάτων και σε κάλλο, του αρωματικού φυτού *Salvia sclarea*. Παρά την ευρύτατη χρήση του και την εξαιρετική σημασία του αιθέριου ελαίου του, τα βιβλιογραφικά δεδομένα για το συγκεκριμένο φυτικό είδος παραμένουν περιορισμένα, καθώς ο αριθμός των ολοκληρωμένων σχετικών μελετών δεν είναι μεγάλος, γεγονός που αποτελεί ακόμα ένα κίνητρο για την διεξαγωγή της εν λόγω εργασίας.

Με εξαίρεση τις δύο πρόσφατα χαρακτηρισμένες, ως προς τη λειτουργία τους, συνθετάσες διτερπενίων που καταλύουν την σύνθεση της σκλαρεόλης, τα υπόλοιπα γονίδια που επιλέχθηκαν προέρχονται από το συγγενικό είδος *Salvia fruticosa* και συμμετέχουν στη βιοσύνθεση μονοτερπενίων, διτερπενίων, φαινυλοπροπανοειδών και φλαβονοειδών. Ιδιαίτερα ενδιαφέρον κρίθηκε το γεγονός ότι, σύμφωνα με την μελέτη των *Fani M. Chatzopoulou et al.*, 2010, τα γονίδια αυτά εμφανίζουν πολύ υψηλά επίπεδα έκφρασης στα τριχώματα, ενώ σημαντικά χαμηλά στο φυλλό παρουσία ή απουσία των τριχωμάτων, καταδεικνύοντας τον σημαίνοντα ρόλο του αδενώδους τριχώματος ως «πλούσιο εργοστάσιο» παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών. Για κάθε γονίδιο, μέσω του ευρετικού αλγορίθμου *BLAST* διεξήχθη αναζήτηση ακολουθιών με την ίδια λειτουργία, οι οποίες εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα με αυτό. Εν συνεχεία για κάθε γονίδιο επιλέχθηκαν οι επτά πρώτες αλληλουχίες με το μικρότερο E Value. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αποτέλεσμα πολλαπλής ευθυγράμμισης των επιλεγμένων αλληλουχιών και σχεδιασμού σε συντηρημένες περιοχές, τηρώντας τα απαραίτητα κριτήρια.

Στα πλαίσια της εν λόγω μελέτης ωστόσο δεν κατέστη δυνατή η επιτυχημένη ενίσχυση των επιθυμητών γονιδίων, τόσο στο φύλλο όσο και στη τρίχα, παρά τις πολυάριθμες προσπάθειες βελτίωσης των προσεγγίσεών μας. Μια πιθανή αιτία του αποτελέσματος αυτού, είναι η μειωμένη ενδεχομένως ειδικότητα πρόσδεσης κάθε ζευγαριού εκκινητών στη μήτρα, λόγω των περιορισμένων βιβλιογραφικών δεδομένων για την *Salvia sclarea*, με αποτέλεσμα τη δέσμευσή τους και σε άλλες αλληλουχίες «στόχους» πλην των επιθυμητών και κατ'επέκταση την ενίσχυση περισσοτέρων του ενός γονιδίων.

Το ενδεχόμενο αυτό ενισχύεται σημαντικά από την εν γένει υψηλή ομολογία που παρουσιάζεται μεταξύ των συνθετασών των μόνο-, δί-, και σέски-τερπενίων, με τις πλέον συντηρημένες περιοχές να αντιστοιχούν στις υπομονάδες που συμμετέχουν στην κατάλυση κοινών σταδίων, όπως είναι ο ισομερισμός των πρόδρομων μορίων και τις λιγότερο συντηρημένες να σχετίζονται με την κατάλυση αντιδράσεων κυκλοποίησης, από τις οποίες συντίθεται τα τελικά προϊόντα. Ωστόσο στις χαμηλότερες ταξινομικές βαθμίδες, σε επίπεδο γένους ο βαθμός ομοιότητας αυξάνεται ακόμα και στην περίπτωση των προαναφερθέντων λιγότερο συντηρημένων περιοχών. Παράλληλα, ιδιαίτερα μεγάλη ομολογία παρουσιάζεται και σε επίπεδο υπο-οικογένειας (TPS-a: συνθετάσες δί-, και σέски-τερπενίων, TPS-b: συνθετάσες μόνοτερπενίων), καθώς τα μέλη κάθε υπο-οικογένειας διαθέτουν παρόμοιες αλληλουχίες, έστω και αν καταλύουν τον σχηματισμό διαφορετικών προϊόντων. Μάλιστα η ασφαλής πρόβλεψη της ταυτότητας των τελικών προϊόντων, χωρίς την διεξαγωγή ενζυμικών δοκιμών μπορεί να επιτευχθεί μόνο βάση της πλήρους αλληλουχίας των γονιδίων (*Bolhmann et al., 1998*). Στο φυτό *Abies grandis* απαντώνται επτά ομόλογα γονίδια συνθετασών, τα οποία κωδικοποιούν διαφορετικά προϊόντα (*Bolhmann et al., 1997*).

Βάση των παραπάνω δεδομένων εξάγεται το συμπέρασμα ότι, η ύπαρξη έστω και μικρής απόκλισης στην αλληλουχία των ζητούμενων γονιδίων, σε σχέση με αυτά στα οποία βασίστηκε ο σχεδιασμός των εκκινητών δύναται να μειώσει σημαντικά την ειδικότητα πρόσδεσής τους. Σε συνάρτηση με την ήδη υπάρχουσα υψηλή ομολογία, αλλά και το γεγονός ότι τα προς μελέτη γονίδια εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης στο φύλλο φαίνεται να συνηγορούν στο ενδεχόμενο των πολλαπλών σημείων πρόσδεσης. Ωστόσο, τα δεδομένα και τα συμπεράσματα που προέκυψαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, δεδομένου ότι τον τελευταίο καιρό ολοένα και πληθαίνουν οι δημοσιοποιημένες μελέτες για την *Salvia sclarea* μπορούν να αποτελέσουν εφελτήριο μελλοντικών προσεγγίσεων.

Παράλληλα, λόγω της υψηλής εμπορικής και οικονομικής σημασίας που προσδίδουν οι δευτερογενείς μεταβολίτες του, το φυτό *Salvia sclarea* αποτελεί είδος αυξημένου ενδιαφέροντος και για το τομέα της ιστοκαλλιέργειας. Τα τελευταία χρόνια ολοένα και ενισχύεται η προσπάθεια της *in vitro* παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών, κυρίως εκείνων για τους οποίους τα δεδομένα σχετικά με τη ρύθμιση του βιοχημικού μονοπατιού τους παραμένουν ελλιπή, όπως η σκλαρεόλη. Ταυτόχρονα, η απόκτηση αρωματικών φυτών μέσω των τεχνικών της ιστοκαλλιέργειας διασφαλίζει την λήψη αυξημένων επιπέδων παραγωγής των μεταβολικών τους προϊόντων, ανεξαρτήτως κλιματολογικών συνθηκών και εποχιακών διακυμάνσεων. Επομένως, ιδιαίτερα σημαντική πρόκληση αποτελεί η προσπάθεια βελτίωσης, ποιοτικά και ποσοτικά, των διαθέσιμων μεθόδων.

Στόχος στην παρούσα μελέτη ήταν ο σχηματισμός κάλλου από έκφυτα φύλλων του φυτού *Salvia sclarea*, και εν συνεχεία η λήψη αναγεννημένων φυτών. Όσον αφορά την καλλογένεση, τέσσερα από τα έξι θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν οδήγησαν στην εμφάνιση κάλλου. Αναλυτικότερα, στα υποστρώματα MS-C12 (**1mg/L 2,4 D + 0,1mg/L BA**) και MS-C15 (**1mg/L NAA + 0,1mg/L BA**) απαντώνται τα υψηλότερα ποσοστά καλλογένεσης, 35,83% και 31,19% αντίστοιχα. Ανάπτυξη κάλλου, με χαμηλότερα ποσοστά παρατηρήθηκε όμως και στις περιπτώσεις όπου πραγματοποιήθηκε χρήση αποκλειστικά αυξίνης, MS-C11 (**2mg/L 2,4 D**) και MS-C14 (**2mg/L NAA**), 29,17% και 26,08% αντιστοίχως. Ωστόσο, ειδοποιός διαφορά μεταξύ των χειρισμών κρίνεται το χρονικό διάστημα μέχρι την ανάπτυξη του κάλλου, το οποίο για τα υποστρώματα MS-C12 και MS-C15 διαρκεί 30 ημέρες, ενώ για τα MS-C11 και MS-C14 παρατείνεται σε 40 ημέρες. Επιπρόσθετα, διαφορά σημειώνεται στο χρώμα και το μέγεθος των κάλλων, καθώς οι κάλλοι των υποστρωμάτων MS-C12 και MS-C15 διαθέτουν έντονο πράσινο χρώμα, μεγαλύτερο μέγεθος και υψηλότερο δυναμικό ανάπτυξης, σε αντίθεση με αυτούς των MS-C11 και MS-C14, οι οποίοι εμφανίζουν κίτρινο χρώμα, μικρότερο μέγεθος και χαμηλότερες τιμές στον GI.

