



ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ  
ΙΔΡΥΜΑ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΟΠΩΡΟΚΗΠΕΥΤΙΚΩΝ-ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΤΗΣ ΖΩΗΣ ΜΠΑΤΗ**

**ΤΙΤΛΟΣ:**

**ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ: ΒΕΛΤΙΩΣΗ  
ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ DNA ΣΤΟ ΦΥΤΟ  
*PISTACIA LENTISCUS* &  
ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΓΙΑ ΤΗ ΜΑΖΙΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ  
ΤΩΝ ΑΓΡΙΟΓΑΡΥΦΑΛΛΩΝ *DIANTHUS SP.***

**ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:**

**Δρ. ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΤΣΟΚΤΟΥΡΙΔΗΣ  
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΣΥΝΕΡΓΑΤΗΣ**

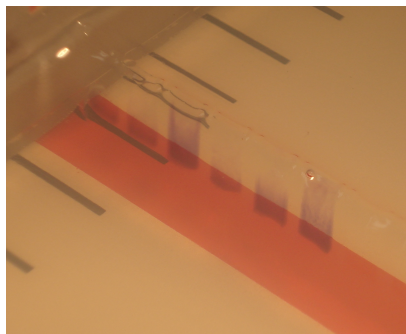
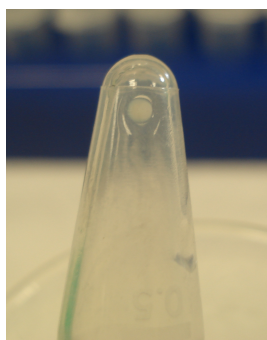
**ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ  
ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2009**



**ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ  
ΙΔΡΥΜΑ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΟΠΩΡΟΚΗΠΕΥΤΙΚΩΝ-ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ**

**ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ: ΒΕΛΤΙΩΣΗ  
ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ DNA ΣΤΟ ΦΥΤΟ  
*PISTACIA LENTISCUS* &  
ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΓΙΑ ΤΗ ΜΑΖΙΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ  
ΤΩΝ ΑΓΡΙΟΓΑΡΥΦΑΛΛΩΝ *DIANTHUS* SP.**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ  
ΤΗΣ ΖΩΗΣ ΜΠΑΤΗ**



**ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:  
Δρ. ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΤΣΟΚΤΟΥΡΙΔΗΣ  
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΣΥΝΕΡΓΑΤΗΣ**

Η υποβολή της Πτυχιακής Διατριβής αποτελεί μέρος των απαιτήσεων για την απονομή του Πτυχίου στο Τμήμα Φυτικής Παραγωγής, της Σχολής Τεχνολογίας Γεωπονίας, του Αλεξάνδρειου Τεχνολογικού Ιδρύματος Θεσσαλονίκης

**ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ  
ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2009**

**ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Με την ολοκλήρωση της πτυχιακής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας (ΕΘΙΑΓΕ), και συγκεκριμένα το Εργαστήριο Προστασίας και Αξιοποίησης Αυτοφύων και Ανθοκομικών Ειδών του Βαλκανικού Βοτανικού Κήπου Κρουσίων (Β.Β.Κ.Κ.) και ιδιαίτερα τη Δρ. Ελένη Μαλούπα που με δέχτηκε να κάνω την πρακτική μου εξάσκηση και την πτυχιακή μου διατριβή στο συγκεκριμένο εργαστήριο και όλο το προσωπικό του τμήματος αυτού. Το υλικό που χρησιμοποιήθηκε στο πειραματικό σκέλος έχει παραχωρηθεί εξ' ολοκλήρου από το εργαστήριο αυτό, καθώς και όλα τα υλικά. Επίσης, θα ήθελα να τους ευχαριστήσω για τη διάθεση των εργαστηρίων για την πραγματοποίηση αυτής της πτυχιακής μου διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω το Δρ. Τσοκτουρίδη Γεώργιο για τη συνεχή του βοήθεια στην πραγματοποίηση αυτής της εργασίας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την συμφοιτήτρια και φίλη μου Μαρία Δρίτσα για την βοήθεια της στην εκπόνηση αυτής της εργασίας καθώς και για την συμπαράσταση της.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου γιατί χωρίς τη βοήθεια και την υπομονή τους δεν θα μπορούσα να τελειώσω την διατριβή μου καθώς και για τη στήριξη σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι τεχνικές της βιοτεχνολογίας που ασχολείται η πτυχιακή εργασία είναι η απομόνωση DNA και η ιστοκαλλιέργεια. Η μέθοδος απομόνωσης DNA πραγματοποιήθηκε στο φυτό σχίνο (*Pistacia lentiscus*), βασίζεται στην παρουσία των αντιδραστηρίων EDTA, CTAB, NaCl, Activated Charcoal, PVP και Tris-HCl. Χρησιμοποιήθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις τους για βρεθούν οι κατάλληλες που θα παράγουν τη μεγαλύτερη ποσότητα και την καλύτερη ποιότητα DNA. Οι διάφορες συγκεντρώσεις είναι για το CTAB 70, 50, 40 και 30mM, για το NaCl 1,3, 1,5, 1,7, 1,9, 2 και 2,5M, για το PVP 50 και 25mg/250mg φυτικού ιστού σχίνου και για το Activated Charcoal 0 και 7,5mg/ml buffer. Ο καλύτερος συνδυασμός αποδείχθηκαν οι ποσότητες: EDTA 20mM, CTAB 50mM, NaCl 1,7M, PVP 50mg/250mg φυτικού ιστού χωρίς την προσθήκη του Activated Charcoal.

Η μέθοδος της ιστοκαλλιέργειας εφαρμόστηκε σε αγριογαρύφαλλα της ελληνικής χλωρίδας. Εγκαταστάθηκαν μοσχεύματα φυτών που κόπηκαν από φυτά που βρίσκονται στις μητρικές φυτείες και πολλαπλασιάστηκαν *in vitro*, με τελικό στόχο να αναπτυχθούν πλήρως και να μεταφερθούν στις τελικές τους θέσεις.

<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b>	<b>iii</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>iv</b>
<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b>	<b>v</b>
<b>ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ</b>	<b>viii</b>
<b>ΛΙΣΤΑ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ</b>	<b>ix</b>
<b>ΛΙΣΤΑ ΕΙΚΟΝΩΝ</b>	<b>x</b>
<b>ΛΙΣΤΑ ΠΙΝΑΚΩΝ</b>	<b>xiv</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ</b>	<b>1</b>
<b>ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA</b>	
<b>ΑΠΟ ΦΥΤΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥΣ ΣΧΙΝΟΥ</b>	
<b>(<i>Pistacia lentiscus</i>)</b>	
<b>1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>2</b>
<b>1.1.1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ</b>	<b>5</b>
<b>1.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>6</b>
<b>1.2.1. ΕΠΙΛΟΓΗ ΦΥΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ</b>	<b>6</b>
<b>1.2.2. ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ</b>	<b>6</b>
<b>ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΚΑΤΑ ΤΗ</b>	
<b>ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ</b>	
<b>1.2.3. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ</b>	<b>8</b>
<b>ΤΟΥ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA</b>	
<b>1.2.4. ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA</b>	<b>10</b>
<b>1.2.4.1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΗΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ</b>	<b>10</b>
<b>1.2.4.2. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ</b>	<b>11</b>
<b>ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ</b>	
<b>1.2.4.3. ΨΗΦΙΑΚΗ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ</b>	<b>13</b>
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΜΕΣΩ</b>	
<b>ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ UV ΚΑΙ ΤΟΥ</b>	
<b>ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΥ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟΥ</b>	
<b>ΛΟΓΙΣΜΙΚΟΥ</b>	
<b>1.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>15</b>
<b>1.3.1. ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA</b>	<b>15</b>
<b>ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΗΝ ΚΛΙΜΑΚΑ λDNA</b>	

