



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ & ΓΕΩΡΓΙΚΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΥ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΚΑΙΝΟΤΟΜΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΑΕΙΦΟΡΙΚΗ ΓΕΩΡΓΙΑ,
ΣΤΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΦΥΤΩΝ & ΣΤΗΝ ΑΓΡΟΜΕΤΕΩΡΟΛΟΓΙΑ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

«Μελέτη και ταυτοποίηση της βιοσυνθετικής οδού ανθοκυανών
σε ερυθρόβρακτους φαινοτύπους *Sideritis raeseri*»



Αγγελική Α. Κασιούρα

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:
Τάνη Ελένη, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ
2023

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ & ΓΕΩΡΓΙΚΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΥ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΚΑΙΝΟΤΟΜΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΑΕΙΦΟΡΙΚΗ ΓΕΩΡΓΙΑ,
ΣΤΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΦΥΤΩΝ & ΣΤΗΝ ΑΓΡΟΜΕΤΕΩΡΟΛΟΓΙΑ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

«Μελέτη και ταυτοποίηση της βιοσυνθετικής οδού ανθοκυανών
σε ερυθρόβρακτους φαινοτύπους *Sideritis raeseri*»

“Elucidation of anthocyanin biosynthetic pathway in a red-colored
ecotype of *Sidetitis raeseri* species”

Αγγελική Α. Κασιούρα

Εξεταστική επιτροπή:

Τάνη Ελένη, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ (επιβλέπουσα)

Σάρρου Ειρήνη, Ερευνήτρια ΕΛΓΟ- ΔΗΜΗΤΡΑ (συνεπιβλέπουσα)

Μπεμπέλη Πηνελόπη, Καθηγήτρια ΓΠΑ

Μελέτη και ταυτοποίηση της βιοσυνθετικής οδού ανθοκυανών σε ερυθρόβρακτους φαινότυπους *Sideritis raeseri*

ΠΜΣ Καινοτόμες Εφαρμογές στην Αειφορική Γεωργία, Βελτίωση Φυτών & στην Αγρομετεωρολογία

Τμήμα Φυτικής Παραγωγής

Εργαστήριο Γενετικής Βελτίωσης & Γενετικού Πειραματισμού

Περίληψη

Το είδος *S. raeseri*, γνωστό και ως «τσάι του βουνού», είναι φυτικό ενδημικό είδος της Βαλκανικής Χερσονήσου και κατατάσσεται στα αρωματικά φυτά, λόγω της χημικής του σύστασης που χαρακτηρίζεται από την παρουσία δευτερογενών μεταβολιτών. Ο σιδηρίτης έχει εμπορική και οικονομική αξία, καθώς καταναλώνεται ευρέως ως ρόφημα και καταπραΰνει συμπτώματα γρίπης, αναπνευστικών λοιμώξεων και δυσπεψίας, ενώ θεωρείται ότι έχει αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική δράση. Η αντιοξειδωτική του δράση αποδίδεται κυρίως στην παρουσία προϊόντων του δευτερογενούς μεταβολισμού. Σε άγριους πληθυσμούς *S. raeseri* στη Βόρεια Ελλάδα εντοπίστηκαν φαινότυποι που αναπτύσσουν ερυθρά βράκτεια φύλλα, αντί για πράσινα, που είναι ο φυσιολογικός φαινότυπος, κάτι το οποίο θεωρήθηκε ως αρνητικό χαρακτηριστικό λόγω του ότι ήταν ανεπιθύμητο από το καταναλωτικό κοινό. Η παρουσία των «ερυθρόβρακτων» φαινότυπων οφείλεται στην παραγωγή ανθοκυανών στα βράκτεια με αποτέλεσμα τον κόκκινο-καφέ χρωματισμό. Οι ανθοκυανίνες είναι φαινολικές ενώσεις και μπορεί να έχουν προστατευτικό ρόλο για το φυτό έναντι βιοτικών ή αβιοτικών καταπονήσεων. Το μονοπάτι βιοσύνθεσης των ανθοκυανών έχει αποσαφηνιστεί σε άλλα είδη, επομένως τα γονίδια που συμμετέχουν σε αυτό είναι γνωστά.

Ο κύριος στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η απομόνωση και ο λειτουργικός χαρακτηρισμός των κυριότερων γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση ανθοκυανών, αλλά και η μέτρηση της σχετικής τους έκφρασης στα «ερυθρόβρακτα» φυτά. Γι' αυτό το σκοπό, τα υποψήφια γονίδια *DFR*, *ANS* και *UFGT* απομονώθηκαν και κλωνοποιήθηκαν σε φορείς για να χαρακτηριστούν σε ετερόλογα συστήματα έκφρασης, όπως οι ζυμομύκητες (*Saccharomyces cerevisiae*). Αυτό δεν κατέστη εφικτό, καθώς στα προϊόντα των γονιδίων δεν ανιχνεύθηκε δραστηριότητα μέσω υγρής χρωματογραφίας. Ωστόσο, τα αποτελέσματα της ανάλυσης RT-qPCR έδειξαν ότι τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν τα κυριότερα ένζυμα που συμμετέχουν σε αυτή τη βιοσυνθετική οδό ήταν σημαντικά αυξημένα σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης των ίδιων γονιδίων στο φαινότυπο με πράσινα βράκτεια.

Τέλος, όλη η έρευνα της παρούσας εργασίας συμβάλλει στη λειτουργική ανάλυση των γονιδίων που πιθανόν βοηθούν στη βελτίωση των γονοτύπων με ερυθρά βράκτεια, αλλά και ταυτοποίηση αυτών των γονιδίων που η υπερέκφρασή τους οδηγεί στην παραγωγή περισσότερων δευτερογενών μεταβολιτών που είναι επιθυμητοί για τη φαρμακοβιομηχανία.

Επιστημονική περιοχή: Γενετική Βελτίωση

Λέξεις κλειδιά: *Sideritis*, ανθοκυανίνες, αρωματικά φυτά

Elucidation of anthocyanin biosynthetic pathway in a red-colored ecotype of *Sideritis raeseri* species

MSc Innovative Applications in Sustainable Agriculture, Plant Breeding & Agro-meteorology
Department of Crop Science
Laboratory of Plant Breeding & Biometry

Abstract

S. raeseri, also known as "mountain tea", is a plant species native to the Balkan Peninsula and is classified as an aromatic plant due to its chemical composition characterized by the presence of secondary metabolites. *S. raeseri* has commercial and economic value, as it is widely consumed as a beverage and heals symptoms of flu, respiratory infections and indigestion, and is considered to have anti-inflammatory and antioxidant properties. Its antioxidant activity is mainly attributed to the presence of products of secondary metabolism. In wild populations of *S. raeseri* in Northern Greece, phenotypes developed red bracts instead of green bracts, that is the normal phenotype, which was considered as a negative characteristic because it was undesirable by the consuming public. The presence of the "red-brown" phenotypes is due to the production of anthocyanins in the bracts resulting in a red-brown coloring. Anthocyanins are phenolic compounds and may have a protective role for the plant against biotic or abiotic stresses. The biosynthetic pathway of anthocyanins has been elucidated on other species, therefore the genes involved in it are known.

The main objective of the present thesis is the isolation and functional characterization of the main genes involved in anthocyanin biosynthesis and the measurement of their relative expression in "red-brown"-bracts plants. For this purpose, candidate genes *DFR*, *ANS* and *UFGT* were mined in *Sideritis* available *de novo* transcriptome and cloned into vectors in order to be functionally characterized in heterologous expression systems such as yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). Through our first attempt to express the genes in yeast no activity was detected in the gene products by liquid chromatography. However, the results of RT-qPCR analysis showed that the expression levels of genes encoding the main enzymes involved in this biosynthetic pathway were significantly increased compared to the expression levels of the same genes in the green-bract phenotype.

In conclusion, all this research contributes to the functional analysis of genes that may help to improve genotypes with red bracts, but also to the identification of those genes whose overexpression leads to the production of more secondary metabolites that are desirable for the pharmaceutical industry.

Scientific area: Plant Breeding

Key words: *Sideritis*, anthocyanins, medicinal plants

Πρόλογος - Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία εκπονήθηκε κατά μέρος στο Εργαστήριο Γενετικής Βελτίωσης και Γεωργικού Πειραματισμού του Τμήματος Φυτικής Παραγωγής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Βιοχημείας του ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ και στο ερευνητικό ινστιτούτο Fondazione Edmund Mach (San Michele all' Adige, Trento, Italy) μέσω του προγράμματος Erasmus+ για μεταπτυχιακούς φοιτητές κατά τη χρονική περίοδο 2022-2023. Η πραγματοποίηση του πειραματικού μέρους εκεί έγινε υπό την επίβλεψη του επικεφαλής του εργαστηρίου “Department of Food Quality and Natural Products” Dr. Stefan Martens.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Τάνη Ελένη και την κα. Σάρρου Ειρήνη για την ανάθεση της εργασίας και για τη συνεχή καθοδήγηση και βοήθεια τους καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας για το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα, αλλά και την κα. Μπεμπέλη Πηνελόπη ως μέλος της τριμελούς μου επιτροπής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Dr. Stefan Martens για την άψογη συνεργασία και τη βοήθειά του, αλλά και τη ομάδα του εργαστηρίου του στη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Περιεργόμενα

<u>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u>	7
1.1 Το γένος <i>Sideritis</i>	7
1.1.1 Ταξινομική κατάταξη και γεωγραφική εξάπλωση	7
1.1.2 Βοτανικά χαρακτηριστικά και χημική σύσταση των <i>S. raeseri</i> και <i>S. scardica</i>	8
1.1.3 Εμπορική αξία και βιολογικές δράσεις	9
1.1.4 Γενετική παραλλακτικότητα και βελτίωση του γένους <i>Sideritis</i>	10
1.2 Η οικογένεια Lamiaceae στην Ελλάδα	11
1.3 Ο δευτερογενής φυτικός μεταβολισμός	12
1.4 Φλαβονοειδή-Ανθοκυανίνες	12
1.4.1 Βιοσύνθεση ανθοκυανών	14
1.4.2 Ρύθμιση βιοσυνθετικής οδού ανθοκυανών	16
1.4.3 Βιολογικές δράσεις ανθοκυανών	18
1.4.5 Πηγές ανθοκυανών	19
1.5 «Ωμικές» τεχνολογίες στα αρωματικά φυτά και συστήματα ετερόλογης έκφρασης σε μικροβιακούς ξενιστές	20
1.6 Αντικειμενικός στόχος της διπλωματικής εργασίας	21
<u>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</u>	22
<u>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u>	36
3.1 Επιλογή γονιδίων μελέτης για λειτουργικό χαρακτηρισμό σε ετερόλογα συστήματα (<i>S. cerevisiae</i> ή/και <i>E. coli</i>) και για RT-qPCR	36
3.2 Αποτελέσματα κλωνοποίησης γονιδίων στους φορείς pJET 1.2 και pYES2	37
3.3 Αποτελέσματα αλληλούχησης	39
3.4 Αποτελέσματα RT-qPCR - Μελέτη έκφρασης των γονιδίων <i>SrANS</i> (anthocyanin synthase), <i>SrDFR</i> (dihydroflavonol 4-reductase), <i>SrUFGT</i> (flavonoid 3-O-glucosyltransferase), <i>SrPAL</i> (phenylalanine ammonia-lyase) και <i>SrCHS</i> (chalcone synthase)	53
<u>ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</u>	64
<u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>	70

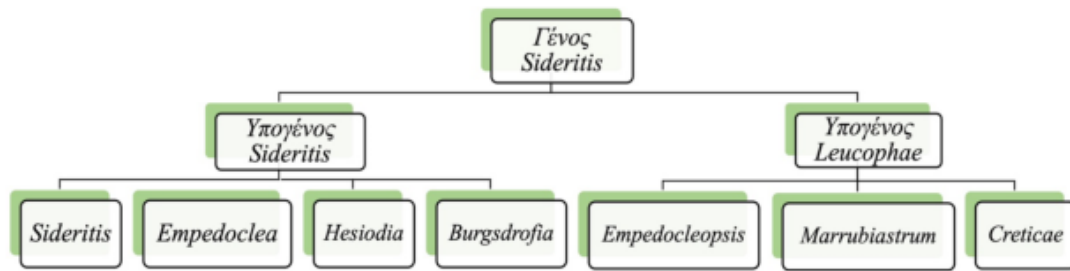
Εισαγωγή

1.1 Το γένος *Sideritis*

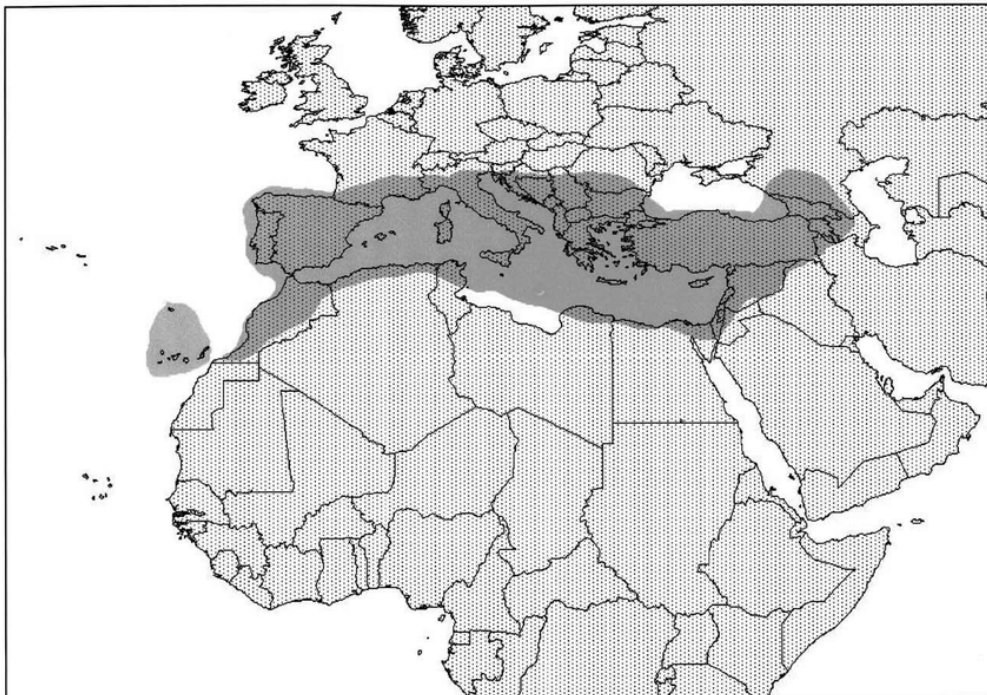
1.1.1 Ταξινόμική κατάταξη και γεωγραφική εξάπλωση

Το γένος *Sideritis* ανήκει στην οικογένεια Lamiaceae και στην τάξη Lamiales και αποτελείται από περίπου 150 πολυετή ή ετήσια είδη (Dülgeroğlu & Unal, 2017; Patelou et al., 2020; di Giacomo et al., 2022) τα οποία κατανέμονται στις χώρες της Μεσογείου, από τα Κανάρια Νησιά και τη Μαδέιρα έως την Τουρκία (Εικόνα 1.2) (Barber et al., 2002; Dülgeroğlu & Unal, 2017b). Χαρακτηριστικό της κατανομής του γένους *Sideritis* είναι ο συχνός ενδημισμός των ειδών. Από τις χώρες στις οποίες συναντάται, υπολογίζεται ότι η Ισπανία και η Τουρκία έχουν το μεγαλύτερο αριθμό ενδημικών ειδών (González-Burgos et al., 2011). Επίσης, το είδος *Sideritis raeseri*, όπως και το είδος *S. scardica*, είναι ενδημικά είδη της Βαλκανικής Χερσονήσου και είναι γνωστά ως «τσάι του βουνού» (Patelou et al., 2020), ενώ τα είδη *S. athoa*, *S. euboea*, *S. syriaca*, *S. raeseri*, *S. scardica* και *S. clandestina* είναι ενδημικά της Ελλάδας (Goliaris & Roupakias, 1997). Η ονομασία του γένους προέρχεται από την ελληνική λέξη «σίδηρος» και αποδίδεται στην ικανότητα του φυτού να θεραπεύει τραύματα που έχουν προκληθεί από όπλα κατασκευασμένα από σίδηρο (González-Burgos et al., 2011; Aneva et al., 2019). Το γένος *Sideritis* διαιρείται σε δύο υπογένη, *Sideritis* και *Leucophae*, με τα περισσότερα είδη να ανήκουν στο υπογένος *Sideritis*. Μια βασική διαφορά που έχουν τα δύο υπογένη είναι ο αριθμός των χρωμοσωμάτων. Συγκεκριμένα, τα υπογένος *Sideritis* περιλαμβάνει αποκλειστικά διπλοειδή είδη, ενώ στο υπογένος *Leucophae* καταγράφονται είδη με ποικιλία στον αριθμό χρωμοσωμάτων (González-Burgos et al., 2011). Η περαιτέρω ταξινόμηση του υπογένους *Sideritis* περιλαμβάνει τέσσερις ομάδες: οι δύο από αυτές, *Sideritis* και *Empedoclea*, αναφέρονται σε πολυετή φυτά, που αναπτύσσονται στις Μεσογειακές περιοχές, και οι άλλες δύο ομάδες, *Hesiodia* και *Burgsdorfia*, περιλαμβάνουν μικρό αριθμό ετήσιων φυτών. Το υπογένος *Leucophae* διαιρείται σε τρεις ομάδες: *Empedocleopsis*, *Marrubiastrum* και *Creticae* (Dülgeroğlu & Unal, 2017) (Εικόνα 1.1).

Παρόλες τις προσπάθειες, θεωρείται ένα αμφιλεγόμενο είδος με δυσκολίες στην ταξινόμηση βάσει μορφολογικών χαρακτηριστικών λόγω του έντονου υβριδισμού που παρατηρείται μεταξύ των ειδών (González-Burgos et al., 2011b; Kalivas et al., 2014; Dülgeroğlu & Unal, 2017a; Aneva et al., 2019). Έτσι, για την αποτελεσματικότερη διάκριση των ειδών χρησιμοποιούνται ως δείκτες ταξινόμησης προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού του φυτού, όπως τα φλαβονοειδή και τα διτερπένια, καθώς υπάρχουν διαφορές στη δομή και τη συγκέντρωσή τους μεταξύ των ειδών του ίδιου γένους (González-Burgos et al., 2011b).



Εικόνα 1.1: Διαίρεση του γένους *Sideritis* σε υπογένη και ομάδες.



Εικόνα 1.2: Γεωγραφική κατανομή του γένους *Sideritis* (Barber et al., 2002).

1.1.2 Βοτανικά χαρακτηριστικά και χημική σύσταση των *S. raeseri* και *S. scardica*

Τα είδη του γένους *Sideritis* είναι μονοετείς ή πολυετείς πόες και κατατάσσονται στα αρωματικά φυτά. Είναι δικοτυλήδονα φυτά με ανάπτυξη έως 40-50 cm, ξυλώδη στη βάση και, συχνά, έχουν πυκνό τρίχωμα (Todorova & Trendafilova, 2014). Τα φύλλα του συνήθως είναι στενά, αντίθετα, επιμήκη, ακέραια ή πριονωτά, άμισχα στα ανώτερα τμήματα και έμισχα στα κατώτερα. Τα άνθη είναι κίτρινα, ή σπανιότερα λευκά, και η ταξιανθία είναι χαμηλότερη από τον κάλυκα (Εικόνα 1.3). Οι ωοθήκες είναι ωοειδείς, τρίχωρες και στρογγυλές προς την κορυφή. Τα είδη του γένους *Sideritis* spp. αναπτύσσονται βέλτιστα σε υψόμετρο μεγαλύτερο από 1000m και είναι καλά προσαρμοσμένα σε συνθήκες έλλειψης νερού. Ο πολλαπλασιασμός του σιδεριτή

πραγματοποιείται τόσο εγγενώς, με σπόρο, όσο και αγενώς, με παραφυάδες. (González-Burgos et al., 2011b; Valchev & Kozuharova, 2022).

Τα φυτά του γένους *Sideritis* ανήκουν στα αρωματικά φυτά, συνεπώς η χημική τους σύσταση χαρακτηρίζεται από την παρουσία πληθώρας δευτερογενών μεταβολιτών, οι οποίοι θα αναλυθούν στο επόμενο κεφάλαιο. Μερικοί από αυτούς τους μεταβολίτες είναι τα τερπένια, τα φλαβονοειδή, τα αιθέρια έλαια, οι λιγνάνες και οι στερόλες, αλλά τα φλαβονοειδή, τα αιθέρια έλαια και τα διτερπένια εντοπίζονται σχεδόν σε όλα από τα είδη (di Giacomo et al., 2022). Τα διτερπένια είναι τα πιο άφθονα από την κατηγορία των τερπενίων, καθώς περίπου 160 διαφορετικές ενώσεις εντοπίστηκαν σε άνθη, βλαστούς και φύλλα. Ακόμη, οι πολυφαινόλες, μια κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών, είναι άφθονες στα συγκεκριμένα είδη, ενώ έχει αποδειχθεί και η συσχέτιση της παρουσίας συγκεκριμένων φλαβονοειδών με τη γεωγραφική θέση του κάθε είδους (González-Burgos et al., 2011a; Żyżelewicz et al., 2020a). Μεταβολομικές αναλύσεις έδειξαν ότι οι κύριες ομάδες πολυφαινόλων που εντοπίστηκαν ήταν οι φαινυλαιθυλικοί γλυκοζίτες (π.χ βερμπασκοζίτης, εχινακοζίτης) και οι ακετυλογλυκοζίτες φλαβονοειδών, ενώ συγκεκριμένα στα είδη *S. scardica* και *S. raeseri* περιέχονται δύο ακόμη κατηγορίες φλαβονών, 8-υδροξυφλαβόνες και 5,7-υδροξυφλαβόνες (πχ λουτεόλη και απιγενίνη). Όσον αφορά την περιεκτικότητα σε αιθέρια έλαια, παρότι ο σιδερίτης ανήκει στην οικογένεια Lamiales, δεν είναι πλούσια πηγή αιθέριων ελαίων. Η περιεκτικότητα των φυτών σε αιθέρια έλαια εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τι συνθήκες καλλιέργειας, το υψόμετρο, τις εδαφικές συνθήκες, αλλά και από το μέρος του φυτού από το οποίο απομονώνονται τα αιθέρια έλαια (Aligiannis et al., 2001; Żyżelewicz et al., 2020). Στο φυτό *S. scardica* και *S. raeseri* τα κύρια αιθέρια έλαια που ταυτοποιήθηκαν ήταν το α-πινένιο, β-πινένιο, καρβακρόλη, καρνοφυλλένιο και γερμακρένιο. Τέλος, οι περιεκτικότητες των ανόργανων στοιχείων είναι κατά φθίνουσα σειρά: $K > P > Ca > Mg > Na > Mn > Fe > Cu > Zn$ (Romanucci et al., 2017; Irakli et al., 2018; Żyżelewicz et al., 2020b).



Εικόνα 1.3: Το τσάι του βουνού. (<https://www.greekflora.gr/el/flowers/1158/Sideritis-scardica>)

1.1.3 Εμπορική αξία και βιολογικές δράσεις

Τα είδη *S. scardica* και *S. raeseri* (τσάι του βουνού) είναι ευρέως γνωστά για την κατανάλωσή τους ως ροφήματα, πολλές φορές σε συνδυασμό με λεμόνι ή μέλι, καταπραΰνοντας συμπτώματα γρίπης, αναπνευστικών λοιμώξεων, αλλά και

συμπτώματα δυσπεψίας (Valchev & Kozuharova, 2022). Επίσης, όσον αφορά τη χρήση του στην παραδοσιακή ιατρική, θεωρείται ότι έχει αντιφλεγμονώδη, αντιμικροβιακή, αντιοξειδωτική, αναλγητική, αντιγηραντική και αντικαρκινική δράση (Aligiannis et al., 2001; Gabrieli et al., 2005; González-Burgos et al., 2011b; Sklirou et al., 2021; di Giacomo et al., 2022). Σε γενικότερο πλαίσιο, η αξιοποίηση των φυσικών προϊόντων για τη θεραπεία παθογόνων καταστάσεων είναι πολύ διαδεδομένη παγκοσμίως και αποτελεί μια πιο ασφαλή εναλλακτική προσέγγιση, λόγω των ενδεχόμενων παρενεργειών που παρουσιάζει η μακροχρόνια χρήση φαρμάκων (Niazian, 2019; Mssillou et al., 2022). Η φαρμακολογική δραστηριότητα των ειδών αυτών αποδίδεται στην παρουσία φαινολικών ενώσεων, διτερπενίων και φλαβονοειδών (Di Giacomo et al., 2022; Romanucci et al., 2017).

Για παράδειγμα, η παρουσία γ-τερπινενίου στα υπέργεια τμήματα του φυτού είναι αυτή που προσδίδει αντιφλεγμονώδη δράση απέναντι στη UV ακτινοβολία και φαίνεται να είναι χρήσιμη η αξιοποίησή της σε θεραπεία πληγών του δέρματος (Romanucci et al., 2017; Mssillou et al., 2022). Ακόμη, η αντιμικροβιακή δράση έναντι Gram θετικών βακτηρίων, Gram αρνητικών βακτηρίων ή μυκήτων, όπως του μύκητα *Candida albicans*, είναι αποτέλεσμα της παρουσίας αιθέριων ελαίων, όπως α-πινένιο και δ-τερπινεόλη (Romanucci et al., 2017), ή της συνεργιστικής δράσης διαφορετικών ειδών τερπενίων (Di Giacomo et al., 2022; Żyzelewicz et al., 2020b).

Η αντιοξειδωτική δράση σχετίζεται με την παρουσία φαινολικών ενώσεων στους ιστούς του σιδερίτη, όπως η απεγινίνη, η κατεχίνη και διάφορα φλαβονοειδή και ενώσεις που συμμετέχουν στο φαινυλοπροπανοειδικό μονοπάτι (Romanucci et al., 2017; Mssillou et al., 2022). Η οξειδωτική καταπόνηση που υφίσταται ένας οργανισμός μπορεί να είναι είτε ενδογενής (πχ ελεύθερες ρίζες οξυγόνου-ROS), είτε εξωγενής (πχ ακτινοβολία). Η κατάσταση οξειδωτικής καταπόνησης προκαλεί τη γήρανση των κυττάρων και κατ' επέκταση βλάβες σε επίπεδο γενώματος και πρωτεώματος (di Giacomo et al., 2022), ενώ μακροπρόθεσμα ευθύνεται για ασθένειες όπως το Alzheimer και άλλες παθήσεις του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (Kanak et al., 2022). Ο ακριβής τρόπος με τον οποίο οι φαινολικές ενώσεις λειτουργούν ως αμυντικοί μηχανισμοί απέναντι στις ROS παραμένει άγνωστος. Τέλος, μελέτες σε οργανισμούς-μοντέλα έχουν αποδείξει την αγχολυτική δράση του είδους *S. scardica* (Vasilopoulou et al., 2013), αλλά και τη δράση των φαινολικών ενώσεών του ως αναστολείς των μεταφορέων μονοαμινών (Knörle, 2012).

1.1.4 Γενετική παραλλακτικότητα και βελτίωση του γένους *Sideritis*

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα είδη του γένους *Sideritis* ανήκουν στα Αρωματικά και Φαρμακευτικά Φυτά (Medicinal and Aromatic Plants). Αυτό σημαίνει ότι χαρακτηρίζονται από υψηλά ποσοστά δευτερογενών μεταβολιτών με μεγάλη σημασία για την υγεία του ανθρώπου. Λόγω της σημασίας τους για τον άνθρωπο, ως φαρμακευτικά αλλά και για τη χρήση τους ως ροφήματα, συλλέγονται συχνά άγριοι πληθυσμοί που αυτοφύονται, με αποτέλεσμα πολλά από τα είδη, που συχνά είναι και ενδημικά, να απειλούνται (Patelou et al., 2020). Το γεγονός αυτό καθιστά επιτακτική την ανάγκη προστασίας και διατήρησης αυτών των ειδών, τόσο με *in situ* όσο και με *ex situ* τεχνικές (Grdiša et al., 2019). Παρόλα αυτά, η βελτίωση αυτών των φυτών αποτελεί ακόμα πρόκληση, ειδικά χρησιμοποιώντας συμβατικές μεθόδους, αν και τα μοριακά εργαλεία που επιταχύνουν τα βελτιωτικά προγράμματα και επιτρέπουν τη βελτίωση από τα πρώιμα κιάλια στάδια έχουν αρχίσει να εφαρμόζονται στα αρωματικά φυτά (Kumar & Gupta, 2008; Niazian, 2019b). Αυτό οφείλεται σε ένα πλήθος παραγόντων, όπως στο γεγονός ότι δεν υπάρχουν οργανισμοί-μοντέλα για τα αρωματικά φυτά, πολλά προϊόντα του μεταβολισμού τους ελέγχονται από πολύπλοκα

βιοσυνθετικά μονοπάτια στα οποία εμπλέκονται πολλά γονίδια, ενώ παράλληλα υπάρχει έλλειψη πληροφοριών σε μεταγραφικό επίπεδο (RNA-sequencing) (Patelou et al., 2020). Συνεπώς, οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί ως τώρα στα είδη του γένους *Sideritis* spp. περιορίζονται κυρίως στη μελέτη της γενετικής και χημικής παραλλακτικότητας είτε μεταξύ ειδών, είτε μεταξύ πληθυσμών του ίδιου είδους, με τη βοήθεια μοριακών δεικτών ή συγκεκριμένων μεταβολιτών που χρησιμοποιούνται ως χημικοί δείκτες.

Οι Grdiša et al., (2019) εξέτασαν τη γενετική παραλλακτικότητα εννέα πληθυσμών του είδους *S. scardica* που αναπτύχθηκαν σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες (πχ κλίμα, έδαφος και υψόμετρο) στη Βαλκανική Χερσόνησο χρησιμοποιώντας 226 μοριακούς δείκτες AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) και διαπίστωσαν χαμηλή παραλλακτικότητα μεταξύ φυτών του ίδιου πληθυσμού, αλλά υψηλή διαπληθυσμιακή παραλλακτικότητα. Συγκεκριμένα, όλοι οι πληθυσμοί εμφάνισαν μοναδικές ζώνες, γεγονός το οποίο εξηγείται και από γεωγραφικούς παράγοντες, καθώς πιθανά πιο απομονωμένοι πληθυσμοί αναπτύσσουν μοναδικούς γονοτύπους, και κατ' επέκταση φαινοτύπους. Σε αντίστοιχη μελέτη εννέα πληθυσμών *S. raeseri* από την Ελλάδα και τη Βόρεια Μακεδονία με τη χρήση 12 URP (Universal Rice Primer) δεικτών ταυτοποιήθηκαν 86-122 πολυμορφικές ζώνες, ενώ το ποσοστό διαπληθυσμιακής γενετικής παραλλακτικότητας ήταν 66.3 % (Patelou et al., 2020). Ακόμη, οι Kalivas et. al (2014) με τη μέθοδο του DNA barcoding για τη διάκριση ειδών *Sideritis* χρησιμοποίησαν την περιοχή ITS2 που είναι μια nrDNA (nuclear ribosomal DNA) και παρατήρησαν μεγαλύτερη ομοιότητα μεταξύ των ειδών *S. scardica* και *S. syriaca*, ενώ τη χαμηλότερη ομοιότητα μεταξύ των *S. raeseri* και *S. clandestina*. Τέλος, ανάλυση με AFLP δείκτες σε 14 άγριους πληθυσμούς από τρεις διαφορετικές ορεινές περιοχές του είδους *S. euboica*, ενδημικού είδους στην ευρύτερη περιοχή της Εύβοιας, έδειξε χαμηλή ποικιλομορφία μεταξύ των πληθυσμών από το νότιο τμήμα της Εύβοιας και υψηλότερη μεταξύ των πληθυσμών από το βόρειο τμήμα. Παράλληλα, σημειώθηκε υψηλή ενθοπληθυσμιακή γενετική παραλλακτικότητα παρά διαπληθυσμιακή μεταξύ των τριών διαφορετικών περιοχών (Sarrou et al., 2022).

1.2 Η οικογένεια Lamiaceae στην Ελλάδα

Η οικογένεια Lamiaceae στην Ελλάδα αντιπροσωπεύεται από 111 ενδημικά τάξα, με τον μεγαλύτερο αριθμό αυτών να εντοπίζονται στην Κρήτη και τη νότια Πελοπόννησο. Τα είδη αυτής της οικογένειας είναι γνωστά για τη διατροφική και φαρμακευτική τους αξία, που αποδίδεται στην παρουσία αιθέριων ελαίων, με αποτέλεσμα να αποτελούν πολύτιμες πηγές φυσικών προϊόντων στην κοσμετολογία, τη φαρμακολογία και την ιατρική. Συνεπώς, τα είδη αυτά -όπως και γενικότερα τα αρωματικά φυτά- συμβάλλουν σημαντικά στην ελληνική οικονομία και προσφέρουν οικοσυστημικές υπηρεσίες (Solomou et al., 2016; Cheminal et al., 2020). Εκτός από τη άμεση αξιοποίησή τους από τον άνθρωπο, τα ενδημικά είδη της οικογένειας Lamiaceae προσφέρουν οικοσυστημικές υπηρεσίες που συσχετίζονται με την κουλτούρα και την παράδοση κάθε περιοχής και αποτελούν την ταυτότητά της (Kougioumoutzis et al., 2022). Ο όρος «οικοσυστημικές υπηρεσίες» αναφέρεται στη «συμβολή» της λειτουργίας του οικοσυστήματος στη βελτίωση της ποιότητας ζωής του ανθρώπου (Cheminal et al., 2022). Η ολοένα και δημοφιλέστερη χρήση τους και η προσφορά οικοσυστημικών υπηρεσιών οφείλεται στο ότι τα είδη αυτά παράγουν αιθέρια έλαια υψηλής ποιότητας, γεγονός που σχετίζεται με τις εδαφοκλιματικές συνθήκες της Ελλάδας (αλλά και της Μεσογείου γενικότερα) (Solomou et al., 2016). Ωστόσο, το μεγαλύτερο ποσοστό των ενδημικών ταξών Lamiaceae στην Ελλάδα δεν έχει αποδειχθεί με ποιο τρόπο θα μπορούσε να αξιοποιηθεί προς όφελος του ανθρώπου (Cheminal et al., 2020).

1.3 Ο δευτερογενής φυτικός μεταβολισμός

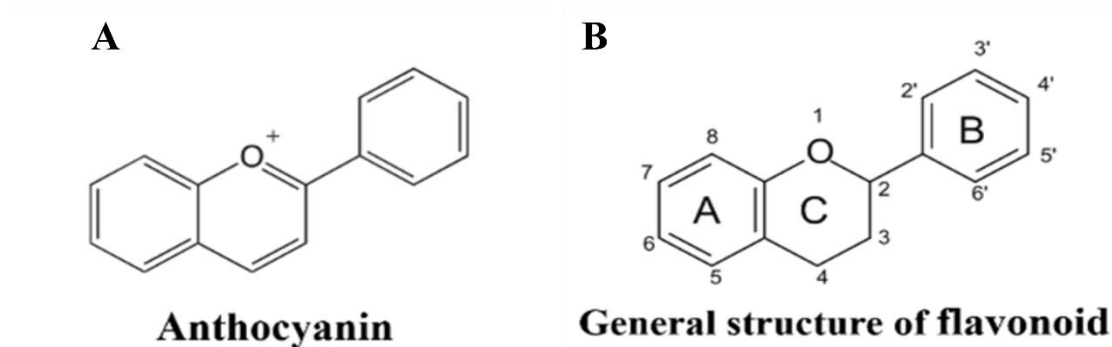
Τα φυτά συνθέτουν μια μεγάλη ποικιλία οργανικών ενώσεων που ταξινομούνται σε πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες. Οι πρωτογενείς μεταβολίτες (πχ αμινοξέα, υδατάνθρακες) αξιοποιούνται για την πραγματοποίηση των βασικών λειτουργιών του φυτού, όπως η ανάπτυξη, η αναπνοή και η φωτοσύνθεση. Από την άλλη πλευρά, οι δευτερογενείς μεταβολίτες δεν έχουν άμεση σύνδεση με τις βασικές λειτουργίες του φυτού και έχουν περιορισμένη κατανομή στο φυτικό βασίλειο, αντίθετα με τους πρωτογενείς μεταβολίτες (Ελευθερίου, 2007).