Συχνός περιοριστικός παράγοντας στους *in vitro* χειρισμούς των αρωματικών φυτών είναι η εμφάνιση εκτεταμένων νεκρωτικών «σημείων» («brown necrotic areas») στα έκφυτα σε σύντομο χρονικό διάστημα από την εγκατάστασή τους, αναστέλλοντας έτσι τις διαδικασίες της καλλογένεσης και της βλαστογένεσης και τα έκφυτα να οδηγούνται σε ολική νέκρωση. Τραυματισμούς του ιστού, κατά τη λήψη του έκφυτου επάγει την αυξημένη έκκριση φαινολικών παραγώγων, τα επίπεδα των οποίων είναι ιδιαίτερα υψηλά στα αρωματικά φυτά. Στην συνέχεια πραγματοποιείται οξειδωση των φαινολικών σε κινόνες, οι οποίες διαθέτουν τοξική δράση για τους ιστούς. Στην παρούσα εργασία, το φαινόμενο του «browning» εμφανίστηκε σε όλα τα υποστρώματα. Ωστόσο, στα MS-C12 και MS-C15 δεν έδρασε ανασταλτικά στην καλλογένεση, καθώς η αύξηση των κάλλων συνεχίστηκε με σταθερό ρυθμό. Αντίθετα, στα MS-C11 και MS-C14, σημειώθηκε ταχύτερη εμφάνιση των νεκρωτικών περιοχών, εκτεταμένη κάλυψη των εκφύτων και τελικά πλήρης νέκρωση.

Τέλος, μεταξύ των MS-C12 και MS-C15 δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά στο δυναμικό ανάπτυξης ή στη μορφολογία των κάλλων, ενώ και στα δύο η εξέλιξη της καλλογένεσης ακολουθεί παρόμοια πορεία στο χρόνο. Επομένως, βάση του σύνολο των δεδομένων εξάγεται το συμπέρασμα ότι στην εν λόγω εργασία καταλληλότερα υποστρώματα καλλογένεσης αποδόχθηκαν τα υποστρώματα MS-C12 και MS-C15.

Συνοψίζοντας, στην εν λόγω εργασία πραγματοποιήθηκε επιτυχής σχηματισμός κάλλου, με χρήση έκφυτων φύλλο του φυτού *Salvia sclarea*. Παράλληλα, οι διαφοροποιήσεις που παρατηρήθηκαν μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων εγείρουν το ενδιαφέρον για την διερεύνηση περαιτέρω διαφορών σε επίπεδο μεταβολικών προϊόντων αυξημένης σημασίας, όπως η σκλαρεόλη. Με χρήση χρωματογραφικών τεχνικών, για παράδειγμα υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης-HPLC θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί ποιοτική και ποσοτική ανάλυση της σύστασης των κάλλων σε δευτερογενείς μεταβολίτες, ώστε να μελετηθεί η δυνατότητα αύξησης των επιπέδων τους, μέσω εφαρμογής διαφορετικών *in vitro* χειρισμών.

Με στόχο την βλαστογένεση χρησιμοποιήθηκαν δέκα διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα, ωστόσο η επίτευξη της δεν κατέστη δυνατή, ενώ στην πλειοψηφία των περιπτώσεων σημειώθηκε εμφάνιση κάλλου ή αύξηση του μεγέθους του ήδη υπάρχοντος. Η αδυναμία επαγωγής της βλαστογένεσης από τους κάλλους πιθανώς να συσχετίζεται με τις ιδιότητες των ορμονών που χρησιμοποιήθηκαν. Παραδείγματος χάριν, η ορμόνη 2,4D διαθέτει υψηλή συγγένεια πρόσδεσης με την πρωτεΐνη που είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά της εντός του κυττάρου και μικρή με την πρωτεΐνη εξόδου, με αποτέλεσμα την αργή μεταφορά της εκτός του κυττάρου και την σημαντική αύξηση της ενδοκυτταρικής της συγκέντρωσης. Παράλληλα, η συσώρευση της 2,4D συσχετίζεται και με την αύξηση των επιπέδων της ορμόνης IAA, μέσω των βιοσυνθετικών μονοπατιών που χρησιμοποιούν ως πρόδρομο μόριο την τρυπτοφάνη (Michalczuk *et al.*, 1992). Επομένως, αποτέλεσμα αυτών θα μπορούσε να είναι η υποεκτίμηση του λόγου κυτοκινίνης/αυξίνης, που απαιτείται για την επίτευξη της βλαστογένεσης. Ακόμη αξίζει να σημειωθεί ότι σε υποστρώματα όπου δεν πραγματοποιήθηκε προσθήκη αυξινών, στα MS-S11 (**2mg/L BA**) και MS-S12 (**5mg/L BA**), παρατηρήθηκε σχηματισμός κάλλου από έκφυτα φύλλου. Το αποτέλεσμα αυτό ενδεχομένως να υποδηλώνει την ύπαρξη αυξημένων επιπέδων ενδογενών αυξινών στα μητρικά φυτά, γεγονός που θα μπορούσε να δικαιολογήσει και τις περιπτώσεις της συνεχούς αύξησης προυπάρχοντος κάλλου.

Συμπερασματικά στην παρούσα εργασία πάρα το γεγονός ότι δεν κατέστη εφικτή η επίτευξη της βλαστογένεσης αναπτύχθηκαν ορισμένοι προβληματισμοί που ενισχύουν το ενδιαφέρον για την διεξαγωγή μελλοντικών *in vitro* δοκιμών, με στόχο τη λήψη αναγεννημένων φυτών. Τέλος, αρκετά ενδιαφέρουσα προσέγγιση θα μπορούσε να αποτελέσει η κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης από κάλλους του φυτού *Salvia sclarea*, με στόχο την μελέτη του τρανσκριπτομικού προφίλ του ιστού και σε συνθήκες ιστοκαλλιέργειας.

5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το αρωματικό φυτό *Salvia sclarea* αποτελεί έναν από τους πιο δημοφιλής εκπροσώπους της οικογένειας των *Lamiaceae*, καθώς το αιθέριο έλαιο του φυτού αξιοποιείται ευρέως στην κοσμετολογία, στη βιομηχανία τροφίμων και στην φαρμακοβιομηχανία. Τα άνθη και τα φύλλα του φυτού αποτελούν την μεγαλύτερη πηγή του διτερπενίου σκλαρεόλη, χημική ουσία εξέχουσας σημασίας για το τομέα της αρωματοποιίας, η έκκριση της οποίας, όπως και των δύο ακόμη βασικών συστατικών του ελαίου, των μονοτερπενίων λιναλοόλη και οξικό εστέρα της λιναλοόλης πραγματοποιείται από αδενώδη τριχώματα με δομή οστού («capitate glandular hairs»), ενώ από ασπιδοειδή αδενώδη τριχώματα («peltate glandular hairs») εκκρίνεται το σεσκιτερπένιο γερμακρένιο D. Παράλληλα, λόγω της υψηλής εμπορικής και οικονομικής σημασίας που προσδίδουν οι δευτερογενείς μεταβολίτες του, το φυτό *Salvia sclarea* αποτελεί είδος αυξημένου ενδιαφέροντος και για το τομέα της ιστοκαλλιέργειας. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η συγκριτική μελέτη των επιπέδων έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται σε μονοπάτια του δευτερογενούς μεταβολισμού στο φύλλο, στα τριχώματα, στο φύλλο απουσία τριχωμάτων και σε κάλλο, του φυτού, μέσω των διαδικασιών της απομόνωσης ολικού RNA και της ηπιποσοτικής RT-PCR. Ταυτόχρονα, μέσω κατάλληλων τεχνικών ιστοκαλλιέργειας, στόχος είναι η δημιουργία κάλλου και τελικά η λήψη αναγεννημένων φυτών.

Στην εν λόγω μελέτη δύο τροποποιημένα πρωτόκολλα κρίθηκαν καταλληλότερα για την απομόνωση ολικού RNA από τους ιστούς του φυτού, καθώς εφαρμογή του διαδεδομένου σε χρήση πρωτόκολλου *phenol/chloroform extraction* οδήγησε στην απόκτηση δειγμάτων χαμηλής καθαρότητας, ως προς τις προσμίξεις με πρωτεΐνες και φαινολικά. Ωστόσο, στα πλαίσια της εργασίας αυτής δεν κατέστη εφικτή η επιτυχημένη ενίσχυση των επιθυμητών γονιδίων, τόσο στο φύλλο όσο και στη τρίχα, πιθανόν λόγω μειωμένης ειδικότητας πρόσδεσης κάθε ζευγαριού εκκινητών στη μήτρα, απόρροια των περιορισμένων, μέχρι σήμερα, βιβλιογραφικών δεδομένων για *Salvia sclarea*. Το ενδεχόμενο αυτό ενισχύεται σημαντικά, τόσο από την εν γένει υψηλή ομολογία μεταξύ συνθετασών μόνο-, δι-, και σέσκι-τερπενίων, όσο και σε επίπεδο υπο-οικογένειας. Όσον αφορά την καλλογένεση, τέσσερα από τα έξι θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν οδήγησαν στην εμφάνιση κάλλου, με δύο από αυτά να αποδεικνύονται καταλληλότερα από άποψη μορφολογίας, δυναμικού ανάπτυξης και χρόνου καλλογένεσης. Τέλος, η επαγωγή της βλαστογένεσης αποδείχθηκε ανεπιτυχής, ενώ σε ορισμένα θρεπτικά υποστρώματα σημειώθηκε εμφάνιση κάλλου ή αύξηση του μεγέθους του ήδη υπάρχοντος.