1.3.2.	ΕΠΙΔΡΑΣΗ NaCl ΣΤΗΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗ DNA ΑΠΟ ΦΥΛΛΑ ΣΧΙΝΟΥ ( <i>Pistacia lentiscus</i> )	17
1.3.3.	ΕΠΙΔΡΑΣΗ CTAB ΣΤΗΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗ DNA ΑΠΟ ΦΥΛΛΑ ΣΧΙΝΟΥ ( <i>Pistacia lentiscus</i> )	18
1.3.4.	ΕΠΙΔΡΑΣΗ PVP ΣΤΗΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗ DNA ΑΠΟ ΦΥΛΛΑ ΣΧΙΝΟΥ ( <i>Pistacia lentiscus</i> )	19
1.3.5.	ΕΠΙΔΡΑΣΗ Activated Charcoal ΣΤΗΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗ DNA ΑΠΟ ΦΥΛΛΑ ΣΧΙΝΟΥ ( <i>Pistacia lentiscus</i> )	20
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ</b>		<b>22</b>
<b>ΑΓΡΙΟΓΑΡΥΦΑΛΛΩΝ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΧΛΩΡΙΔΑΣ</b>		
2.1.	<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>23</b>
2.1.1.	<b>ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΦΥΤΙΚΩΝ ΙΣΤΩΝ</b>	<b>23</b>
2.1.2.	<b>ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΟ ΓΑΡΥΦΑΛΛΟ</b>	<b>25</b>
2.1.3.	<b>ΒΟΤΑΝΙΚΟΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΕΣ</b>	<b>26</b>
2.1.4.	<b>ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ</b>	<b>27</b>
2.2.	<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>28</b>
2.2.1.	<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ</b>	<b>28</b>
2.2.2.	<b>ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ</b>	<b>29</b>
2.2.3.	<b>ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΚΦΥΤΩΝ ΚΑΙ ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗ</b>	<b>31</b>
2.2.4.	<b>ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΡΑΠΕΖΑΣ ΝΗΜΑΤΙΚΗΣ ΡΟΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ</b>	<b>32</b>
2.3.	<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>34</b>

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3</b>	<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	<b>38</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4</b>	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>40</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5</b>	<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ</b>	<b>43</b>

**ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ**

**CTAB:** βρωμίδιο του εξακετυλ-τριμεθυλ-αμμωνίου

**DDW:** νερό μοριακής ποιότητας χωρίς ίχνη DNA και RNA

**DNA:** Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ

**EDTA:** Ethylenediaminetetraacetic acid

**EtOH:** Αιθανόλη

**M:** Μοριακότητα

**NaCl:** Χλωριούχο Νάτριο

**PVP:** πολύ-βυνιλ-πυρολιδώνιο

**RNA:** Ριβονουκλεϊκό οξύ

**rpm:** περιστροφές ανά λεπτό

**SDS:** Sodium Dodecyl Sulphate

**TAE:** Tris/Acetic Acid/EDTA

**UV:** Υπεριώδη Ακτινοβολία

**°C:** Βαθμοί Κελσίου



## ΛΙΣΤΑ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

<b>Γράφημα 1.3.1.</b> Επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων NaCl στην ποσότητα του DNA που απομονώνεται κατά την εκχύλιση φύλλων σχίνου ( <i>Pistacia lentiscus</i> ).	<b>17</b>
<b>Γράφημα 1.3.2.</b> Επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων CTAB στην ποσότητα του DNA που απομονώνεται κατά την εκχύλιση φύλλων σχίνου ( <i>Pistacia lentiscus</i> ).	<b>19</b>
<b>Γράφημα 1.3.3.</b> Επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων PVP στην ποσότητα του DNA που απομονώνεται κατά την εκχύλιση φύλλων σχίνου ( <i>Pistacia lentiscus</i> ).	<b>20</b>
<b>Γράφημα 1.3.4.</b> Επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων Activated Charcoal στην ποσότητα του DNA που απομονώνεται κατά την εκχύλιση φύλλων σχίνου ( <i>Pistacia lentiscus</i> ).	<b>21</b>

## ΛΙΣΤΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

- Εικόνα 1.3.1.** :Ποσοτικοποίηση γενωμικού DNA. Τα δείγματα σε ποσότητες 5μl, 10μl και 15μl από το stock DNA απομονώθηκαν με τη διαδικασία της εκχύλισης και διαχωρίζονται από την ηλεκτροφόρηση μέσω πηκτής αγαρόζης 0,7% σε 1 x TAE. Γνωστές ποσότητες από λDNA (40, 60, 80, 100 και 150ng) και 1kb ladder (δείγμα L) χωρίστηκαν παράλληλα. Η συγκέντρωση του DNA των δειγμάτων P, Π, Ο, Ξ εκτιμήθηκε σε σύγκριση με την ένταση από τα δείγματα του λDNA και τη ζώνη του 1kb. **15**
- Εικόνα 2.1.1** Διάγραμμα απεικόνισης τρόπων αναπαραγωγής φυτών με ιστοκαλλιέργεια (Χατζόπουλος 2004) **24**
- Εικόνα 2.3.1.** Φυτά του γένους *Dianthus* στο θάλαμο ανάπτυξης των 22°C που πολλαπλασιάστηκαν με τη διαδικασία της ιστοκαλλιέργειας. **35**
- Εικόνα 2.3.2.** Τελάρο πολλαπλών θέσεων στο οποία φυτεύονται φυτά του γένους *Dianthus* που έχουν αναπτυχθεί με τη διαδικασία της ιστοκαλλιέργειας και τοποθετείται στη υδρονέφωση. **35**
- Εικόνα 2.3.3.** Μολύνσεις από βακτήρια και μύκητες σε καλλιέργειες του γένους *Dianthus* με τη διαδικασία της ιστοκαλλιέργειας. **36**
- Εικόνα 2.3.4.** Μητρικές φυτείες φυτών του γένους *Diathus*. **37**
- Εικόνα 5.1.** Καθαρά γουδιά πορσελάνης που θα χρησιμοποιηθούν για την ομογενοποίηση φυτικών ιστών του σχίνου (*Pistacia lentiscus*), PVP και Buffer εκχύλισης DNA. **44**
- Εικόνα 5.2.** Ζυγαριά ακριβείας με 4 δεκαδικά ψηφία για τη μέτρηση των 250mg φυτικών ιστών του σχίνου (*Pistacia lentiscus*), PVP και Activated Charcoal. **44**
- Εικόνα 5.3.** Γουδιά πορσελάνης με PVP και φυτικό ιστό του φυτού *Pistacia lentiscus* (250mg) έτοιμα για την προσθήκη του Buffer εκχύλισης DNA και ομογενοποίηση. **45**
- Εικόνα 5.4.** Ομογενοποίηση φυτικού ιστού του φυτού *Pistacia* **45**

<i>lenticus</i> , PVP και Buffer εκχύλισης DNA σε γουδιά πορσελάνης.	
<b>Εικόνα 5.5.</b> Επώαση δειγμάτων σε υδατόλουτρο για 2 ώρες στους 46	
55°C ± 2°C με ανακίνηση κάθε 15 λεπτά.	
<b>Εικόνα 5.6.</b> Μηχανική πιπέτα τύπου Gilson για τη μεταφορά 46	
διαλυμάτων και αντιδραστηρίων	
<b>Εικόνα 5.7.</b> Φυγόκεντρος 24 θέσεων για μικροφιαλίδια των 1,5μl 47	
και 2μl που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό διαλυμάτων	
εκχύλισης DNA.	
<b>Εικόνα 5.8.</b> Φάσεις διαχωρισμού υπερκειμένου όταν δε 48	
χρησιμοποιείται Activated Charcoal στο Buffer εκχύλισης DNA.	
<b>Εικόνα 5.9.</b> Φάσεις διαχωρισμού υπερκειμένου όταν 48	
χρησιμοποιείται Activated Charcoal Buffer εκχύλισης DNA	
<b>Εικόνα 5.10.</b> Δείγματα όπου έγινε η προσθήκη 2-propanol για 1 49	
ώρα σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να δημιουργηθεί το άσπρο	
ίζημα του DNA.	
<b>Εικόνα 5.11.</b> Άσπρο ίζημα σε μικροφιαλίδιο αφού έχει ξεπλυθεί με 49	
διάλυμα αιθανόλης 70%.	
<b>Εικόνα 5.12.</b> Επιτραπέζια ηλεκτροφόρηση τμημάτων DNA σε 50	
πηκτική αγαρόζης.	
<b>Εικόνα 5.13.</b> Τοποθέτηση δειγμάτων DNA στις συγκεντρώσεις των 50	
5μl,10μl και 15μl σε πηκτική αγαρόζης, μέσα σε επιτραπέζια	
ηλεκτροφόρηση	
<b>Εικόνα 5.14.</b> Τροφοδοτικό παροχής ηλεκτρισμού σε 51	
μεταβαλλόμενη τάση για τη λειτουργία της επιτραπέζιας	
ηλεκτροφόρησης.	
<b>Εικόνα 5.15.</b> Υγρός κλίβανος για την αποστείρωση του θρεπτικού 52	
υποστρώματος που είναι τοποθετημένο στα βαζάκια.	
<b>Εικόνα 5.16</b> Τράπεζα εργασίας που χρησιμοποιήθηκε για την 52	
ιστοκαλλιέργεια αγριογαρυφάλλων.	
<b>Εικόνα 5.17.</b> Επιτραπέζιος αποστειρωτής ξηρού τύπου που 53	
χρησιμοποιήθηκε για την αποστείρωση των εργαλείων κατά τη	
διαδικασία της ιστοκαλλιέργειας αγριογαρυφάλλων η οποία	
βρίσκεται μέσα στην τράπεζα εργασίας.	