Για πολλά χρόνια δεν ήταν ακριβώς γνωστή η σημασία των δευτερογενών μεταβολιτών και επικρατούσε η άποψη ότι ήταν άχρηστα προϊόντα του μεταβολισμού των φυτών. Τα τελευταία χρόνια έχουν μελετηθεί αρκετά, λόγω του ενδιαφέροντος που επικρατεί για τη δημιουργία φυσικών φαρμάκων, ελαίων και αρωμάτων από φυσικά προϊόντα και αυτό έχει οδηγήσει και στην μελέτη της λειτουργικότητάς τους για το ίδιο το φυτό. Συγκεκριμένα, οι δευτερογενείς μεταβολίτες φαίνεται να αποτελούν αμυντικό μηχανισμό των φυτών έναντι βιοτικών καταπονήσεων (πχ παθογόνους μικροοργανισμούς) και αβιοτικών καταπονήσεων (πχ ακτίνες UV) (Yang et al., 2012). Επίσης, προσελκύουν επικονιαστές με αποτέλεσμα να συμβάλλουν στη διασπορά των σπερμάτων και να λειτουργούν ως παράγοντες ανταγωνισμού (Dudareva et al., 2013).

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες μπορούν να διακριθούν σε τρεις ομάδες: τα τερπένια, τις φαινολικές ενώσεις και τις αζωτούχες ενώσεις (πχ αλκαλοειδή, αμίνες). Οι φαινολικές ενώσεις εμφανίζουν μεγάλη ποικιλία και περιλαμβάνουν τα φαινυλοπροπανοειδή, τις κουμαρίνες, τα στυλβένια και τα φλαβονοειδή (Yang et al., 2012b). Τα βιοσυνθετικά μονοπάτια των δευτερογενών μεταβολιτών συνδέονται άμεσα με τον πρωτογενή μεταβολισμό, καθώς αυτά τα προϊόντα προκύπτουν από ενδιάμεσα προϊόντα του πρωτογενούς μεταβολισμού, όπως για παράδειγμα ορισμένα αμινοξέα και το ακετυλοσυνένζυμο-A (Rodriguez-Mateos et al., 2014a). Η βιοσύνθεση των δευτερογενών μεταβολιτών παρουσιάζει αναπτυξιακή ρύθμιση σε όλα τα στάδια και φαίνεται να είναι πιο έντονη σε νεαρούς ιστούς σε σχέση με πιο ώριμους ιστούς, καθώς αυτοί έχουν μεγαλύτερη ανάγκη για προστασία (Dudareva et al., 2004). Τέλος, η βιοσύνθεσή τους εξαρτάται από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η ηλιακή ακτινοβολία, η υγρασία και η θερμοκρασία (Taiz & Zaiger, 2012).

1.4 Φλαβονοειδή-Ανθοκυανίνες

Τα φλαβονοειδή είναι μια σημαντική ομάδα υδατοδιαλυτών φυτικών δευτερογενών μεταβολιτών, ανήκουν στην ομάδα των πολυφαινόλων και ευθύνονται συχνά για το χρωματισμό των καρπών και των ανθέων, συντίθενται στο κυτταρόπλασμα και μεταφέρονται στο χυμοτόπιο μέσω του ενδοπλασματικού δικτύου (Falcone Ferreyra et al., 2012; Rodriguez-Mateos et al., 2014). Παράγονται από τη φαινυλαλανίνη, η οποία μετατρέπεται σε π-κουμαρικό-ακετυλοσυνένζυμο Α μέσω του φαινυλοπροπανοειδικού μονοπατιού. Η κύρια δομή τους αποτελείται από 15 άτομα άνθρακα (C₁₅) με διάταξη C₆-C₃-C₆ (A-C-B) (Εικόνα 1.4B) και ανάλογα με τα βαθμό οξείδωσης του ετεροκυκλικού δακτυλίου και των αριθμό των μεθυλικών και ακετυλικών ομάδων στους αρωματικούς δακτυλίους χωρίζονται σε έξι κύριες ομάδες: τις φλαβόνες, τις ανθοκυανιδίνες, τις φλαβονόλες, τις ισοφλαβόνες, τις φλαβανόνες και τις φλαβονο-3-όλες.



Εικόνα 1.4: Δομή μορίου ανθοκυανίνης (A) και φλαβονοειδούς (B) (Liu et al., 2021).

Διαφορετικές ομάδες φλαβονοειδών έχουν διαφορετικές λειτουργίες, όπως την προστασία του φυτού από την υπερϊώδη ακτινοβολία, λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης, και την μεταφορά της αυξίνης μέσα στους ιστούς. Στον άνθρωπο τα φλαβονοειδή χρησιμοποιούνται ως ενεργά συστατικά για την προστασία του νευρικού συστήματος, της υγείας του δέρματος, του αναπαραγωγικού συστήματος, ενώ δρουν και ως αντιγηραντικά και αντικαρκινικά συστατικά (Liu et al., 2021).

Οι ανθοκυανίνες είναι μια κατηγορία φλαβονοειδών, που προκύπτουν από τη γλυκοζυλίωση των ανθοκυανιδινών (αγλυκόνες), και εντοπίζονται σε ιστούς φυτών όπως τα φύλλα, τα άνθη, οι ρίζες και άλλα μέρη. Οι ανθοκυανίνες εμφανίζονται πολύ συχνότερα στη φύση σε σχέση με τις ανθοκυανιδίνες (Mohammed & Khan, 2022). Τα ποσοστά συγκέντρωσής τους στα φύλλα είναι 80%, στα 69% στους καρπούς και 50% στα άνθη (Rodriguez-Mateos et al., 2014b). Η ετυμολογία της λέξης «ανθοκυανίνη» προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις «άνθος» και «κυανός», δηλαδή μπλε. Είναι άφθονες σε είδη όπως τα κεράσια, τα μούρα, τα ρόδια και τα δαμάσκηνα και μπορεί να προσδίδουν διάφορα χρώματα όπως ροζ, μωβ, κόκκινο και μπλε. Το τελικό χρώμα που προσδίδουν στο φυτό εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως τα είδη των ανθοκυανών που παράγονται και η ποσότητά τους, τα συμπλέγματα που δημιουργούν οι ανθοκυανίνες με μεταλλικά ιόντα, η ύπαρξη άλλων χρωστικών (πχ φλαβόνες), οι τροποποιήσεις στο μόριό τους (πχ μεθυλίωση, ακετυλίωση) και, τέλος, στο pH στο χυμοτόπιο (Falcone Ferreyra et al., 2012). Ως κατηγορία των φλαβονοειδών, οι ανθοκυανίνες έχουν προστατευτικό ρόλο έναντι της υψηλής ακτινοβολίας όπως και της υπερϊώδους ακτινοβολίας, έχουν αντιοξειδωτική δράση έναντι βιολογικών και αβιοτικών καταπονήσεων, ενώ παράλληλα εμπλέκονται στη ρύθμιση της ωρίμανσης, της ωσμωτικής ισορροπίας και της μεταφοράς μονοσακχαριτών. Στον άνθρωπο έχει ταυτοποιηθεί η φαρμακολογική τους δράση κατά των καρδιαγγειακών ασθενειών, του καρκίνου και του διαβήτη (Sunil & Shetty, 2022; Mohammed & Khan, 2022). Έχουν αναγνωριστεί 25 διαφορετικές ανθοκυανίνες που διαφέρουν μεταξύ τους στον αριθμό των υδροξυλικών (-OH) και μεθοξυλικών (-OCH₃) ομάδων και στο είδος του σακχάρου που προστίθεται κατά την γλυκοζυλίωση (γλυκόζη, γαλακτόζη, ραμνόζη, αραβινόζη, ξυλόζη). Σε κάποιες περιπτώσεις, μπορεί να προστεθούν και δισακχαρίτες ή τρισακχαρίτες (Mannino et al., 2021). Συχνές θέσεις γλυκοζυλίωσης είναι οι C₇, C₅ και C₃ (Tanaka et al., 2008a). Οι πιο κοινές μη-μεθυλιωμένες ανθοκυανίνες είναι η κυανιδίνη (Cy), η πελαργονιδίνη (Pg) και η δελφινιδίνη (Dp) (Εικόνα 1.5). Η πεονιδίνη (Pn), η μαλβινιδίνη (Mv) και η πετουνιδίνη (Pt) είναι μεθυλιωμένες ανθοκυανίνες που μπορεί επίσης να εντοπιστούν σε διάφορα είδη (Mannino et al., 2021). Η χημική

σταθερότητα, η βιολογική δράση και η ένταση του χρώματος των ανθοκυανών επηρεάζονται πρωτίστως από το ποσοστό ακετυλίωσης και γλυκοζυλίωσης των ενώσεων, αλλά και από άλλους παράγοντες όπως το pH, η συγκέντρωση των υπόλοιπων φαινολικών ενώσεων και η συγκέντρωση μεταλλικών ιόντων (Sunil & Shetty, 2022a). Πιο κοκκινωπές αποχρώσεις εμφανίζονται σε $pH < 3$, περίπου άχρωμες σε $pH 3-6$ και μπλε σε $pH > 6$ (Tanaka et al., 2008a).

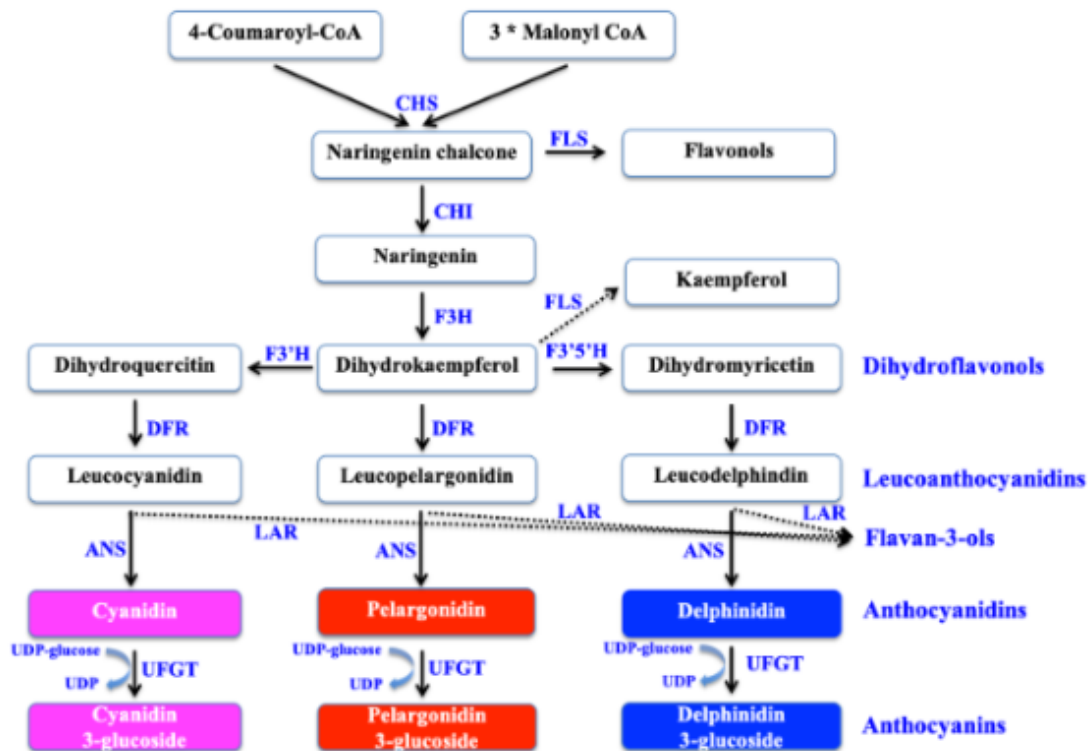


Εικόνα 1.5: Οι μη μεθυλιωμένες ανθοκυανίνες (Falcone Ferreyra et al., 2012).

1.4.1 Βιοσύνθεση ανθοκυανών

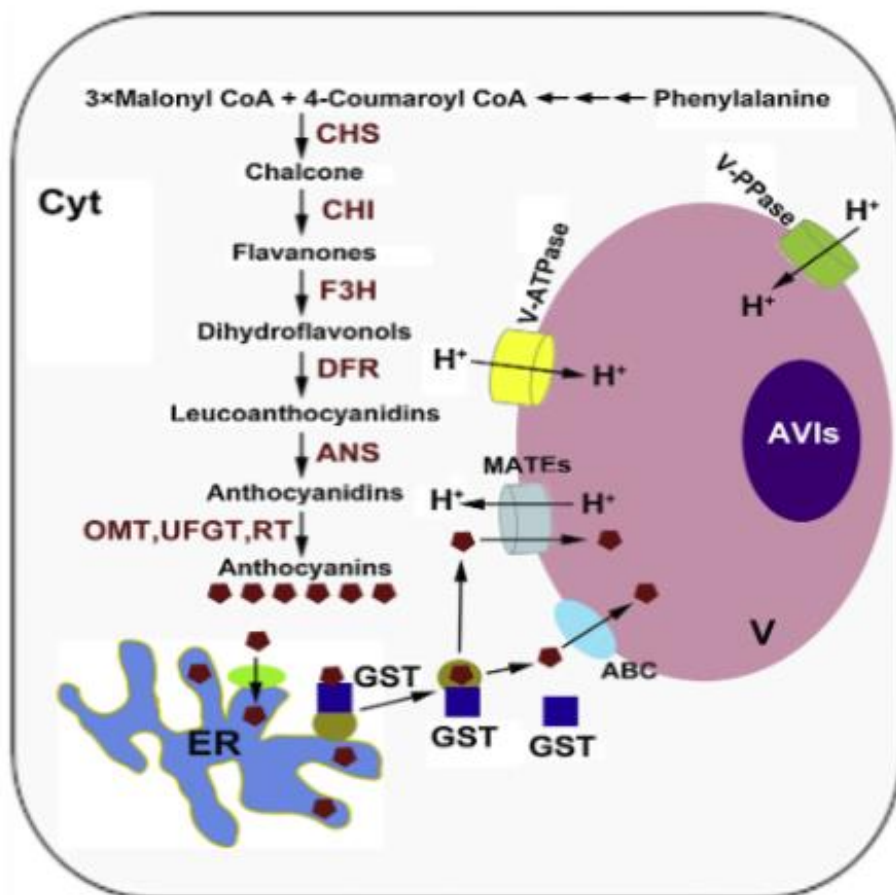
Τα ένζυμα που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των ανθοκυανών εδράζονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και συγκροτούν ένα σύμπλοκο ενζύμων (Mannino et al., 2021). Η σύνθεσή τους ξεκινά από τα μετέπειτα στάδια της σύνθεσης των φλαβονοειδών, όπου αρχική ένωση είναι η φαινυλαλανίνη (Phe). Στην πρώτη αντίδραση η φαινυλαλανίνη μετατρέπεται σε κιναμωμικό οξύ από την αμμωνιακή λυάση της φαινυλαλανίνης (PAL), το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε κουμαρικό οξύ από την 4-υδροξυλάση του κιναμωμικού οξέος (C4H). Έπειτα, η λιγάση του κουμαροϋλοσυνενζύμου A (4CL) μετατρέπει το κουμαρικό οξύ σε 4-κουμαροϋλο-CoA. Με τη δράση της συνθάσης της χαλκόνης (CHS) στη 4-κουμαροϋλο-CoA, το οποίο είναι συνδεδεμένο με τρία μόρια μηλονηλικό-CoA, παράγεται η 4-υδροξυχαλκόνη (ή χαλκόνη της ναριγενίνης) και σηματοδοτείται η αρχή της βιοσυνθετικής οδού των φλαβονοειδών. Αμέσως μετά, η χαλκόνη της ναριγενίνης μετατρέπεται σε 7,3',5'-τριυδροξυφλαβόνη (ή ναριγενίνη) από την ισομεράση της χαλκόνης (CHI). Στη συνέχεια, η 3-υδροξυλάση της φλαβανόνης (F3H) οξειδώνει την 7,3',5'-τριυδροξυφλαβόνη σε διυδροκαμφερόλη, η οποία μετατρέπεται σε διυδρομυρικετίνη ή διυδροκερκετίνη (διυδροφλαβονόλες) από την 3'-υδροξυλάση των φλαβονοειδών (F3'H) ή την 3'-5'-υδροξυλάση των φλαβονοειδών (F3'5'H), αντίστοιχα. Η F3'H και F3'5'H ανήκουν στα ένζυμα του P450 κυτοχρώματος και υδροξυλιώνουν τη διυδροκαμφερόλη στον B δακτύλιο (Sunil & Shetty, 2022a). Η ρεδουκτάση της διυδροφλαβονόλης (DFR) μετατρέπει τις τρεις διυδροφλαβονόλες (διυδροκαμφερόλη-DHK, διυδρομυρσιτίνη-DHM και διυδροκερσιτίνη-DHQ) στις άχρωμες λευκοανθοκυανίνες (λευκοκυανιδίνη, λευκοπελαργονιδίνη και λευκοδελφινιδίνη) προσθέτοντας μια υδροξυλική ομάδα στη θέση C₄ του C δακτυλίου και έπειτα η συνθάση της ανθοκυανίνης (ANS) παράγει τις τρεις πιο συχνές ανθοκυανιδίνες, κυανιδίνη, πελαργονιδίνη και δελφινιδίνη (Εικόνα 1.6). Σε κάποια είδη, όπως ποικιλίες *Cymbidium* και *Petunia*, η DFR έχει υψηλή εξειδίκευση και δεν μπορεί να οδηγήσει

στο σχηματισμό διυδροκαμφερόλης, άρα ούτε στο σχηματισμό πελαργονιδίνης, με αποτέλεσμα την απουσία κόκκινων αποχρώσεων στα άνθη (Sunil & Shetty, 2022a).



Εικόνα 1.6: Η βιοσυνθετική οδός των ανθοκυανών (Sunil & Shetty, 2022a).

Με την ολοκλήρωση της σύνθεσής τους, οι ανθοκυανιδίνες μεταφέρονται στο χυμοτόπιο μέσω του ενδοπλασματικού δικτύου, ενώ στη διαδικασία μεταφορά μπορεί να εμπλέκεται και η συσκευή Golgi (Mannino et al., 2021). Η ακριβής διαδικασία της μεταφοράς τους στο χυμοτόπιο παραμένει άγνωστη και διαφέρει μεταξύ των ειδών, αλλά πιθανά εμπλέκεται η πρωτεΐνη GST (S-τρανσφεράσης της γλουταθιόνης), άλλοι μεμβρανικοί μεταφορείς, οι μεταφορείς MATE1 (AM1) και AM3 και οι μεταφορείς ABC. Ακόμη, η λειτουργία αυτών των ενζύμων εξαρτάται άμεσα ή έμμεσα από δύο αντλίες πρωτονίων στον τονοπλάστη, τη V-ATPase και τη V-PPase, που ρυθμίζουν το pH στο εσωτερικό του χυμοτοπίου (Εικόνα 1.7) (Tanaka et al., 2008b; Gu et al., 2019). Τέλος, ακολουθεί η γλυκοζυλίωση των ανθοκυανιδινών από γλυκοζυλτρανσφεράσες (πχ UFGT), όπου παράγεται η πιο σταθερή μορφή των ανθοκυανών (Mannino et al., 2021; Mohammed & Khan, 2022a)

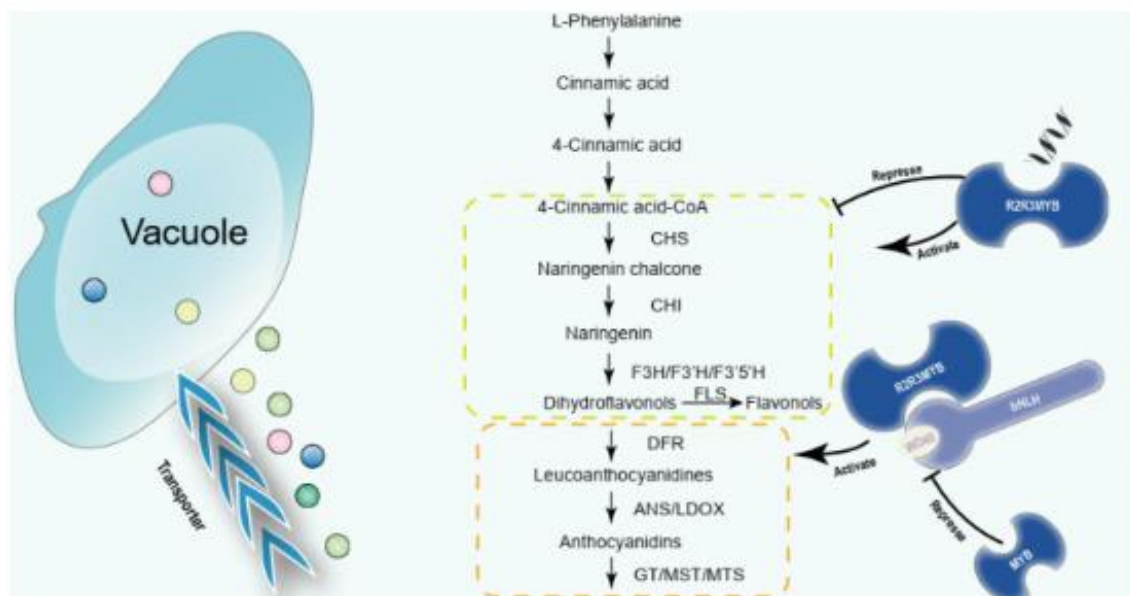


Εικόνα 1.7: Μεταφορά των ανθοκυανών από το κυτταρόπλασμα στο χυμοτόπιο (Gu et al., 2019a)

1.4.2 Ρύθμιση βιοσυνθετικής οδού ανθοκυανών

Η βιοσύνθεση των ανθοκυανών με σκοπό την αύξηση της συγκέντρωσής τους ή τη μελέτη των γονιδίων που εμπλέκονται στο μονοπάτι ελέγχεται σε μεταγραφικό, μετα-μεταγραφικό, μετα-μεταφραστικό και επιγενετικό επίπεδο. Η ρύθμιση σε μεταγραφικό επίπεδο διαφέρει μεταξύ μονοκοτυλήδων και δικοτυλήδων φυτών. Στα μονοκοτυλήδωνα η ρύθμιση πραγματοποιείται από συγκεκριμένες οικογένειες γονιδίων, όπως οι MYB (όπως πχ MYB10, MYB 11, MYB12), οι bHLH (πχ bHLH3) και οι WD40, που σχηματίζουν μαζί το σύμπλοκο MBW, ενώ στα δικοτυλήδωνα τα πρώτα βιοσυνθετικά στάδια από τους μεταγραφικούς παράγοντες R2R3-MYB και στη συνέχεια από το σύμπλοκο MBW (Εικόνα 1.8) (Chaves-Silva et al., 2018a; Rahim et al., 2014). Οι μεταγραφικοί παράγοντες MYB έχουν συντηρημένη δομή 52 αμινοξέων με ένα αμινοτελικό άκρο, το οποίο συνδέεται με άλλες πρωτεΐνες. Οι MYB χωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες (1R-MYB, R2R3-MYB, 4R-MYB) ανάλογα με τις επαναλήψεις της συντηρημένης δομής της πρωτεΐνης, ενώ αυτοί που φαίνεται να επηρεάζουν περισσότερο τη σύνθεση φλαβονοειδών είναι οι R2R3-MYB. Διάφορες έρευνες σε διαφορετικά είδη έχουν επιβεβαιώσει την επίδραση των MYB στην παραγωγή ανθοκυανών αναφερόμενες κυρίως σε μεταβολές που πραγματοποιούνται στους υποκινητές των MYB γονιδίων (Gu et al., 2019b; Saito et al., 2013). Επίσης, οι MYB εμπλέκονται και στη ρύθμιση του πρωτογενούς μεταβολισμού, στη κυτταρική

μορφογένεση, στο σχηματισμό μεριστωματικών κυττάρων και στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (Rahim et al., 2014). Εκτός από θετικοί ρυθμιστές, κάποιοι μεταγραφικοί παράγοντες MYB μπορεί να λειτουργούν και ως καταστολείς της βιοσυνθετικής οδού των ανθοκυανών, όπως πχ οι MYB4, MYB32 και MYB7, οι οποίοι καταστέλλουν τη λειτουργία των γονιδίων DFR και ANS (Zhao et al., 2022). Οι μεταγραφικοί παράγοντες bHLH αποτελούνται από περίπου 18 υδρόφιλα αμινοξέα και 6 βασικά αμινοξέα και με το N-αμινοτελικό τους άκρο προσδένονται στο DNA. Στη δομή τους, ακόμη, έχουν δύο διακριτές υδρόφοβες περιοχές που σχηματίζουν α-έλικες που χωρίζονται από έναν βρόγχο στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης (Rahim et al., 2014; Liu et al., 2021). Από τους bHLH, οι GL3 (GLABRA3), EGL3 (ENHANCER OF GLABRA 3) και TT8 (TRANSPARENT TESTA 8) είναι οι πιο σημαντικοί στη ρύθμιση της σύνθεσης των ανθοκυανών. Αν και οι GL3 και EGL3 επηρεάζουν την έκφραση της F3'H, ο EGL3 είναι εξίσου σημαντικός για την ενεργοποίηση των γονιδίων που κωδικοποιούν την DFR και ANS. Παρόλα αυτά, το αν οι μεταγραφικοί παράγοντες είναι αρνητικοί ή θετικοί ρυθμιστές της σύνθεσης ανθοκυανών εξαρτάται και από το τους περιβαλλοντικούς παράγοντες (Chaves-Silva et al., 2018b). Οι WD40 είναι μια ομάδα μεταγραφικών παραγόντων που δεν είναι επαρκώς εξακριβωμένη η δράση της, αλλά στα ευκαρυωτικά κύτταρα δε δρουν μόνοι τους, αλλά μόνο συνδεδεμένοι με τους MYB και τους bHLH σχηματίζοντας σύμπλοκο (Liu et al., 2021). Τέλος, άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες λιγότερο μελετημένοι ως προς τη δράση τους είναι οι WRKY, BZIP, COP1, JAZ, NAC, SPL και MADS-box (Stracke et al., 2007; Chen et al., 2019).



Εικόνα 1.8: Ρύθμιση μεταγραφικών παραγόντων σε διαφορετικά στάδια της βιοσυνθετικής οδού (Zhao et al., 2022).

Σε επιγενετικό επίπεδο, η τροποποίηση H3K4me3, δηλαδή η τριπλή μεθυλίωση της τέταρτης λυσίνης της ιστόνης 3, φαίνεται να επηρεάζει τη βιοσύνθεση των ανθοκυανών. Συγκεκριμένα, σε γενετικώς τροποποιημένα φυτά *Arabidopsis thaliana* με αυξημένο ποσοστό H3K4me3 οι ανθοκυανίνες ήταν αυξημένες σε συγκέντρωση. Όσον αφορά τη ρύθμιση σε μετα-μεταγραφικό και μετα-μεταφραστικό επίπεδο, υπάρχουν αρκετά λιγότερες πληροφορίες, αλλά αρκετά miRNAs ρυθμίζουν τα επίπεδα έκφρασης μεταγραφικών παραγόντων (πχ MYB75, MYBL2) και ως επακόλουθο αλλάζουν και τα επίπεδα ανθοκυανών. Για παράδειγμα, το miR858a καταστέλλει την έκφραση του

MYBL2, που είναι αρνητικός ρυθμιστής, με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται η βιοσύνθεση (Mohammed & Khan, 2022). Ακόμη, υπερέκφραση του miR828, το οποίο ελέγχει την έκφραση των MYB75, MYB82 και MYB113, είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή ανθοκυανών (F. Yang et al., 2013).

Εκτός από την ενδοκυτταρική ρύθμιση, η βιοσύνθεση των ανθοκυανών ελέγχεται και από μια πληθώρα περιβαλλοντικών παραγόντων, οι οποίοι είτε επιδρούν άμεσα στα εμπλεκόμενα γονίδια είτε στους μεταγραφικούς παράγοντες. Το φως είναι ένας από τους πιο σημαντικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες που εμπλέκονται στο μονοπάτι βιοσύνθεσης. Έντονη φωτεινότητα μπορεί να αυξήσει την έκφραση του MYB1 στο μήλο, υπερεκφράζοντας τα γονίδια που κωδικοποιούν τα ένζυμα της βιοσυνθετικής οδού, με αποτέλεσμα την παραγωγή υψηλής συγκέντρωσης ανθοκυανών (Gu et al., 2019b). Ακόμη, οι συνθήκες υψηλής φωτεινότητας αναστέλλουν γρήγορα την έκφραση του MYBL2, ενεργοποιώντας τους PAP1, PAP2 και GL3, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση ανθοκυανών. Σε συνθήκες χαμηλής φωτεινότητας πραγματοποιείται η αντίστροφη διαδικασία (Chaves-Silva et al., 2018b). Επίσης, το χρώμα αλλά και η συγκέντρωση των ανθοκυανών στο χυμοτόπιο εξαρτώνται από το pH. Κόκκινοι χρωματισμοί αναπτύσσονται σε όξινο pH, ενώ αποχρώσεις του μπλε αρχίζουν να εμφανίζονται σε πιο υψηλό pH (Sunil & Shetty, 2022a). Το pH ρυθμίζεται, επιπλέον, από τη ροή πρωτονίων μεταξύ κυτταροπλάσματος και χυμοτοπίου, η οποία πραγματοποιείται από τις H⁺-ATPάσες (VHAs) και τις H⁺-πυροφωσφατάσες (VHPs), με τη σειρά τους ελέγχονται από τους μεταγραφικούς παράγοντες MYB1 και MYB (Tanaka et al., 2008b; Gu et al., 2019a). Σε pH μεγαλύτερα του 7 οι ανθοκυανίνες συνήθως αποικοδομούνται, καθώς είναι πιο σταθερές σε όξινο περιβάλλον (Nistor et al., 2022a). Ακόμη, η θερμοκρασία μπορεί να επηρεάσει τη βιοσύνθεση ανθοκυανών, καθώς χαμηλές θερμοκρασίες ενισχύουν τη σύνθεσή τους, ενώ υψηλές θερμοκρασίες την αναστέλλουν (Chaves-Silva et al., 2018a; Sunil & Shetty, 2022b). Τέλος, η έλλειψη αζώτου και φωσφόρου ενεργοποιεί τους μεταγραφικούς παράγοντες PAP1, PAP2, MYB12 και GL3, οπότε αυξάνεται και η σύνθεση ανθοκυανών (Chaves-Silva et al., 2018a).

1.4.3 Βιολογικές δράσεις ανθοκυανών

Η παρουσία δευτερογενών μεταβολιτών -άρα και ανθοκυανών- στα φυτά τους προσφέρει προστασία έναντι βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων, λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης, ενώ ταυτόχρονα συσχετίζονται και με τη γονιμότητα της γύρης, κάτι που αρχικά αποδείχθηκε σε γενετικώς τροποποιημένα φυτά καλαμποκιού που παρουσίαζαν έλλειψη φλαβονειδών (Falcone Ferreyra et al., 2012). Συμμετέχουν ακόμη και σε άλλες κυτταρικές διεργασίες, όπως η μεταφορά σακχάρων και η διατήρηση της ωσμωτικής ισορροπίας. Εκτός από τα παραπάνω, οι ανθοκυανίνες έχουν σημαντικά οφέλη και για την ανθρώπινη υγεία. Για πολλά χρόνια δεν ήταν ακριβώς γνωστός ο τρόπος με τον οποίο οι ανθοκυανίνες απορροφώνται από τον ανθρώπινο οργανισμό, αλλά πλέον έχει αποδειχθεί πως απορροφώνται πλήρως από το στομάχι και το λεπτό έντερο και αποβάλλονται από το ουροποιητικό σύστημα (Ma et al., 2021). Τα οφέλη στον άνθρωπο περιλαμβάνουν την αντικαρκινική, αντική και αντιφλεγμονώδη τους δράση και αποδίδονται επίσης στον αντιοξειδωτικό τους χαρακτήρα, καθώς «εξουδετερώνουν» τις υπάρχουσες ενεργές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species-ROS) (Mannino et al., 2021). Οι ενεργές μορφές οξυγόνου, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂), οι υδροξυλικές ομάδες (OH⁻) και το ανιόν υπεροξειδίου (O₂⁻), προκαλούν οξειδωτικό στρες στα κύτταρα και όταν εμφανίζονται σε αυξημένες συγκεντρώσεις μπορεί να προκαλέσουν σοβαρές βλάβες στον οργανισμό, όπως καταστροφή του DNA, τη δημιουργία γενετικών αλλαγών, την

καταστροφή της δομής των πρωτεϊνών και των λιπιδίων και, τέλος, τον κυτταρικό θάνατο. Αυτό συμβαίνει διότι οι ROS προσπαθούν να πάρουν πίσω το ηλεκτρόνιο που τους λείπει, ώστε να σταθεροποιηθεί η δομή τους, αλληλοεπιδρώντας με άλλα μόρια, τα οποία εν τέλει αποσταθεροποιούνται και χάνουν τη λειτουργία τους. Όσο αυτός ο κύκλος αντιδράσεων συνεχίζει, προκαλούνται καταστροφές στα κύτταρα με αποτέλεσμα την εμφάνιση παθογόνων καταστάσεων (Slika et al., 2022). Η παρουσία των ROS, επιπλέον, συνοδεύεται από την εμφάνιση φλεγμονών στον οργανισμό με την ενεργοποίηση συγκεκριμένων μονοπατιών και την έκφραση προ-φλεγμονικών παραγόντων (Nistor et al., 2022b). Τα μόρια με αντιοξειδωτική δραστηριότητα, όπως τα φλαβονοειδή και γενικότερα οι φαινολικές ενώσεις, έχουν την ικανότητα λόγω της δομής τους να «εξουδετερώνουν» τις ROS δίνοντάς τους το ηλεκτρόνιο που έχουν χάσει, αποτρέποντας έτσι την καταστροφή άλλων μορίων σημαντικών για τις κυτταρικές λειτουργίες. Τα φλαβονοειδή, λόγω της ύπαρξης υδροξυλικών ομάδων έχουν αντιοξειδωτική δράση και μειώνουν τις ROS μεταφέροντας ένα άτομο υδρογόνου και ένα ηλεκτρόνιο από την υδροξυλική ομάδα. Η αντιοξειδωτική δράση είναι ανάλογη του αριθμού των υδροξυλικών ομάδων. Αντίθετα, η μεθυλίωση και η γλυκοζυλίωση των φλαβονοειδών μειώνουν την αντιοξειδωτική τους δράση, διότι δυσκολεύουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το μόριο του φλαβονοειδούς. Επίσης, οι φαινολικές ενώσεις μπορούν να ενεργοποιούν τη λειτουργία αντιοξειδωτικών ενζύμων (Slika et al., 2022).