Abstract

Salvia sclarea (clary sage) is one of the most popular aromatic plants of the *Lamiaceae* family, due to the fact that the plant's essential oil is widely used in cosmetology, in the food industry, and also in the pharmaceutical industry. Plant's leaves and inflorescence are the biggest source of sclareol in nature, a diterpene of great importance for the fragrance industry. Sclareol, as well as linalool and linalyl

acetate, the other two dominant ingredients in *Salvia sclarea* oil are secreted by capitate glandular hairs, while the sesquiterpene germacrene D is secreted by peltate glandular hairs. In the same time, the increased commercial and economic value of *Salvia sclarea* because of its secondary metabolites, led to its use also in tissue culture techniques. The aim of this essay was to study the expression levels of genes participating in different pathways of secondary metabolism, in whole leaves, isolated trichomes, leaves without trichomes and callus from *Salvia sclarea*, by carrying out the procedures of total RNA isolation and semiquantitative RT-PCR analysis. Moreover, the goal was the achievement of callus induction and the production of regenerated plants through *in vitro* techniques.

As a result of this study, two modified protocols were found to be the most suitable for the isolation of high quality total RNA from *Salvia sclarea* tissues, compared to the widely used *phenol/chloroform extraction* protocol, which resulted in samples containing high levels of polyphenols and proteins. However, the amplification of selected genes was not achieved during this essay, probably due to primers' low specificity with the target, due to limited bibliographic data concerning *Salvia sclarea*. The existing high homology not only between monoterpene, diterpene and sesquiterpene synthases, but also within each subfamily enhances the probability of mispriming mentioned before. As far as callogenesis is concerned, four out of six different types of medium resulted in callus induction, while two of them were found to be more suitable when callus morphology, growth capacity and days to visible callus are taken into account. Finally, shoot induction was not achieved, while in some cases callus induction or gain in the pre-existing callus size was observed.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ❖ Afolayan A.J., JJM Meyer., 1995. Morphology and ultrastructure of secreting and nonsecreting foliar trichomes of *Helichrysum aureonitens* (*Asteraceae*). *International Journal of Plant Sciences* > Vol. 156: 481-487.
- ❖ Akhondzadeh S., Noroozian M., Mohammadi M., Ohadinia S., Jamshidi A. H., Khani M. 2003. *Salvia officinalis* extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomized and placebo-controlled trial. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 28, 53–59.
- ❖ Akira Koiwai and Toshiake Matsuzaki, 1988. Callus Induction and Shoot Generation from Flower Trichomes of *Nicotiana tabacum*. *Agric. Biol. Chem.*, 52 (5): 1289-1290
- ❖ 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
- ❖ Angelopoulou D, Demetzos C, Dimas C, Perdetzoglou D, Loukis A. 2001. Essential oils and hexane extracts from leaves and fruits of *Cistus monspeliensis*. Cytotoxic activity of ent-13-epi-manoyl oxide and its isomers. *Planta Med.* 2001 Mar;67(2):168-71.
- ❖ Azza A. Tawfik & Mohamed F. Mohamed, 2007. Regeneration of salvia (*Salvia officinalis* L.) via induction of meristematic callus. In *Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant* 43: 21–27
- ❖ Asaph Aharoni, Maarten A. Jongsma, Tok-Yong Kim, Man-Bok Ri, Ashok P. Giri, Francel W. A. Verstappen, Wilfried Schwab, Harro J. Bouwmeester., 2006. Metabolic Engineering of Terpenoid Biosynthesis in Plants. *Phytochemistry Reviews* February 2006, Volume 5, Issue 1, pp 49-58
- ❖ Ascensão L, Francisco A, Cotrim H, Pais MS., 2005. Comparative structure of the labellum in *Ophrys fusca* and *O. lutea* (*Orchidaceae*). *Am J Bot.* 2005 (7):1059-67.
- ❖ Banthorpe Derek V., Jacqueline T. Brown and George S. Morris, 1990. Accumulation of the anti-fungal diterpene sclareol by cell cultures of *Salvia sclarea* and *Nicotiana Glutinosa* *Phytochemistry*, 29, No. 7: 2145-2148
- ❖ Barnes J., L.A. Anderson, J.D. Phillipson, 2002. *Herbal Medicines*, Pharmaceutical Press, London
- ❖ Barthlott W., Porembski S., 1996. Ecology and morphology of *Blossfeldia liliputana* (*Cactaceae*): A poikilohydric and almost astomate succulent. *Botanica Acta* 109:161-166
- ❖ Bisio A., A. Corallo, P. Gastaldo, G. Romussi, G. Ciarallo, N. Fontana, N. De Tommasi and P. Profumo, 1999. Glandular Hairs and Secreted Material in *Salvia blepharophylla* Brandegees ex Epling Grown in Italy. *Annals of Botany* 83: 441-452
- ❖ Bektas Tepe, Munevver Sokmen, H. Askin Akpulat, Atalay Sokmen, 2006. Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chemistry* 95: 200–204
- ❖ Blakeman J.P., 1971. The chemical environment of the leaf surface in relation to growth of pathogenic fungi. *Ecology of Leaf Surface Micro-organisms*. London Academic Press: 256-268
- ❖ Jörg Bohlmann, Christopher L. Steele, Rodney Croteau, 1997. Monoterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*). cDNA isolation, characterization, and functional expression of myrcene synthase, (-)-(4S)-limonene synthase, and (-)-(1S,5S)-pinene synthase. *J Biol Chem.* 272: 21784-92.
- ❖ Jörg Bohlmann, Gilbert Meyer-Gauen, Rodney Croteau, 1998. Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95: 4126-33.
- ❖ Bosabalidis A, Gabrieli C, Niopas I., 1998. Flavone aglycones in glandular hairs of *Origanum x intercedens*. *Phytochemistry.* 1998 Nov 20;49(6):1549-1553.
- ❖ Bouvier F, Dogbo O, Camara B, 2003. Biosynthesis of the Food and Cosmetic Pigment Bixin (Annatto). *Science* 300: 2089-2091
- ❖ Bouvier F, Rahier A, Camara B , 2005. Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Progress in Lipid Research* 44: 357-429
- ❖ Canan Ozdemir, Gülcan Senel, 1999. The Morphological, Anatomical and Karyological Properties of *Salvia sclarea* L.. *Tr. J. of Botany* 23: 7-18
- ❖ Caniard Anne, Philipp Zerbe, Sylvain Legrand, Allison Cohade, Nadine Valot, Jean-Louis Magnard, Jörg Bohlmann, Laurent Legendre, 2012. Discovery and functional characterization of two diterpene synthases for sclareol biosynthesis in *Salvia sclarea* (L.) and their relevance for perfume manufacture. *BMC Plant Biology* 12:119