- Εικόνα 5.18.** Ξηρός κλίβανος που χρησιμοποιήθηκε για την αποστείρωση μικροεργαλείων, γυαλικών κ.ά. αντικειμένων που χρησιμοποιούνται στην ιστοκαλλιέργεια. 54
- Εικόνα 5.19.** pHμετρο για τη μέτρηση της οξύτητας του θρεπτικού υποστρώματος. 54
- Εικόνα 5.21.** Ζυγαριά αναλογική για τη ζύγιση των συστατικών που χρησιμοποιούνται στο θρεπτικό υπόστρωμα. 55
- Εικόνα 5.20.** Θερμική εστία και Μαγνητικός αναδευτήρας για τη παρασκευή του θρεπτικού υποστρώματος. 55
- Εικόνα 5.22.** Μοσχεύματα από φυτά του γένους *Dianthus* τα οποία προορίζονται για εγκατάσταση με τη διαδικασία της ιστοκαλλιέργειας. 56
- Εικόνα 5.23.** Καθαρισμός μοσχευμάτων αμέσως μετά την κοπή για την απομάκρυνση χωμάτων. 56
- Εικόνα 5.24.** Απολύμανση των μοσχευμάτων με διάλυμα χλωρίνης 20% με τη βοήθεια του μαγνητικού αναδευτήρα. 57
- Εικόνα 5.25.** Καθαρισμός μοσχευμάτων με απεσταγμένο νερό μέσα στην τράπεζα εργασίας από τη χλωρίνη μετά τη διαδικασία της απολύμανσης με ανακίνηση για 1 λεπτό. 57
- Εικόνα 5.26.** Βαζάκια με θρεπτικό υπόστρωμα στα οποία θα τοποθετηθούν τα μοσχεύματα. 58

## ΛΙΣΤΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

<b>Πίνακας 1.2.1.</b> Χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων	7
<b>Πίνακας 1.2.2.</b> Εργαστηριακές συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων	8
<b>Πίνακας 1.3.1.</b> Αποτελέσματα πειραμάτων εκχύλισης DNA από φύλλα του φυτού σχίνος ( <i>Pistacia lentiscus</i> ) χρησιμοποιώντας διάφορες συγκεντρώσεις NaCl, CTAB, PVP και Activated Charcoal. Η στήλη με το κίτρινο φόντο δείχνει τις ποσότητες του DNA που εκχυλίστηκε στους διάφορους συνδυασμούς αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν.	16
<b>Πίνακας 2.2.1.</b> Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος και κατά την εργασία στην τράπεζα	28
<b>Πίνακας 2.2.2.</b> Συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή και κατά την εργασία στην τράπεζα	29

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Δημιουργία πρωτόκολλου απομόνωσης

γενωμικού DNA

από φυτικούς ιστούς σχίνου (*Pistacia lentiscus*)