Σε *in vitro* και *in vivo* μελέτες έχει αποδειχθεί, ότι οι ανθοκυανίνες μπορούν να αναστείλουν την εξάπλωση πολλών ειδών καρκίνου, όπως τον καρκίνο του ήπατος, τον καρκίνο των νεφρών, τον καρκίνο του μαστού, τον καρκίνο του εγκεφάλου, τον καρκίνο του θυροειδούς αδένα και τον καρκίνο του δέρματος (Dong et al., 2022). Η παρουσία ανθοκυανών φαίνεται να καταστέλλει την έκφραση του παράγοντα NF-κB, που προάγει τη μετάσταση του καρκίνου (Ma et al., 2021). Οι ανθοκυανίνες, επίσης, προστατεύουν τα νευρικά κύτταρα και αποτρέπουν την εμφάνιση ασθενειών όπως Alzheimer και Parkinson (Nistor et al., 2022b). Ακόμη, αποτρέπουν την εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων, την εμφάνιση διαβήτη, παχυσαρκίας, αλλά και προβλημάτων όρασης (Mohammed & Khan, 2022). Αυτό επιτυγχάνεται με τη γρήγορη αύξηση της οξειδωτικής λειτουργίας των μιτοχονδρίων στα μυϊκά και στα λιπώδη κύτταρα αυξάνοντας έτσι την ενέργεια του σώματος και την ταχύτερη μεταβολική λειτουργία. Τέλος, οι ανθοκυανίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φάρμακα πρόληψης ή θεραπείας του διαβήτη, διότι έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν τη λειτουργία των υδρολυτικών ενζύμων που συμμετέχουν στην πέψη των υδατανθράκων, με αποτέλεσμα την αποφυγή της απότομης αύξησης γλυκόζης στο αίμα (Ma et al., 2021; Nistor et al., 2022b).

1.4.5 Πηγές ανθοκυανών

Τα φρούτα και τα λαχανικά αποτελούν τις κύριες φυσικές πηγές ανθοκυανών που ο άνθρωπος μπορεί να καταναλώσει. Τέτοια παραδείγματα είναι τα βατόμουρα, οι φράουλες, τα ρόδια, τα δαμάσκηνα και τα κεράσια. Το περιεχόμενό τους σε ανθοκυανίνες μπορεί να ποικίλλει, αλλά γενικά τα φρούτα έχουν υψηλότερη συγκέντρωση σε σχέση με τα λαχανικά (Mannino et al., 2021). Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις εντοπίζονται κυρίως στον καρπό, αν και ανθοκυανίνες μπορεί να υπάρχουν και στα φύλλα και τις ρίζες. Παρόλα αυτά, η ευρεία αναγνώριση που έχουν αποκτήσει πλέον ως αντιοξειδωτικές ουσίες έχει επεκτείνει την αξιοποίησή τους στην παραγωγή ροφημάτων, συμπληρωμάτων διατροφής και προϊόντα προσωπικής υγιεινής και περιποίησης σε διάφορες εταιρείες (Mohammed & Khan, 2022). Συνεπώς, η πρόσληψη μπορεί να επιτευχθεί και με την κατανάλωσή τους σε μορφή κάψουλας ή,

σε περίπτωση δερματικής χρήσης, σε μορφή κρέμας. Κρέμες που περιέχουν ανθοκυανίνες έχουν δοκιμαστεί και έχει αποδειχθεί πως συμβάλλουν στη γρηγορότερη επούλωση πληγών του δέρματος και στην πρόληψη συμπτωμάτων γήρανσης (Nistor et al., 2022b).

1.5 «Ωμικές» τεχνολογίες στα αρωματικά φυτά και συστήματα ετερόλογης έκφρασης σε μικροβιακούς ξενιστές

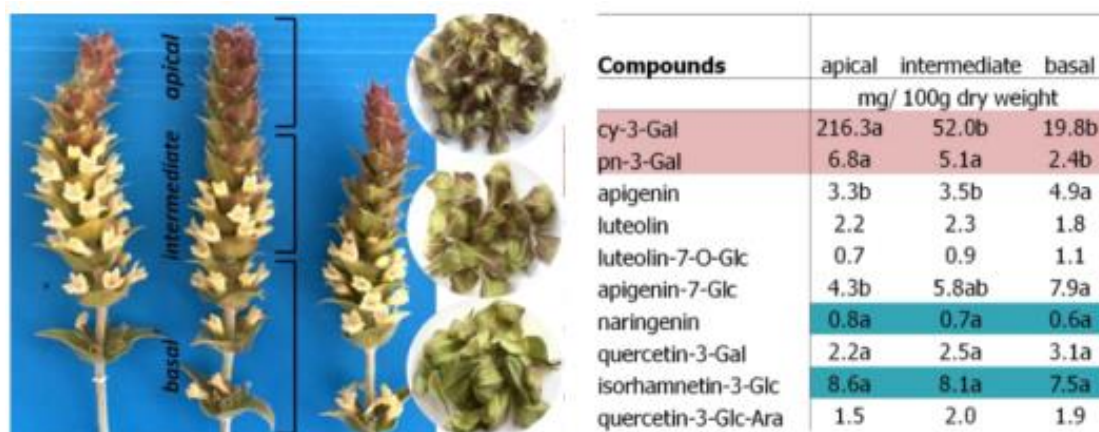
Τα αρωματικά φυτά χρησιμοποιούνται για θεραπευτικούς σκοπούς από την αρχαιότητα και είναι ικανά να συνθέσουν ένα ευρύ φάσμα δευτερογενών μεταβολιτών, οι οποίοι έχουν εμπορική σημασία για την παραγωγή φαρμακευτικών προϊόντων. Η βελτίωσή τους με συμβατικές μεθόδους συχνά είναι δύσκολη λόγω της απουσίας οργανισμών-μοντέλων, όμως τα αρωματικά φυτά έχουν το σημαντικό πλεονέκτημα της μεγάλης γενετικής ποικιλότητας, που στη βελτίωση είναι απαραίτητη. Η βελτίωση των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών εστιάζει στην παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας και, ταυτόχρονα, καλύτερης ποιότητας δευτερογενών μεταβολιτών για την περαιτέρω αξιοποίησή τους. Ως τώρα, οι «ωμικές» τεχνολογίες (γενωμική, μεταβολομική, μεταγραφομική, πρωτεωμική) έχουν συμβάλει στην αποτελεσματικότερη και γρηγορότερη αναγνώριση γονιδίων που εμπλέκονται σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια. Η ανάπτυξη μοριακών δεικτών και η μέθοδος του DNA barcoding έχουν χρησιμοποιηθεί για βελτιωτικούς σκοπούς και, συγκεκριμένα, για τη μελέτη της γενετικής παραλλακτικότητας κάποιου είδους. Επίσης, η χαρτογράφηση των QTL (Quantitative Trait Loci) είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος για τον εντοπισμό και τη μελέτη των γονιδιακών τμημάτων που ρυθμίζουν την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών. Τέλος, όσον αφορά τις γενωμικές μεθόδους (genomics), το «genome editing», ιδιαίτερα η μέθοδος CRISPR/Cas9, είναι πλέον πολύτιμο εργαλείο για τη δημιουργία κληρονομίσιμων αλλαγών αποφεύγοντας τις παλαιότερες μεθόδους γενετικής τροποποίησης, αν και ως τώρα οι μελέτες του στα αρωματικά φυτά είναι περιορισμένες. Τέλος, η μελέτη του μεταγραφώματος (transcriptomics) έχει αποδειχθεί ότι είναι η πιο κοινή μέθοδος που ακολουθείται από τους βελτιωτές με τη βοήθεια σύγχρονων βιοπληροφορικών εργαλείων για την κατανόηση της λειτουργίας των γονιδίων και των υπόλοιπων ρυθμιστικών μηχανισμών που εμπλέκονται για τη βελτίωση των αρωματικών φυτών ως προς τους δευτερογενείς μεταβολίτες (BARUT et al., 2022). Στη μεταγραφωμική ανάλυση περιλαμβάνονται οι μικροσυστοιχίες, που βασίζονται στον υβριδισμό και η τεχνική RNA-seq, που βασίζεται στις μεθόδους αλληλούχησης. Τέλος, η μελέτη του «μεταβολόματος» αποσκοπεί στον έλεγχο των προϊόντων του δευτερογενούς μεταβολισμού ως προς την ποιότητά τους και σε συνδυασμό με τη μεταγραφωμική ανάλυση δημιουργεί μια πιο ξεκάθαρη εικόνα ως προς την ανάπτυξη βελτιωτικών προγραμμάτων (L. Yang et al., 2022).

Από την άλλη, η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA επιτρέπει τη μεταφορά αυτών των γονιδίων και την έκφρασή τους σε οργανισμούς-ξενιστές, με αποτέλεσμα την παραγωγή των αντίστοιχων μεταβολιτών. Η χρήση αυτών των μικροβιακών ξενιστών είναι σημαντική, διότι συχνά οι δευτερογενείς μεταβολίτες παράγονται σε είδη τα οποία προέρχονται από άγριους πληθυσμούς ή είναι απειλούμενα, με αποτέλεσμα η εκτεταμένη χρήση τους για την παραγωγή φαρμακευτικών προϊόντων να οδηγήσει τελικά στην εξαφάνισή τους. Επίσης, η διαδικασία σχεδιασμού ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας ως ξενιστές φυτικά είδη είναι αρκετά πιο ακριβή και πολυπλοκότερη. Αντίθετα, οι μικροβιακοί ξενιστές παράγουν τους δευτερογενείς μεταβολίτες γρηγορότερα και σε υψηλές συγκεντρώσεις (Vasilev, 2022).

Οι πιο κοινοί μικροβιακοί ξενιστές που χρησιμοποιούνται για ετερόλογη έκφραση προϊόντων του φυτικού μεταβολισμού είναι το βακτήριο *Escherichia coli* και η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*. Παρότι η διαδικασία έκφρασης είναι γρηγορότερη στο *E. coli*, συχνά μπορεί να υπάρχουν προβλήματα στην έκφραση ορισμένων πρωτεϊνών σε προκαρυωτικούς οργανισμούς, όπως πχ των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών. Για αυτό το λόγο, προτιμάται η ζύμη *S. cerevisiae*, ως ευκαρυωτικός οργανισμός (Wang et al., 2011). Όπως είναι γνωστό, οι ζύμες δε συνθέτουν φαινολικές ενώσεις φυσικά, παρόλα αυτά διαθέτουν τα απαραίτητα αρωματικά αμινοξέα που αποτελούν αρχικές ενώσεις των βιοσυνθετικών οδών, όπως στην περίπτωση των ανθοκυανών (Chrzanowski, 2020). Συνεπώς, για την ετερόλογη έκφραση των γονιδίων που συμμετέχουν στο βιοσυνθετικό μονοπάτι των ανθοκυανών η ζύμη *S. cerevisiae* αποτελεί τον πιο βολικό ξενιστή.

1.6 Αντικειμενικός στόχος της διπλωματικής εργασίας

Όπως έχει αναφερθεί, τα είδη του γένους *Sideritis* έχουν σημαντική εμπορική αξία, λόγω της ευρείας κατανάλωσης των υπέργειων τμημάτων του με τη μορφή ροφήματος (τσάι του βουνού). Η εμπορική αξιοποίηση των παραγόμενων δρογών των διαφόρων ειδών εξαρτάται από την ποιότητα της παραγόμενης βιομάζας των φυτών, η οποία αναφέρεται σε οργανοληπτικά χαρακτηριστικά όπως το χρώμα (το οποίο προτιμάται να είναι πράσινο) και το άρωμα, την παρουσία ξένων υλών, και το μικροβιακό φορτίο. Τα είδη με την μεγαλύτερη εμπορική αξία στην Ελλάδα είναι το *S. scardica* και *S. raeseri*, οι ταξιανθίες των οποίων φέρουν βράκτια φύλλα πράσινου χρώματος. Ωστόσο, σε περιοχές της Β. Ελλάδας (Πιερία, Καστοριά, Πρέσπες) έχει εντοπιστεί η παρουσία «ερυθρόβρακτων» φαινοτύπων σε φυσικούς πληθυσμούς αλλά και καλλιέργειες των δύο ειδών, ενώ ιδιαίτερα στο είδος *S. raeseri* το φαινόμενο είναι πιο έντονο. Προκαταρκτική μελέτη «ερυθρόβρακτων» φυτών στα εργαστήριά μας με ανάλυση σε Υγρό Χρωματογράφο (LC-MS/MS) υπέδειξε ότι το ερυθρό χρώμα στα βράκτια φύλλα των φυτών οφείλεται στην παρουσία ανθοκυανών με κύρια τον 3-γαλακτοζίτη της κυανιδίνης (Εικόνα 1.9). Ωστόσο η παρουσία του ερυθρού χρώματος στα φύλλα θεωρείται ανεπιθύμητο χαρακτηριστικό για την εμπορική αξιοποίηση τέτοιων παραγόμενων δρογών.



Εικόνα 1.9: Αποτελέσματα LC-MS/MS στα βράκτια φύλλα των ερυθρών φαινοτύπων.

Καθώς η παρουσία των εν λόγω ανθοκυανών οφείλεται στην έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων (*DFR*, *ANS*, *UFGT*) στα φυτά, γεγονός που σε συνδυασμό με την υψηλή ικανότητα υβριδισμού των ειδών του γένους *Sideritis* μπορεί να επιδράσει σημαντικά στην κληρονομήση τέτοιων γονιδίων σε απογόνους -και άρα στην «επιμόλυνση» των φυτών που φέρουν πράσινα βράκτεια φύλλα, η παρούσα μελέτη αποσκοπεί στη διερεύνηση του μηχανισμού με τον οποίο η φαινοτυπική ποικιλομορφία «μεταφράζεται» σε χημική ποικιλομορφία.

Μέσω της διερεύνησης της παρουσίας και λειτουργικότητας των προτεινόμενων εμπλεκόμενων γονιδίων και της έκφρασής τους σε διαφορετικούς ιστούς δύο φαινοτύπων του είδους *S. raeseri* σε μοριακό επίπεδο, σκοπός της μελέτης ήταν να θέσει τις βάσεις για την κατανόηση του φαινομένου εμφάνισης τέτοιων ερυθρόβρακτων γονοτύπων στην φύση συνδυάζοντας δεδομένα μεταγραφομικής και μεταβολομικής ανάλυσης.

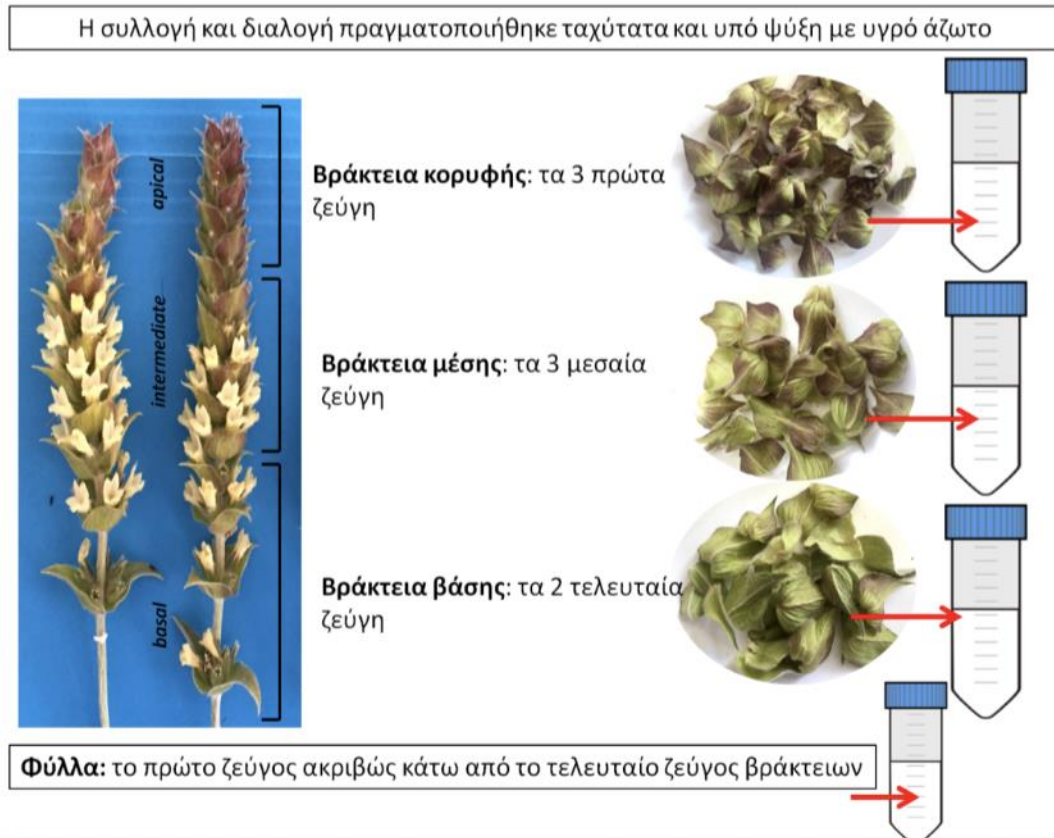
Έτσι πραγματοποιήθηκε μία προσπάθεια να απαντηθούν τα παρακάτω ερωτήματα:

- 1) Εντοπισμός των εμπλεκόμενων γονιδίων (*DFR*, *ANS*, *UFGT*) σε «ερυθρόβακτους» γονοτύπους
- 2) Η παρουσία αυτών των γονοτύπων σηματοδοτεί τελικά και την έκφρασή τους;
- 3) Πώς διαφοροποιείται η συσσώρευση ανθοκυανών σε διαφορετικά μέρη της ταξιανθίας του είδους και αυτή η διαφοροποίηση συνδέεται με την ποσοτική έκφραση των αντίστοιχων υπεύθυνων γονιδίων;
- 4) Υπάρχει πιθανότητα να επιδρά στην ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση της έκφρασής τους πιθανός μεταγραφικός παράγοντας;
- 5) Υπάρχει πιθανότητα ανάπτυξης ενός μοριακού δείκτη που να ανιχνεύει νωρίς (ίσως και σε επίπεδο πολλαπλασιαστικού υλικού) τέτοιους «ανεπιθύμητους» γονοτύπους σε μία καλλιέργεια του είδους;
- 6) Με ποιον τρόπο θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν οι «ερυθρόβακτοι» γονοτύποι, εφόσον έχουν ευεργετικές ιδιότητες για τον άνθρωπο;

Υλικά και Μέθοδοι

Φυτικό υλικό – Συνθήκες καλλιέργειας

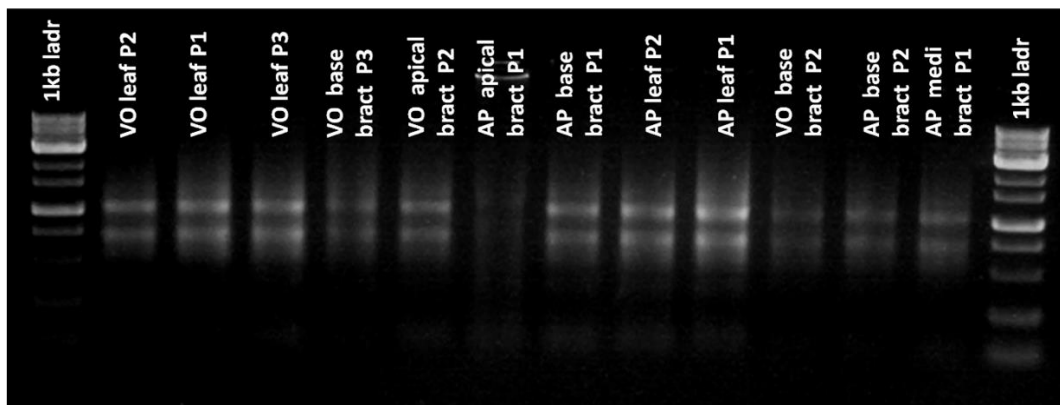
Για τις ανάγκες του πειράματος χρησιμοποιήθηκε φυτικό υλικό του είδους *Sideritis raeseri* που διατηρείται στη συλλογή του Ινστιτούτου Γενετικής Βελτίωσης & Φυτογενετικών Πόρων (ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ) και προέρχεται από διαφορετικές ορεινές περιοχές της Βόρειας Ελλάδας. Κατά το Μάιο του 2022 (όταν τα φυτά βρίσκονταν σε στάδιο πλήρους σχηματισμού της ταξιανθίας και έναρξη ανθοφορίας) συλλέχθηκε φυτικός ιστός από δύο φαινοτύπους σιδερίτη: 1) φαινότυπο ο οποίος σταθερά εκφράζει ερυθρό χρώμα βράκτειων φύλλων, και 2) φαινότυπο με πράσινο χρώμα βράκτειων φύλλων. Καθώς έχει παρατηρηθεί ότι η ένταση του ερυθρού χρώματος τείνει να φθίνει από τα βράκτεια της κορυφής προς αυτά στη βάση της ταξιανθίας, συλλέχθηκαν βράκτεια φύλλα από την κορυφή, το μέσο, τη βάση της ταξιανθίας, καθώς και το πρώτο ζεύγος πραγματικών φύλλων κάτω από τη βάση, και για τους δύο φαινοτύπους. Τα δείγματα συλλέχθηκαν από τρία ατομικά κλωνικά φυτά (3 βιολογικές επαναλήψεις) ανά φαινότυπο, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.1. Συνολικά, 24 δείγματα φυτικών ιστών χρησιμοποιήθηκαν για τον περαιτέρω πειραματισμό.



Εικόνα 2.1: Απεικόνιση της επιλογής φυτικού ιστού για τον πειραματισμό.

Απομόνωση RNA από φυτικό ιστό

Η απομόνωση του ολικού RNA έγινε ακολουθώντας τις οδηγίες του εγχειριδίου Spectrum Plant Total RNA Kit της εταιρίας Sigma-Aldrich. Για την απομόνωση ζυγίστηκαν 100mg λειοτριβμένου φυτικού ιστού με υγρό άζωτο σε σωλήνα Eppendorf. Αρχικά, πραγματοποιείται λύση των κυτταρικών τοιχωμάτων και ομογενοποίηση των κυττάρων χρησιμοποιώντας το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο περιέχει 1% 2-μερκαπτοαιθανόλη, με έντονη ανακίνηση και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 11.000 στροφές, ώστε να καθιζάνει ο ιστός. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καινούργιο σωλήνα Eppendorf, στον οποίο έχει τοποθετηθεί στήλη, όπου εκεί «καθαρίζεται» και προσδένεται το RNA, χρησιμοποιώντας το ρυθμιστικό διάλυμα 1. Έπειτα, γίνεται κατεργασία με DNAάση (από Monarch Kit), ώστε το RNA που απομονώνεται να είναι πιο καθαρό. Ακολουθούν δύο πλύσεις με το ρυθμιστικό διάλυμα 2 και, τέλος, το RNA εκλούεται από τη στήλη μετά από προσθήκη απεσταγμένου νερού (RNAase-free) και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11.000 στροφές. Το απομονωμένο RNA αποθηκεύεται στους -80°C για περαιτέρω χρήση. Η συγκέντρωση και η καθαρότητά του ελέγχεται με μέτρηση στο NanoDrop και ηλεκτροφόρηση σε 1% πηκτή αγαρόζης (Εικόνα 2.2). Η καθαρότητα των δειγμάτων φαίνεται από το λόγο OD260/OD280 και για δείγματα RNA υπολογίζεται ότι η βέλτιστη τιμή είναι 2.



Εικόνα 2.2: Πηκτή αγαρόζης απομονωμένου RNA των δειγμάτων.

Μετατροπή RNA σε cDNA μέσω της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής

Η μετατροπή του RNA σε cDNA έγινε με την αντίστροφη μεταγραφάση LunaScript RT Master Mix Kit.

Για την αντίδραση τοποθετήθηκαν σε σωλήνες Eppendorf τα παρακάτω αντιδραστήρια:

Αντιδραστήρια	Όγκος ανά δείγμα
LunaScript RT Master Mix (5X)	4 μ l
10 μ M random primer mix	2 μ l
RNA	500 ng
dH ₂ O	Μέχρι 20 μ l
Τελικός όγκος: 20 μ l	

Η αντίδραση μετατροπής πραγματοποιείται με επώαση στην PCR με βάση το εξής πρωτόκολλο:

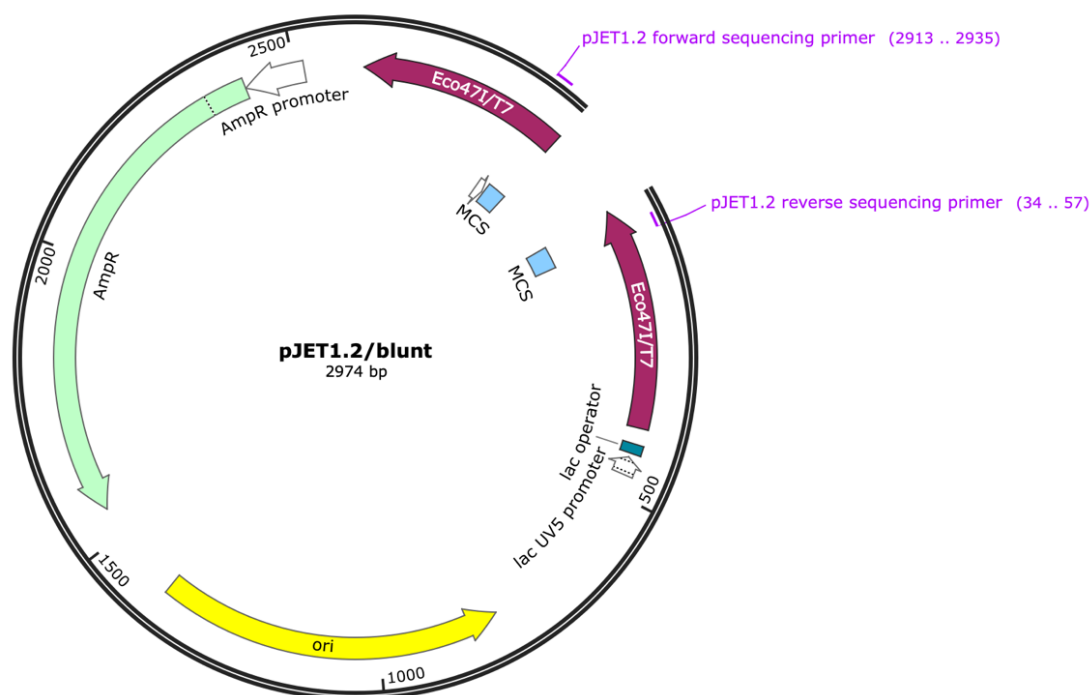
Θερμοκρασία	Χρόνος
25 °C	2 λεπτά
55 °C	10 λεπτά
95 °C	1 λεπτό

Πλασμιδιακοί φορείς

- **pJET1.2/blunt**

Το πλασμίδιο pJET1.2/blunt (2974 ζεύγη βάσεων) χρησιμοποιήθηκε ως φορέας για κλωνοποίηση γονιδιακών τμημάτων σε αυτό, καθώς λόγω των «ανοιχτών» άκρων του (multiple cloning site-MCS) καθιστά εύκολη την κλωνοποίηση τμημάτων σε αυτό, διότι το ένθεμα εισάγεται στη θέση αυτή. Το γονίδιο *bla*(Ap^R) προσδίδει στο πλασμίδιο ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμικικιλίνη κωδικοποιώντας τη β-γαλακταμάση. Έτσι, μόνο τα βακτήρια που έχουν δεχθεί το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο θα μπορούν να

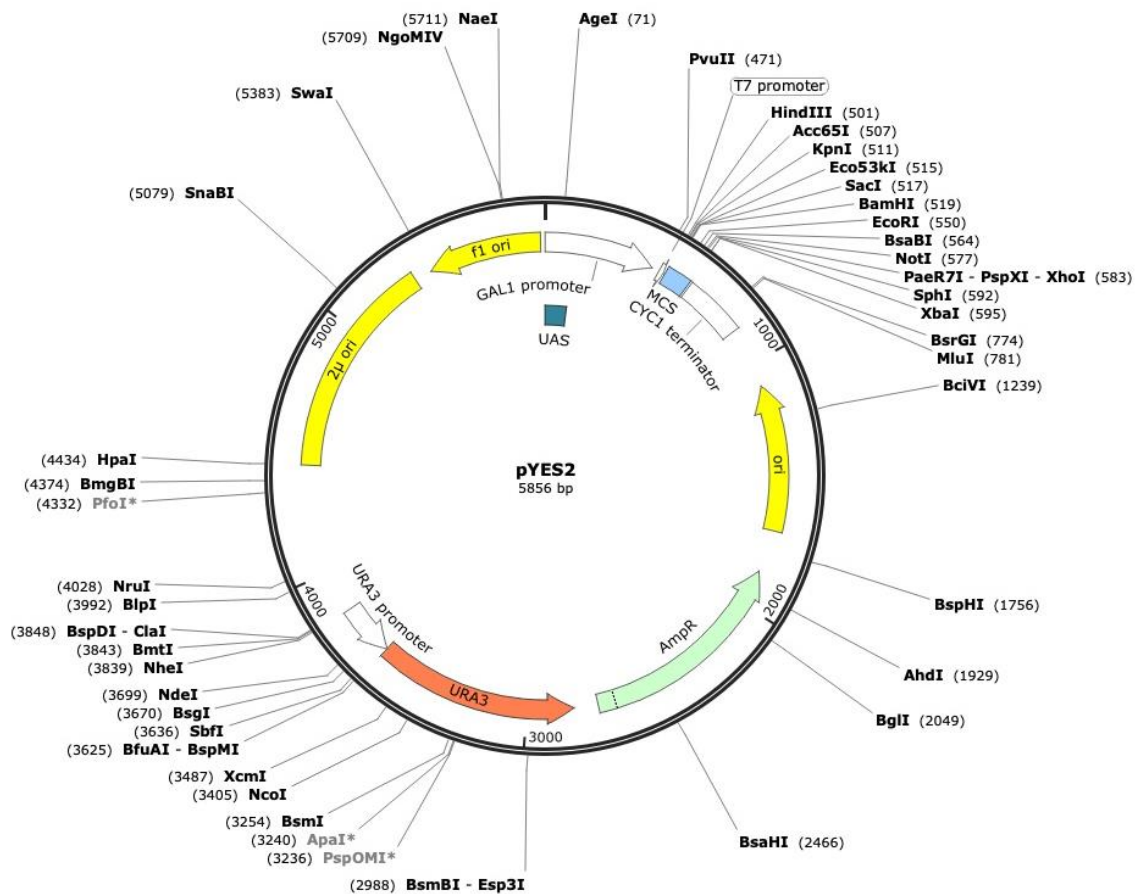
δημιουργήσουν αποικίες και να αναπτυχθούν παρουσία αμπικιλίνης. Ο χάρτης του πλασμιδίου pJET1.2/blunt παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.3 με τη βοήθεια του λογισμικού Snapgene.



Εικόνα 2.3: Πλασμιδιακός χάρτης του pJET1.2/blunt. (από Snapgene)

- **pYES2**

Στην παρούσα εργασία, το πλασμίδιο pYES2 (5856 ζεύγη βάσεων) χρησιμοποιήθηκε ως φορέας έκφρασης των επιθυμητών γονιδίων στα επιλεγμένα στελέχη βακτηρίων και ζυμών. Το πλασμίδιο κόβεται με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα εντός της περιοχής MCS, όπου εισάγεται το γονίδιο ενδιαφέροντος με τη βοήθεια του ενζύμου λιγάση. Περιέχει στη αλληλουχία του το γονίδιο *bla*, ο οποίος του προσδίδει ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά αμπικιλίνη και καρβενικιλίνη, αλλά και το γονίδιο *URA3*, που προσδίδει ικανότητα ανάπτυξης των στελεχών που έχουν λάβει το πλασμίδιο απουσία ουρακίλης στο θρεπτικό υπόστρωμα, λόγω ικανότητας σύνθεσης ουρακίλης. Η τελευταία ιδιότητα του πλασμιδίου pYES2 αξιοποιείται στη διαδικασία επιλογής αποικιών. Ο χάρτης του πλασμιδίου pYES2 παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.4 με τη βοήθεια του λογισμικού Snapgene.



Εικόνα 2.4: Πλασμιδιακός χάρτης του φορέα έκφρασης pYES2 (από Snapgene).

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η μέθοδος αυτή επιτυγχάνει την επαναλαμβανόμενη αντιγραφή ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA με τη βοήθεια μιας ειδικής πολυμεράσης και δύο εκκινητών (forward και reverse), ειδικούς για την κάθε επιθυμητή περιοχή του DNA (Πίνακας 2.1). Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται στις αντιδράσεις PCR είναι σε συγκέντρωση 10 mM. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν στο λογισμικό Snapgene με T_m από 58-60 °C. Οι γονιδιακές περιοχές ενδιαφέροντος που χρησιμοποιήθηκαν προέκυψαν από «στοίχιση» αντίστοιχων αλληλουχιών άλλων ειδών μέσω του εργαλείου BLAST του NCBI (National Center for Biotechnology Information) σε δεδομένα *de novo* RNAseq (που πραγματοποιήθηκαν στα εργαστήρια του ινστιτούτου Fondazione Edmund Mach) για τα είδη *Sideritis spp.*. Για τη «στοίχιση» χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MegaX. Η διαδικασία αυτή ήταν απαραίτητη, διότι δεν έχει αλληλουχηθεί ακόμα το γονιδίωμα του είδους που μελετήθηκε και οι πληροφορίες ήταν περιορισμένες. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγεία τμήματα cDNA και πλασμιδιακού DNA. Στις περιπτώσεις που απαιτούνταν μεγαλύτερη ακρίβεια στην εξακρίβωση της ενίσχυσης κάποιου τμήματος DNA επιλέχθηκε η αντίδραση Q5 High-Fidelity PCR από την εταιρία BioLabs. Η PCR πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το 2X PCRBIO HS Taq Mix Red από την εταιρία PCRBIO SYSTEMS ακολουθώντας το εξής πρωτόκολλο για 40 κύκλους:

Θερμοκρασία	Χρόνος
95 °C	2 λεπτά
95 °C	30 δευτερόλεπτα
59 °C (T _m)	30 δευτερόλεπτα
72 °C	1 λεπτό
72 °C	10 λεπτά

Για την Q5 High-Fidelity PCR ακολουθήθηκε το εξής πρωτόκολλο για 35 κύκλους:

Θερμοκρασία	Χρόνος
98 °C	30 δευτερόλεπτα
98 °C	10 δευτερόλεπτα
59 °C	30 δευτερόλεπτα
72 °C	45 δευτερόλεπτα
72 °C	2 λεπτά
Διατήρηση: 4 °C	

Για τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε η συσκευή PCR Biometra TGradient Thermocycler.

Πίνακας 2.1: Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τον εντοπισμό και την απομόνωση των επιθυμητών γονιδίων. Στην ονομασία φαίνεται το ένζυμο περιορισμού που χρησιμοποιήθηκε για την πέψη της περιοχής αναγνώρισης του κάθε γονιδίου.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή '5 – '3	Γονίδιο
<i>Sr_UFGT_F</i>	ATGGTGTCCACTCGCATAT	<i>SrUFGT</i>
<i>Sr_UFGT_R</i>	TCAAATACTAATAATTTCCAGCAATTTCTC	<i>SrUFGT</i>
<i>Sr_ANS_F</i>	ATGATACACCCCTCTCAAACC	<i>SrANS</i>
<i>Sr_ANS_R</i>	TTAATCATCCTCAGTCTTCCTAAAC	<i>SrANS</i>
<i>Sr_leaf_DFR_F</i>	ATGTCTGCGAAAACCGCG	<i>SrDFR</i>
<i>Sr_leaf_DFR_R</i>	TCAATTTGTTTTTGTGTAGATCTTGC	<i>SrDFR</i>
<i>Sr_ANS_KpnI_F</i>	CGGGTACCAAAATGATACACCCCTCTCAAACC	<i>SrANS</i>
<i>Sr_ANS_XhoI_R</i>	CCCTCGAGTTAATCATCCTCAGTCTTCCTAAAC	<i>SrANS</i>
<i>Sr_UFGT_BamHI_F</i>	CGGGATCCAAAATGGTGTTCCTCGCATAT	<i>SrUFGT</i>
<i>Sr_UFGT_XhoI_R</i>	CCCTCGAGTCAAATACTAATAATTTCCAGCAATTTCTC	<i>SrUFGT</i>
<i>Sr_leaf_DFR_KpnI_F</i>	GGGGTACCAAAATGTCTGCGAAAACCGCG	<i>SrDFR</i>
<i>Sr_leaf_DFR_XhoI_R</i>	CCCTCGAGTCAATTTGTTTTTGTGTAGATCTTGC	<i>SrDFR</i>

Στελέχη *Escherichia coli*, θρεπτικά μέσα και συνθήκες καλλιέργειας

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα κλωνοποίησης και το μετασχηματισμό πλασμιδιακών φορέων τα στελέχη Mach1 και DH5alpha *Escherichia coli*. Το στέλεχος Mach1 έχει γονότυπο *F- φ80(lacZ)ΔM15 ΔlacX74 hsdR(rK-mK+) ΔrecA1398 endA1 tonA*. Ο γονότυπος *lacZΔM15* δίνει τη δυνατότητα διάκρισης των

λευκών αποικιών κατά την επιλογή, ο *hsdR* επιτρέπει την αποδοτική τροποποίηση του μη μεθυλιωμένου DNA που μπορεί να προκύψει από τις PCR διαδικασίες, ο *DrecA1398* μειώνει την πιθανότητα εμφάνισης ομόλογου ανασυνδυασμού στο κλωνοποιημένο DNA, ο *endA1* αυξάνει την ποσότητα και την ποιότητα του πλασμιδιακού DNA και, τέλος, ο *tonA* προσδίδει ανθεκτικότητα στο στέλεχος κατά των T1 και T5 φάγων. Το στέλεχος DH5alpha έχει γονότυπο F- φ80*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r_k^- , m_k^+) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1* λ-. Τα «δεκτικά» κύτταρα (competent cells) διατηρούνται στους -80°C για επόμενες χρήσεις.