- ❖ Carrubba A., la Torre R., Piccaglia R., Marotti M. 2002. Characterization of an Italian biotype of clary sage (*Salvia sclarea* L.) grown in a semi-arid Mediterranean environment. *Flavour Fragr. J.* 17, 191–194
- ❖ Chatzopoulou Fani M., Antonios M. Makris, Anagnostis Argiriou, Jorg Degenhardt, Angelos K. Kanellis, 2010. EST analysis and annotation of transcripts derived from a trichome-specific cDNA library from *Salvia fruticosa*. *Plant Cell Rep* 29: 523–534
- ❖ Chinou I, 2005. Labdanes of natural origin: biological activities (1981–2004). *Curr Med Chem* 12: 1295–1317
- ❖ Corradi M. G., A. Bianchi and A. Albasini, 1993. Chromium toxicity in *Salvia sclarea*. Effects of hexavalent chromium on seed germination and seedling development. *Environmental and Experimental Botany* 33, No. 3: 405–413
- ❖ Corsi G. and S. Bottega, 1999. Glandular Hairs of *Salvia officinalis*: New Data on Morphology, Localization and Histochemistry in Relation to Function. *Annals of Botany* 84: 657–664
- ❖ Croteau R., Kutchan T.M., Lewis N.G., 2000. Natural products (secondary metabolites), In : *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (B, Buchanan, W. Gruissem R., Jones eds.). Rockville: American Society of Plant Biologists, pp 1250–1318
- ❖ Davis PH. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, vol 7. Edinburgh University Press: Edinburgh, 1982, 400–461
- ❖ Davies KL, Turner MP., 2004. *Pseudopollen in Dendrobium unicum Seidenf. (Orchidaceae): reward or deception?* *Ann Bot.* 2004 (1):129–32
- ❖ Degenhardt Jorg, Tobias G. Kollner, Jonathan Gershenzon, 2009. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry* 70: 1621–1637
- ❖ Demetzos C, Stahl B, Anastasaki T, Gazouli M, Tzouveleki L, Rallis M, 1999. Chemical analysis and antimicrobial activity of the resin “Ladano”, of its essential oil and of the isolated compounds. *Planta Med* 65:76–78
- ❖ Dickison W.C., 2000. *Integrative Plant Anatomy*. San Diego. Academic Press: 533
- ❖ Dimas K, Demetzos C, Vaos V, Ioannidis P, Trangas T., 2001. Labdane type diterpenes down-regulate the expression of c-Myc protein, but not of Bcl-2, in human leukemia T-cells undergoing apoptosis. *Leuk Res.* 2001 Jun;25(6):449–54.
- ❖ Dimas K, Papadaki M, Tsimplouli C, Hatziantoniou S, Alevizopoulos K, Pantazis P, Demetzos C., 2006. Labd-14-ene-8,13-diol (sclareol) induces cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells and enhances the activity of anticancer drugs. *Biomed Pharmacother.* 2006 Apr;60(3):127–33. Epub 2006 Feb 21.
- ❖ Dubos Christian, Ralf Stracke, Erich Grotewold, Bernd Weisshaar, Cathie Martin and Loic Lepiniec, 2010. MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* Vol. 15, No. 10
- ❖ Duke S.O, C Canel, A.M Rimando, M.R Telle, M.V Duke, R.N Paul, 2000. Current and potential exploitation of plant glandular trichome productivity. *Advances in Botanical Research* Volume 31, 2000, Pages 121–151
- ❖ 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.
- ❖ Eisenreich, W., Bacher, A., Arigoni, D., Rohdich, F., 2004. Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cell. Mol. Life Sci.* 61Q: 401–426
- ❖ Fahn A., (1991) *Plant anatomy*. Pergamon Press, Oxford
- ❖ Fahn A. and D.F. CUTLER., (1992) *Xerophytes*. *Encyclopedia of Plant Anatomy*, Band 13, Teil 3, Gebrüder Borntraeger, Berlin.
- ❖ Falara Vasiliki, Eran Pichersky, and Angelos K. Kanellis, 2010. A Copal-8-ol Diphosphate Synthase from the Angiosperm *Cistus creticus* subsp. *creticus* Is a Putative Key Enzyme for the Formation of Pharmacologically Active, Oxygen-Containing Labdane-Type Diterpenes. *Plant Physiology* 154:301–310
- ❖ Falara Vasiliki, Vasileios Fotopoulos, Thanasis Margaritis, Thalia Anastasaki, Irene Pateraki, Artemios M. Bosabalidis, Dimitris Kafetzopoulos, Costas Demetzos, Eran Pichersky, Angelos K. Kanellis, 2008. Transcriptome analysis approaches for the isolation of trichome-specific genes from the medicinal plant *Cistus creticus* subsp. *creticus*. *Plant Mol Biol* 68:633–651
- ❖ Farukh S. Sharopov and William N. Setzer, 2012. The Essential Oil of *Salvia sclarea* L. from Tajikistan. *Rec. Nat. Prod.* 6:1: 75–79

- ❖ Fiore Giovina, Cristina Nencini, Federica Cavallo, Anna Capasso, Ammar Bader, Giorgio Giorgi and Lucia Micheli, 2006. *In vitro* Antiproliferative Effect of Six *Salvia* species on Human Tumor Cell Lines. *Phytother. Res.* 20: 701–703
- ❖ Fournier P. Le livre des plantes medicinales at vénéneuses de France. Tome III. Paul Lechevalier Editeur, Paris 1942
- ❖ Gamborg OL, Miller R & Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cell. *Exp. Cell Res.* 50: 151–158
- ❖ Gang David R., Hiroyuki Kasahara, Zhi-Qiang Xia, Kristine Vander Mijnsbrugge, Guy Bauw, Wout Boerjan, Marc Van Montagu, Laurence B. Davin, and Norman G. Lewis, 1999. Evolution of Plant Defense Mechanisms. Relationships of phenylcoumaran benzylic ether reductases to pinoresinol-lariciresinol and isoflavone reductases. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 274, No. 11: 7516–7527
- ❖ Gónnewich Nils, Yasuhiro Higashi, Xiaohong Feng, Kum-Boo Choi, Jórgen Schmidt, Toni M. Kutchan, 2012. A diterpene synthase from the clary sage *Salvia sclarea* catalyzes the cyclization of geranylgeranyl diphosphate to (8R)-hydroxy-copalyl diphosphate. *Phytochemistry* (in press)
- ❖ Gorai Mustapha, Hayet Gasmi, Mohamed Neffati, 2011. Factors influencing seed germination of medicinal plant *Salvia aegyptiaca* L. (Lamiaceae). *Saudi Journal of Biological Sciences* 18: 255–260
- ❖ Grieve, M. (1984). *A Modern Herbal*. Savvas Publishing. ISBN unknown
- ❖ Guoyin Kai, Hui Xu, Congcong Zhou, Pan Liao, Jianbo Xiao, Xiuqin Luo, Lijia You, Lin Zhang, 2011. Metabolic engineering tanshinone biosynthetic pathway in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures. *Metabolic Engineering* 13: 319–327
- ❖ Guoyin Kai, Pan Liao, Tong Zhang, Wei Zhou, Jing Wang, Hui Xu, Yuanyun Liu, and Lin Zhang, 2010. Characterization, Expression Profiling, and Functional Identification of a Gene Encoding Geranylgeranyl Diphosphate Synthase from *Salvia miltiorrhiza*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 15: 236-245
- ❖ Gurr G.M., McGrath D., 2002. Foliar pubescence and resistance to potato moth, *Phthorimaea operculella*, in *Lycopersicon hirsutum*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 103:35-41
- ❖ Gutterman, 2000. Environmental factors and survival strategies of annual plant species in the Negev Desert, Israel. *Plant Species Biology* Volume 15, Issue 2, pages 113–125
- ❖ 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
- ❖ Hannibal T. Musarurwa, Johannes van Staden, Nokwanda P. Makunga, 2010. *In vitro* seed germination and cultivation of the aromatic medicinal *Salvia stenophylla* (Burch. ex Benth.) provides an alternative source of a-bisabolol. *Plant Growth Regul* 61:287–295
- ❖ Hatice Ogutcu, Atalay Sokmen, Munevver Sokmen, Moschos Polissiou, Julia Serkedjieva, Dimitra Daferera, Fikretin Sahin, Ozlem Baris, Medine Gulluce, 2008. Bioactivities of the Various Extracts and Essential Oils of *Salvia limbata* C.A.Mey. and *Salvia sclarea* L.. *Turk J Biol* 32: 181-192
- ❖ Hensen I, Müller C. Experimental and structural investigations of anemochorous dispersal. *Plant Ecology* 133 (2). 1997:169 - 180.
- ❖ Huang SQ, Takahashi Y, Dafni A., 2002. Why does the flower stalk of *Pulsatilla cernua* (*Ranunculaceae*) bend during anthesis?. *Am J Bot.* 2002 Oct;89(10):1599-603.
- ❖ Johnson H.B., 1975. Plant pubescence: an ecological perspective. *Botanical review* 41:233-260
- ❖ Kampranis Sotirios C., Daphne Ioannidis, Alan Purvis, Walid Mahrez, Ederina Ninga, Nikolaos A. Katerelos, Samir Anssour, Jim M. Dunwell, Jorg Degenhardt, Antonios M. Makris, Peter W. Goodenough, and Christopher B. Johnson, 2007. Rational Conversion of Substrate and Product Specificity in a *Salvia* Monoterpene Synthase: Structural Insights into the Evolution of Terpene Synthase Function. *The Plant Cell*, Vol. 19: 1994–2005
- ❖ Karabourniotis G., Bornman J.F., 1999. Penetration of UV-A, UV-B and blue light through the leaf trichome layers of two xeromorphic plants, olive and oak, measured by optical fibre microprobes. *Physiologia Plantarum* 105:655-661
- ❖ Karabourniotis G., Bornman J.F., Liakoura V., 1999. Different leaf surface characteristics of three grape cultivars affect leaf optical properties as measured with fibre optics: possible implication in stress tolerance. *Australian Journal of Plant Physiology* 26: 47-53
- ❖ 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