## 1.1. Εισαγωγή

Τις τελευταίες δεκαετίες έχει σημειωθεί αυξανόμενο ενδιαφέρον στο πεδίο της Μοριακής Βιολογίας. Ωστόσο, η Μοριακή Βιολογία των φυτών είναι σε δυσμενέστερη θέση από εκείνη των ζώων. Η αιτία είναι ότι η απομόνωση γενετικού υλικού (DNA) από φυτά δυσχεραίνεται λόγω της σύστασης του κυτταρικού τοιχώματος των φυτικών κυττάρων και των δευτερογενών μεταβολιτών που περιέχουν ορισμένα από αυτά. Καθώς πρωταρχικό βήμα για οποιοδήποτε μοριακό χειρισμό αποτελεί η απομόνωση DNA, η εύρεση μιας μεθόδου που να απομονώνει DNA καλής ποιότητας και ποσότητας από όλα σχεδόν τα είδη φυτών αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

Το πιο συχνό πρόβλημα που συναντάτε σε όλες σχεδόν τις διαδικασίες απομόνωσης DNA είναι η παρουσία ανεπιθύμητων ουσιών στο τελικό δείγμα. Τέτοιες ουσίες είναι οι δευτερογενείς μεταβολίτες, οι πρωτεΐνες και το RNA.

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι μια μεγάλη, ποικίλη τάξη οργανικών ενώσεων που παράγουν τα φυτά, οι οποίες εμφανίζονται να μην έχουν άμεση λειτουργική δράση στην αύξηση και την ανάπτυξη, ενώ έχουν περιορισμένη και ανομοιογενή κατανομή στο φυτικό βασίλειο. Μπορούν να διαιρεθούν σε τρεις χημικά διακριτές ομάδες: τα τερπένια, τις φαινολικές ενώσεις και τις αζωτούχες ενώσεις (Varma *et al.*, 2007; Τσέκος, 2004).

Τα τερπένια συντίθενται από το ακετυλο-συνένζυμο Α ή από βασικές ενδιάμεσες ενώσεις της γλυκοσυλίωσης και λόγω της λιπιδιακής τους φύσης είναι αδιάλυτα στο νερό. Αποτελούν συστατικό των αιθέριων

ελαίων και των ρητινών, ενώ λειτουργούν και ως αντιφυτοφάγα αμυντικά συστατικά.

Οι φαινολικές ενώσεις είναι οι ουσίες που περιέχουν μια φαινολική ομάδα (μια υδροξυλική λειτουργική ομάδα επάνω σε έναν αρωματικό δακτύλιο) και μπορεί να διαλύονται σε οργανικούς ή ανόργανους διαλύτες ή ακόμα να είναι αδιάλυτες. Συντίθενται διαμέσου της διαδρομής του σικιμικού οξέος ή της διαδρομής του μηλονικού οξέος και έχουν επίσης αμυντικό ρόλο. Κατά τη λύση του κυττάρου, οι φαινόλες βγαίνουν από τα χυμοτόπια και οξειδώνονται από τις κυτταρικές οξειδάσες. Οι οξειδωμένες πολυφαινόλες υποβάλλονται σε μη αντιστρεπτές αντιδράσεις με τα νουκλεϊκά οξέα και προκαλούν ενζυμική αμαύρωση στο DNA υποβαθμίζοντάς το σε χαμηλά επίπεδα ποιότητας για τις περισσότερες μοριακές διαδικασίες χρησιμοποίησής τους. Για την αντιμετώπιση του προβλήματος της επιμόλυνσης του DNA με φαινόλες, προστίθενται αντιοξειδωτικά αντιδραστήρια στο buffer απομόνωσης για να αποφευχθεί η οξείδωση των φαινολών κατά τη λύση του κυττάρου. Τα πιο κοινά χρησιμοποιούμενα χημικά αντιδραστήρια για το σκοπό αυτό είναι το PVP και το PVPP, τα οποία δρουν σχηματίζοντας πολυμερή μέσω δεσμών υδρογόνου με τα φαινολικά συστατικά ξεχωρίζοντας έτσι τις φαινόλες από το DNA.

Οι αζωτούχες ενώσεις βιοσυντίθενται κατά κύριο λόγο από τα αμινοξέα και στη χημική τους δομή έχουν άζωτο. Οι πιο γνωστές αζωτούχες ενώσεις είναι τα αλκαλοειδή, τα οποία είναι υδατοδιαλυτά (Varma *et al.*, 2007; Τσέκος, 2004).