Η καλλιέργεια των Mach1 και DH5alpha κυττάρων έπειτα από τον μετασχηματισμό πραγματοποιήθηκε με επώαση στους 37°C για 12 h σε θρεπτικό μέσο Luria-Bertani με σύσταση 10g τρυπτόνη, 5g εκχύλισμα κυττάρων ζύμης, 10g NaCl ανά λίτρο σε απεσταγμένο νερό. Για τη στερεοποίηση του θρεπτικού υποστρώματος χρησιμοποιήθηκαν 15g/L άγαρ. Στη συνέχεια, το θρεπτικό μέσο αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο και προστίθεται η απαραίτητη ποσότητα του κατάλληλου αντιβιοτικού. Τα τρυβλία με το στερεό θρεπτικό υπόστρωμα διατηρούνται στους 4°C, ενώ το υγρό θρεπτικό διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

Μετασχηματισμός βακτηρίων *Escherichia coli* με θερμική καταπόνηση

Για τη διαδικασία του μετασχηματισμού των δεκτικών κυττάρων *E. coli* προστίθενται σε σωλήνα Eppendorf 5 μl του προϊόντος της αντίδρασης της λιγάσης ανά 50 μl καλλιέργειας δεικτικών κυττάρων και το μίγμα αναδεύεται ελαφρά και επωάζεται σε πάγο για 30 λεπτά. Ακολουθεί μια σύντομη έκθεση των κυττάρων για 30 δευτερόλεπτα σε θερμικό σοκ (42 °C), ώστε να κύτταρα να μπορέσουν να ενσωματώσουν το DNA. Στη συνέχεια, επανατοποθετούνται στον πάγο για 2 λεπτά και έπειτα, αφού προστεθούν (κάτω από ασηπτικές συνθήκες) 250 μl προθερμασμένου ρυθμιστικού διαλύματος S.O.B. (Sulfur-oxidizing Bacteria), επωάζονται στους 37°C για μία ώρα με ταυτόχρονη ανάδευση σε ταχύτητα 225 rpm. Τέλος, 100 μl από τα μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία με επιλεγμένο αντιβιοτικό για να σχηματίσουν αποικίες για 12 ώρες.

PCR αποικιών

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιήθηκε επίσης και για τον εντοπισμό αποικιών βακτηρίων *Escherichia coli* που φέρουν ανασυνδυασμένα πλασμίδια με το επιθυμητό γονίδιο. Για τις αντιδράσεις αυτές ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο για την αντίδραση της PCR και ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε αποικία βακτηρίου.

4Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο για το διαχωρισμό μορίων DNA. Η μέθοδος στηρίζεται στη μετακίνηση φορτισμένων μορίων υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Λόγω των διαφορετικών μαζών – άρα και φορτίων – τα μόρια DNA κινούνται μέσα στην πηκτή προς την κάθοδο με διαφορετικές

ταχύτητες, με τα μικρότερα να πηγαίνουν πιο γρήγορα. Η αγαρόζη είναι ένας πολυσακχαρίτης και το πήκτωμά της περιλαμβάνει πόρους, ώστε να την διαπερνούν τα μόρια DNA. Η πηκτή παράγεται διαλύοντας 1,5% αγαρόζης σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης. Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το 1X TAE (40mM Tris-CH₃COOH, 1mM EDTA, pH=7,5). Πριν τη στερεοποίηση της πηκτής προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο φθορίζει όταν η πηκτή εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία, ώστε να διακρίνεται με τη μορφή ζώνης η θέση των μορίων DNA. Μαζί με τα δείγματα στην πηκτή τοποθετείται και μάρτυρας (ladder) που δίνει πληροφορίες για το μέγεθος των τμημάτων DNA. Ο μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα είναι ο μάρτυρας λ (100 bp).

Απομόνωση και καθαρισμός DNA από πηκτή αγαρόζης

Αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση και διαχωριστούν οι ζώνες, η επιθυμητή ζώνη κόβεται από την πηκτή προσεκτικά με αποστειρωμένο νυστέρι, τοποθετείται σε σωλήνα Eppendorf και καθαρίζεται χρησιμοποιώντας το High Pure PCR Product Purification Kit της εταιρίας Roche. Ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή, πρώτα ρευστοποιείται η πηκτή αγαρόζης με τη χρήση θερμότητας και έπειτα τοποθετείται το ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης, το οποίο επιτυγχάνει την πρόσδεση του DNA στη στήλη με ταυτόχρονη απομάκρυνση των υπόλοιπων συστατικών με φυγοκέντρηση. Ακολουθούν διαδοχικές πλύσεις της στήλης και, τέλος, το DNA εκλύεται σε απεσταγμένο νερό και διατηρείται στους -20 °C για μελλοντική χρήση. Η συγκέντρωση και η καθαρότητά του ελέγχεται με μέτρηση στο NanoDrop. Η καθαρότητα των δειγμάτων φαίνεται από το λόγο OD260/OD280 και για δείγματα DNA υπολογίζεται ότι η βέλτιστη τιμή είναι 1,8.

Πέψη με ένζυμα περιορισμού

Η πέψη των πλασμιδιακών φορέων και των γονιδιακών τμημάτων για απομόνωση του ενθέματος ενδιαφέροντος έγινε με ένζυμα περιορισμού της εταιρίας Thermo Fisher Scientific. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή ακολουθώντας το εξής πρωτόκολλο (Πίνακας 2.2):

Πίνακας 2.2: Το πρωτόκολλο κατεργασίας με ένζυμα περιορισμού.

Αντιδραστήρια	Όγκος ανά αντίδραση
10X Ρυθμιστικό Διάλυμα	2 μl
Ένζυμο περιορισμού I	1 μl
Ένζυμο περιορισμού II	1 μl
Πλασμιδιακός φορέας/πλασμιδιακό DNA	1000 ng/500 ng
dH ₂ O	Μέχρι τα 20 μl
Τελικός όγκος: 20 μl	

Η αντίδραση της πέψης πραγματοποιείται με επώαση για 1 ώρα στους 37 °C και 10 λεπτά στους 80 °C για αδρανοποίηση των ενζύμων. Έπειτα, τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αγαρόζης.

Πίνακας 2.3: Συνδυασμοί ενζύμων περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν ανά γονίδιο ενδιαφέροντος.

Γονίδιο	Φορέας	Ένζυμα περιορισμού
<i>SrDFR</i>	pYES2	<i>KpnI</i> x <i>XhoI</i>
<i>SrANS</i>	pYES2	<i>KpnI</i> x <i>XhoI</i>
<i>SrUFGT</i>	pYES2	<i>BamHI</i> x <i>XhoI</i>

Κλωνοποίηση γονιδίων ενδιαφέροντος στους πλασμιδιακούς φορείς

Για την εισαγωγή του γονιδίου στον φορέα pJET1.2/blunt δε χρησιμοποιούνται ένζυμα περιορισμού, διότι διαθέτει ανοιχτά άκρα ώστε να εισαχθεί το ένθεμα με την αντίδραση της λιγάσης. Η ποσότητα του ενθέματος καθορίζεται από το μήκος των γονιδίων και την συγκέντρωσή τους μετά από μέτρηση στο NanoDrop. Τα γονίδια που κλωνοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είχαν μήκος μεταξύ 1000-2000 ζεύγη βάσεων, συνεπώς για την αντίδραση λιγάσης απαιτούνται 50-100 ng με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή του ενζύμου της λιγάσης που χρησιμοποιήθηκε (εταιρία Thermo Fisher Scientific). Η T4 λιγάση είναι το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση σύνδεσης των ανοιχτών άκρων με το τμήμα του γονιδίου προς ένθεση.

Αντιδραστήρια	Όγκος ανά αντίδραση
10X Ρυθμιστικό διάλυμα Λιγάσης	2 μ l
Προϊόν ενθέματος	50-100 ng
Φορέας pJET1.2/blunt	1 μ l
T4 λιγάση	1 μ l
dH ₂ O	Μέχρι τα 20 μ l
Τελικός όγκος: 20 μ l	

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για τις αντιδράσεις λιγάσης ήταν το εξής:

Θερμοκρασία	Χρόνος
22 °C	2 ώρες
16 °C	14 ώρες
70 °C	10 λεπτά
Διατήρηση: 4 °C	

Για την αντίδραση σύνδεσης των ενθεμάτων και του φορέα έκφρασης pYES2 μετά από τις πέψεις και των δύο με τα ίδια κατάλληλα ένζυμα περιορισμού ανά περίπτωση τηρήθηκε η αναλογία συγκέντρωσης 3:1 (ένθεμα : φορέας). Η ποσότητα των ενθεμάτων και των φορέων καθορίζεται από το μήκος των γονιδίων και την συγκέντρωσή τους μετά από μέτρηση στο NanoDrop. Για τα γονίδια *DFR* και *ANS* υπολογίστηκαν 50 ng για την αντίδραση, ενώ για το γονίδιο *UFGT* υπολογίστηκαν 75 ng.

Αντιδραστήρια	Όγκος ανά αντίδραση
10X Ρυθμιστικό διάλυμα Λιγάσης	2 µl
Κομμένο πλασμίδιο	50 ng
Κομμένο ένθεμα	50 ή 75 ng
T4 λιγάση	1 µl
dH ₂ O	Μέχρι τα 20 µl
Τελικός όγκος: 20 µl	

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα *E. Coli*

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από τα βακτηριακά κύτταρα χρησιμοποιήθηκε το NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel, Germany) σύμφωνα με τις οδηγίες του πρωτοκόλλου (high-copy plasmids). Μετά την απομόνωση, τα πλασμίδια μπορούν να ελεγχθούν αν είναι ανασυνδυασμένα με PCR και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης.

Αλληλούχιση DNA

Η αλληλούχιση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων πραγματοποιήθηκε στα εργαστήρια του ινστιτούτου Fondazione Edmund Mach και ο έλεγχος των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό Snapgene. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται για την αλληλούχιση δειγμάτων είναι σε συγκέντρωση 3.2 mM και φαίνονται στον Πίνακα 2.4.

Πίνακας 2.4: Εκκινητές για την αλληλούχιση ανασυνδυασμένων πλασμιδίων για τους φορείς pJET1.2/blunt και pYES2.

Όνομα εκκινητή	Φορέας	Αλληλουχία εκκινητή '5 – '3
pJET1.2 forward sequencing primer	pJET1.2	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC
pJET1.2 reverse sequencing primer	pJET1.2	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG
GAL1_forward	pYES2	AATATACCTCTATACTTTAACGTC
CYC_TT_reverse	pYES2	GCGTGAATGTAAGCGTGAC

Στέλεχη *Saccharomyces cerevisiae*, θρεπτικά μέσα και συνθήκες καλλιέργειας

Το στέλεχος σακχαρομύκητα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το INVSc1 με γονότυπο *MATa his3D1 leu2 trp1-289 ura3-52 MAT his3D1 leu2 trp1-289 ura3-52*. Η καλλιέργεια των κυττάρων σακχαρομύκητα επιτυγχάνεται με επώαση στους 28°C σε θρεπτικό υπόστρωμα YPG με σύσταση 10g εκχύλισμα ζύμης, 20g πεπτόνης και 20% γλυκόζη (που προστίθεται μετά την αποστείρωση του θρεπτικού στο αυτόκαυστο) ανά λίτρο. Για την επιλογή αποικιών ζυμών έπειτα από το μετασχηματισμό με πλασμιδιακό DNA χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο απουσία ουρακίλης με χημική σύσταση 1.92g SD-U (Synthetic Drop-out without Uracil), 6.7g YNB (Yeast Nitrogen Base) και 20%

γλυκόζη ανά λίτρο (που προστίθεται μετά την αποστείρωση του θρεπτικού στο αυτόκαυστο). Το θρεπτικό μέσο στερεοποιείται και τοποθετείται σε τρυβλία με 20 g/L άγαρ. Τα στερεοποιημένα και τα υγρά θρεπτικά υποστρώματα διατηρούνται στους 4°C για μακροπρόθεσμη χρήση.

Μετασχηματισμός *Saccharomyces cerevisiae* με θερμική καταπόνηση

Κορεσμένη καλλιέργεια *Saccharomyces cerevisiae* προστίθεται σε 5 ml θρεπτικό μέσο YPG και επωάζεται στους 28 °C μέχρι να φτάσει στην επιθυμητή φάση ανάπτυξης ($OD_{600}=0,6-0,8$). Η καλλιέργεια μοιράζεται σε σωλήνες Falcon χωρητικότητας 50 ml και φυγοκεντρείται σε ταχύτητα στροφών 5.000 rpm και θερμοκρασία 4 °C για 15 λεπτά. Το ίζημα της καλλιέργειας επαναιωρείται και αναδεύεται με 5 ml αποστειρωμένο νερό, επωάζεται στον πάγο 5 λεπτά και μετά φυγοκεντρείται ξανά σε θερμοκρασία 4 °C για 15 λεπτά. Τέλος, το ίζημα επαναδιαλύεται δύο φορές σε διάλυμα 1 ml TE/LiAc και 0,25 ml TE/LiAc αντίστοιχα. Για κάθε αντίδραση μετασχηματισμού αναμιγνύονται σε σωλήνα Eppendorf 50 μl από τα κύτταρα ζύμης, 240 μl διαλύματος PEG (Polyethylene glycol) 50%, 2 μg πλασμιδιακού DNA και 50 μl μετουσιωμένου ssDNA (salmon sperm DNA) και οι σωλήνες Eppendorf επωάζονται για 30 λεπτά στους 30 °C και σε ταχύτητα στροφών 200 rpm. Στη συνέχεια, τα κύτταρα υπόκεινται θερμικό σοκ στους 42 °C για 15 λεπτά και αμέσως μετά φυγοκεντρούνται σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, επαναδιαλύονται σε 200 μl αποστειρωμένο νερό και επιστρώνονται σε τρυβλία με συγκεκριμένο θρεπτικό (απουσία ουρακίλης) και επωάζονται στους 28 °C για τουλάχιστον 3 ημέρες. Μετά το πέρας των τριών ημερών, και εφόσον έχουν αναπτυχθεί αποικίες στα τρυβλία, με ειδική σπάτουλα απομονώνεται μικρός αριθμός αποικιών, αναδεύονται σε 5 ml υγρό θρεπτικό SD-U και επωάζονται για 12 ώρες στους 28 °C. Την επόμενη μέρα, η κορεσμένη καλλιέργεια αραιώνεται μέχρι να φτάσει την επιθυμητή συγκέντρωση ($OD_{600}=0,6-0,8$). Έπειτα, προστίθενται 10 ml 20% γαλακτόζης στην καλλιέργεια, με σκοπό να ξεκινήσει η σύνθεση των πρωτεϊνών. Τέλος, οι καλλιέργειες επωάζονται ξανά στους 28 °C για 12 ώρες, χωρίζονται σε σωλήνες falcon χωρητικότητας 50 ml, φυγοκεντρούνται και το ίζημα αποθηκεύεται στο -80°C.

Έλεγχος ενζυμικής δραστηριότητας

Μετά τον μετασχηματισμό των ζυμών με το πλασμιδιακό DNA του φορέα έκφρασης, πρέπει αν ελεγχθεί αν η παρουσία του γονιδίου-ενδιαφέροντος στον οργανισμό-ξενιστή ισοδυναμεί και με την παραγωγή λειτουργικών ενζύμων. Συνεπώς, ο έλεγχος αυτός πραγματοποιείται παρέχοντας σε 5 ml καλλιέργειας μετασχηματισμένων ζυμών κατάλληλη ποσότητα υποστρώματος, ώστε να ταυτοποιηθεί αν υπάρχει λειτουργικότητα των ενζύμων μέσω της παραγωγής του αντίστοιχου προϊόντος.

- **Έλεγχος ενζυμικής δραστηριότητας για το ένζυμο DFR**

Ως υποστρώματα για την ενζυμική αντίδραση του ενζύμου DFR (ρεδουκτάση της διυδροφλαβονόλης) χρησιμοποιήθηκαν η διυδροκαμφερόλη (DHK) και η διυδροκουερσιτίνη (DHQu) σε συγκέντρωση 1 mg/ml DMSO. Για την προετοιμασία

της ενζυμικής αντίδρασης, το ίζημα των μετασχηματισμένων κυττάρων που διατηρείται στους -80°C επαναιωρείται με 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος 10 mM TEK και επωάζεται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 11.000 στροφές και προστίθενται σε αυτά ξανά 1 ml ρυθμιστικό διάλυμα TEK. Στη συνέχεια, στο μίγμα κυττάρων και ρυθμιστικού διαλύματος τοποθετείται 1g «χάντρες» γυαλιού, οι σωλήνες falcon αναδεύονται έντονα για 30 δευτερόλεπτα και για 30 δευτερόλεπτα επωάζονται στον πάγο. Οι δύο αυτές διαδικασίες γίνονται εναλλάξ για 20 λεπτά. Μετά προστίθενται 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος στα κύτταρα και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό. Τέλος, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέους σωλήνες Eppendorf, οι οποίοι φυγοκεντρούνται ξανά. Στον Πίνακα 2.5 φαίνεται το πρωτόκολλο για την ενζυμική αντίδραση για 4 διαφορετικές ποσότητες ενζυμικού εκχυλίσματος και για τα δύο υποστρώματα.

Πίνακας 2.5: Πρωτόκολλο ενζυμικής αντίδρασης DFR.

Ρυθμιστικό διάλυμα	Ενζυμικό εκχύλισμα	NADPH	Όγκος υποστρώματος	Υπόστρωμα
179 μl	10 μl	10 μl	1 μl	DHK
164 μl	25 μl	10 μl	1 μl	DHK
139 μl	50 μl	10 μl	1 μl	DHK
89 μl	100 μl	10 μl	1 μl	DHK
179 μl	10 μl	10 μl	1 μl	DHQu
164 μl	25 μl	10 μl	1 μl	DHQu
139 μl	50 μl	10 μl	1 μl	DHQu
89 μl	100 μl	10 μl	1 μl	DHQu
Γελικός όγκος:				
200 μl				

Μετά την προετοιμασία των αντιδραστηρίων, οι σωλήνες Eppendorf επωάζονται κλειστοί για 1 ώρα στους 30°C , ώστε να δράσει το ένζυμο. Μετά το πέρας της μίας ώρας, στους σωλήνες προστίθενται 200 μl οξικός αιθυλεστέρας (ethyl acetate) δύο φορές και οι σωλήνες φυγοκεντρούνται για να απομονωθεί η ανώτατη υγρή φάση και να αναλυθούν τα προϊόντα.

- **Έλεγχος ενζυμικής δραστηριότητας για το ένζυμο ANS**

Ως υπόστρωμα για την ενζυμική αντίδραση του ενζύμου ANS (συνθάση της ανθοκυανιδίνης) χρησιμοποιήθηκε η λευκοανθοκυανιδίνη (LCy) σε συγκέντρωση 1 mg/ml DMSO. Για την προετοιμασία της ενζυμικής αντίδρασης, το ίζημα των μετασχηματισμένων κυττάρων που διατηρείται στους -80°C επαναιωρείται με 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος KPi (Potassium Phosphate Buffer) 0,1M (1M K_2HPO_4 + 1M KH_2PO_4) και επωάζεται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 11.000 στροφές και προστίθενται σε αυτά 1 ml ρυθμιστικό διάλυμα KPi. Στη συνέχεια, στο μίγμα κυττάρων και ρυθμιστικού διαλύματος τοποθετούνται 1g «χάντρες» γυαλιού, οι σωλήνες falcon αναδεύονται έντονα για 30 δευτερόλεπτα και για 30 δευτερόλεπτα επωάζονται στον πάγο. Οι δύο αυτές διαδικασίες γίνονται εναλλάξ για 20 λεπτά. Μετά προστίθενται 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος στα κύτταρα και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό. Τέλος, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέους σωλήνες Eppendorf, οι οποίοι φυγοκεντρούνται ξανά. Στον Πίνακα 2.6 φαίνεται το πρωτόκολλο (Kazuki Saito et al., 1999) για την ενζυμική αντίδραση για 4 διαφορετικές ποσότητες ενζυμικού εκχυλίσματος.

Πίνακας 2.6: Πρωτόκολλο ενζυμικής αντίδρασης ANS (Kazuki Saito et al., 1999).

Ρυθμιστικό διάλυμα	Ενζυμικό εκχύλισμα	Διθειοθρεϊτόλη (DTT)	Θειϊκός σίδηρος (FeSO ₄)	Ασκορβικό νάτριο	2-οξογλουταρικό οξύ	Υπόστρωμα (LCy)
160 μl	-	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl	1 μl
135 μl	25 μl	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl	1 μl
110 μl	50 μl	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl	1 μl
60 μl	100 μl	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl	1 μl
Τελικός όγκος: 200 μl						

Μετά την προετοιμασία των αντιδραστηρίων, οι σωλήνες Eppendorf επωάζονται ανοιχτοί για 1 ώρα στους 30 °C, ώστε να δράσει το ένζυμο. Μετά το πέρας της μίας ώρας, στους σωλήνες προστίθενται 200 μl οξικός αιθυλεστέρας (ethyl acetate) δύο φορές και οι σωλήνες φυγοκεντρώνονται για να απομονωθεί η ανώτατη υγρή φάση και να αναλυθούν τα προϊόντα.

Ανάλυση αποτελεσμάτων – Υγρή χρωματογραφία

Η Υγρή Χρωματογραφία είναι μια διαχωριστική τεχνική με ευρεία χρήση τα τελευταία χρόνια, λόγω του μεγάλου αριθμού οργανικών και ανόργανων ενώσεων που μπορεί να διαχωρίσει. Η τεχνική αυτή είναι αποτέλεσμα της συνδυαστικής δράσης μιας στατικής και μιας κινητής φάσης. Ο χρόνος ανάλυσης με Υγρή Χρωματογραφία είναι συνήθως μικρός, της τάξεως των μερικών λεπτών και η ευαισθησία είναι πολύ υψηλή. Ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μίγματος πραγματοποιείται με τη βοήθεια μιας στήλης, η οποία πρέπει να περιέχει ένα κατάλληλο υλικό, που είναι χαρακτηριστικό για κάθε ομάδα συστατικών. Όταν το δείγμα εισαχθεί στη στήλη, οι ενώσεις κατανέμονται μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης, με αποτέλεσμα να μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες κατά μήκος της στήλης. Τα διάφορα συστατικά αποτυπώνονται στο καταγραφικό σύστημα ως καμπύλες Gauss.

Στην παρούσα εργασία, τα προϊόντα των ενζυμικών αντιδράσεων αναλύθηκαν με τη μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υπερ-Υψηλής Απόδοσης (Ultra-HPLC), χρησιμοποιώντας στήλες με πολύ μικρό μέγεθος σωματιδίων (2 μm).

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) – Ποσοτική PCR (qPCR)

Η real-time PCR είναι μια ευαίσθητη τεχνική ποσοτικοποίησης νουκλεϊκών οξέων με μεγάλη ακρίβεια σε ένα μίγμα. Αποτελεί μια πρόσφατη παραλλαγή της PCR και μελετάει τα επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης με μια διαδικασία που ονομάζεται αντίστροφη μεταγραφή (reverse transcription PCR, RT-PCR). Στην real-time PCR ως εκμαγείο χρησιμοποιείται cDNA. Η ποσοτικοποίηση επιτυγχάνεται με την παρακολούθηση ενίσχυσης μιας συγκεκριμένης γονιδιακής περιοχής σε πραγματικό χρόνο μέσω της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού μιας χρωστικής. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν μη ειδικές χρωστικές (TB Green από την εταιρία TaKaRa, EvaGreen από την εταιρία Bio-Rad). Ο φθορισμός υπολογίζεται σε κάθε κύκλος αντίδρασης με αποτέλεσμα να σχηματίζεται καμπύλη ενίσχυσης. Η αύξηση του «σήματος» του φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος. Για τη μελέτη

της σχετικής έκφρασης ενός γονιδίου μεταξύ των δειγμάτων χρησιμοποιείται ένα ή και παραπάνω «γονίδια αναφοράς» που η έκφρασή τους είναι σταθερή και ανεξάρτητη μεταξύ των δειγμάτων. Στην παρούσα εργασία, ως γονίδια αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν το γονίδιο της β-ακτίνης και του παράγοντα επιμήκυνσης-α.

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στη συσκευή CFX96 Dx Real-Time PCR της εταιρίας Bio-Rad. Το πρωτόκολλο που ακολουθείται στην αντίδραση της real-time PCR για 40 κύκλους φαίνεται στον Πίνακα 2.7. Τα τελευταία βήματα της αντίδρασης περιλαμβάνουν τη διάσπαση του δίκλωνου DNA που προκύπτει κατά την αντίδραση. Για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων απαιτούνται εκκινητές σχεδιασμένοι με συγκεκριμένες προδιαγραφές (ορισμένο ποσοστό GC, συγκεκριμένο εύρος μήκους κλπ) στο λογισμικό Snapgene (Πίνακας 2.8). Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν από την κα. Ειρήνη Σάρρου, ερευνήτρια στον ΕΛ.Γ.Ο Δημήτρα (Θέρμη, Θεσσαλονίκη). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του λογισμικού Statistica.

Πίνακας 2.7: Το πρωτόκολλο της real-time PCR.

Θερμοκρασία	Χρόνος	
95 °C	30 δευτερόλεπτα	
95 °C	5 δευτερόλεπτα	x40
60 °C	15 δευτερόλεπτα	
95 °C	15 δευτερόλεπτα	

Πίνακας 2.8: Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις της real-time PCR.

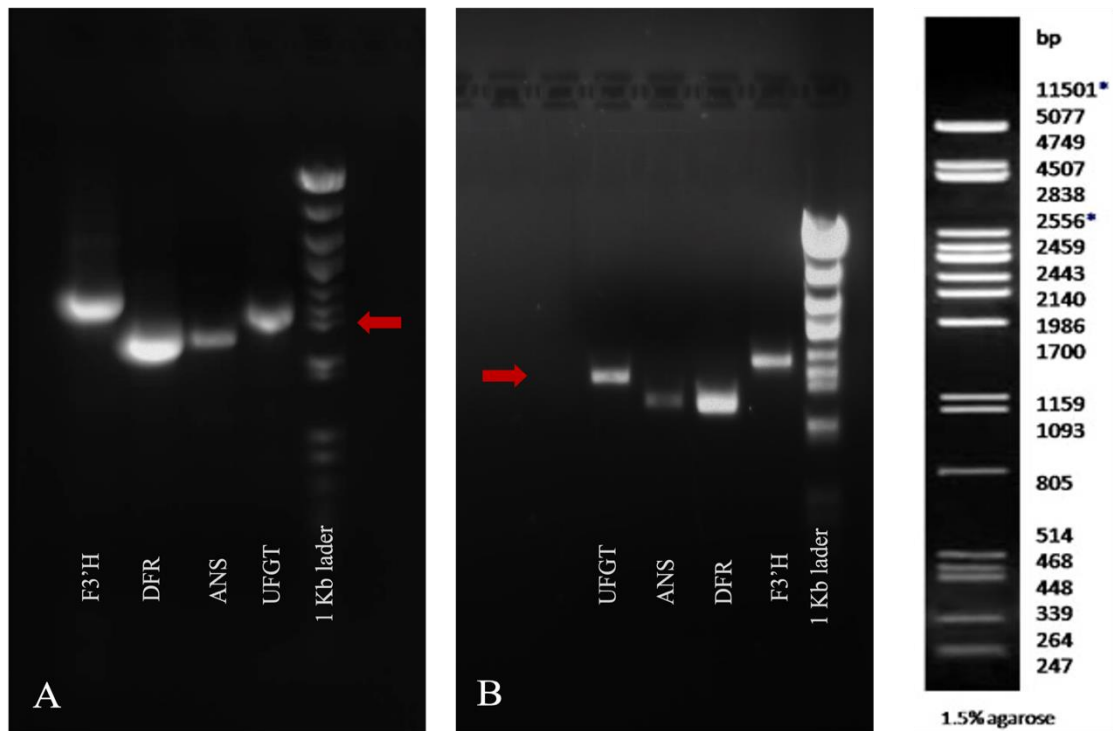
Όνομα εκκινητή	Γονίδιο	Αλληλουχία εκκινητή '5 – '3	Μήκος εκκινητή (bp)	Μήκος ενισχυμένου τμήματος
<i>qPCR_DFR_F</i>	<i>SrDFR</i>	GAAAGAAGTGATTGAGCCAACG	22	163
<i>qPCR_DFR_R</i>	<i>SrDFR</i>	CAAATCACTCCAACCTGGTTTCG	22	163
<i>qPCR_ANS_F</i>	<i>SrANS</i>	TCGAGGAGAAGGAGAAATATGC	22	217
<i>qPCR_ANS_R</i>	<i>SrANS</i>	AGGGCTCTCAGTTGCTTTGC	20	217
<i>qPCR_UFGT_F</i>	<i>SrUFGT</i>	CGACGCGATAATCCTCAATTTCG	22	142
<i>qPCR_UFGT_R</i>	<i>SrUFGT</i>	CGATAGGCACCCTGTTTTGTTCG	22	142
<i>qPCR_PAL_F</i>	<i>SrPAL</i>	GCATGAAACCGACCCGTTGC	20	171
<i>qPCR_PAL_R</i>	<i>SrPAL</i>	GCCTTGTTTTCGTGACACGTCG	21	171
<i>qPCR_CHS_F</i>	<i>SrCHS</i>	GCCACCGTCTTGTCCATAGG	20	181
<i>qPCR_CHS_R</i>	<i>SrCHS</i>	GGAACCTCTTCGGTCAGGTGC	20	181
<i>qPCR_ELF_F</i>	<i>SrELF</i>	ATCTCAAGCGTGGTTATGTTGC	22	170
<i>qPCR_ELF_R</i>	<i>SrELF</i>	CAGCTCTGCAAACCTAACAGC	21	170
<i>qPCR_ACTIN_F</i>	<i>SrACTIN</i>	TGGGTTTTGCTGGAGATGATGC	21	117
<i>qPCR_ACTIN_R</i>	<i>SrACTIN</i>	GCCTCGTCACCAACATAAGC	20	117

Αποτελέσματα

3.1 Επιλογή γονιδίων μελέτης για λειτουργικό χαρακτηρισμό σε ετερόλογα συστήματα (*S. cerevisiae* ή/και *E. coli*) και για RT-qPCR

Τα γονίδια που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία επιλέχθηκαν με βάση το γενικότερο βιοσυνθετικό μονοπάτι των ανθοκυανών που έχει προταθεί στα φυτά και την διερεύνηση πιθανής έκφρασης αυτών των γονιδίων από το μεταγράφημα (de novo transcriptome) των δύο αλληλουχημένων ειδών σιδερίτη (*S. raeseri*, *S. scardica*). Πιο συγκεκριμένα, για την κλωνοποίηση και έπειτα το λειτουργικό χαρακτηρισμό τους επιλέχθηκαν τα γονίδια dihydroflavol 4-reductase (*DFR*), anthocyanin synthase (*ANS*) και *UFGT* flavonoid 3-O-glucosyltransferase (*UFGT*), τα οποία εκφράζονται στα τελευταία στάδια του βιοσυνθετικού μονοπατιού, άρα χαρακτηρίζονται και ως πιο κομβικά για την παραγωγή ανθοκυανών. Για την RT-qPCR, δηλαδή για τον προσδιορισμό της έκφρασης ποσοτικά, επιλέχθηκαν επιπλέον τα γονίδια phenylalanine ammonia lyase (*PAL*) και chalcone synthase (*CHS*), με σκοπό να προκύψει μια πιο σαφής εικόνα όσον αφορά την έκφραση των γονιδίων που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των ανθοκυανών από τα πιο πρώιμα στάδια ως τα τελικά.

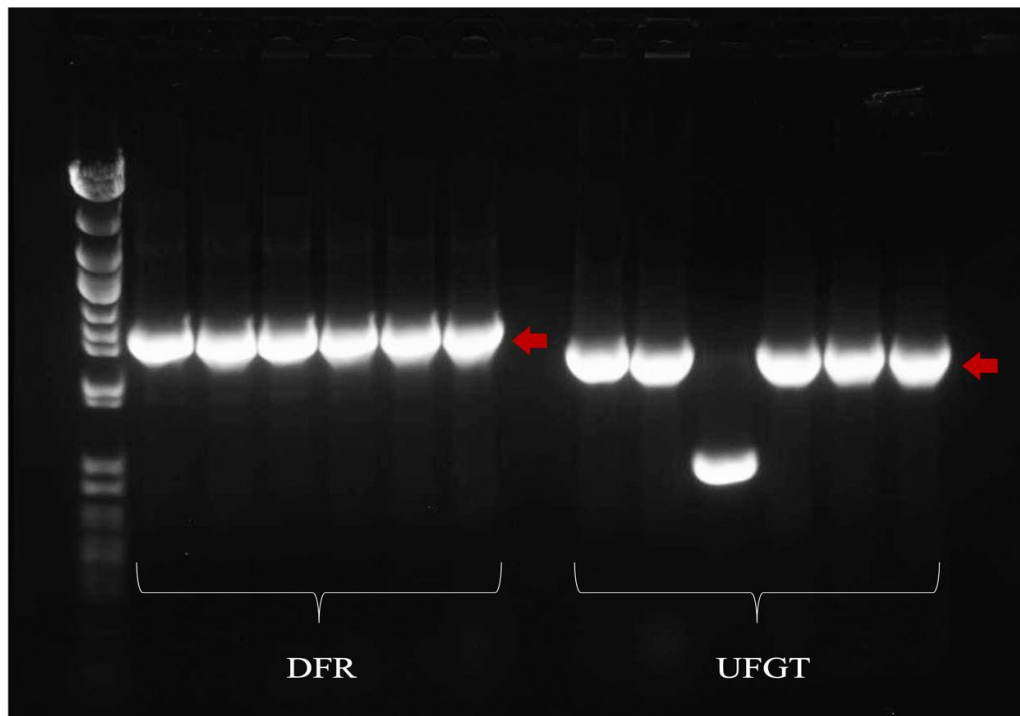
Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε cDNA ιστού (βράκτεια κορυφής, βράκτεια μέσης, βράκτεια βάσης, φύλλα) από τον ερυθρόβρακτο φαινότυπο για να γίνει εξακρίβωση της ενίσχυσης των γονιδιακών περιοχών ενδιαφέροντος (*DFR*, *ANS* και *UFGT*) μέσω PCR (με χρήση απλής πολυμεράσης). Για την ενίσχυση του προϊόντος χρησιμοποιήθηκε πολυμεράση υψηλής πιστότητας (Q5-PCR proof reading) για τον περιορισμό πιθανών τυχαίων λαθών κατά τη διαδικασία. Τα μήκη ολόκληρων των γονιδίων ήταν μεταξύ 1000-1500 bp ζεύγη βάσεων. Παρατηρήθηκε η ενίσχυση των γονιδιακών τμημάτων, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.1.