- ❖ 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., 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
- ❖ Keeling, C. I., and Bohlmann, J. (2006). Tansley Review: Genes, enzymes, and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens. *New Phytologist* 170(4):657-675
- ❖ Kiarash Afshar Pour Rezaeieh, Mina Shidfar, Bilal Gürbüz and Khalid M. Khavar, 2012. Genomic DNA extraction from seed induced callus and explants in *Salvia* L. species for utilization in secondary metabolite production. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 6(4): 636-640
- ❖ Kintzios Spiridon E., 2000. SAGE, The Genus *Salvia*. Harwood academic publishers
- ❖ Kintzios S., A. Nikolaou, M. Skoula, 1999. Somatic embryogenesis and in vitro rosmarinic acid accumulation in *Salvia officinalis* and *S. fruticosa* leaf callus cultures. *Plant Cell Reports* 18: 462–466
- ❖ Kintzios, S., Nikolaou, A., Skoula, M., Drossopoulos, J., Holevas, C. (1996). Somatic embryogenesis and in vitro rosmarinic acid production from mature leaves of *Salvia officinalis* and *S. fruticosa* biotypes collected in Greece. F.Pank (ed.), *Eucarpia Series: Beitr. . Zuchtungsforschung*, 282–285.
- ❖ Kreiter S., M-S. Tixier, B. A. Croft, P. Auger, and D. Barret., 2002. Plants and Leaf Characteristics Influencing the Predaceous Mite *Kampimodromus aberrans*(Acari: Phytoseiidae) in Habitats Surrounding Vineyards. *Environmental Entomology* 31(4):648-660.
- ❖ Lange BM, Croteau R, 1999. Genetic engineering of essential oil production in mint. *Curr Opin Plant Biol* 2: 139-144
- ❖ 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.
- ❖ Larkin J C, M D Marks, J Nadeau, and F Sack., 1997. Epidermal cell fate and patterning in leaves. *Plant Cell.* 1997 July; 9(7): 1109–1120.
- ❖ Lasseigne F. Todd, Stuart L. Warren, Frank A. Blazich, and Thomas G. Ranney, 2007. Day/Night Temperature Affects Growth and Photosynthesis of Cultivated *Salvia* Taxa. *J. AMER. SOC. HORT. SCI.* 132(4): 492–500
- ❖ Lies Maes and Alain Goossens, 2010. Hormone-mediated promotion of trichome initiation in plants is conserved but utilizes species- and trichome-specific regulatory mechanisms. *Plant Signaling & Behavior* 5,2: 205-207
- ❖ Lichtenthaler HK ,2000. Non-mevalonate isoprenoid biosynthesis: enzymes, genes and inhibitors. *Biochem Soc Trans* 28: 785-789
- ❖ Liu W., C. Ernie Chilcott, Richard C. Reich, Gary M. Hellmann. 1999. Regeneration of *Salvia sclarea* via organogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* Volume 36, Issue 3, pp 201-206
- ❖ Liu J., Xia K., Zhu J., Deng Y., Huang X., Hu B., Xu X., Xu Z., 2006. The nightshade proteinase inhibitor IIb gene is constitutively expressed in glandular trichomes. *Plant and Cell Physiology* 47:1274-1284
- ❖ Geir Løe, Per Toräng, Myriam Gaudeul, Jon Ågren, 2007. Trichome production and spatiotemporal variation in herbivory in the perennial herb *Arabidopsis lyrata*. *Oikos* 116:134-142
- ❖ Loreti F. Morini S. 1982. Mass propagation of fruit trees in Italy by tissue culture: present status and perspectives. *Combined Proceedings, International Plant Propagators Society* 1983. 32: 283-291
- ❖ Loulakakis Konstantinos A., Kalliopi A. Roubelakis-Angelakis and Angelos K. Kanellis, 1996. Isolation of Functional RNA From Grapevine Tissues Poor in Nucleic Acid Content. *Am. J. Enol. Vitic.*, Vol. 47, No. 2
- ❖ Łukasz Kuzma, Elzbieta Bruchajzer, Halina Wysokinska, 2009. Methyl jasmonate effect on diterpenoid accumulation in *Salvia sclarea* hairy root culture in shake flasks and sprinkle bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology* 44: 406–410
- ❖ Łukasz Kuźma, Danuta Kalemba, Marek Różalski, Barbara Różalska, Marzena Więckowska-Szakiel, Urszula Krajewska and Halina Wysokińska, 2009. Chemical Composition and

- Biological Activities of Essential Oil from *Salvia sclarea* Plants Regenerated *in vitro*. *Molecules* 14:1438-1447
- ❖ Ł. Kuźma, M. Rózsalski, E. Walencka, B. Rozalska, H. Wysokinska, 2007. Antimicrobial activity of diterpenoids from hairy roots of *Salvia sclarea* L.: Salvipisone as a potential anti-biofilm agent active against antibiotic resistant Staphylococci. *Phytomedicine* 14:31–35
 - ❖ Łukasz Kuzma, Zuzanna Skrzypek & Halina Wysokinska, 2006. Diterpenoids & triterpenoids in hairy roots of *Salvia sclarea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 84: 171-179
 - ❖ Manetas Y. 1996. Optical properties of hairs during the early growth stages of leaf development in *Platanus orientalis*. *Australian Journal of Plant Physiology* 23: 535–538
 - ❖ Martin DM, Faldt J, Bohlmann J, 2004. Functional characterization of nine Norway Spruce TPS genes and evolution of gymnosperm terpene synthases of the TPS-d subfamily. *Plant Physiol* 135: 1908-1927
 - ❖ Masinde P.S., 2004. Trap-flower fly pollination in East African *Ceropegia* L. (*Apocynaceae*). *International Journal of Tropical Insect Science*. Vol. 24, Issue 01, March 2004 pp 55-72
 - ❖ McCaskill D. and Croteau R. 1999. Strategies for bioengineering the development and metabolism of glandular tissues in plants. *Nature Biotech*, 17: 31-36
 - ❖ McGarvey D.J., Croteau R., 1995. Terpenoid metabolism. *Plant Cell*, 7: 1015-1026
 - ❖ Michalczuk L., Cooke TJ., Cohen DJ., 1992. Auxins levels at different stages of carrot somatic embryogenesis. *Phytochemistry* 31:1097-1103
 - ❖ Mirian Bueno, Osvaldo Di Sapio, Melisa Barolo, María Emilia Villalonga, Héctor Busilacchi and Cecilia Severin, 2010. *In vitro* response of different *Salvia hispanica* L. (*Lamiaceae*) explants. *Ideefyn* vol 21: 125-126
 - ❖ Moyano F. , A. Cocucci¹, A. Sérsic, 2003. Accessory Pollen Adhesive from Glandular Trichomes on the Anthers of *Leonurus sibiricus* L. (*Lamiaceae*). *Plant Biol (Stuttg)* 2003; 5(4): 411-418
 - ❖ Mouna Ben Taarit, Kamel Msaada, Karim Hosni, Brahim Marzouk, 2011. Physiological changes and essential oil composition of clary sage (*Salvia sclarea* L.) rosette leaves as affected by salinity. *Acta Physiol Plant* 33:153-162
 - ❖ Mouna Ben Taarit, Kamel Msaada, Karim Hosni, Brahim Marzouk, 2012. Fatty acids, phenolic changes and antioxidant activity of clary sage (*Salvia sclarea* L.) rosette leaves grown under saline conditions. *Industrial Crops and Products* 38: 58– 63
 - ❖ Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473–497
 - ❖ Murugan, R. and Shivanna, KR. and Rao, RR. (2006) Pollination biology of *Aristolochia tagala*, a rare species of medicinal importance. *Current Science*, 91 (6). pp. 795-798.
 - ❖ Naser A. Arikat, Fawzia M. Jawad, Nabila S. Karam, Rida A. Shibli, 2003. Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticosa* Mill.). *Scientia Horticulturæ* 100: 193–202
 - ❖ Ortiz-Perez, E, Cianzio, S, Wiley, H, Horner H, Davis, W, Palmer, Reid, 2006. Insect-Mediated cross-pollination in soybean (*Glycine Max* (L.) Merrill): I. Agronomic Performance. *Field Crops Research*. 101:259-268
 - ❖ Pateraki Irene, Angelos K. Kanellis, 2008. Isolation and functional analysis of two *Cistus creticus* cDNAs encoding geranylgeranyl diphosphate synthase. *Phytochemistry* 69: 1641-1652
 - ❖ Pelin Baran, Canan Ozdemir and Kamuran Aktas, 2008. Glandular and eglandular hairs on the aerial organs of *Salvia viridis* L. (*Lamiaceae*) in Turkey. *Pak. J. Pl. Sci.*, 14 (1): 1-8
 - ❖ Perry E. K., Pickering A. T., Wang W. W., Houghton P. J., Perry N. S. L. 1999. Medicinal Plants and Alzheimer's Disease: from Ethnobotany to Phytotherapy. *J. Pharm. Pharmacol.*, 51, 527-534.
 - ❖ Peterson R.L. and Vermeer J., (1984) Histochemistry of trichomes. In: *Biology and Chemistry of Plant trichomes*. Plenum Press, New York. pp.71-94.
 - ❖ Pinarosa Avato, Irene Morone Fortunato, Claudia Ruta, Roberta D'Elia, 2005. Glandular hairs and essential oils in micropropagated plants of *Salvia officinalis* L.. *Plant Science* 169:29–36
 - ❖ Ray F. Evert, 2006. ESAU'S PLANT ANATOMY. Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body: Their Structure, Function, and Development. John Wiley & Sons Inc., Publication. Third Edition.
 - ❖ Prakash V., 1990. Leafy spices. CRC Press, Boca Raton, Florida, US, pp:114
 - ❖ Rodriguez-Concepcion M, 2006. Early Steps in Isoprenoid Biosynthesis: Multilevel Regulation of the Supply of Common Precursors in Plant Cells. *Phytochemistry Reviews* 5:1-15