Εικόνα 3.1: Πηκτή αγαρόζης απλής PCR (A) και Q5-PCR proof reading (B) όπου φαίνονται οι ζώνες ενίσχυσης των γονιδιακών τμημάτων ενδιαφέροντος.

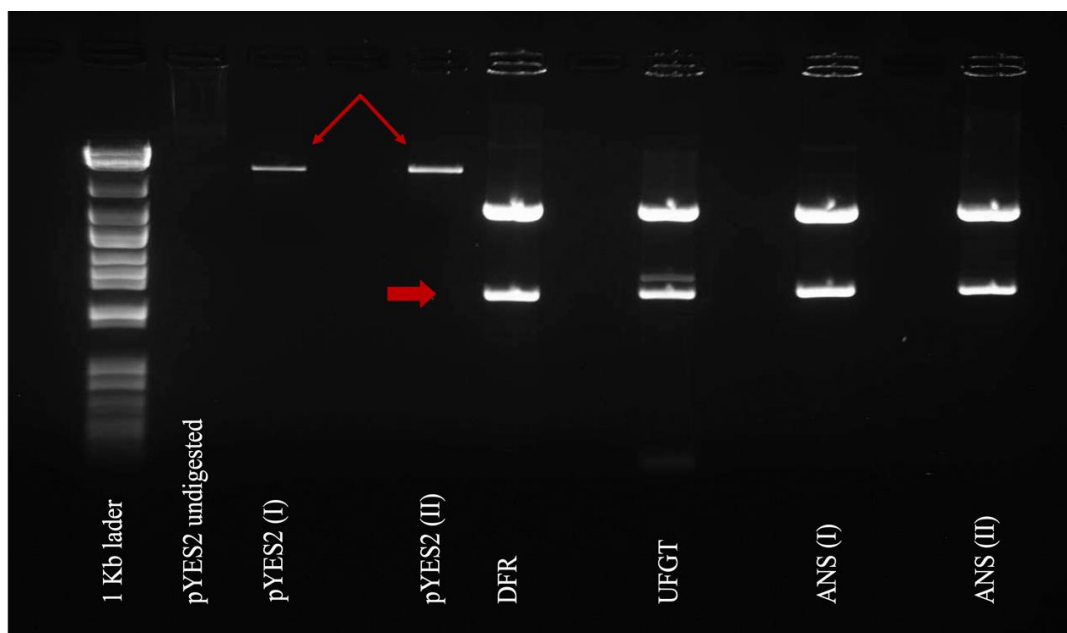
3.2 Αποτελέσματα κλωνοποίησης γονιδίων στους φορείς pJET 1.2 και pYES2

Τα προϊόντα της PCR, κατόπιν καθαρισμού τους, χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για την αντίδραση σύνδεσης (ligation) με τον ανοιχτό φορέα pJET1.2. Τα προϊόντα αυτής της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό των βακτηρίων *E. coli*, τα οποία καλλιεργήθηκαν με αποτέλεσμα την ανάπτυξη αποικιών σε τριβλία petri, όπως έχει ήδη περιγραφεί στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι. Ενδεικτικά, στην Εικόνα 3.2 φαίνονται οι ζώνες σε πηκτή αγαρόζης της PCR των αποικιών (colony-PCR) για τις θετικές αποικίες των μετασχηματισμένων βακτηρίων με τα γονίδια *SrDFR* και *SrUFGT*.



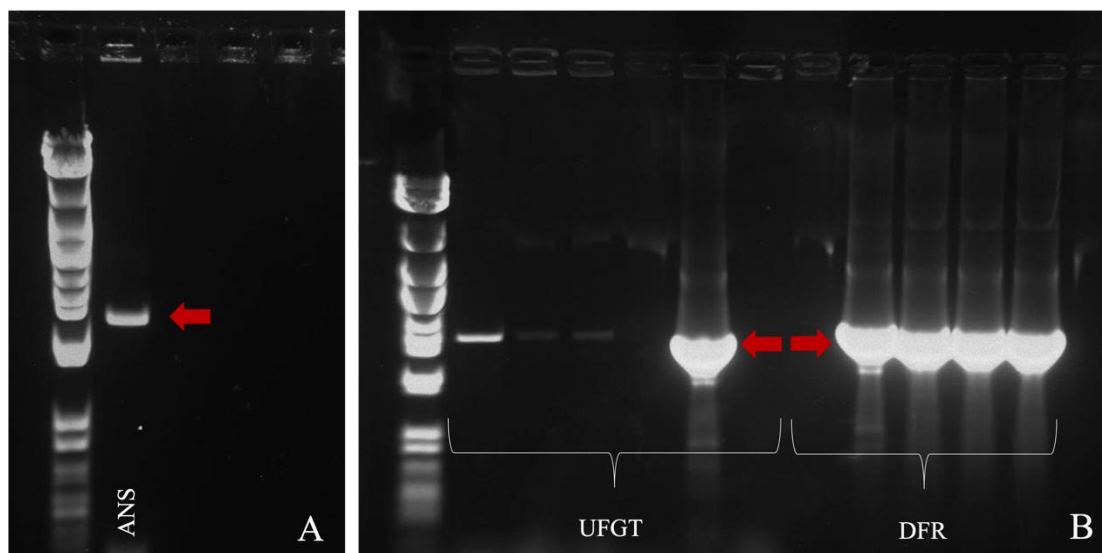
Εικόνα 3.2: Πηκτή αγαρόζης PCR αποικιών για να εντοπιστούν οι αποικίες βακτηρίων που φέρουν το επιθυμητό γονιδιακό τμήμα. Συγκεκριμένα, έξι αποικίες ήταν θετικές για το γονίδιο *SrDFR* (1056bp) και πέντε για το γονίδιο *SrUFGT* (1350bp).

Στη συνέχεια, το πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε από τις θετικές αποικίες και ο φορέας pYES2 επεξεργάστηκαν με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα (restriction enzymes), όπως έχει περιγραφεί στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι και απομονώθηκαν οι επιθυμητές ζώνες, απ' όπου καθαρίστηκε το DNA που χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση σύνδεσης φορέα-ενθέματος (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.3: Πηκτή αγαρόζης όπου φαίνονται έπειτα από πέψη ο φορέας pYES με δύο διαφορετικούς συνδυασμούς ενζύμων [pYES(I), pYES(II)] και τα ενθέματα. Από την πέψη των ενθεμάτων απομονώθηκε η κατώτερη ζώνη.

Τα προϊόντα από την αντίδραση σύνδεσης χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό βακτηρίων *E.coli* για την περαιτέρω διερεύνηση/αναζήτηση θετικών αποικιών. Παρατηρήθηκε μία θετική αποικία για το γονίδιο *SrANS*, δύο για το γονίδιο *SrUFGT* και τέσσερις για το γονίδιο *SrDFR*. Ο μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε ξανά για την πηκτική αгарόζης ήταν 1000 βάσεων (Εικόνα 3.4).



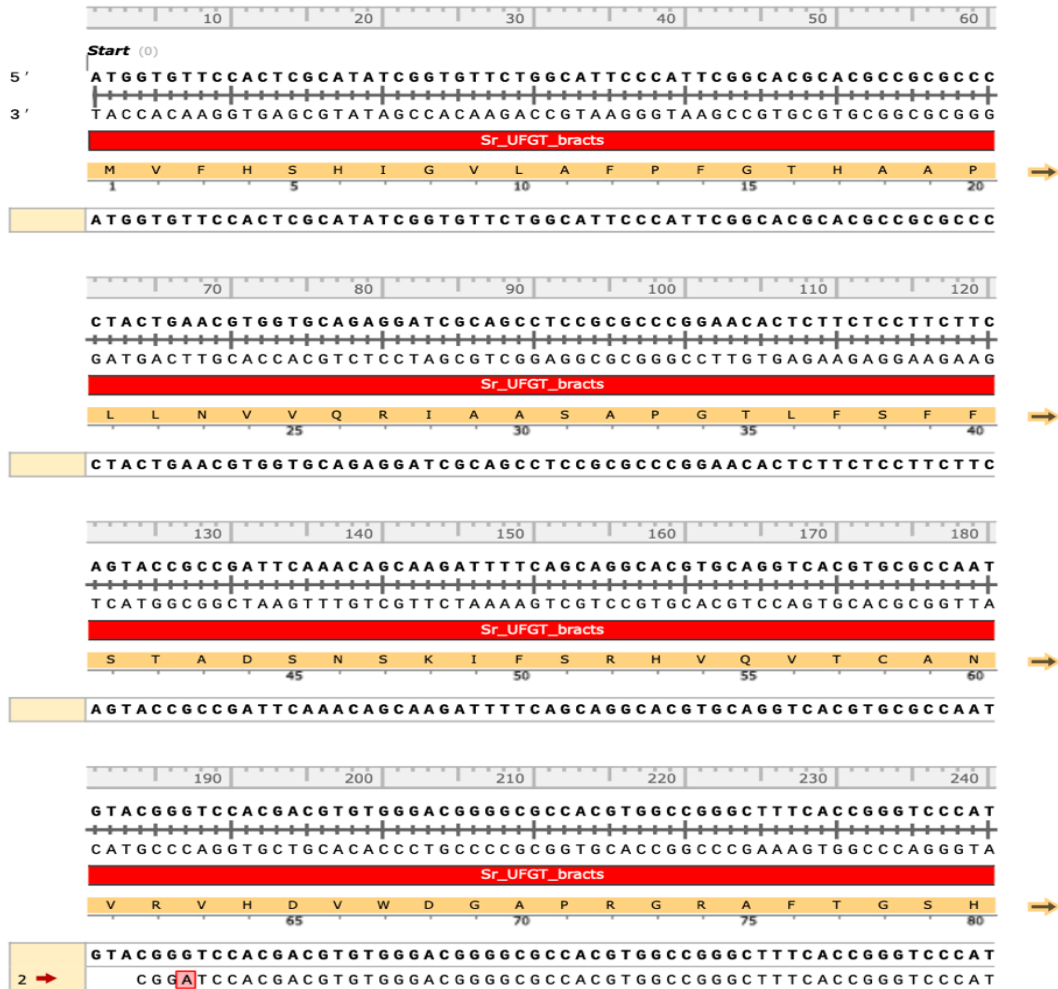
Εικόνα 3.4: Πηκτική αгарόζης PCR αποικιών για την ανίχνευση θετικών αποικιών *E. coli* μετά από την εισαγωγή του φορέα pYES2 με το γονίδιο *SrANS* (1170bp) (A) και τα γονίδια *SrUFGT* και *SrDFR* (B).

Έπειτα από τον καθαρισμό του, το πλασμιδιακό DNA των θετικών αποικιών αλληλουχίστηκε και χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό σακχαρομυκήτων *S. cerevisiae*, όπως έχει περιγραφεί στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι.

3.3 Αποτελέσματα αλληλούχησης

Οι ανασυνδυασμένοι φορείς αλληλουχίστηκαν και έπειτα από στοίχιση με την αλληλουχία των γονιδίων ως αλληλουχία-αναφορά φαίνεται πως τα γονίδια *SrDFR* και *SrUFGT* κλωνοποιήθηκαν επιτυχώς. (Εικόνα 3.5, Εικόνα 3.6, Εικόνα 3.7, Εικόνα 3.8). Αντίθετα, από την αλληλούχηση του ανασυνδυασμένου φορέα με το γονίδιο *SrANS* αποδείχθηκε πως η αποικία πιθανόν να μην ήταν θετική (false positive), διότι η στοίχιση των αλληλουχιών δεν μπορούσε να πραγματοποιηθεί λόγω μεγάλου αριθμού διαφορετικών βάσεων σε σύγκριση με την αλληλουχία αναφοράς του γονιδίου *ANS*. Στο τελικό στάδιο και για το λειτουργικό χαρακτηρισμό των επιτυχώς κλωνοποιημένων γονιδίων σε μετασχηματισμένους σακχαρομυκήτες με τον φορέα pYES2 και τα γονίδια *SrANS* και *SrDFR* προστέθηκαν τα αντίστοιχα υποστρώματα διυδροκαμφερόλη-DHK) και διυδροκουερσιτίνη DHQu *SrDFR* και λευκοανθοκυανιδίνη (LCy) για το λευκοανθοκυανιδίνη-LCy για το *SrANS*), ώστε να μελετηθεί η δράση των ενζύμων που καταλύουν τη μετατροπή των πρόδρομων ενώσεων σε προϊόντα. Στις περιπτώσεις των *SrANS*, *SrDFR* και *SrUFGT* δεν ανιχνεύθηκε ενεργότητα του ενζύμου έπειτα από

ανάλυση σε Υγρό Χρωματογράφο Υπερ-υψηλής Απόδοσης (Ultra-HPLC). Παρακάτω δίνεται η στοίχιση των γονιδίων με τα δεδομένα της αλληλούχησης μετά την κλωνοποίηση για το γονίδιο και τα χρωματογραφήματα που καταδεικνύουν την ακρίβεια της αλληλούχησης για τα γονίδια *SrDFR* και *SrUFGT*.



250 260 270 280 290 300

TTCGAGGCAATCGGGTTGTTTCCTCAAGGCCGTTCCGGACAATTTTGAGGCGGTTATTGGA
 AAGCTCCGTTAGCCCAACAAGGAGTTCCGGCAAGGCCGTGTTAAAACTCCGCCAATAACCT

Sr_UFGT_bracts

F E A I G L F L K A V P D N F E A V I G
 85 90 95 100

2 → TTCGAGGCAATCGGGTTGTTTCCTCAAGGCCGTTCCGGACAATTTTGAGGCGGTTATTGGA
 TTCAGAGGCAATCGGGTTGTTTCCTCAAGGCCGTTCCGGACAATTTTGAGGCGGTTATTGGA

310 320 330 340 350 360

GAAGCGGAAAAGGAATGTGGGTTGAAGATATGCTGTTTGATTAGCGATGCGTTCTTGTGG
 CTTTCGCTTTTCTTACACCCAACCTTCTATACGACAACTAATCGCTACGCAAGAACACC

Sr_UFGT_bracts

E A E K E C G L K I C C L I S D A F L W
 105 110 115 120

2 → GAAGCGGAAAAGGAATGTGGGTTGAAGATATGCTGTTTGATTAGCGATGCGTTCTTGTGG
 GAAGCGGAAAAGGAATGTGGGTTGAAGATATGCTGTTTGATTAGCGATGCGTTCTTGTGG

370 380 390 400 410 420

TTTTCTTGTGATTTGGCTGAGAAACGAGGGGTACCGTGGGTAGCCCTCTGGACATCTGCT
 AAAAGAACAATAAACCGACTCTTTGCTCCCAATGGCACCCATCGGGAGACCTGTAGACGA

Sr_UFGT_bracts

F S C D L A E K R G V P W V A L W T S A
 125 130 135 140

1 ← TTTTCTTGTGATTTGGCTGAGAAACGAGGGGTACCGTGGGTAGCCCTCTGGACATCTGCT
 GGTACCGTGGGTAGCCCTCTGGACATCTGCT
 2 → TTTTCTTGTGATTTGGCTGAGAAACGAGGGGTACCGTGGGTAGCCCTCTGGACATCTGCT

430 440 450 460 470

TCCTGTTCCCTCTCTGCACACATGTATACTGATGATATAGTGAAAAGCGCTTGGGCC AAA
 AGGACAAGGGAGAGACGTGTGTACATATGACTACTATATCACTTTCGCGAACCCGG TTT

Sr_UFGT_bracts

S C S L S A H M Y T D D I V K A L G P N
 145 150 155 160

1 ← TCCTGTTCCCTCTCTGCACACATGTATACTATGATATAGTGAAAAGCGCTTGGGCC AAA
 2 → TCCTGTTCCCTCTCTGCACACATGTATACTAAATGATATAGTGAAAAGCGCTTGGGCC AAA

490 500 510 520 530

TGGCGTTGCGGGAAAAGGAAGAACACGAGAAGATCCAGCCGTTGATTCCAGGGCTGGAAAT
 ACCGCAACGCCCTTTCTTCTTGTGCTCTTCTAGGTCGGCAACTAAGGTCCCACCTTTA

Sr_UFGT_bracts

G V A G K E E H E K I Q P L I P G L E M
 165 170 175 180

1 ← TGGCGTTGCGGGAAAAGGAAGAACACGAGAAGATCCAGCCGTTGATTCCAGGGCTGGAAAT
 TGGCGTTGCGGGAAAAGGAAGAACACGAGAAGATCCAGCCGTTGATTCCAGGGCTGGAAAT
 2 → TGGCGTTGCGGGAAAAGGAAGAACACGAGAAGATCCAGCCGTTGATTCCAGGGCTGGAAAT

550 560 570 580 590

GGTGAGTTTCAGAGATCTGCCGCCGGAGGTTTTCTGGATAACAATCCGTCGCCGATTGC
 CCACTCAAAGTCTCTAGACGGCGGCCTCCAAAAGACCTATTGTTAGGCAGCGGCTAACG

Sr_UFGT_bracts

V S F R D L P P E V F L D N N P S P I A
 185 190 195 200

1 ← GGTGAGTTTCAGAGATCTGCCGCCGGAGGTTTTCTGGATAACAATCCGTCGCCGATTGC
 GGTGAGTTTCAGAGATCTGCCGCCGGAGGTTTTCTGGATAACAATCCGTCGCCGATTGC
 2 → GGTGAGTTTCAGAGATCTGCCGCCGGAGGTTTTCTGGATAACAATCCGTCGCCGATTGC

610 620 630 640 650

GCTAGCGATCATTAAAGGCGGTGGAGAAGCTACCGAGATCCGACGCGATAATCCTCAATTC
 CGATCGCTAGTAATTCCGCCACCTCTTCGATGGCTCTAGGCTGCGCTATTAGGAGTTAAG

Sr_UFGT_bracts

L A I I K A V E K L P R S D A I I L N S

205 210 215 220

1 ← GCTAGCGATCATTAAAGGCGGTGGAGAAGCTACCGAGATCCGACGCGATAATCCTCAATTC
 2 → GCTAGCGATCATTAAAGGCGGTGGAGAAGCTACCGAGATCCGACGCGATAATCCTCAATTC

670 680 690 700 710

GTTGAGGAAATCGATCCGATTATCACGACAGATCTGAAATCGAAATTCGGTCATTTTCT
 CAAGCTCCTTTAGCTAGGCTAATAGTGCTGTCTAGACTTTAGCTTTAAGGCAGTAAAAGA

Sr_UFGT_bracts

F E E I D P I I T T D L K S K F R H F L

225 230 235 240

1 ← GTTGAAGGAAATCGATCCGATTATCACGACAGATCTGAAATCGAAATTCGGTCATTTTCT
 2 → GTTGAAGGAAATCGATCCGATTATCACGACAGATCTGAAATCGAAATTCGGTCATTTTCT

730 740 750 760 770

CAACATCGGACCTTCAATTGTTCCCTTCCAAAACCGCGGACGACAAAACAGGGTGCCTATC
 GTTGTAGCCTGGAAGTTAACAAGGAAGGTTTTGGCGCCTGCTGTTTTGTCCCACGGATAG

Sr_UFGT_bracts

N I G P S I V P S K T A D D K T G C L S

245 250 255 260

1 ← CAACATCGGACCTTCAATTGTTCCCTTCCAAAACCGCGGACGACAAAACAGGGTGCCTATC
 2 → CAACATCGGACCTTCAATTGTTCCCTTCCAAAACCGCGGACGACAAAACAGGGTGCCTATC

790 800 810 820 830

GTGGCTGGAGAACCAAACCGAGCCTAGATCTGTGGTCTACATCAGCTTCGGCACGGTGGC
 CACCGACCTCTTGGTTTGGCTCGGATCTAGACACCAAGATGTAGTCGAAGCCGTGCCACCG

Sr_UFGT_bracts

W L E N Q T E P R S V V Y I S F G T V A

265 270 275 280

1 ← GTGGCTGGAGAACCAAACCGAGCCTAGATCTGTGGTCTACATCAGCTTCGGCACGGTGGC
 2 → GTGGCTGGAGAACCAAACCGAGCCTAGATCTGTGGTCTACATCAGCTTCGGCACGGTGGC

850 860 870 880 890

G A C G C C G C C G G A G A A C G A G C T G G C G G C G T T G G C T G A A G C A C T G G A A G C C T G T A A G T T C C C
 C T G C G G C G G C C T C T T G C T C G A C C G C G C A A C C G A C T T C G T G A C C T T C G G A C A T T C A A G G G

Sr_UFGT_bracts

T P P E N E L A A L A E A L E A C K F P

285 290 295 300

1 ← G A C G C C G C C G G A G A A C G A G C T G G C G G C G T T G G C T G A A G C A C T G G A A G C C T G T A A G T T C C C
 G A C G C C G C C G G A G A A C G A G C T G G C G G C G T T G G C T G A A G C A C T G G A A G C C T G T A A G T T C C C
 2 → G A C G C C G C C G G A G A A C G A G C T G G C G G C G T T G G C T G A A G C A C T G G A A G C C T G T A A G T T C C C

910 920 930 940 950

C T T T C T G T G G T C T C T G A G A G A T C A G G C G A G G G A A T C T C T G C C G G A C G G G T T T G C G G A T C
 G A A A G A C A C C A G A G A C T C T C T A G T C C G C T C C C T T A G A G A C G G C C T G C C C A A A C G C C T A G

Sr_UFGT_bracts

F L W S L R D Q A R E S L P D G F A D

305 310 315

1 ← C T T T C T G T G G T C T C T G A G A G A T C A G G C G A G G G A A T C T C T G C C G G A C G G G T T T G C G G A T C
 C T T T C T G T G G T C T C T G A G A G A T C A G G C G A G G G A A T C T C T G C C G G A C G G G T T T G C G G A T C
 2 → C T T T C T G T G G T C T C T G A G A G A T C

970 980 990 1000 1010

G A A C G G C G T C G T T C G G G A A G A T C G T G G C A T G G G C G C C T C A A T T G C A G G T T C T G G C G C A C G
 C T T G C C G C A G C A A G C C T T C T A G C A C C G T A C C C G C G G A G T T A A C G T C C A A G A C C G C G T G C

Sr_UFGT_bracts

R T A S F G K I V A W A P Q L Q V L A H

320 325 330 335

1 ← G A A C G G C G T C G T T C G G G A A G A T C G T G G C A T G G G C G C C T C A A T T G C A G G T T C T G G C G C A C G
 G A A C G G C G T C G T T C G G G A A G A T C G T G G C A T G G G C G C C T C A A T T G C A G G T T C T G G C G C A C G

1030 1040 1050 1060 1070

A T A G C A T G G G A G T G T T C G T C A C T C A C T G T G G A T G G A A C T C G A T C G T C G A G A G C A T T T C G A
 T A T C G T A C C C T C A C A A G C A G T G A G T G A C A C C T A C C T T G A G C T A G C A G C T C T C G T A A A G C T

Sr_UFGT_bracts

D S M G V F V T H C G W N S I V E S I S

340 345 350 355

1 ← A T A G C A T G G G A G T G T T C G T C A C T C A C T G T G G A T G G A A C T C G A T C G T C G A G A G C A T T T C G A
 A T A G C A T G G G A G T G T T C G T C A C T C A C T G T G G A T G G A A C T C G A T C G T C G A G A G C A T T T C G A

1090 1100 1110 1120 1130

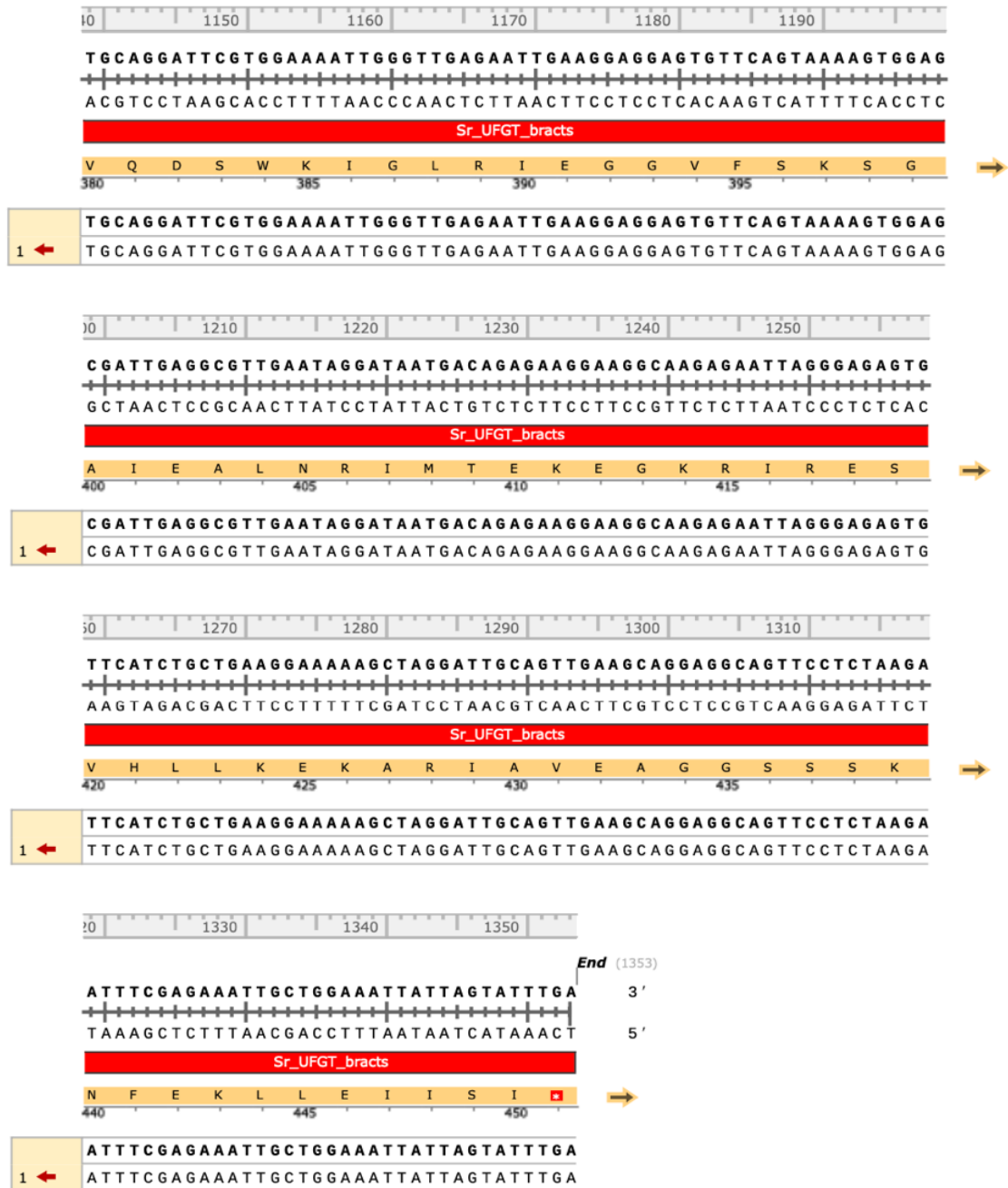
G C G G C G T T C C G A T G A T T T G C C G G C C G T T T T T T G G G G A T C A G A A G C T G A A T A G C A G A A T G G
 C G C C G C A A G G C T A C T A A A C G G C C G G C A A A A A C C C T A G T C T T C G A C T T A T C G T C T T A C C

Sr_UFGT_bracts

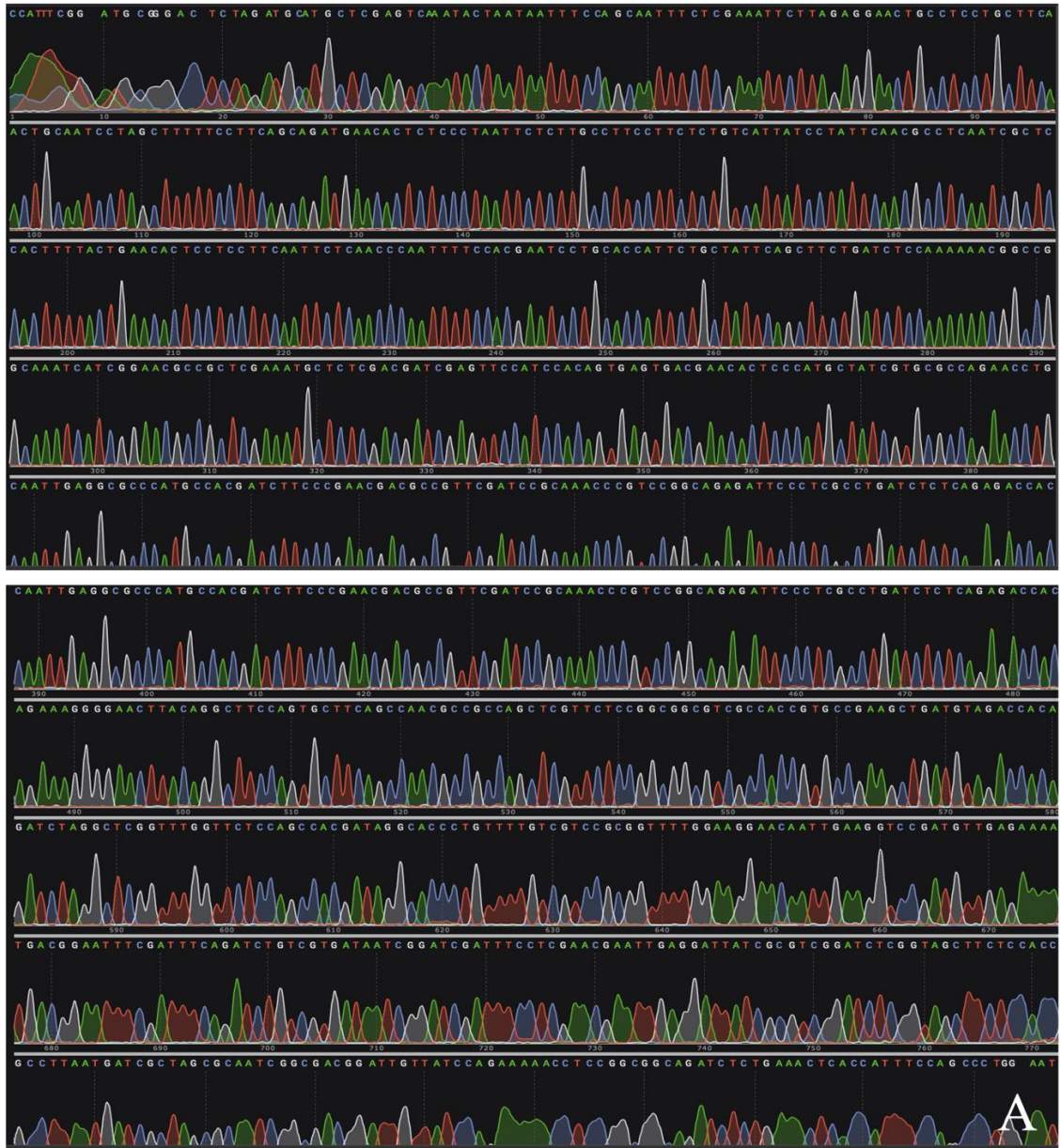
S G V P M I C R P F F G D Q K L N S R M

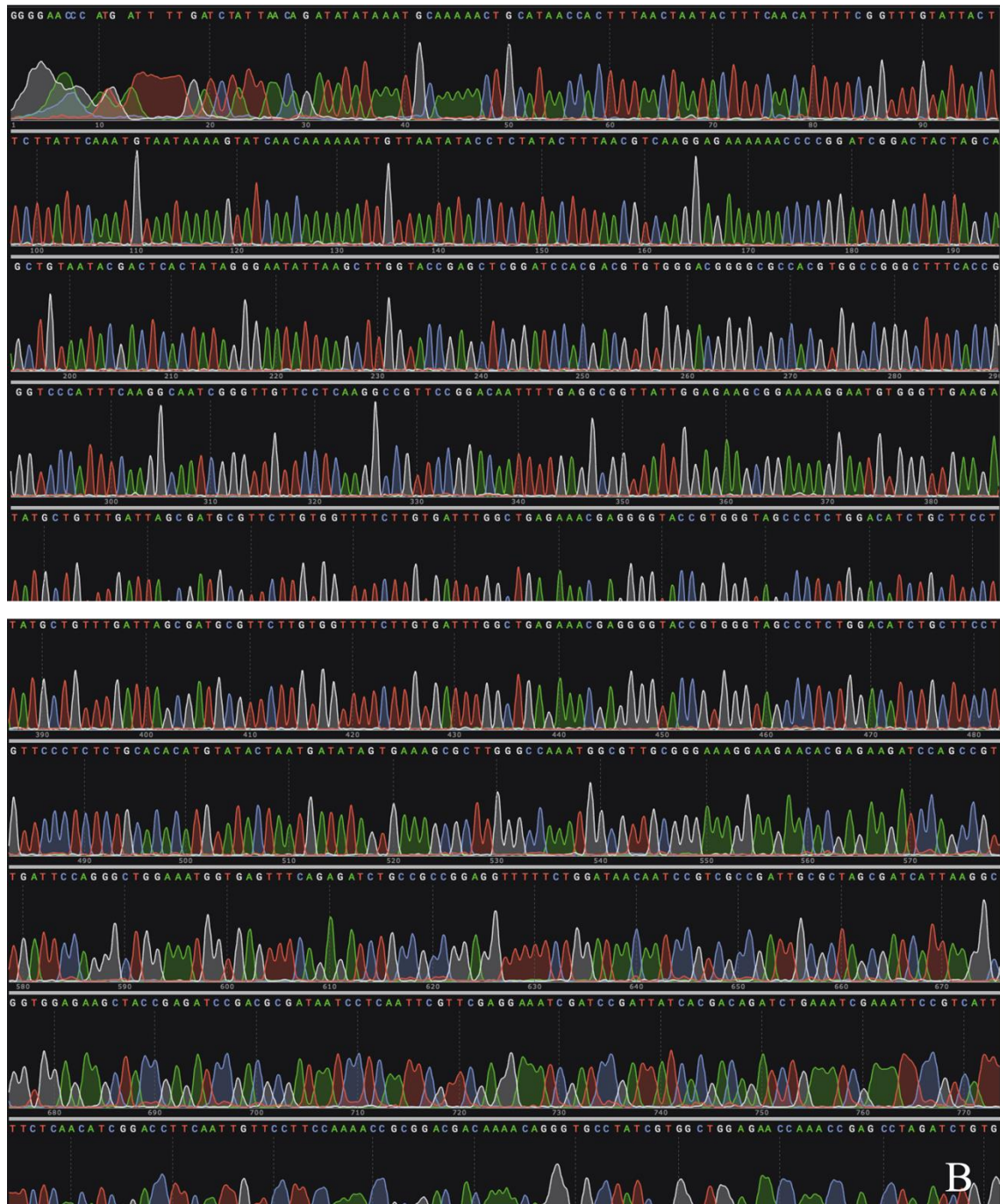
360 365 370 375

1 ← G C G G C G T T C C G A T G A T T T G C C G G C C G T T T T T T G G G G A T C A G A A G C T G A A T A G C A G A A T G G
 G C G G C G T T C C G A T G A T T T G C C G G C C G T T T T T T G G A T C A G A A G C T G A A T A G C A G A A T G G

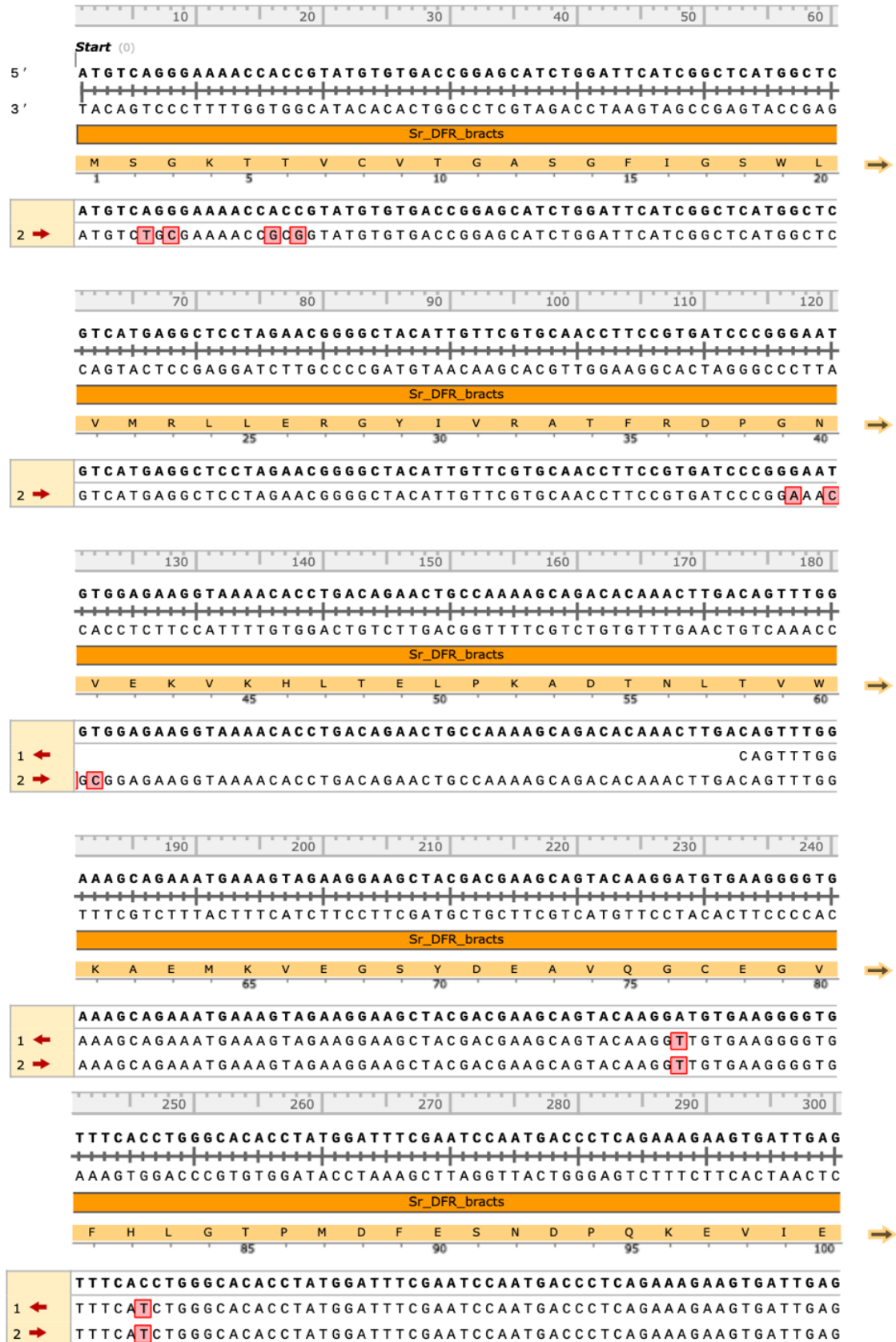


Εικόνα 3.5: Αποτελέσματα αλληλούχησης και στοίχιση των κλωνοποιημένων τμημάτων με το γονίδιο αναφοράς *SrUGT*, όπου φαίνονται οι διαφορές στην αλληλουχία των βάσεων του ενθέματος στο φορέα. Οι αριθμοί (1) και (2) υποδηλώνουν τους δύο τρόπους διαβάσματος της αλληλουχίας με διαφορετικούς εκκινητές (forward και reverse).





Εικόνα 3.6: Χρωματογράφημα αλληλούχησης με forward εκκινητή (A) και με reverse (B) για το γονίδιο *SrUFGT*. Από τις εικόνες φαίνεται πως η ποιότητα του «διαβάσματος» του ενθέματος στο φορέα είναι υψηλή, εκτός από τα άκρα του γονιδίου.



310 320 330 340 350 360

CCAACGGTTCGAGGGGATGCTGAACATCATAAGATCATGTGCCAAAGCCAAAACCTGTGAAG
GTTTGCCAGCTCCCCTACGACTTGTAGTATTCTAGTACACGGTTTCGGTTTTGACACTTC

Sr_DFR_bracts

P T V E G M L N I I R S C A K A K T V K
105 110 115 120

1 ← CCAACGGTTCGAGGGGATGCTGAACATCATAAGATCATGTGCCAAAGCCAAAACCTGTGAAG
2 → CCAACGGTTCGAGGGGATGCTGAACATCATAAGATCATGTGCCAAAGCCAAAACCTGTGAAG

370 380 390 400 410 420

AAATTGATCTTCACTAACTCAGCAGGGACTTTGAATGTTGAAGAACACCCAAAACCAAGTT
TTTAACTAGAAGTGATTGAGTCGTCCTGAAACTTACAACCTTCTTGTGGTTTTTGGTCAA

Sr_DFR_bracts

K L I F T N S A G T L N V E E H Q K P V
125 130 135 140

1 ← AAATTGATCTTCACTAACTCAGCAGGGACTTTGAATGTTGAAGAACACCCAAAACCAAGTT
2 → AAATTGATCTTCACTAACTCAGCAGGGACTTTGAATGTTGAAGAACACCCAAAACCAAGTT

430 440 450 460 470 480

TACGACGAAACCAGTTGGAGTGATTTGGATTTCACTTACTCCAAGAAAATGACTGGATGG
ATGCTGCTTTGGTCAACCTCACTAAACCTAAAGTAAATGAGGTTCTTTACTGACCTACC

Sr_DFR_bracts

Y D E T S W S D L D F I Y S K K M T G W
145 150 155 160

1 ← TACGACGAAACCAGTTGGAGTGATTTGGATTTCACTTACTCCAAGAAAATGACTGGATGG
2 → TACGACGAAACCAGTTGGAGTGATTTGGATTTCACTTACTCCAAGAAAATGACTGGATGG

490 500 510 520 530 540

ATGTATTTTGTGTCTAAAATCCTGGCTGAGAAAAGCAGCAATGGAAGCAGCTAAAAGAGAAT
TACATAAAACACAGATTTTAGGACCGACTCTTTCGTCGTTACCTTCGTCGATTTCTCTTA

Sr_DFR_bracts

M Y F V S K I L A E K A A M E A A K E N
165 170 175 180

1 ← ATGTATTTTGTGTCTAAAATCCTGGCTGAGAAAAGCAGCAATGGAAGCAGCTAAAAGAGAAT
2 → ATGTATTTTGTGTCTAAAATCCTGGCTGAGAAAAGCAGCAATGGAAGCAGCTAAAAGAGAAT

550 560 570 580 590 600

AACATCAACTTCATTAGCATTATACCACCTGTAGTTGTTGGTCCATTTCATCATGCCCACT
TTGTAGTTGAAGTAATCGTAATATGGTGGACATCAACAACCAGGTAAGTAGTACGGGTGA

Sr_DFR_bracts

N I N F I S I I P P V V V G P F I M P T
185 190 195 200

1 ← AACATCAACTTCATTAGCATTATACCACCTGTAGTTGTTGGTCCATTTCATCATGCCCACT
2 → AACATCAACTTCATTAGCATTATACCACCTGTAGTTGTTGGTCCATTTCATCATGCCCACT

670 680 690 700 710 720

ATTATAAAGCAAGGACAATTTGTGCATGTAGATGACATATGTGAGGCTCACATATTCTTG
 TAATATTTTCGTTCTGTTAAACACGTACATCTACTGTATACACTCCGAGTGATAAGAAC

Sr_DFR_bracts

I I K Q G Q F V H V D D I C E A H I F L
 225 230 235 240

1 ← ATTATAAAGCAAGGACAATTTGTGCATGTAGATGACATATGTGAGGCTCACATATTCTTG
 2 → ATTATAAAGCAAGGACAATTTGTGCATGTAGATGACATATGTGAGGCTCACATATTCTTG

730 740 750 760 770

TTTGAGCAACCCACAGCACAAGGAAGATACATTTGCTCC TCTGATGATGCAACCATTTA
 AAACCTCGTTGGGTGTCGTGTTCTTCTATGTAACGAGG AGACTACTACGTTGGTAAAT

Sr_DFR_bracts

F E Q P T A Q G R Y I C S S D D A T I Y
 245 250 255 260

1 ← TTTGAGCAACCCACAGCACAAGGAAGATACATTTGCTCC TCTGATGATGCAACCATTTA
 2 → TTTGAGCAACCCACAGCACAAGGAAGATACATTTGCTCC TCTGATGATGCAACCATTTA

790 800 810 820 830

TGATATAGCTAATTTGATTAGAGAGAAATGGCCTGAATATCATATTCCGACCGAGTTCGA
 ACTATATCGATTAACCTAATCTCTCTTTACCGACTTATAGTATAAGGCTGGCTCAAGCT

Sr_DFR_bracts

D I A N L I R E K W P E Y H I P T E F E
 265 270 275 280

1 ← TGATATAGCTAATTTGATTAGAGAGAAATGGCCTGAATATCATATTCCGACCTGAGTTGA
 2 → TGA

850 860 870 880 890

AGGCATTGATAAGGACATACCGCTTGTACGTTTCTCCTCCAAGAAGTTGACGTCAATGGG
 TCCGTAACCTATTCTGTATGGCGAACATGCAAAGAGGAGGTTCTTCAACTGCAGTTACCC

Sr_DFR_bracts

G I D K D I P L V R F S S K K L T S M G
 285 290 295 300

1 ← AGGCATTGATAAGGACATACCGCTTGTACGTTTCTCCTCCAAGAAGTTGACGTCAATGGG

910 920 930 940 950

TTTTTCGTTTAAAGTACACGCTAGAGGACATGTACAGAGGAGCTATTGAGACTTGCAGAGA
 AAAAAAGCAAATTCATGTGCGATCTCCTGTACATGTCTCCTCGATAACTCTGAACGTCTCT

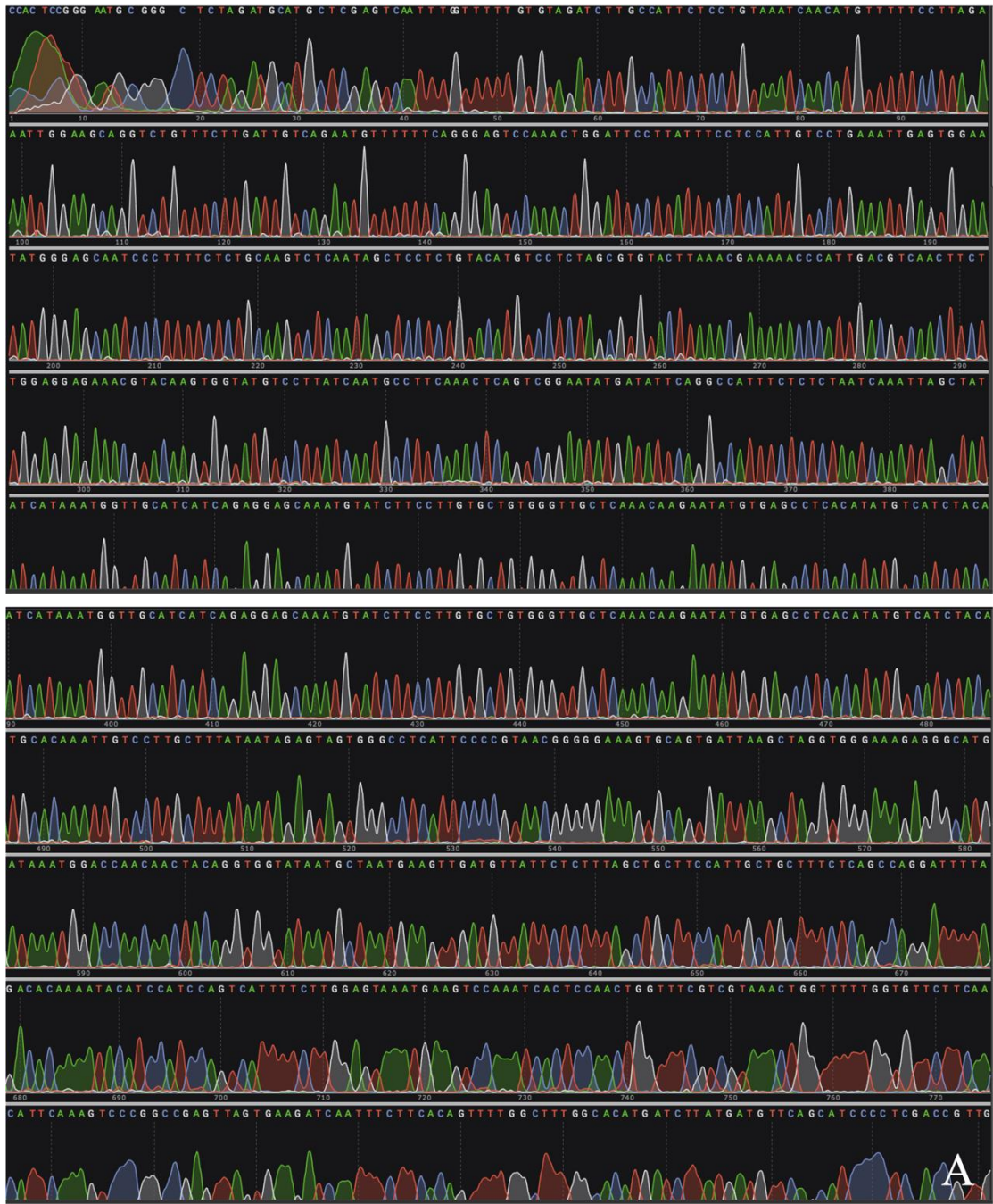
Sr_DFR_bracts

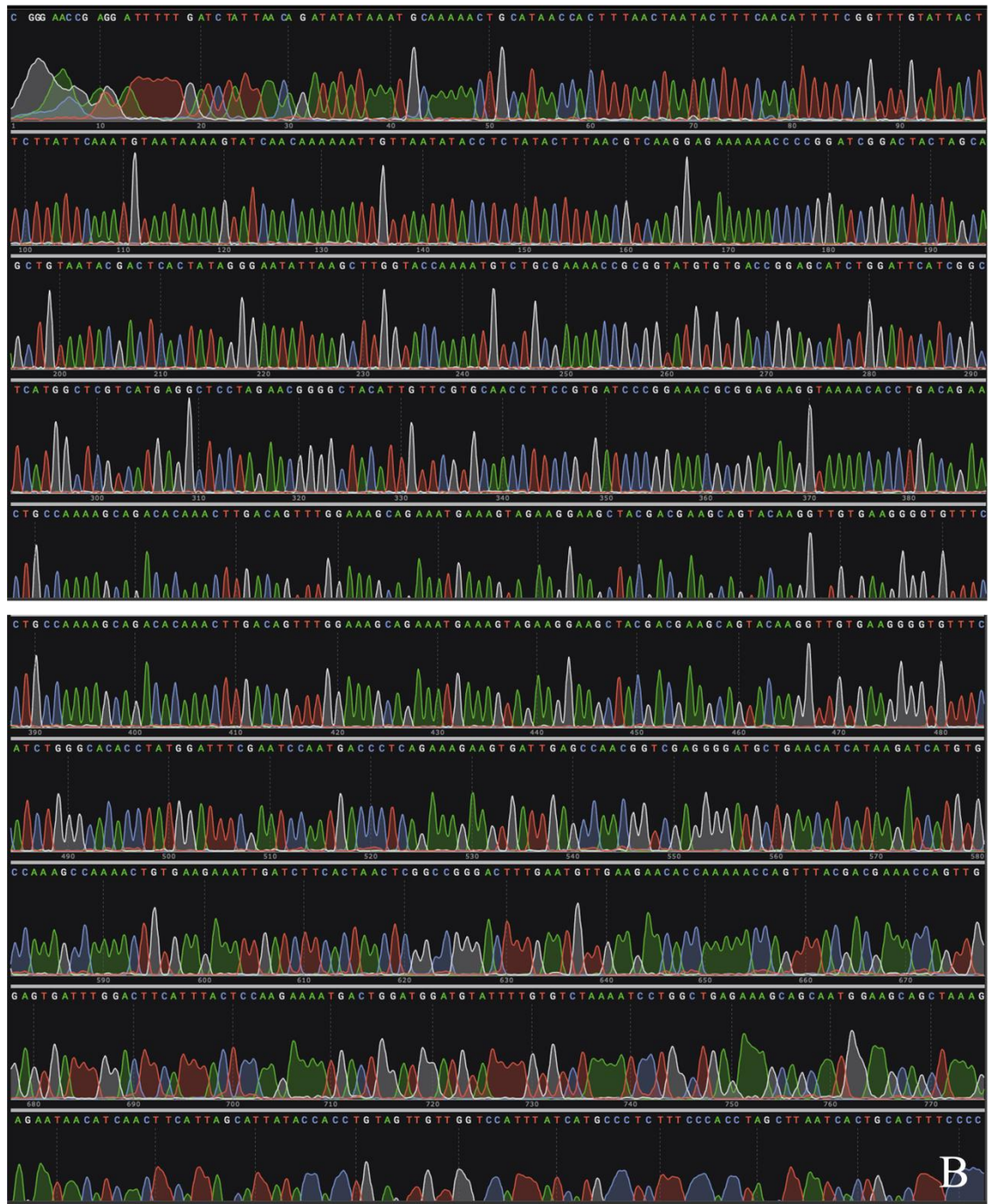
F S F K Y T L E D M Y R G A I E T C R E
 305 310 315 320

1 ← TTTTTCGTTTAAAGTACACGCTAGAGGACATGTACAGAGGAGCTATTGAGACTTGCAGAGA



Εικόνα 3.7: Αποτελέσματα αλληλούχησης και στοίχιση των κλωνοποιημένων τμημάτων με το γονίδιο αναφοράς *SrDFR*, όπου φαίνονται οι διαφορές στην αλληλουχία των βάσεων του ενθέματος στο φορέα. Οι αριθμοί (1) και (2) υποδηλώνουν τους δύο τρόπους διαβάσματος της αλληλουχίας με διαφορετικούς εκκινητές (forward και reverse).





Εικόνα 3.8: Χρωματογράφημα αλληλούχησης με forward εκκινητή (A) και με reverse (B) για το γονίδιο *SrDFR*. Από τις εικόνες φαίνεται πως η ποιότητα του «διαβάσματος» του ενθέματος στο φορέα είναι υψηλή, εκτός από τα άκρα του γονιδίου.

3.4 Αποτελέσματα RT-qPCR - Μελέτη έκφρασης των γονιδίων *SrANS* (anthocyanin synthase), *SrDFR* (dihydroflavonol 4-reductase), *SrUFGT* (flavonoid 3-O-glucosyltransferase), *SrPAL* (phenylalanine ammonia-lyase) και *SrCHS* (chalcone synthase)

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η σχετική έκφραση πέντε γονιδίων που συμμετέχουν στο βιοσυνθετικό μονοπάτι των ανθοκυανών σε διαφορετικά στάδια. Η ανάλυση με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (RT-qPCR) των γονιδίων *SrANS*, *SrDFR*, *SrUFGT*, *SrPAL* και *SrCHS* πραγματοποιήθηκε με cDNA που απομονώθηκε από ερυθρόβρακτα και μη ατομικά φυτά *Sideritis raeseri* και η έκφρασή τους κανονικοποιήθηκε ως προς την έκφραση των γονιδίων αναφοράς *elf1a* και *Actin-b*.

Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η έκφραση των πέντε γονιδίων σε είκοσι τέσσερα δείγματα, εκ των οποίων δώδεκα είχαν ερυθρά βράκτια φύλλα (R) και δώδεκα είχαν πράσινα βράκτια (G, πράσινος φαινότυπος). Τα δώδεκα φυτά κάθε φαινότυπου περιλαμβάνουν τρεις βιολογικές επαναλήψεις (τρία φυτά-A, B, C) για τέσσερις διαφορετικούς ιστούς (basal bract-1, medium bract-2, apical bract-3, leaves-4) (Εικόνα 3.9). Τα «πράσινα» δείγματα ήταν οι αριθμοί 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 19, 20, 23, ενώ τα «ερυθρά» οι αριθμοί 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 22, 24 (Πίνακας 3.1).

Πίνακας 3.1: Αρίθμηση των δειγμάτων ανά ιστό και φαινότυπο με αντιστοιχία στα διαγράμματα.

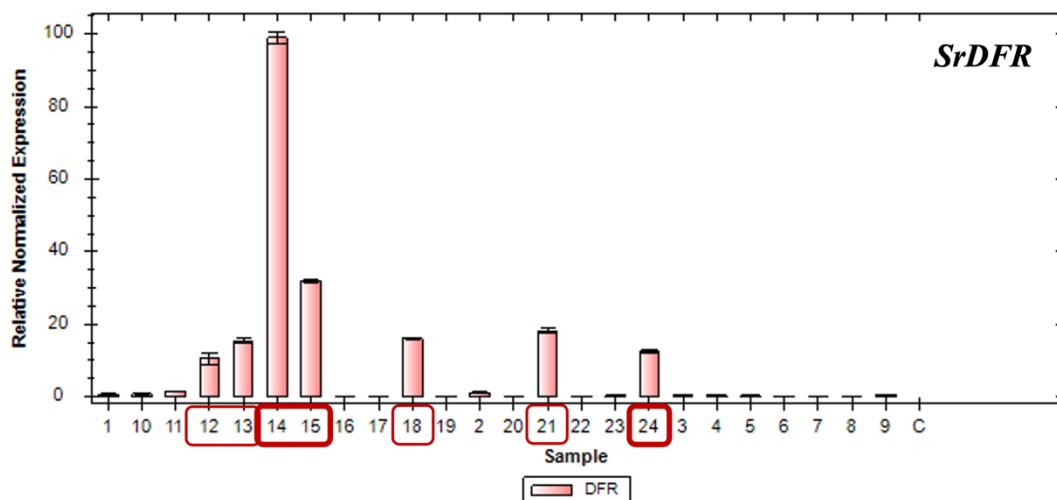
Ιστός	Αριθμοί
Βράκτια βάσης από πράσινο φυτό	1, 2, 19
Μεσαία βράκτια από πράσινο φυτό	3, 4, 5
Κορυφαία βράκτια από πράσινο φυτό	6, 20, 23
Φύλλα από πράσινο φυτό	7, 8, 9
Βράκτια βάσης από ερυθρό φυτό	10, 11, 12
Μεσαία βράκτια από ερυθρό φυτό	13, 18, 21
Κορυφαία βράκτια από ερυθρό φυτό	14, 15, 24
Φύλλα από ερυθρό φυτό	16, 17, 22

Όνομα δείγματος	Αριθμός δείγματος
G_BB	1A
G_BB	1B
G_BB	1C
G_MB	2A
G_MB	2B
G_MB	2C
G_AB	3A
G_AB	3B
G_AB	3C
G_L	4A
G_L	4B
G_L	4C
R_BB	5A
R_BB	5B
R_BB	5C
R_MB	6A
R_MB	6B
R_MB	6C
R_AB	7A
R_AB	7B
R_AB	7C
R_L	8A
R_L	8B
R_L	8C

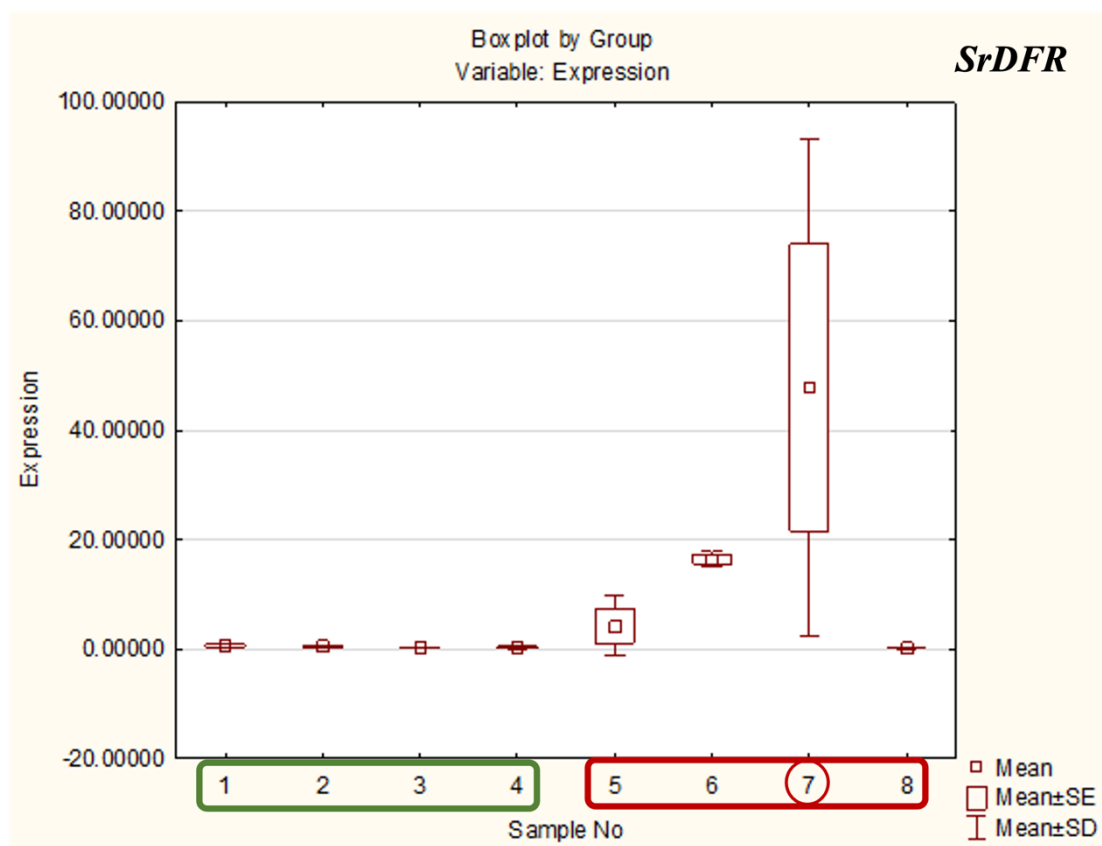
8 ομάδες

Εικόνα 3.9: Διαχωρισμός των δειγμάτων ανά βιολογική επανάληψη, ιστό και φαινότυπο.

Στην Εικόνα 3.10 καταδεικνύεται ότι τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *SrDFR* είναι μηδενικά σε όλα τα φυτά και δείγματα με πράσινα βράκτια σε όλους τους ιστούς, ενώ είναι αρκετά υψηλά στους ερυθρόβρακτους φαινοτύπους, στο ακραίο και στο μεσαίο τμήμα του βράκτιου φύλλου. Επίσης, βρέθηκε αυξημένη έκφραση και σε ένα δείγμα βασικού μεριστώματος (δείγμα 12). Επιπλέον, στην Εικόνα 3.11 απεικονίζεται ο μέσος όρος της έκφρασης του γονιδίου ανά ομάδα μαζί με την τυπική απόκλιση, όπου φαίνεται ξανά η υψηλή έκφραση του γονιδίου *SrDFR* στα ακραία βράκτεια φυτών σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες.



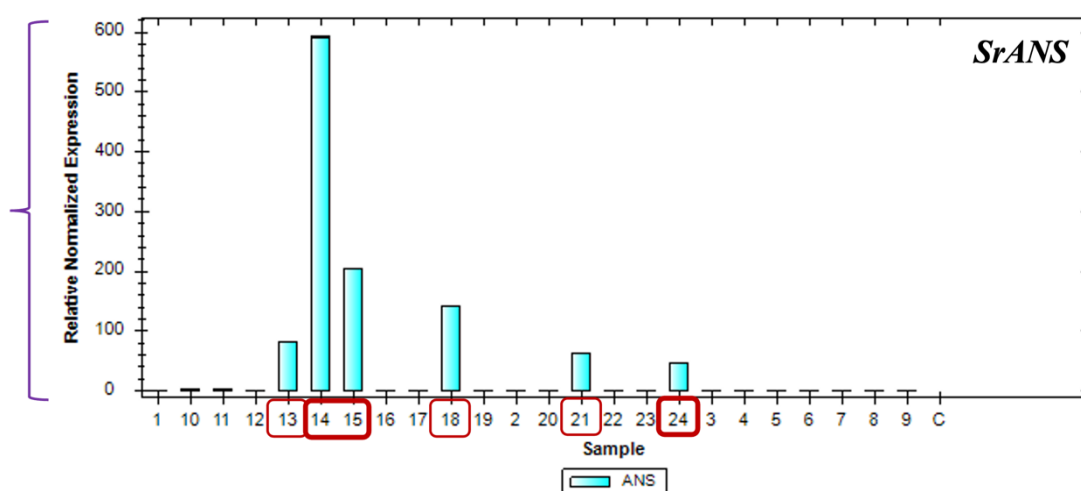
Εικόνα 3.10: Απεικόνιση της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *SrDFR* στα διαφορετικά δείγματα. Τα δείγματα με αριθμό 14, 15 και 24 αντιπροσωπεύουν τις βιολογικές επαναλήψεις για το κορυφαίο ερυθρό βράκτειο, όπου η έκφραση είναι αρκετά υψηλή, οι αριθμοί 13, 18 και 21 αντιπροσωπεύουν τις βιολογικές επαναλήψεις για το μεσαίο ερυθρό βράκτειο και, τέλος, το δείγμα 12 αντιπροσωπεύει τη βιολογική επανάληψη για το βασικό ερυθρό βράκτειο. Η έκφραση είναι φανερά αυξημένη στα παραπάνω δείγματα, ενώ είναι μηδενική σε όλα τα φυτά με τον κανονικό (πράσινο) φαινότυπο.



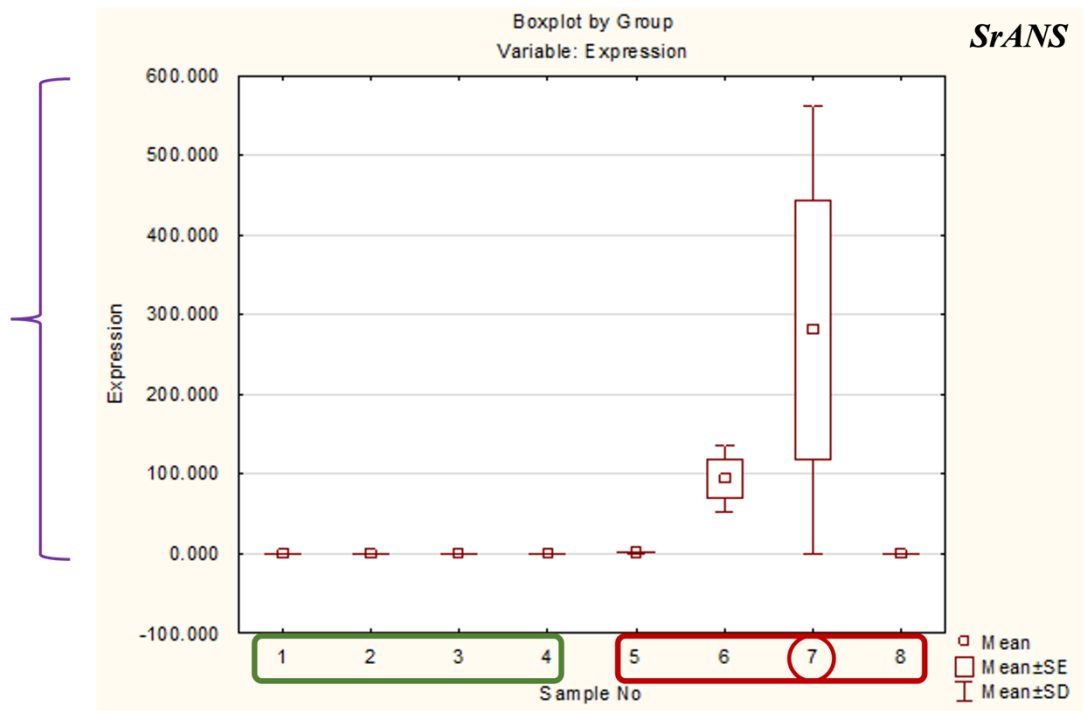
Εικόνα 3.11: Θηκόγραμμα με το μέσο όρο και την τυπική απόκλιση της έκφρασης του γονιδίου *SrDFR* μεταξύ των οκτώ ομάδων των δειγμάτων. Φαίνεται καθαρά πως η έκφραση στην 7^η ομάδα (ακραία βράκτεια φυτών) είναι υψηλότερη και με μεγάλη

τυπική απόκλιση μεταξύ των δειγμάτων. Αντίθετα, η έκφραση στα βασικά και στα μεσαία μεριστώματα είναι χαμηλότερη με μικρότερη τυπική απόκλιση μεταξύ των δειγμάτων.

Στην Εικόνα 3.12 αποδεικνύεται ότι τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *SrANS* είναι μηδενικά σε όλους τους ιστούς των πράσινων φαινοτύπων, ενώ είναι υψηλά στους ερυθρόβρακτους φαινοτύπους, στο κορυφαίο και στο μεσαίο βράκτειο φύλλο. Ειδικότερα, στα δείγματα 14, 15, και 24 η έκφραση είναι πολύ υψηλή, όπως φαίνεται και από την κλίμακα. Επιπλέον, στην Εικόνα 3.13 απεικονίζεται ο μέσος όρος της έκφρασης του γονιδίου ανά ομάδα μαζί με την τυπική απόκλιση, όπου φαίνεται ξανά η υψηλή έκφραση του γονιδίου *SrANS* στα κορυφαία βράκτεια φυτών σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες.

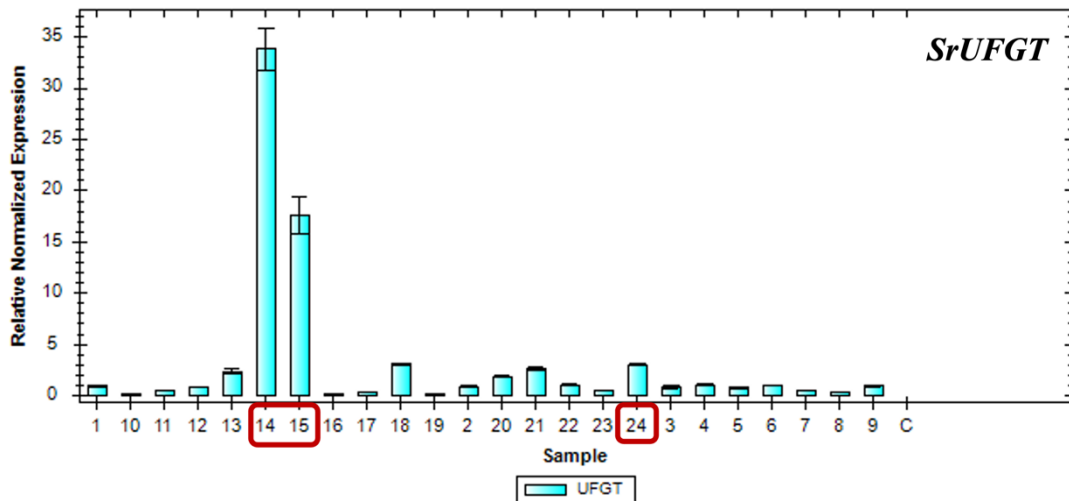


Εικόνα 3.12: Απεικόνιση της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *SrANS* στα διαφορετικά δείγματα. Τα δείγματα με αριθμό 14, 15 και 24 αντιπροσωπεύουν τις βιολογικές επαναλήψεις για το κορυφαίο ερυθρό βράκτειο, όπου η έκφραση είναι πολύ υψηλή και οι αριθμοί 13, 18 και 21 αντιπροσωπεύουν τις βιολογικές επαναλήψεις για το μεσαίο ερυθρό βράκτειο. Η έκφραση είναι φανερά αυξημένη στα παραπάνω δείγματα, όπως φαίνεται και στην κλίμακα αριστερά, ενώ είναι μηδενική σε όλα τα φυτά με τον κανονικό (πράσινο) φαινότυπο.