- ❖ Rozalski Marek, Łukasz Kuzma, Urszula Krajewska, and Halina Wysokinska, 2006. Cytotoxic and Proapoptotic Activity of Diterpenoids from *in vitro* Cultivated *Salvia sclarea* Roots. Studies on the Leukemia Cell Lines. Z. Naturforsch. 61c: 483-488
- ❖ Schellmann S, Hulskamp M, 2005. Epidermal differentiation: trichomes in Arabidopsis as a model system. Int J Dev Biol 49: 579–584
- ❖ Schillmiller AL, Last RL, Pichersky E., 2008. Harnessing plant trichome biochemistry for the production of useful compounds. Plant J. 2008 May;54(4):702-11.
- ❖ Schillmiller Anthony L., Robert L. Last, and Eran Pichersky, 2008. Harnessing plant trichome biochemistry for the production of useful compounds. The Plant Journal 54: 702–711
- ❖ Schmiderer C., P. Grassi, J. Novak, M. Weber & C. Franz, 2008. Diversity of essential oil glands of clary sage (*Salvia sclarea* L., Lamiaceae). Plant Biology 10: 433–440
- ❖ Seelmann L., A. Auer, D. Hoffmann, P. Schausberger., 2004. Leaf pubescence mediates intraguild predation between predatory mites. Oikos Volume 116, Issue 5, pages 807–817
- ❖ Shepherd RW, Bass WT, Houtz RL, Wagner GJ., 2005. Phylloplanins of tobacco are defensive proteins deployed on aerial surfaces by short glandular trichomes. Plant Cell. 2005 Jun;17(6):1851-61. Epub 2005 May 13.
- ❖ Siebert Daniel J., 2004. Localization of Salvinorin A and Related Compounds in Glandular Trichomes of the Psychoactive Sage, *Salvia divinorum*. Annals of Botany 93: 763-771
- ❖ Simmons A.T., Gurr G.M., 2005. Trichomes of *Lycopersicon* species and their hybrids: effects on pests and natural enemies. Agricultural and Forest Entomology 7:265-276
- ❖ Steyn E.M.A., Smith G.F., Van Wyk A.E., 2004. Functional and taxonomic significance of seed structure in *Salix mucronata* (Salicaceae). Bothalia 34:53-59
- ❖ Sunil Chandra Joshi and S.C. Pant, 2010. Physical Purity Analysis and Germination of *Salvia sclarea* L. a Medicinal Plant. Nature and Science 2010:8(1)
- ❖ Sylvain Legrand, Nadine Valot, Florence Nicolé, Sandrine Moja, Sylvie Baudino, Frédéric Jullien, Jean-Louis Magnard, Jean-Claude Caissard, Laurent Legendre, 2010. One-step identification of conserved miRNAs, their targets, potential transcription factors and effector genes of complete secondary metabolism pathways after 454 pyrosequencing of calyx cDNAs from the Labiate *Salvia sclarea* L. Gene 450: 55–62
- ❖ Theobald W.L., Krahulik J.L., Rollins R.C., 1979. Trichome description and classification, In: Anatomy of the Dicotyledons, Vol.1:40-53
- ❖ Torres, M.E., Velasco-Neguerela, A., Perez-Alonso, M.J., Pinilla, M.G. (1997). Volatile constituents of two *Salvia* species grown wild in Spain. Journal of Essential Oil Research. 9, 27–33
- ❖ Van Dam, J. Daniel Hare, 1998. Biological Activity of *Datura wrightii* Glandular Trichome Exudate Against *Manduca Sexta* Larvae. Journal of Chemical Ecology. September 1998, Volume 24, Issue 9, pp 1529-1549
- ❖ Ulubelen a., Oksuz S., Goren n., 1987. Sesquiterpene acids from *Inula viscosa*. Phytochemistry 26:1223-1224
- ❖ Uphof J. C. TH., and K. Hummel., 1962. Plant Hairs. Encyclopedia of Plant Anatomy, Band 4, Teil 5. Gebrüder Borntraeger, Berlin
- ❖ 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 K, Croteau R, 2000. Taxol biosynthesis: molecular cloning of a benzoyl- CoA:taxane 2alpha-O-benzoyltransferase cDNA from taxus and functional expression in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97: 13591-13596
- ❖ Wang E., Wang R., DeParasis J., Loughrin J.H., Gan S., Wagner G.J., 2001. Suppression of a P450 hydroxydase gene in plant trichome glands enhances natural-product-based aphid resistance. Nature Biotechnology 19:371-374
- ❖ Wenping Hua, Jie Song, Cuiqin Li, Zhezhi Wang, 2012. Molecular cloning and characterization of the promoter of SmGGPPs and its expression pattern in *Salvia miltiorrhiza*. Mol Biol Rep 39: 5775–5783
- ❖ Wennuan Liu, C. Ernie Chilcott, Richard C. Reich and Gary M. Hellmann, 2000. Regeneration of *Salvia sclarea* via organogenesis. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 36: 201–206
- ❖ Werker Ella, 1993. Function of Essential Oil-Secreting Glandular Hairs in Aromatic Plants of the Lamiaceae - A Review. Flavour and Fragrance Journal, VOL. 8: 249-255
- ❖ Werker E., 2000. Trichome diversity and development. Advances in Botanical Research Vol.31. Academic press Pages 1–35

- ❖ Werker E., Ravid U., Putievsky E. 1985. Glandular hairs and their secretions in the vegetative and reproductive organs of *Salvia sclarea* and *S. dominica*. *Israel Journal of Botany*. 34: 239–252.
- ❖ Xiaoguo Zhang and David G. Oppenheimer, 2004. A Simple and Efficient Method for Isolating Trichomes for Downstream Analyses. *Plant Cell Physiol*. 45(2): 221–224
- ❖ Ya-ping Yan, Zhe-zhi Wang, 2007. Genetic transformation of the medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated method. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 88:175–184
- ❖ Zaks Alon, Rachel Davidovich-Rikanati, Einat Bar, Moshe Inbar, and Efraim Lewinsohn, 2008. Biosynthesis of linalyl acetate and other terpenes in lemon mint (*Mentha aquatica* var. *citrata*, Lamiaceae) glandular trichomes. *Israel Journal of Plant Sciences* Vol. 56: 233–244
- ❖ Zeriahe N., R.Pratt, Goldberg A., M. Catesson and M. Harche-Kaid, 1998. Cell Walls of Seed Hairs from *Lygeum spartum*: Ultrastructure, Composition and Mechanical Properties. *Ann Bot* (1998) 81 (1): 61-66.
- ❖ Zheng W, Wang S.Y, 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J Agric Food Chem* 49: 5165-70
- ❖ Zhu Y. Z., Huang S. H., Tan B. K. H., Sun J., Whiteman M., Zhu Y.-C. 2004. Antioxidants in Chinese herbal medicines: a biochemical perspective. *Nat. Prod. Rep.* 21, 478 -489.
- ❖ Αναστασάκη Θ., 1999. Μελέτη πηκτικών συστατικών φυτών της Κρητικής χλωρίδας με αέριο χρωματογραφία και αέριο χρωματογραφία συνδεδεμένη με φασματομετρία μάζας. Μεταπτυχιακή διατριβή. Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα
- ❖ Γαλάτης Β., Γανωτάκης Δ., Γκανή-Σπυροπούλου Κ., Καραμπουρνιώτης Γ., Κοτζαμπάσης Κ., Κωνσταντινίδου Ε.-Ι., Μανέτας Ι., Ρουμπελάκη-Αγγελάκη Κ.Α., 2003. Φυσιολογία Φυτών από το μόριο στο περιβάλλον. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης: 333-353
- ❖ Καραμπουρνιώτης Γ., 2003. Δευτερογενής μεταβολισμός. Φυσιολογία Φυτών: Από το Μόριο στο Περιβάλλον. Ηράκλειο: Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης: 333-354
- ❖ Κατσιώτης Σταύρος, Χατζοπούλου Πασχαλίνα, 2010. Αρωματικά - Φαρμακευτικά Φυτά και Αιθέρια Έλαια. Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη:43-54, 235-269, 875-894
- ❖ Μανέτας Ι., 2003. Πρόσληψη και μεταφορά νερού, εντός: Φυσιολογία Φυτών: Από το μόριο στο περιβάλλον. Ηράκλειο: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης: 40-98
- ❖ Μποζαμπαλίδης Α., 2003. Βοτανική. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης: 382
- ❖ Χατζόπουλος Π., 2001. Βιοτεχνολογία Φυτών. Εκδόσεις Εμβρυο: 191-220