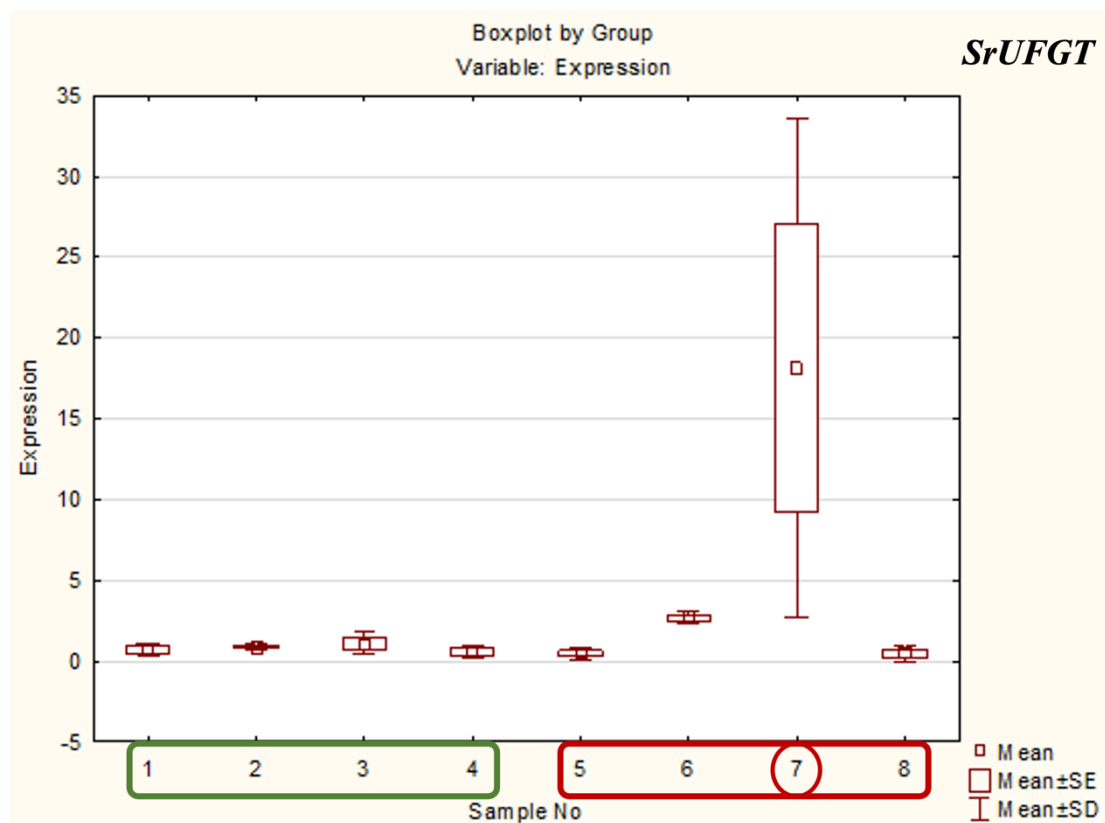


Εικόνα 3.13: Θηκόγραμμα με το μέσο όρο και την τυπική απόκλιση της έκφρασης του γονιδίου *SrANS* μεταξύ των οκτώ ομάδων των δειγμάτων. Φαίνεται καθαρά πως η έκφραση στην 7^η ομάδα (κορυφαία ερυθρά βράκτεια) είναι υψηλότερη και με μεγάλη τυπική απόκλιση μεταξύ των δειγμάτων. Αντίθετα, η έκφραση στα μεσαία ερυθρά βράκτεια είναι χαμηλότερη με μικρότερη τυπική απόκλιση μεταξύ των δειγμάτων.

Αντίθετα με τα προηγούμενα αποτελέσματα έκφρασης των γονιδίων *SrDFR* και *SrANS*, στην Εικόνα 3.14 φαίνεται ότι το γονίδιο *SrUFGT* εκφράζεται σε όλους σχεδόν τους φαινοτύπους, αν και είναι φανερά υψηλότερη η έκφραση στο κορυφαίο ερυθρό βράκτειο φύλλο. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η γλυκοζυλίωση, την οποία καταλύει το γονίδιο *UFGT*, μπορεί να είναι μια κυτταρική διαδικασία που εμπλέκεται σε πολλές λειτουργίες (για παράδειγμα στη σύνθεση άλλων φλαβονών του σιδηρίτη όπως τα παράγωγα ισοκουτελαρεΐνης και υπολαετίνης). Επιπλέον, στην Εικόνα 3.15 απεικονίζεται ο μέσος όρος της έκφρασης του γονιδίου ανά ομάδα μαζί με την τυπική απόκλιση, όπου φαίνεται ξανά η υψηλή έκφραση του γονιδίου *SrUFGT* στα κορυφαία ερυθρά βράκτεια φυτών σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες.

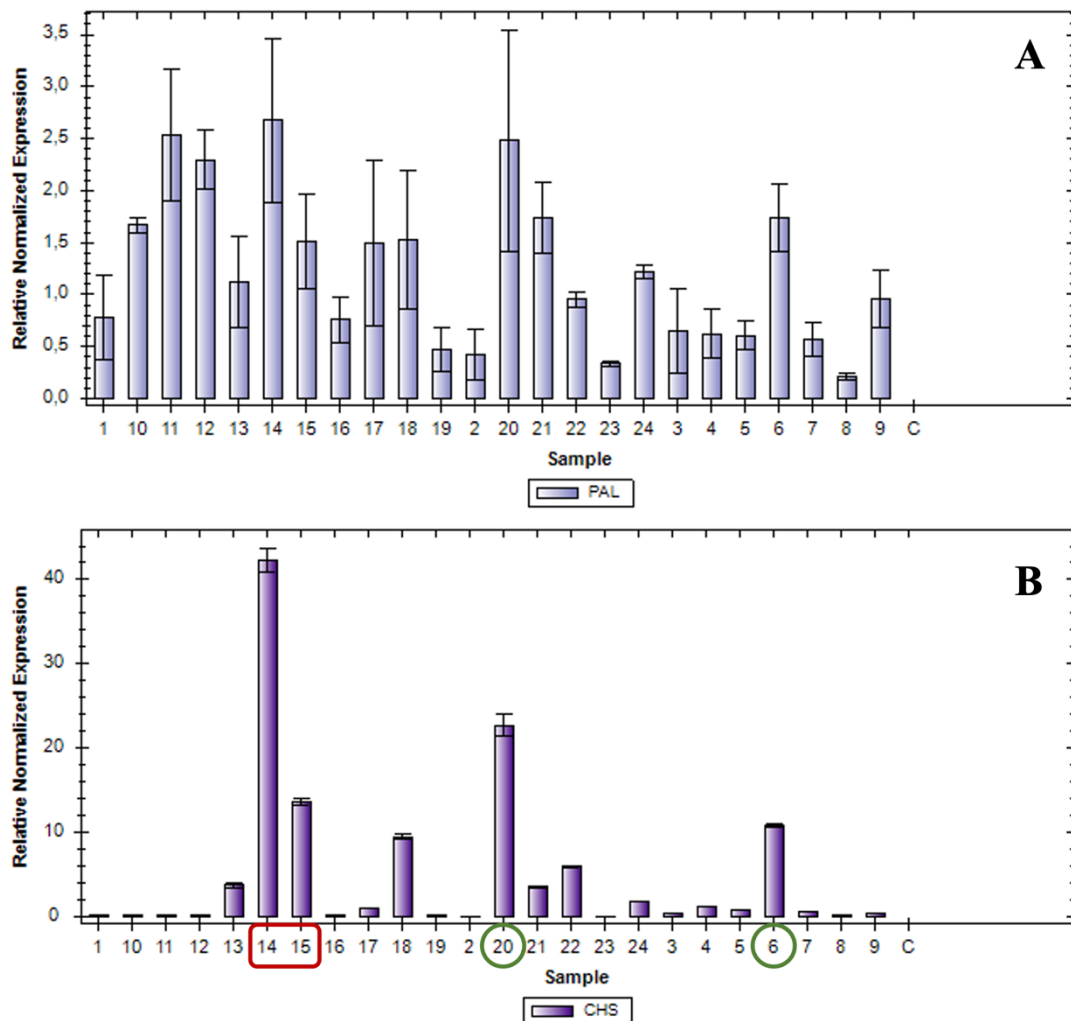


Εικόνα 3.14: Απεικόνιση της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *SrUFGT* στα διαφορετικά δείγματα. Τα δείγματα με αριθμό 14, 15 και 24 αντιπροσωπεύουν τις βιολογικές επαναλήψεις για το ακραίο ερυθρό βράκτειο φύλλο, όπου η έκφραση είναι υψηλή σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα.



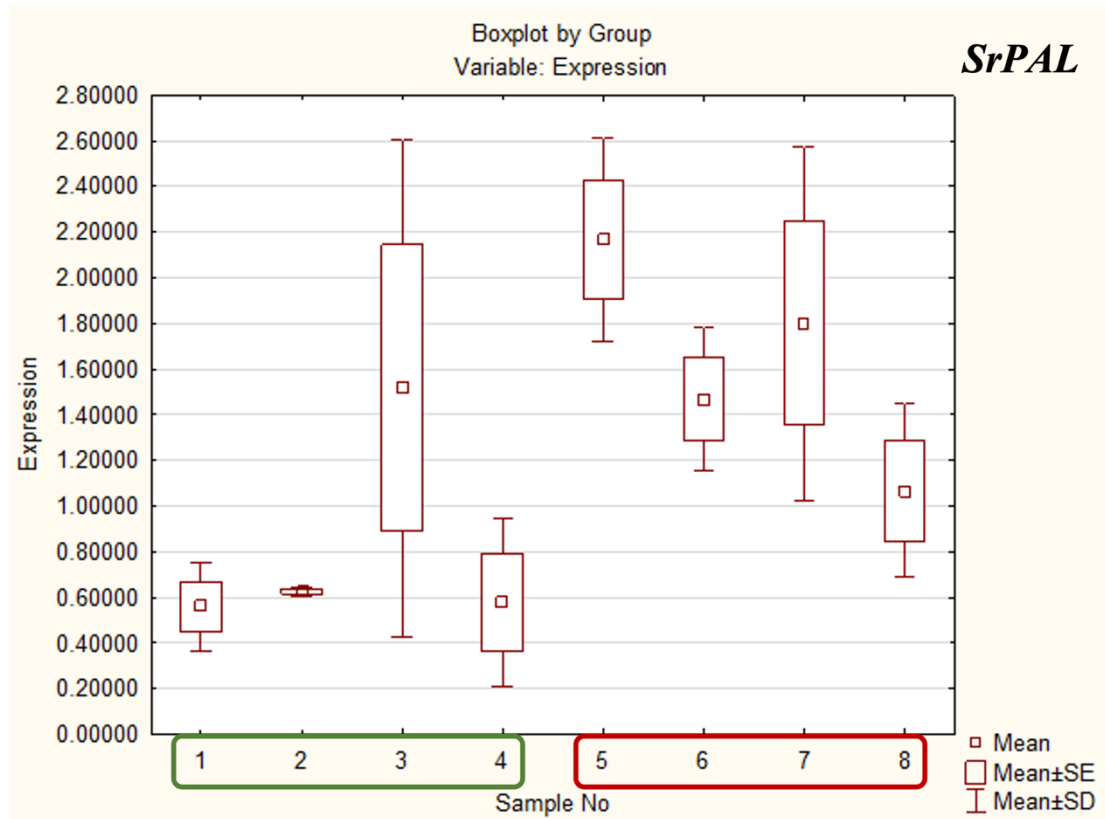
Εικόνα 3.15: Θηκόγραμμα με το μέσο όρο και την τυπική απόκλιση της έκφρασης του γονιδίου *SrUFGT* μεταξύ των οκτώ ομάδων των δειγμάτων. Φαίνεται καθαρά πως η έκφραση στην 7^η ομάδα (κορυφαία ερυθρά βράκτεια) είναι υψηλότερη και με μεγάλη τυπική απόκλιση μεταξύ των δειγμάτων. Αντίθετα, η έκφραση υπόλοιπα δείγματα είναι χαμηλή με μικρότερη τυπική απόκλιση μεταξύ των δειγμάτων.

Στη συνέχεια, εκτός από τα τρία κυριότερα γονίδια που συμμετέχουν στην παραγωγή ανθοκυανών, αναλύθηκε η έκφραση και των γονιδίων *SrPAL* και *SrCHS* που καταλύουν αντιδράσεις σε πιο πρώιμα στάδια κατά το σχηματισμό φλαβονοειδών. Πράγματι, η έκφραση των δύο αυτών γονιδίων στα κορυφαία ερυθρά βράκτεια των φυτών δεν είχε φανερές διαφορές με τα υπόλοιπα δείγματα. Συγκεκριμένα, το *SrPAL*, που είναι το πρώτο γονίδιο που εκφράζεται κατά τη βιοσύνθεση φλαβονοειδών, έχει πολύ χαμηλή έκφραση σε όλα τα δείγματα, είτε φυσιολογικά είτε ερυθρόβρακτα (Εικόνα 3.16). Το γονίδιο *SrCHS*, που συμμετέχει επίσης σε πρώιμα στάδια, φαίνεται να εκφράζεται περισσότερο σε ερυθρόβρακτα φυτά, ενώ παράλληλα έχει υψηλή έκφραση και σε ορισμένα φυσιολογικά (πράσινα) φυτά (Εικόνα 3.16). Ακόμη, στις Εικόνες 3.17 και 3.18 απεικονίζεται ο μέσος όρος της έκφρασης των γονιδίων *SrPAL* και *SrCHS*, αντίστοιχα, ανά ομάδα μαζί με την τυπική απόκλιση, όπου φαίνεται πως η έκφραση του γονιδίου *SrPAL* δεν είναι ευκρινώς διαφοροποιημένη μεταξύ των δειγμάτων και είναι αρκετά χαμηλή, ενώ η έκφραση του *SrCHS* είναι αυξημένη στις ομάδες 3 (κορυφαίο πράσινα βράκτεια) και 7 (κορυφαία ερυθρά βράκτεια) σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες.

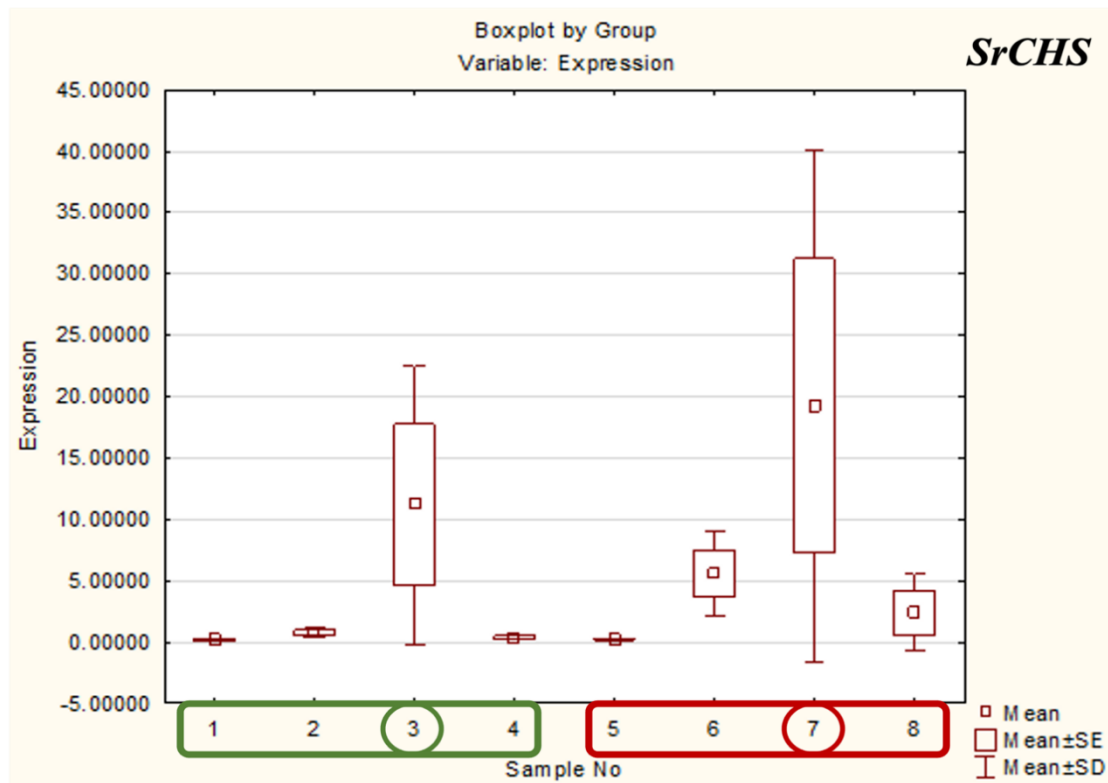


Εικόνα 3.16: Απεικόνιση της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *SrPAL* (A) και *SrCHS* (B) στα διαφορετικά δείγματα. Όσον αφορά την έκφραση του *SrPAL*, φαίνεται πως

είναι πολύ χαμηλή και δε διαφοροποιείται σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών φαινοτύπων.



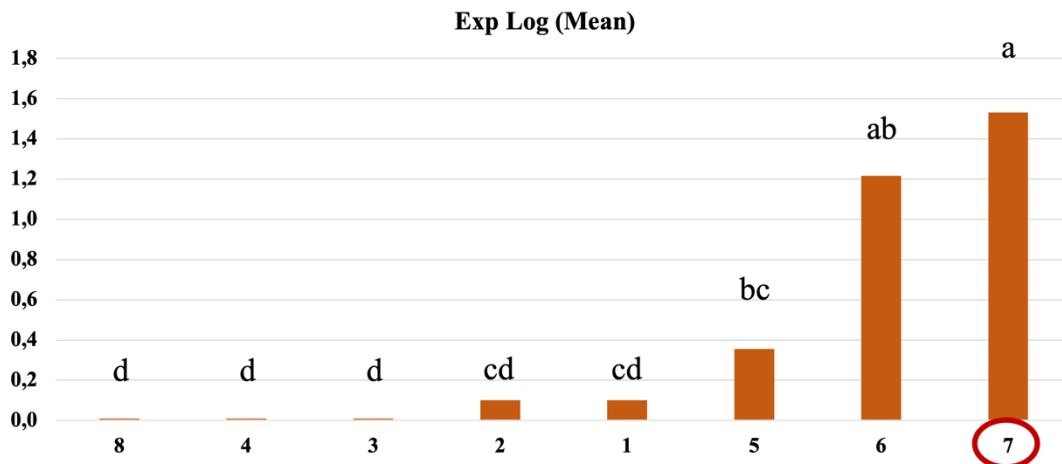
Εικόνα 3.17: Θηκόγραμμα με το μέσο όρο και την τυπική απόκλιση της έκφρασης του γονιδίου *SrPAL* μεταξύ των οκτώ ομάδων των δειγμάτων. Φαίνεται καθαρά πως δεν υπάρχει σαφής διαφοροποίηση της έκφρασης μεταξύ των 7 ομάδων, ανεξαρτήτως φαινοτύπου.



Εικόνα 3.18: Θηκόγραμμα με το μέσο όρο και την τυπική απόκλιση της έκφρασης του γονιδίου *SrCHS* μεταξύ των οκτώ ομάδων των δειγμάτων. Φαίνεται καθαρά πως η έκφραση στην 3^η (κορυφαία πράσινα βράκτεια) και 7^η ομάδα (κορυφαία ερυθρά βράκτεια) είναι υψηλότερη και με μεγάλη τυπική απόκλιση μεταξύ των δειγμάτων. Αντίθετα, η έκφραση υπόλοιπα δείγματα είναι χαμηλή με μικρότερη τυπική απόκλιση μεταξύ των δειγμάτων.

Στη συνέχεια, με σκοπό να διερευνηθεί αν τα αποτελέσματα των RT-qPCR είναι στατιστικά σημαντικά, εφαρμόστηκε one-way ANOVA (Analysis of Variance) για τα γονίδια *SrDFR*, *SrANS* και *SrUFGT*. Έτσι, δίνεται μια πιο ξεκάθαρη προσέγγιση ως προς την ομοιότητα της έκφρασης των γονιδίων μεταξύ των οκτώ ομάδων που μελετήθηκαν. Λόγω των μεγάλων διαφορών σχετικής έκφρασης μεταξύ των δειγμάτων των ομάδων, χρησιμοποιήθηκε στην ANOVA ο λογάριθμος της μέσης τιμής. Όσον αφορά το γονίδιο *SrDFR*, από την ανάλυση ANOVA φαίνεται οι οκτώ ομάδες να χωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες ανάλογα με την έκφραση του γονιδίου στα δείγματα (Εικόνα 3.19) και επιβεβαιώνεται η μεγαλύτερη διαφοροποίηση των δειγμάτων της 7^{ης} ομάδας (κορυφαία ερυθρά βράκτεια) σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες. Η ομοιότητα των ομάδων ως προς την έκφραση ελέγχθηκε με Tukey Test για όλα τα γονίδια.

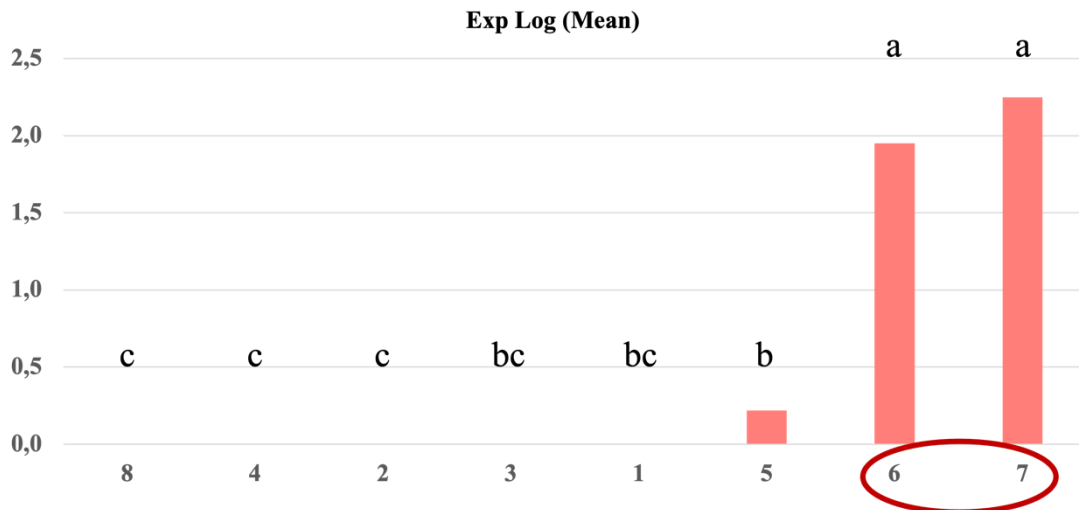
Αριθμός ομάδας	Exp Log (Mean)	1	2	3	4
8	0,0	****			
4	0,0	****			
3	0,0	****			
2	0,1	****	****		
1	0,1	****	****		
5	0,4		****	****	
6	1,2			****	****
7	1,5				****



Εικόνα 3.19: Αποτελέσματα ANOVA για την έκφραση του γονιδίου *SrDFR* μεταξύ των διαφορετικών ομάδων. Στον κάθετο άξονα φαίνεται ο λογάριθμος της μέσης τιμής και στον οριζόντιο άξονα οι διαφορετικές ομάδες δειγμάτων. Από τους πίνακες και το διάγραμμα φαίνεται η κατηγοριοποίηση των ομάδων σε τέσσερις κατηγορίες με βάση την έκφραση του γονιδίου, με την 7^η ομάδα να διαφοροποιείται σημαντικά στατιστικά σε σχέση με τις υπόλοιπες.

Ακόμη, για το γονίδιο *SrANS*, από την ανάλυση ANOVA φαίνεται οι οκτώ ομάδες να χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με την έκφραση του γονιδίου στα δείγματα (Εικόνα 3.20) και επιβεβαιώνεται η μεγαλύτερη διαφοροποίηση των δειγμάτων της 6^{ης} και 7^{ης} ομάδας (κορυφαία ερυθρά βράκτεια και μεσαία ερυθρά βράκτεια) σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες.

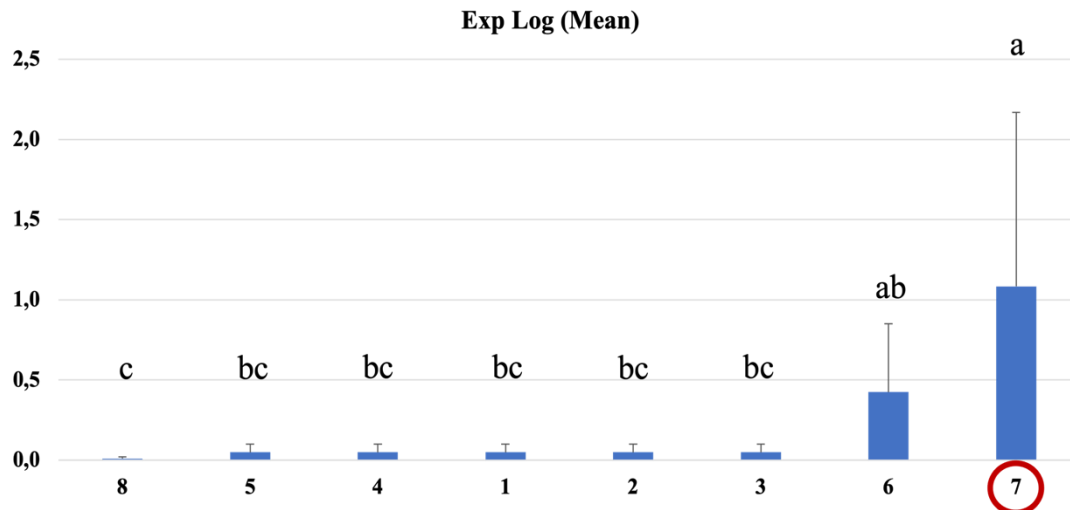
Αριθμός ομάδας	Exp Log (Mean)	1	2	3
8	0,0	****		
4	0,0	****		
2	0,0	****		
3	0,0	****	****	
1	0,0	****	****	
5	0,2		****	
6	2,0			****
7	2,2			****



Εικόνα 3.20: Αποτελέσματα ANOVA για την έκφραση του γονιδίου *SrANS* μεταξύ των διαφορετικών ομάδων. Στον κάθετο άξονα φαίνεται ο λογάριθμος της μέσης τιμής και στον οριζόντιο άξονα οι διαφορετικές ομάδες δειγμάτων. Από τους πίνακες και το διάγραμμα φαίνεται η κατηγοριοποίηση των ομάδων σε τρεις κατηγορίες με βάση την έκφραση του γονιδίου, με την 6^η και 7^η ομάδα να διαφοροποιείται σημαντικά στατιστικά σε σχέση με τις υπόλοιπες.

Τέλος, αναφορικά με το γονίδιο *SrUFGT*, από την ανάλυση ANOVA φαίνεται οι οκτώ ομάδες να χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με την έκφραση του γονιδίου στα δείγματα (Εικόνα 3.21) και επιβεβαιώνεται η μεγαλύτερη διαφοροποίηση των δειγμάτων της 7^{ης} ομάδας (κορυφαία ερυθρά βράκτεια) σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες.

Αριθμός ομάδας	Exp Log (Mean)	1	2	3
8	0,0	****		
5	0,1	****	****	
4	0,1	****	****	
1	0,1	****	****	
2	0,1	****	****	
3	0,1	****	****	
6	0,4		****	****
7	1,1			****



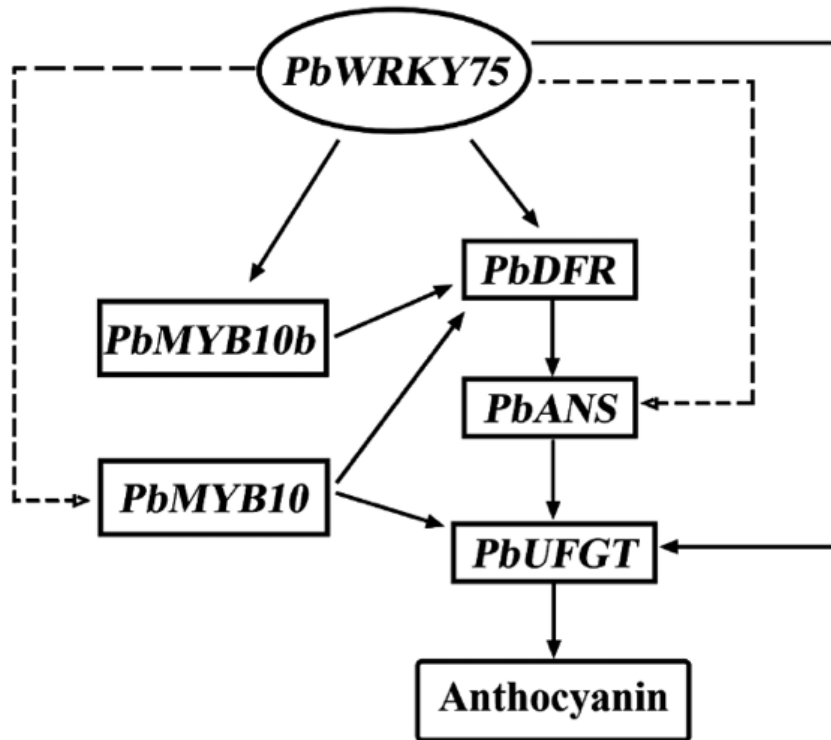
Εικόνα 3.21: Αποτελέσματα ANOVA για την έκφραση του γονιδίου *SrUFGT* μεταξύ των διαφορετικών ομάδων. Στον κάθετο άξονα φαίνεται ο λογάριθμος της μέσης τιμής και στον οριζόντιο άξονα οι διαφορετικές ομάδες δειγμάτων. Από τους πίνακες και το διάγραμμα φαίνεται η κατηγοριοποίηση των ομάδων σε τρεις κατηγορίες με βάση την έκφραση του γονιδίου, με την 7^η ομάδα να διαφοροποιείται σημαντικά στατιστικά σε σχέση με τις υπόλοιπες.

Συζήτηση-Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία, τα γονίδια που κλωνοποιήθηκαν και μελετήθηκε η ποσοτική έκφρασή τους επιλέχθηκαν με βάση προηγούμενες εργασίες που πραγματοποιήθηκαν σε άλλα είδη σχετικά με τη βιοσύνθεση των ανθοκυανών και τη ρύθμισή της. Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε μέσω RT-qPCR η σημαντικά αυξημένη έκφραση των γονιδίων *DFR*, *ANS* και *UFGT* στον ερυθρόβρακτο φαινότυπο *S. raeseri*, ενώ η έκφραση των γονιδίων που καταλύουν αντιδράσεις στα πρώιμα στάδια του μονοπατιού (*PAL* και *CHS*) δεν παρουσίασε σημαντική στατιστική διαφορά στην έκφρασή τους. Η πιο συνηθισμένη μέθοδος ανίχνευσης των διαφορετικά εκφραζόμενων γονιδίων (DEGs) είναι μέσω μεταγραφωμικής ανάλυσης, όπου μετριέται ο αριθμός των αντιγράφων των γονιδίων και υπολογίζονται οι διαφορές μεταξύ δύο φαινοτύπων, και περαιτέρω διενέργεια αντιδράσεων RT-qPCR με σκοπό την επαλήθευση των αποτελεσμάτων της μεταγραφωμικής ανάλυσης.

Πράγματι, σε προηγούμενη μελέτη στο είδος *Zoysia japonica* Steud. μεταγραφωμική ανάλυση για εντοπισμό των διαφορετικά εκφραζόμενων γονιδίων μεταξύ μωβ και πράσινων φαινοτύπων έδειξε αυξημένη έκφραση των γονιδίων *ZjANS* και *ZjDFR*, που στη συνέχεια εξακριβώθηκε και από τη διενέργεια RT-qPCR. Ακόμη, στο μωβ φαινότυπο βρέθηκε αυξημένη έκφραση δύο μεταγραφικών παραγόντων, *ZjMYB1* και *ZjMYB2*, οι οποίοι πιθανά ενεργοποιούν τα γονίδια *ANS* και *DFR* που καταλύουν αντιδράσεις στα τελευταία στάδια σύνθεσης των ανθοκυανών (Ahn et al., 2015). Αντίστοιχη έρευνα των Ma et al. (2023) μεταξύ μπλε και λευκών ανθών του είδους *Iris bulleyana* έδειξε μετά από μεταγραφωμική ανάλυση ότι 180 γονίδια ήταν διαφορετικά εκφρασμένα μεταξύ των δύο φαινοτύπων. Συγκεκριμένα, τα γονίδια *3GT*, *5GT*, που παράγουν ένζυμα τα οποία καταλύουν την αντίδραση γλυκοζυλίωσης των ανθοκυανιδινών, και *CHS* βρέθηκαν να έχουν λιγότερα σε αριθμό αντίγραφα μεταγραφής στο λευκό φαινότυπο σε σχέση με τον μπλε.

Η παρουσία ανθοκυανών είναι συνηθισμένη και σε πολλά εδώδιμα είδη. Στο ρόδι (*Punica granatum* L.), ένα από τα πιο σημαντικά εμπορικά εδώδιμα φρούτα, διαπιστώθηκε η αυξημένη έκφραση των γονιδίων *PgCHS*, *PgCHI*, *PgF3H*, *PgDFR* και *PgUFGT* στους πιο έντονα κόκκινους κάρπους, με «κορύφωση» της έκφρασης στο στάδιο της ωρίμανσης. Ωστόσο, στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης των λευκών καρπών παρατηρήθηκε επίσης υψηλή έκφραση των γονιδίων *PgCHS*, *PgCHI* και *PgF3H*, γεγονός που υποδεικνύει πως αυτά τα γονίδια, που συμμετέχουν στη σύνθεση φλαβονών, ισοφλαβονοειδών και φλαβονολών, εκφράζονται φυσιολογικά, αλλά δεν οδηγούν στη σύνθεση ανθοκυανών (Zhao et al., 2015). Σε κόκκινους και λευκούς καρπούς κερασιάς (*Prunus tomentosa*) έγινε μεταγραφωμική και μεταβολομική ανάλυση από τους Zhang et al. (2022) και διαπιστώθηκε η παρουσία 285 διαφορετικά εκφραζόμενων γονιδίων που συνδέονται με την παρουσία διαφορετικών μεταβολιτών και παραγώγων φλαβονοειδών μεταξύ των δύο φαινοτύπων. Μεταξύ αυτών, βρέθηκαν 9 γονίδια που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση, τη μεταφορά και την αποικοδόμηση των ανθοκυανών, όπως τα *PtPAL*, *PtDFR*, *PtANS*, *PtUFGT* και *PtSGT11* με τα *PtUFGT* και *PtSGT11* να παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη διαφορά. Εκτός από τις αντιδράσεις που οδηγούν άμεσα στη σύνθεση ανθοκυανίνης στα διαφορετικά είδη, σημαντικό ρόλο κατέχει η δράση των μεταγραφικών παραγόντων στην έκφραση ενός γονιδίου (Zhang et al., 2022). Οι μεταγραφικοί παράγοντες των ομάδων WRKY, MYB και bHLH έχει βρεθεί πως αλληλοεπιδρούν με τα γονίδια που συμμετέχουν στα τελευταία στάδια του βιοσυνθετικού μονοπατιού ανθοκυανών (*DFR*, *ANS* και *UFGT*). Πιο συγκεκριμένα, στο αχλάδι (*Pyrus bretschneideri*) τα γονίδια *PbDFR*, *PbANS* και *PbUFGT* εμφάνισαν αυξημένη έκφραση στην ποικιλία “Zaosu”, όπως και οι θετικοί ρυθμιστές τους *PbMYB10* και *PbMYB10b*. Ακόμη, η υπερέκφραση του *PbWRKY75* φαίνεται πως προάγει την έκφραση των *PbDFR*, *PbUFGT* και *PbMYB10b* με την πρόσδεσή του στους υποκινητές των παραπάνω γονιδίων (Εικόνα 4.1). Αντίστοιχοι μεταγραφικοί παράγοντες που δρουν με τον ίδιο μηχανισμό έχουν αναφερθεί και στο είδος *Arabidopsis thaliana*, όπως οι *AtPAP1*, *AtPAP2* και *AtMYB114* (Cong et al., 2021). Τέλος, μεταγραφωμική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε ποικιλίες *Prunus persica* με λευκά και κόκκινα άνθη. Ο μεταγραφικός παράγοντας *PpMYB108* εντοπίστηκε με σημαντικά περισσότερα αντίγραφα στο μεταγράφομα του φαινοτύπου με τα κόκκινα άνθη, ειδικότερα στον ιστό από τα πέταλα του άνθους. Επιπλέον, η υπερέκφρασή του σε διαγονιδιακά φυτά καπνού οδήγησε σε σκούρα ροζ άνθη, σε αντίθεση με τα ανοιχτόχρωμα ροζ άγριου τύπου άνθη. Τέλος, το παρόμοιο μοτίβο έκφρασης των *PpMYB108* και *PpDFR* οδήγησε στο συμπέρασμα ότι ο *PpMYB108* λειτουργεί σαν «ενεργοποιητής» του γονιδίου *PpDFR* με τη σύνδεσή του στον υποκινητή του *PpDFR* μέσω μιας αλληλουχίας έξι ζευγών βάσεων (Khan et al., 2022).