► CinSyn1-REV

gi11118226	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	340	360	380	400	420	440	460	480	500	520	540	560	580	600	620	640	660	680	700	720	740	760	780	800	820	840	860	880	900	920	940	960	980	1000	1020	1040	1060	1080	1100	1120	1140	1160	1180	1200	1220	1240	1260	1280	1300	1320	1340	1360	1380	1400	1420	1440	1460	1480	1500	1520	1540	1560	1580	1600	1620	1640	1660	1680	1700	1720	1740	1760	1780	1800	1820	1840	1860	1880	1900	1920	1940	1960	1980	2000	2020	2040	2060	2080	2100	2120	2140	2160	2180	2200	2220	2240	2260	2280	2300	2320	2340	2360	2380	2400	2420	2440	2460	2480	2500	2520	2540	2560	2580	2600	2620	2640	2660	2680	2700	2720	2740	2760	2780	2800	2820	2840	2860	2880	2900	2920	2940	2960	2980	3000	3020	3040	3060	3080	3100	3120	3140	3160	3180	3200	3220	3240	3260	3280	3300	3320	3340	3360	3380	3400	3420	3440	3460	3480	3500	3520	3540	3560	3580	3600	3620	3640	3660	3680	3700	3720	3740	3760	3780	3800	3820	3840	3860	3880	3900	3920	3940	3960	3980	4000	4020	4040	4060	4080	4100	4120	4140	4160	4180	4200	4220	4240	4260	4280	4300	4320	4340	4360	4380	4400	4420	4440	4460	4480	4500	4520	4540	4560	4580	4600	4620	4640	4660	4680	4700	4720	4740	4760	4780	4800	4820	4840	4860	4880	4900	4920	4940	4960	4980	5000	5020	5040	5060	5080	5100	5120	5140	5160	5180	5200	5220	5240	5260	5280	5300	5320	5340	5360	5380	5400	5420	5440	5460	5480	5500	5520	5540	5560	5580	5600	5620	5640	5660	5680	5700	5720	5740	5760	5780	5800	5820	5840	5860	5880	5900	5920	5940	5960	5980	6000	6020	6040	6060	6080	6100	6120	6140	6160	6180	6200	6220	6240	6260	6280	6300	6320	6340	6360	6380	6400	6420	6440	6460	6480	6500	6520	6540	6560	6580	6600	6620	6640	6660	6680	6700	6720	6740	6760	6780	6800	6820	6840	6860	6880	6900	6920	6940	6960	6980	7000	7020	7040	7060	7080	7100	7120	7140	7160	7180	7200	7220	7240	7260	7280	7300	7320	7340	7360	7380	7400	7420	7440	7460	7480	7500	7520	7540	7560	7580	7600	7620	7640	7660	7680	7700	7720	7740	7760	7780	7800	7820	7840	7860	7880	7900	7920	7940	7960	7980	8000	8020	8040	8060	8080	8100	8120	8140	8160	8180	8200	8220	8240	8260	8280	8300	8320	8340	8360	8380	8400	8420	8440	8460	8480	8500	8520	8540	8560	8580	8600	8620	8640	8660	8680	8700	8720	8740	8760	8780	8800	8820	8840	8860	8880	8900	8920	8940	8960	8980	9000	9020	9040	9060	9080	9100	9120	9140	9160	9180	9200	9220	9240	9260	9280	9300	9320	9340	9360	9380	9400	9420	9440	9460	9480	9500	9520	9540	9560	9580	9600	9620	9640	9660	9680	9700	9720	9740	9760	9780	9800	9820	9840	9860	9880	9900	9920	9940	9960	9980	10000
------------	-------	----	-------	----	-------	----	-------	----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	-------	-------

CinSyn1-FOR

g1|18957440: 20 40 60 80 100 120 140 160 180 200 220 240 260 280 300 320 340 360 380 400 420 440 460 480 500 520 540 560 580 600 620 640 660 680 700 720 740 760 780 800 820 840 860 880 900 920 940 960 980 1000 1020 1040 1060 1080 1100 1120 1140 1160 1180 1200 1220 1240 1260 1280 1300 1320 1340 1360 1380 1400 1420 1440 1460 1480 1500 1520 1540 1560 1580 1600 1620 1640 1660 1680 1700 1720 1740 1760 1780 1800 1820 1840 1860 1880 1900 1920 1940 1960 1980 2000 2020 2040 2060 2080 2100 2120 2140 2160 2180 2200 2220 2240 2260 2280 2300 2320 2340 2360 2380 2400 2420 2440 2460 2480 2500 2520 2540 2560 2580 2600 2620 2640 2660 2680 2700 2720 2740 2760 2780 2800 2820 2840 2860 2880 2900 2920 2940 2960 2980 3000 3020 3040 3060 3080 3100 3120 3140 3160 3180 3200 3220 3240 3260 3280 3300 3320 3340 3360 3380 3400 3420 3440 3460 3480 3500 3520 3540 3560 3580 3600 3620 3640 3660 3680 3700 3720 3740 3760 3780 3800 3820 3840 3860 3880 3900 3920 3940 3960 3980 4000 4020 4040 4060 4080 4100 4120 4140 4160 4180 4200 4220 4240 4260 4280 4300 4320 4340 4360 4380 4400 4420 4440 4460 4480 4500 4520 4540 4560 4580 4600 4620 4640 4660 4680 4700 4720 4740 4760 4780 4800 4820 4840 4860 4880 4900 4920 4940 4960 4980 5000 5020 5040 5060 5080 5100 5120 5140 5160 5180 5200 5220 5240 5260 5280 5300 5320 5340 5360 5380 5400 5420 5440 5460 5480 5500 5520 5540 5560 5580 5600 5620 5640 5660 5680 5700 5720 5740 5760 5780 5800 5820 5840 5860 5880 5900 5920 5940 5960 5980 6000 6020 6040 6060 6080 6100 6120 6140 6160 6180 6200 6220 6240 6260 6280 6300 6320 6340 6360 6380 6400 6420 6440 6460 6480 6500 6520 6540 6560 6580 6600 6620 6640 6660 6680 6700 6720 6740 6760 6780 6800 6820 6840 6860 6880 6900 6920 6940 6960 6980 7000 7020 7040 7060 7080 7100 7120 7140 7160 7180 7200 7220 7240 7260 7280 7300 7320 7340 7360 7380 7400 7420 7440 7460 7480 7500 7520 7540 7560 7580 7600 7620 7640 7660 7680 7700 7720 7740 7760 7780 7800 7820 7840 7860 7880 7900 7920 7940 7960 7980 8000 8020 8040 8060 8080 8100 8120 8140 8160 8180 8200 8220 8240 8260 8280 8300 8320 8340 8360 8380 8400 8420 8440 8460 8480 8500 8520 8540 8560 8580 8600 8620 8640 8660 8680 8700 8720 8740 8760 8780 8800 8820 8840 8860 8880 8900 8920 8940 8960 8980 9000 9020 9040 9060 9080 9100 9120 9140 9160 9180 9200 9220 9240 9260 9280 9300 9320 9340 9360 9380 9400 9420 9440 9460 9480 9500 9520 9540 9560 9580 9600 9620 9640 9660 9680 9700 9720 9740 9760 9780 9800 9820 9840 9860 9880 9900 9920 9940 9960 9980 10000