Εικόνα 4.1: Απεικόνιση της αλληλεπίδρασης των μεταγραφικών παραγόντων με τα γονίδια σύνθεσης ανθοκυανών (Cong et al., 2021).

Ανθοκυανίνες και άλλα προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού είναι συχνό να παράγονται και κατά την ωρίμανση των καρπών. Στη φράουλα (*Fragaria x ananassa*) το ένζυμο *PAL* παίζει καθοριστικό ρόλο στην ποιότητα του καρπού, συνεπώς το γονίδιο *FaPAL6* κλωνοποιήθηκε και μελετήθηκε η έκφρασή του σε δύο διαφορετικές ποικιλίες, Camarosa και Toyonoka. Τα επίπεδα mRNA ήταν υψηλότερα στην ποικιλία Camarosa, η οποία είχε υψηλότερα ποσοστά ανθοκυανών από την Toyonoka (Pombo et al., 2011). Ως προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού, οι ανθοκυανίνες έχουν συσχετιστεί με την παρουσία κάποιας καταπόνησης στο φυτό. Προηγούμενες μελέτες αναφέρουν ότι οι ανθοκυανίνες προσδίδουν ανθεκτικότητα σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις, όπως η αλατότητα, η ξηρασία και η χαμηλή θερμοκρασία. Στο κινέζικο λάχανο (*Brassica rapa* L.) η έκθεση σε χαμηλή θερμοκρασία οδήγησε σε ενίσχυση της έκφρασης των γονιδίων *C4H*, *F3H*, *DFR*, *ANS* και *UFGT*. Στη «μωβ» ποικιλία Moro blood του είδους *Citrus sinensis* L. Osbeck υπολογίστηκαν τα επίπεδα ανθοκυανών στους 4°C και στους 9°C μετά τη συγκομιδή των καρπών και διαπιστώθηκε πως η μεγαλύτερη συσσώρευση παρατηρήθηκε στους 9 °C, υποθέτοντας πως οι συγκεκριμένες συνθήκες ήταν οι βέλτιστες για την περαιτέρω μετατροπή της διϋδροφλαβονόλης (Carmona et al., 2017). Στο «γλυκό κεράσι» (*Prunus avium* L.) οι Guo et al. (2018) αποκαλύπτουν πως μεταξύ «σκουρόχρωμων» και «ανοιχτόχρωμων» καρπών υπάρχει διαφορά στην επίδραση του φωτός ως προς την παραγωγή ανθοκυανών, με τους πιο σκούρους καρπούς να επηρεάζονται λιγότερο. Η μεταγραφωμική ανάλυση έδειξε πως τα γονίδια που κωδικοποιούν τα ένζυμα *CHS*, *CHI*, *F3H* και *F3'H* ήταν υπερεκφρασμένα στους ανοιχτόχρωμους καρπούς υπό την επίδραση φωτός.

Ακόμη, μεταγραφωμική ανάλυση σε φυτά που εκτέθηκαν σε χαμηλή θερμοκρασία έδειξε ότι 7 ορθόλογα γονίδια *PAL* και 3 γονίδια *C4H* ήταν υπερεκφρασμένα σε σχέση

με αντίστοιχες συνθήκες χωρίς καταπόνηση. Εκτός από αυτά, αυξημένη έκφραση σε συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας εμφάνισαν και ορθόλογα των γονιδίων *F3'H*, *DFR*, *ANS*, *UGT75C1* και διάφοροι μεταγραφικοί παράγοντες *MYB* (Dai et al., 2022). Σημαντική καταπόνηση με επιπτώσεις στην ανάπτυξη ενός φυτού αποτελεί η οξειδωτική καταπόνηση, που προκαλείται από την παρουσία ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) μέσα στο κύτταρο. Στο καστανό ρύζι (*Oryza sativa* L.) βρέθηκε το γονίδιο *OsC1*, ένας τύπος R2R3 μεταγραφικού παράγοντα, ο οποίος ρυθμίζει τη σύνθεση ανθοκυανών και, αφού υπερεκφράστηκε σε φυτά λευκού ρυζιού, διαπιστώθηκε ότι τα διαγονιδιακά φυτά είχαν χαμηλότερα ποσοστά ROS και μικρότερη καταστροφή των μεμβρανών (Uradhyaya et al., 2021). Ο ίδιος μεταγραφικός παράγοντας *C1* βρέθηκε να ενεργοποιεί την παραγωγή φλαβονοειδών και στο καλαμπόκι (*Zea mays*) (Fang et al., 2023).

Οι ανθοκυανίνες συχνά είναι άφθονες και στα καλλωπιστικά φυτά, δίνοντας τους τα ιδιαίτερα χρώματα που έχουν, έτσι η βιοσύνθεσή τους έχει μελετηθεί και σε κάποια από αυτά τα είδη. Σε έρευνα των Li et al. (2022) στο καλλωπιστικό φυτό *Alternanthera bettzickiana*, επίσης, εκτός από την ανθεκτικότητα στις χαμηλές θερμοκρασίες γίνεται και μια συσχέτιση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας με τη συσσώρευση ανθοκυανών. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι στους φαινότυπους που συσσωρεύτηκαν ανθοκυανίνες στα φύλλα τα επίπεδα χλωροφύλλης ήταν χαμηλότερα, συνεπώς ήταν μειωμένη και η φωτοσυνθετική δραστηριότητα. Στους βολβούς του υβριδίου “Siberia” του γένους *Lillium* βρέθηκαν 19 διαφορετικά εκφραζόμενοι μεταγραφικοί παράγοντες *MYB*, μεταξύ των οποίων και ο *LhMYB114*, ο οποίος ήταν ο μόνος που εμπλέκεται στη συσσώρευση ανθοκυανών (Fang et al., 2023).

Η συσσώρευση ανθοκυανών έχει παρατηρηθεί και σε άλλα αρωματικά φυτά, όπως το κινέζικο τσάι. Η ποικιλία “Zijuan” (*Camellia sinensis* var. *assamica*) εμφανίζει μωβ φύλλα, λόγω της συσσώρευσης ανθοκυανών και το χαρακτηριστικό αυτό οδήγησε στην περαιτέρω μελέτη του μηχανισμού που οδηγεί στην παραγωγή ανθοκυανών. Η μελέτη αυτή προκάλεσε ενδιαφέρον, επειδή το κινέζικο τσάι έχει σημαντική εμπορική αξία, αλλά και οι ανθοκυανίνες με την αντιοξειδωτική τους δράση επηρεάζουν σημαντικές φυσιολογικές διαδικασίες αν καταναλωθούν. Η μεταγραφωμική ανάλυση έδειξε ότι δύο ορθόλογα *ANS* γονίδια ήταν σημαντικά υπερεκφρασμένα στην ποικιλία Zijuan, ενώ το ίδιο αποδείχτηκε έπειτα από διεξαγωγή RT-qPCR. Ακόμη, υπεκεφρασμένο βρέθηκε το γονίδιο που κωδικοποιεί το θετικό ρυθμιστή-μεταγραφικό παράγοντα του *CsANS*, το γονίδιο *CsANI*, της οικογένειας *MYB* (Huang et al., 2022). Οι Zhong et al. (2021), επίσης, μετά από μεταγραφωμική και μεταβολομική ανάλυση στον κόκκινο εξωτερικό φλοιό του μεταλλάγματος “Gantong 1” και στον φυσιολογικό φαινότυπο με πράσινο φλοιό του αρωματικού φυτού *Cinnamomum camphora* διαπίστωσαν την ύπαρξη διαφορετικά εκφραζόμενων γονιδίων, εκ των οποίων 11 ήταν γονίδια που εμπλέκονται άμεσα στην παραγωγή ανθοκυανών, 6 ήταν μεταγραφικοί παράγοντες και 12 ήταν γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα που συμμετέχουν στη μεταφορά των ανθοκυανών στο κύτταρο.

Επιπρόσθετα, διαγονιδιακά φυτά *Nicotiana benthaminana* με το γονίδιο *AmMYB10*, το οποίο εμφάνισε αυξημένη έκφραση σε κάρπους *Aronia melanocarpa*, παρουσίαζαν μικρή παραγωγή ανθοκυανών, αποδεικνύοντας πως ο μεταγραφικός παράγοντας *MYB10* λειτουργεί ως θετικός ρυθμιστής της συσσώρευσης ανθοκυανών (Mahoney et al., 2022).

Με βάση τα αποτελέσματα της RT-qPCR της παρούσας εργασίας, αποδεικνύεται πως μεταξύ των ερυθρόβρακτων και πράσινων-«φυσιολογικών» φαινότυπων πως η συσσώρευση ανθοκυανών όπως προσδιορίστηκε με μεταβολομική ανάλυση

αποδίδεται στην υπερέκφραση των γονιδίων *DFR*, *ANS* και *UFGT*, τα οποία αποτελούν και τα γονίδια-κλειδιά για τη βιοσύνθεσή τους. Τα γονίδια κλωνοποιήθηκαν επιτυχώς σε φορείς, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό των ζυμών, όπως έχει αναφερθεί, ωστόσο, ο λειτουργικός χαρακτηρισμός τους δεν ήταν αρχικά εφικτός. Αυτό μπορεί να οφείλεται πιθανά είτε σε μη ενεργότητα του ενζύμου που παράγεται είτε στις συνθήκες έκφρασής τους. Γενικότερα, η απώλεια ενεργότητας προκαλείται από μεταλλάξεις σε γονιδιακές περιοχές που κωδικοποιούν το αντίστοιχο ένζυμο και οδηγούν σε αλλαγή αμινοξέων, με αποτέλεσμα να αλλάζει η δομή της πρωτεΐνης και η αλληλουχία των αμινοξέων. Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης των γονιδίων του σιδερίτη εμφάνισαν μικρό ποσοστό λαθών στο «διάβασμα» του ενθέματος στο φορέα, παρόλα αυτά τα «λάθη» αυτά ίσως οδηγούν σε διαφορετικό ένζυμο.

Μια άλλη βασική παράμετρος για τη σωστή γονιδιακή έκφραση είναι η δράση των μεταγραφικών παραγόντων. Οι μεταγραφικοί παράγοντες είναι ένζυμα που επιτρέπουν ή απαγορεύουν την έκφραση ενός γονιδίου, συνήθως με κάποια σύνδεσή τους στον υποκινητή του γονιδίου-ενδιαφέροντος. Άρα, μπορούν να είναι είτε θετικοί ρυθμιστές της έκφρασης μιας γονιδιακής περιοχής είτε αρνητικοί ρυθμιστές. Οι μεταγραφικοί παράγοντες που ρυθμίζουν το βιοσυνθετικό μονοπάτι των φλαβονοειδών και των ανθοκυανών χωρίζονται στις ομάδες WRKY, MYB και bHLH κατά κύριο λόγο, οι οποίοι δημιουργούν και σύμπλοκα μεταξύ τους. Συνεπώς, στην παρούσα περίπτωση που δεν ανιχνεύθηκε ενεργότητα των ενζύμων στις ζύμες, παρά το γεγονός ότι τα γονίδια κλωνοποιήθηκαν επιτυχώς, μπορεί να σχετίζεται με την έκφραση ή τη μη έκφραση ενός μεταγραφικού παράγοντα. Οι πιο κοινοί μεταγραφικοί παράγοντες που έχουν βρεθεί στην υπάρχουσα βιβλιογραφία να εμπλέκονται σε βιοσυνθετικά μονοπάτια σε φαρμακευτικά φυτά της οικογένειας Lamiales, όπως ο σιδερίτης, είναι οι MYB και οι bHLH. Άρα, σε περαιτέρω έρευνα απαιτείται η μελέτη της έκφρασης συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων, είτε θετικών είτε αρνητικών ρυθμιστών των γονιδίων, ανατρέχοντας σε προηγούμενη βιβλιογραφία.

Τα ερυθρόβρακτα φυτά *S. raeseri* ήταν ανεπιθύμητα στην αγορά από τους καταναλωτές, λόγω της εμφάνισης των κόκκινων και καφέ αποχρώσεων που προσδίδουν οι ανθοκυανίνες. Εφόσον έχουν εντοπιστεί τα γονίδια που κατά κύριο λόγο ευθύνονται για τη σύνθεση ανθοκυανών στα βράκτια του *S. raeseri*, ο τελικός στόχος είναι η βελτίωση των ερυθρόβρακτων φαινοτύπων προς πράσινα, με σκοπό να αυξηθεί η εμπορική τους αξία. Αυτό θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί μελλοντικά με την ανάπτυξη κάποιων μοριακών δεικτών για το κάθε γονίδιο, ώστε να εντοπίζεται το «ανεπιθύμητο» χαρακτηριστικό σε αρχικά ακόμη στάδια μιας καλλιέργειας (πχ από την προμήθεια πολλαπλασιαστικού υλικού) και να αποφεύγονται φυτά τα οποία μεταγενέστερα θα εμφανίσουν ένα τέτοιο ανεπιθύμητο φαινότυπο.

Ωστόσο, η κατανάλωση διαφόρων τροφίμων και σκευασμάτων πλούσια σε ανθοκυανίνες έχουν σημαντικά οφέλη προς την υγεία του ανθρώπου, όπως έχει ήδη αναφερθεί. Μεταξύ άλλων, έχουν αντιοξειδωτικό χαρακτήρα και επουλωτική δράση στο δέρμα, που είναι τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά τους. Συνεπώς, η βελτιωτική προσέγγιση στον ερυθρόβρακτο σιδερίτη είναι ένα αμφιλεγόμενο θέμα που έχει διαφορετική «κατεύθυνση» ανάλογα με τον αρχικό στόχο. Δηλαδή, μια διαφορετική βελτιωτική προσέγγιση που δεν αποσκοπεί στην αύξηση της εμπορικής σημασίας είναι η αξιοποίηση των ερυθρόβρακτων φαινοτύπων προς άμεση κατανάλωση με τη μορφή αφεψήματος ή με τη χρήση τους σε σκευάσματα καλλυντικών. Αυτό, φυσικά, προϋποθέτει την ενημέρωση του καταναλωτικού κοινού σχετικά με την κατανάλωση ανθοκυανών, την απορρόφησή τους και τα θετικά οφέλη τους στην υγεία, αλλά και την παραπάνω έρευνα γύρω από τους λόγους που προσδίδουν στο φυτό αυτό το χαρακτηριστικό. Η «αιφνίδια» παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών στα φυτά

συνήθως σχετίζεται με την παρουσία κάποιας καταπόνησης στις συνθήκες καλλιέργειας, όπως αυξημένη αλατότητα, ξηρασία ή αλλαγές στην διαθέσιμη ποσότητα του νερού. Συμπερασματικά, μεταξύ άλλων, σε συνέχεια της παρούσας εργασίας είναι σημαντικό να μελετηθεί και η αιτία που ωθεί το φυτό να συνθέσει ανθοκυανίνες, είτε είναι κάποιος βιοτικός ή κάποιος αβιοτικός παράγοντας κι αν είναι σκόπιμη η επιβολή μιας ήπιας καταπόνησης με στόχο την παραγωγή επιθυμητών δευτερογενών μεταβολιτών.

Βιβλιογραφία

- Ahn, J. H., Kim, J. S., Kim, S., Soh, H. Y., Shin, H., Jang, H., Ryu, J. H., Kim, A., Yun, K. Y., Kim, S., Kim, K. S., Choi, D., & Huh, J. H. (2015). De novo transcriptome analysis to identify anthocyanin biosynthesis genes responsible for tissue-specific pigmentation in zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.). *PLoS ONE*, *10*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124497>
- Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., Chinou, I. B., Mitakou, S., Gikas, E., & Tsiaropoulos, A. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of five taxa of *Sideritis* from Greece. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(2), 811–815. <https://doi.org/10.1021/jf001018w>
- Aneva, I., Zhelev, P., Kozuharova, E., Danova, K., Nabavi, S. F., & Behzad, S. (2019). Genus *Sideritis*, section *Empedoclia* in southeastern Europe and Turkey – studies in ethnopharmacology and recent progress of biological activities. In *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences* (Vol. 27, Issue 1, pp. 407–421). Springer. <https://doi.org/10.1007/s40199-019-00261-8>
- Barber, J. C., Francisco-Ortega, J., Santos-Guerra, A., Turner, K. G., & Jansen, R. K. (n.d.). *Origin of Macaronesian Sideritis L. (Lamioideae: Lamiaceae) inferred from nuclear and chloroplast sequence datasets*. www.academicpress.com
- BARUT, M., NADEEM, M. A., AKGÜR, Ö., TANSI, L. S., AASIM, M., ALTAf, M. T., & BALOCH, F. S. (2022). Medicinal and aromatic plants in the omics era: application of plant breeding and biotechnology for plant secondary metabolite production. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, *46*(2), 182–203. <https://doi.org/10.55730/1300-011x.2970>
- Carmona, L., Alquézar, B., Marques, V. V., & Peña, L. (2017). Anthocyanin biosynthesis and accumulation in blood oranges during postharvest storage at different low temperatures. *Food Chemistry*, *237*, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.076>
- Chaves-Silva, S., Santos, A. L. dos, Chalfun-Júnior, A., Zhao, J., Peres, L. E. P., & Benedito, V. A. (2018b). Understanding the genetic regulation of anthocyanin biosynthesis in plants – Tools for breeding purple varieties of fruits and vegetables. In *Phytochemistry* (Vol. 153, pp. 11–27). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.05.013>
- Cheminal, A., Kokkoris, I. P., Zotos, A., Strid, A., & Dimopoulos, P. (2022). Assessing the Ecosystem Services Potential of Endemic Floras: A Systematic Review on the Greek Endemics of Peloponnese. In *Sustainability (Switzerland)* (Vol. 14, Issue 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/su14105926>
- Chen, L., Hu, B., Qin, Y., Hu, G., & Zhao, J. (2019). Advance of the negative regulation of anthocyanin biosynthesis by MYB transcription factors. In *Plant Physiology and Biochemistry* (Vol. 136, pp. 178–187). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.01.024>
- Chrzanowski, G. (2020). *Saccharomyces cerevisiae*—an interesting producer of bioactive plant polyphenolic metabolites. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 19, pp. 1–18). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21197343>
- Cong, L., Qu, Y., Sha, G., Zhang, S., Ma, Y., Chen, M., Zhai, R., Yang, C., Xu, L., & Wang, Z. (2021). PbWRKY75 promotes anthocyanin synthesis by

- activating PbDFR, PbUFGT, and PbMYB10b in pear. *Physiologia Plantarum*, *173*(4), 1841–1849. <https://doi.org/10.1111/ppl.13525>
- Dai, Y., Zhang, L., Sun, X., Li, F., Zhang, S., Zhang, H., Li, G., Fang, Z., Sun, R., Hou, X., & Zhang, S. (2022). Transcriptome analysis reveals anthocyanin regulation in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.) at low temperatures. *Scientific Reports*, *12*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10106-1>
 - Di Giacomo, S., Di Sotto, A., Angelis, A., Percaccio, E., Vitalone, A., Gulli, M., Macone, A., Axiotis, E., & Skaltsounis, A. L. (2022). Phytochemical Composition and Cytoprotective Properties of the Endemic *Sideritis sipylea* Boiss Greek Species: A Valorization Study. *Pharmaceuticals*, *15*(8). <https://doi.org/10.3390/ph15080987>
 - Dong, Y., Wu, X., Han, L., Bian, J., He, C., El-Omar, E., Gong, L., & Wang, M. (2022). The Potential Roles of Dietary Anthocyanins in Inhibiting Vascular Endothelial Cell Senescence and Preventing Cardiovascular Diseases. In *Nutrients* (Vol. 14, Issue 14). MDPI. <https://doi.org/10.3390/nu14142836>
 - Dudareva, N., Pichersky, E., & Gershenzon, J. (2004). Biochemistry of plant volatiles. In *Plant Physiology* (Vol. 135, Issue 4, pp. 1893–1902). American Society of Plant Biologists. <https://doi.org/10.1104/pp.104.049981>
 - Dülgeroğlu, C., & Unal, O. (2017b). *A preliminary intra phylogeny of the genus Sideritis by morphology International Journal of Agriculture and Environmental Research A PRELIMINARY INTRA PHYLOGENY OF THE GENUS SIDERITIS BY MORPHOLOGY*. www.ijaer.in
 - Falcone Ferreyra, M. L., Rius, S. P., & Casati, P. (2012). Flavonoids: Biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 3, Issue SEP). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00222>
 - Fang, S., Lin, M., Ali, M. M., Zheng, Y., Yi, X., Wang, S., Chen, F., & Lin, Z. (2023). LhANS-rr1, LhDFR, and LhMYB114 Regulate Anthocyanin Biosynthesis in Flower Buds of *Lilium* ‘Siberia.’ *Genes*, *14*(3). <https://doi.org/10.3390/genes14030559>
 - Gabrieli, C. N., Kefalas, P. G., & Kokkalou, E. L. (2005). Antioxidant activity of flavonoids from *Sideritis raeseri*. *Journal of Ethnopharmacology*, *96*(3), 423–428. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.09.031>
 - González-Burgos, E., Carretero, M. E., & Gómez-Serranillos, M. P. (2011a). *Sideritis* spp.: Uses, chemical composition and pharmacological activities - A review. In *Journal of Ethnopharmacology* (Vol. 135, Issue 2, pp. 209–225). <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.03.014>
 - Grdiša, M., Radosavljević, I., Liber, Z., Stefkov, G., Ralli, P., Chatzopoulou, P. S., Carović-Stanko, K., & Šatović, Z. (2019). Divergent selection and genetic structure of *Sideritis scardica* populations from southern Balkan Peninsula as revealed by AFLP fingerprinting. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49097-x>
 - Gu, K. Di, Wang, C. K., Hu, D. G., & Hao, Y. J. (2019b). How do anthocyanins paint our horticultural products? In *Scientia Horticulturae* (Vol. 249, pp. 257–262). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.01.034>
 - Huang, F., Duan, J., Lei, Y., Kang, Y., Luo, Y., Chen, Y., Ding, D., & Li, S. (2022). Metabolomic and transcriptomic analyses reveal a MYB gene, CsAN1, involved in anthocyanins accumulation separation in F1 between ‘Zijuan’ (*Camellia sinensis* var. *assamica*) and ‘Fudingdabaicha’ (*C. sinensis* var.

sinensis) tea plants. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1008588>

- Irakli, M., Tsifodimou, K., Sarrou, E., & Chatzopoulou, P. (2018). Optimization infusions conditions for improving phenolic content and antioxidant activity in *Sideritis scardica* tea using response surface methodology. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 8, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2017.12.001>
- Kalivas, A., Ganopoulos, I., Xanthopoulou, A., Chatzopoulou, P., Tsaftaris, A., & Madesis, P. (2014). DNA barcode ITS2 coupled with high resolution melting (HRM) analysis for taxonomic identification of *Sideritis* species growing in Greece. *Molecular Biology Reports*, 41(8), 5147–5155. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3381-5>
- Kanak, S., Krzemińska, B., Celiński, R., Bakalczuk, M., & dos Santos Szewczyk, K. (2022). Phenolic Composition and Antioxidant Activity of *Alchemilla* Species. In *Plants* (Vol. 11, Issue 20). MDPI. <https://doi.org/10.3390/plants11202709>
- Khan, I. A., Cao, K., Guo, J., Li, Y., Wang, Q., Yang, X., Wu, J., Fang, W., & Wang, L. (2022). Identification of key gene networks controlling anthocyanin biosynthesis in peach flower. *Plant Science*, 316. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2021.111151>
- Knörle, R. (2012). Extracts of *Sideritis scardica* as triple monoamine reuptake inhibitors. *Journal of Neural Transmission*, 119(12), 1477–1482. <https://doi.org/10.1007/s00702-012-0824-9>
- Kougioumoutzis, K., Papanikolaou, A., Kokkoris, I. P., Strid, A., Dimopoulos, P., & Panitsa, M. (2022). Climate Change Impacts and Extinction Risk Assessment of *Nepeta* Representatives (Lamiaceae) in Greece. *Sustainability (Switzerland)*, 14(7). <https://doi.org/10.3390/su14074269>
- Kumar, J., & Gupta, P. K. (2008). Molecular approaches for improvement of medicinal and aromatic plants. In *Plant Biotechnology Reports* (Vol. 2, Issue 2, pp. 93–112). <https://doi.org/10.1007/s11816-008-0059-2>
- Liu, W., Feng, Y., Yu, S., Fan, Z., Li, X., Li, J., & Yin, H. (2021). The flavonoid biosynthesis network in plants. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 23). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms222312824>
- Ma, Z., Du, B., Li, J., Yang, Y., & Zhu, F. (2021). An insight into anti-inflammatory activities and inflammation related diseases of anthocyanins: A review of both in vivo and in vitro investigations. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 20). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms222011076>
- Mahoney, J. D., Wang, S., Iorio, L. A., Wegrzyn, J. L., Dorris, M., Martin, D., Bolling, B. W., Brand, M. H., & Wang, H. (2022). De novo assembly of a fruit transcriptome set identifies AmMYB10 as a key regulator of anthocyanin biosynthesis in *Aronia melanocarpa*. *BMC Plant Biology*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03518-8>
- Mannino, G., Gentile, C., Ertani, A., Serio, G., & Berteà, C. M. (2021). Anthocyanins: Biosynthesis, distribution, ecological role, and use of biostimulants to increase their content in plant foods—a review. In *Agriculture (Switzerland)* (Vol. 11, Issue 3, pp. 1–25). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/agriculture11030212>

- Mohammed, H. A., & Khan, R. A. (2022). Anthocyanins: Traditional Uses, Structural and Functional Variations, Approaches to Increase Yields and Products' Quality, Hepatoprotection, Liver Longevity, and Commercial Products. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23042149>
- Mssillou, I., Bakour, M., Slighoua, M., Laaroussi, H., Saghrouchni, H., Ez-Zahra Amrati, F., Lyoussi, B., & Derwich, E. (2022). Investigation on wound healing effect of Mediterranean medicinal plants and some related phenolic compounds: A review. In *Journal of Ethnopharmacology* (Vol. 298). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115663>
- Niazian, M. (2019b). Application of genetics and biotechnology for improving medicinal plants. In *Planta* (Vol. 249, Issue 4, pp. 953–973). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03099-1>
- Nistor, M., Pop, R., Daescu, A., Pinte, A., Socaciu, C., & Rugina, D. (2022b). Anthocyanins as Key Phytochemicals Acting for the Prevention of Metabolic Diseases: An Overview. In *Molecules* (Vol. 27, Issue 13). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules27134254>
- Patelou, E., Chatzopoulou, P., Polidoros, A. N., & Mylona, P. V. (2020). Genetic diversity and structure of *Sideritis raeseri* Boiss. & Heldr. (Lamiaceae) wild populations from Balkan Peninsula. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 16. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2020.100241>
- Pombo, M. A., Martínez, G. A., & Civello, P. M. (2011). Cloning of FaPAL6 gene from strawberry fruit and characterization of its expression and enzymatic activity in two cultivars with different anthocyanin accumulation. *Plant Science*, 181(2), 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.04.012>
- Rahim, M. A., Busatto, N., & Trainotti, L. (2014). Regulation of anthocyanin biosynthesis in peach fruits. *Planta*, 240(5), 913–929. <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2078-2>
- Rodriguez-Mateos, A., Vauzour, D., Krueger, C. G., Shanmuganayagam, D., Reed, J., Calani, L., Mena, P., Del Rio, D., & Crozier, A. (2014a). Bioavailability, bioactivity and impact on health of dietary flavonoids and related compounds: an update. In *Archives of Toxicology* (Vol. 88, Issue 10, pp. 1803–1853). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1330-7>
- Rodriguez-Mateos, A., Vauzour, D., Krueger, C. G., Shanmuganayagam, D., Reed, J., Calani, L., Mena, P., Del Rio, D., & Crozier, A. (2014b). Bioavailability, bioactivity and impact on health of dietary flavonoids and related compounds: an update. In *Archives of Toxicology* (Vol. 88, Issue 10, pp. 1803–1853). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1330-7>
- Romanucci, V., Di Fabio, G., D'Alonzo, D., Guaragna, A., Scapagnini, G., & Zarrelli, A. (2017). Traditional uses, chemical composition and biological activities of *Sideritis raeseri* Boiss. & Heldr. In *Journal of the Science of Food and Agriculture* (Vol. 97, Issue 2, pp. 373–383). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7867>
- Saito, K., Yonekura-Sakakibara, K., Nakabayashi, R., Higashi, Y., Yamazaki, M., Tohge, T., & Fernie, A. R. (2013). The flavonoid biosynthetic pathway in *Arabidopsis*: Structural and genetic diversity. In *Plant Physiology and Biochemistry* (Vol. 72, pp. 21–34). <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.02.001>

- Sarrou, E., Doukidou, L., Avramidou, E. v., Martens, S., Angeli, A., Stagiopoulou, R., Fyllas, N. M., Tourvas, N., Abraham, E., Maloupa, E., Nianiou-Obeidat, I., Ganopoulos, I., & Krigas, N. (2022). Chemodiversity is closely linked to genetic and environmental diversity: Insights into the endangered populations of the local endemic plant *Sideritis euboea* Heldr. of Evia Island (Greece). *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 100426. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2022.100426>
- Slika, H., Mansour, H., Wehbe, N., Nasser, S. A., Iratni, R., Nasrallah, G., Shaito, A., Ghaddar, T., Kobeissy, F., & Eid, A. H. (2022). Therapeutic potential of flavonoids in cancer: ROS-mediated mechanisms. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 146). Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112442>
- Solomou, A. D., Martinos, K., Skoufogianni, E., & Danalatos, N. G. (2016). Medicinal and Aromatic Plants Diversity in Greece and Their Future Prospects: A Review. *Agricultural Science*, 4(1), 9–20. <https://doi.org/10.12735/as.v4i1p09>
- Sunil, L., & Shetty, N. P. (2022b). Biosynthesis and regulation of anthocyanin pathway genes. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 106, Issues 5–6, pp. 1783–1798). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11835-z>
- Tanaka, Y., Sasaki, N., & Ohmiya, A. (2008a). Biosynthesis of plant pigments: Anthocyanins, betalains and carotenoids. In *Plant Journal* (Vol. 54, Issue 4, pp. 733–749). <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03447.x>
- Todorova, M., & Trendafilova, A. (2014). *Sideritis scardica* Griseb., an endemic species of Balkan peninsula: Traditional uses, cultivation, chemical composition, biological activity. In *Journal of Ethnopharmacology* (Vol. 152, Issue 2, pp. 256–265). <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.01.022>
- Upadhyaya, G., Das, A., & Ray, S. (2021). A rice R2R3-MYB (OsC1) transcriptional regulator improves oxidative stress tolerance by modulating anthocyanin biosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 173(4), 2334–2349. <https://doi.org/10.1111/ppl.13583>
- Valchev, H., & Kozuharova, E. (2022). IN SITU AND EX SITU INVESTIGATIONS ON BREEDING SYSTEMS AND POLLINATION OF *SIDERITIS SCARDICA* GRISEB. (LAMIACEAE) IN BULGARIA. *Comptes Rendus de L'Academie Bulgare Des Sciences*, 75(4), 527–535. <https://doi.org/10.7546/CRABS.2022.04.07>
- Vasilev, N. (2022). Medicinal Plants: Guests and Hosts in the Heterologous Expression of High-Value Products. In *Planta Medica* (Vol. 88, Issue 13, pp. 1175–1189). Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/a-1576-4148>
- Vasilopoulou, C. G., Kontogianni, V. G., Linardaki, Z. I., Iatrou, G., Lamari, F. N., Nerantzaki, A. A., Gerothanassis, I. P., Tzakos, A. G., & Margarity, M. (2013). Phytochemical composition of “mountain tea” from *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina* and evaluation of its behavioral and oxidant/antioxidant effects on adult mice. *European Journal of Nutrition*, 52(1), 107–116. <https://doi.org/10.1007/s00394-011-0292-2>
- Wang, Y., Chen, S., & Yu, O. (2011). Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 91, Issue 4, pp. 949–956). <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3449-2>

- Yang, C. Q., Fang, X., Wu, X. M., Mao, Y. B., Wang, L. J., & Chen, X. Y. (2012a). Transcriptional Regulation of Plant Secondary Metabolism. *Journal of Integrative Plant Biology*, 54(10), 703–712. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2012.01161.x>
- Yang, C. Q., Fang, X., Wu, X. M., Mao, Y. B., Wang, L. J., & Chen, X. Y. (2012b). Transcriptional Regulation of Plant Secondary Metabolism. *Journal of Integrative Plant Biology*, 54(10), 703–712. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2012.01161.x>
- Yang, F., Cai, J., Yang, Y., & Liu, Z. (2013). Overexpression of microRNA828 reduces anthocyanin accumulation in Arabidopsis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 115(2), 159–167. <https://doi.org/10.1007/s11240-013-0349-4>
- Yang, L., Yang, Y., Huang, L., Cui, X., & Liu, Y. (2022). From single- to multi-omics: future research trends in medicinal plants. *Briefings in Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bib/bbac485>
- Zhang, A., Yang, H., Ji, S., Tian, C., Chen, N., Gong, H., & Li, J. (2022). Metabolome and Transcriptome Analyses of Anthocyanin Accumulation Mechanisms Reveal Metabolite Variations and Key Candidate Genes Involved in the Pigmentation of Prunus tomentosa Thunb. Cherry Fruit. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.938908>
- Zhao, X., Yuan, Z., Feng, L., & Fang, Y. (2015). Cloning and expression of anthocyanin biosynthetic genes in red and white pomegranate. *Journal of Plant Research*, 128(4), 687–696. <https://doi.org/10.1007/s10265-015-0717-8>
- Zhao, X., Zhang, Y., Long, T., Wang, S., & Yang, J. (2022). Regulation Mechanism of Plant Pigments Biosynthesis: Anthocyanins, Carotenoids, and Betalains. In *Metabolites* (Vol. 12, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/metabo12090871>
- Żyżelewicz, D., Kulbat-Warycha, K., Oracz, J., & Żyżelewicz, K. (2020a). Polyphenols and other bioactive compounds of sideritis plants and their potential biological activity. In *Molecules* (Vol. 25, Issue 16). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules25163763>