CinSyn2-FOR

```
g1|8957440: 20 40 60 80 100 120 140 160
g1|2243818: ATATATGTAGAGAGAAACCAATCCATCAAAAGATAAATTAAGTATAATACAAA...
g1|1589790: ...
g1|1488878: ...
g1|2234687: ...
g1|7643980: ...
g1|1111826: ...
#CinSyn1F: ...
g1|3898893: ...
g1|1125541: ...

g1|8957440: 180 200 220 240 260 280 300 320 340 360 380 400 420 440 460 480 500
g1|2243818: ...
g1|1589790: ...
g1|1488878: ...
g1|2234687: ...
g1|7643980: ...
g1|1111826: ...
#CinSyn1F: ...
g1|3898893: ...
g1|1125541: ...

g1|8957440: 40 60 80 100 120 140 160 180 200 220 240 260 280 300 320 340 360 380 400 420 440 460 480 500
g1|2243818: ...
g1|1589790: ...
g1|1488878: ...
g1|2234687: ...
g1|7643980: ...
g1|1111826: ...
#CinSyn1F: ...
g1|3898893: ...
g1|1125541: ...

g1|8957440: 520 540 560 580 600 620 640 660 680 700 720 740 760 780 800 820 840
g1|2243818: ...
g1|1589790: ...
g1|1488878: ...
g1|2234687: ...
g1|7643980: ...
g1|1111826: ...
#CinSyn1F: ...
g1|3898893: ...
g1|1125541: ...

g1|8957440: 860 880 900 920 940 960 980 1000
g1|2243818: ...
g1|1589790: ...
g1|1488878: ...
g1|2234687: ...
g1|7643980: ...
g1|1111826: ...
#CinSyn1F: ...
g1|3898893: ...
g1|1125541: ...

g1|8957440: 1020 1040 1060 1080 1100 1120 1140 1160 1180
g1|2243818: ...
g1|1589790: ...
g1|1488878: ...
g1|2234687: ...
g1|7643980: ...
g1|1111826: ...
#CinSyn1F: ...
g1|3898893: ...
g1|1125541: ...

g1|8957440: 1200 1220 1240 1260 1280 1300 1320 1340
g1|2243818: ...
g1|1589790: ...
g1|1488878: ...
g1|2234687: ...
g1|7643980: ...
g1|1111826: ...
#CinSyn1F: ...
g1|3898893: ...
g1|1125541: ...

g1|8957440: 1360 1380 1400 1420 1440 1460 1480 1500 1520
g1|2243818: ...
g1|1589790: ...
g1|1488878: ...
g1|2234687: ...
g1|7643980: ...
g1|1111826: ...
#CinSyn1F: ...
g1|3898893: ...
g1|1125541: ...

g1|8957440: 1540 1560 1580 1600 1620 1640 1660 1680
g1|2243818: ...
g1|1589790: ...
g1|1488878: ...
g1|2234687: ...
g1|7643980: ...
g1|1111826: ...
#CinSyn1F: ...
g1|3898893: ...
g1|1125541: ...

g1|8957440: 1700 1720 1740 1760 1780 1800 1820 1840 1860
g1|2243818: ...
g1|1589790: ...
g1|1488878: ...
g1|2234687: ...
g1|7643980: ...
g1|1111826: ...
#CinSyn1F: ...
g1|3898893: ...
g1|1125541: ...

g1|8957440: 1800 1820 1840 1860 1880 1900 1920 1940 1960 1980 2000 2020
g1|2243818: ...
g1|1589790: ...
g1|1488878: ...
g1|2234687: ...
g1|7643980: ...
g1|1111826: ...
#CinSyn1F: ...
g1|3898893: ...
g1|1125541: ...

g1|8957440: 2040 2060 2080 2100 2120 2140 2160 2180 2200
g1|2243818: ...
g1|1589790: ...
g1|1488878: ...
g1|2234687: ...
g1|7643980: ...
g1|1111826: ...
#CinSyn1F: ...
g1|3898893: ...
g1|1125541: ...

g1|8957440: 2240 2260 2280 2300 2320 2340
g1|2243818: ...
g1|1589790: ...
g1|1488878: ...
g1|2234687: ...
g1|7643980: ...
g1|1111826: ...
#CinSyn1F: ...
g1|3898893: ...
g1|1125541: ...
```


➤ LPPS-REV

```

*      20      *      40      *      60      *      80      *      100     *      120     *      140     *      160     *
ssLPPS : ATGACTTCTGTAATTTGAGCAGAGCACCAGCAGCGATTATCCGGGCGAGGCTGACGTACAGCCGGAAATTCATCCCGAGTGTTCATGCTGAAAGCCAGCAGCAACACGGCCCTTCACTTGAATGCCAAATCCGCTCTAAGCACTCTCCAAATAGTGGAAAT : 170
ssLPPSREV : -----
ssSS : -----

*      180     *      200     *      220     *      240     *      260     *      280     *      300     *      320     *      340
ssLPPS : GAGGTATACAGCTGGATGGTCCGACAGCGAGTGAAGAAAGACATTTCCCTGTTTCACTCCGATAGGTTGAGGTAAATGAAAGATCGAGGAGTCAATCGAGTACGTCGAAATCTGTTGATGACCTGGGGGAGCGGGGATTAAGCGGTGACCTATGACAGCG : 340
ssLPPSREV : -----
ssSS : -----

*      360     *      380     *      400     *      420     *      440     *      460     *      480     *      500     *
ssLPPS : CAGTGTATCCCTGATCAAGGACTTGAAGGGGGGAGCCGCCGACAGTCCATCTCTGACATCCGCAACCAATGCTGCTGATCCATCGATCCGTTCTGTAATTTATCGGATCCATATTGCGGCTGTCTAGCTTTGATG : 508
ssLPPSREV : -----
ssSS : -----

*      520     *      540     *      560     *      580     *      600     *      620     *      640     *      660     *      680
ssLPPS : GAGTCCAGCTGATGAGTGAAGTTCGACAAAGAGGTTGAGTCCGACAGGAGTCCGATCTACTTAAAGCCGAAAGTTGACACAGAGCGGCTCCGCTGCTGATGATGATGAGATTTGGGCTGCTGCTCCCTCA : 678
ssLPPSREV : -----
ssSS : -----

*      700     *      720     *      740     *      760     *      780     *      800     *      820     *      840     *
ssLPPS : GATCCATCAATGCAACCACTTTTTCGCTGACAAAGAGTTCGACAAAGAGGTTGAGTCCGACAGGAGTCCGATCTACTTAAAGCCGAAAGTTGACACAGAGCGGCTCCGCTGCTGATGATGAGATTTGGGCTGCTGCTCCCTCA : 847
ssLPPSREV : -----
ssSS : -----

*      860     *      880     *      900     *      920     *      940     *      960     *      980     *      1000    *      1020
ssLPPS : CTGTCCTCCAGCTGATGAGTGAAGTTCGACAAAGAGGTTGAGTCCGACAGGAGTCCGATCTACTTAAAGCCGAAAGTTGACACAGAGCGGCTCCGCTGCTGATGATGAGATTTGGGCTGCTGCTCCCTCA : 1016
ssLPPSREV : -----
ssSS : -----

*      1040    *      1060    *      1080    *      1100    *      1120    *      1140    *      1160    *      1180
ssLPPS : GGTTCCTCCAGCTGATGAGTGAAGTTCGACAAAGAGGTTGAGTCCGACAGGAGTCCGATCTACTTAAAGCCGAAAGTTGACACAGAGCGGCTCCGCTGCTGATGATGAGATTTGGGCTGCTGCTCCCTCA : 1186
ssLPPSREV : -----
ssSS : -----

*      1200    *      1220    *      1240    *      1260    *      1280    *      1300    *      1320    *      1340    *      1360
ssLPPS : TACCAAGCTGATGAGTGAAGTTCGACAAAGAGGTTGAGTCCGACAGGAGTCCGATCTACTTAAAGCCGAAAGTTGACACAGAGCGGCTCCGCTGCTGATGATGAGATTTGGGCTGCTGCTCCCTCA : 1356
ssLPPSREV : -----
ssSS : -----

*      1380    *      1400    *      1420    *      1440    *      1460    *      1480    *      1500    *      1520
ssLPPS : AAGTCCAGCTGATGAGTGAAGTTCGACAAAGAGGTTGAGTCCGACAGGAGTCCGATCTACTTAAAGCCGAAAGTTGACACAGAGCGGCTCCGCTGCTGATGATGAGATTTGGGCTGCTGCTCCCTCA : 1526
ssLPPSREV : -----
ssSS : -----

*      1540    *      1560    *      1580    *      1600    *      1620    *      1640    *      1660    *      1680    *      1700
ssLPPS : GCAATGATGAGTGAAGTTCGACAAAGAGGTTGAGTCCGACAGGAGTCCGATCTACTTAAAGCCGAAAGTTGACACAGAGCGGCTCCGCTGCTGATGATGAGATTTGGGCTGCTGCTCCCTCA : 1696
ssLPPSREV : -----
ssSS : -----

*      1720    *      1740    *      1760    *      1780    *      1800    *      1820    *      1840    *      1860
ssLPPS : CAGCCCTGATGAGTGAAGTTCGACAAAGAGGTTGAGTCCGACAGGAGTCCGATCTACTTAAAGCCGAAAGTTGACACAGAGCGGCTCCGCTGCTGATGATGAGATTTGGGCTGCTGCTCCCTCA : 1866
ssLPPSREV : -----
ssSS : -----

*      1880    *      1900    *      1920    *      1940    *      1960    *      1980    *      2000    *      2020    *      2040
ssLPPS : GAGTCCAGCTGATGAGTGAAGTTCGACAAAGAGGTTGAGTCCGACAGGAGTCCGATCTACTTAAAGCCGAAAGTTGACACAGAGCGGCTCCGCTGCTGATGATGAGATTTGGGCTGCTGCTCCCTCA : 2036
ssLPPSREV : -----
ssSS : -----

*      2060    *      2080    *      2100    *      2120    *      2140    *      2160    *      2180    *      2200
ssLPPS : CAGCCCTGATGAGTGAAGTTCGACAAAGAGGTTGAGTCCGACAGGAGTCCGATCTACTTAAAGCCGAAAGTTGACACAGAGCGGCTCCGCTGCTGATGATGAGATTTGGGCTGCTGCTCCCTCA : 2206
ssLPPSREV : -----
ssSS : -----

*      2220    *      2240    *      2260    *      2280    *      2300    *      2320    *      2340    *      2360
ssLPPS : AGTCCAGCTGATGAGTGAAGTTCGACAAAGAGGTTGAGTCCGACAGGAGTCCGATCTACTTAAAGCCGAAAGTTGACACAGAGCGGCTCCGCTGCTGATGATGAGATTTGGGCTGCTGCTCCCTCA : 2358
ssLPPSREV : -----
ssSS : -----

```