Οι πολυσακχαρίτες αποτελούν ίσως τους κορυφαίους παρεμβολείς στη διαδικασία απομόνωσης του DNA καθώς είναι δύσκολο να απομακρυνθούν. Ως πολυσακχαρίτες χαρακτηρίζονται οι



υδατάνθρακες που έχουν πάνω από δέκα μονάδες μονοσακχαριτών. Οι πιο συνηθισμένοι πολυσακχαρίτες που απαντούν στη φύση έχουν μεγάλο μοριακό βάρος και το μόριό τους αποτελείται από εκατοντάδες ή χιλιάδες μόρια μονοσακχαριτών. Η παρουσία υψηλών επιπέδων πολυσακχαριτών, κάνει το ομογενοποίηση του ιστού πολύ υδαρές και δίνει μια λάθος ένδειξη παρουσίας υψηλών ποσών DNA. Οι πολυσακχαρίτες, συχνά, κατακρημνίζονται μαζί με το DNA προσδίδοντάς του μια κολλώδη, ιξώδη υφή. Το DNA που είναι επιμολυσμένο με πολυσακχαρίτες, έχει την τάση να κολλάει στα πηγαδάκια κατά την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Για την απομάκρυνση των πολυσακχαριτών και την αντιμετώπιση αυτών των προβλημάτων προτείνεται η χρήση διαλυμάτων NaCl υψηλών συγκεντρώσεων (πάνω από 0,5M), τα οποία απομακρύνουν τους πολυσακχαρίτες αυξάνοντας τη διαλυτότητά τους στην EtOH. Ο συνδυασμός διαλύματος NaCl με το κατιονικό απορρυπαντικό CTAB έχει επίσης αποδειχτεί ευεργετικός στην απομόνωση DNA από φυτά πλούσια σε πολυσακχαρίτες. Το CTAB βοηθάει στην κατακρήμνιση του DNA σχηματίζοντας ένα σύμπλεγμα μαζί του σε ένα περιβάλλον χαμηλής ιονικής ισχύος, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις αλατιού σχηματίζει αδιάλυτα συμπλέγματα με τις πρωτεΐνες και τους περισσότερους όξινους πολυσακχαρίτες αφήνοντας στο διάλυμα τα νουκλεϊκά οξέα, τα οποία μετά μπορούν εύκολα να απομονωθούν (Varma *et al.*, 2007: Μπόσκου, 2004).

Ένα από το ποσό πρωτεϊνών και RNA μπορεί να κατακρημνιστεί μαζί με το DNA. Συνήθως, το RNA καθαρίζεται με τη χρήση RNAσών ενώ οι πρωτεΐνες απομακρύνονται με τη χρήση χημικών όπως SDS, DTT και μερκαπτοαιθανόλη ή πρωτεασών. Οι συμβατικές πρωτεΐνες μπορούν να απομακρυνθούν με οργανικούς διαλύτες όπως το χλωροφόρμιο και τη φαινόλη. Στην περίπτωση

αυτή, το κύριο μειονέκτημα είναι οι καυστικές και τοξικές ιδιότητες των ουσιών αυτών (Varma *et al.*, 2007).

Εκτός των μη επιθυμητών ουσιών που παρουσιάστηκαν πιο πάνω, το χλωροπλαστικό και το μιτοχονδριακό DNA θεωρούνται επίσης ανεπιθύμητοι παράγοντες σε μερικές μοριακές βιολογικές εφαρμογές, όπως η δημιουργία γονιδιωματικής βιβλιοθήκης, στην οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο καθαρό χρωμοσωμικό DNA. Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος πριν την απομόνωση DNA μπορεί να προηγηθεί απομόνωση των πυρήνων (Varma *et al.*, 2007).

### 1.1.1 Σκοπός της πτυχιακής εργασίας

Η ακόλουθη πτυχιακή εργασία έχει ως αντικείμενο δύο τεχνικές της βιοτεχνολογίας: την απομόνωση DNA από φυτικούς ιστούς και την ιστοκαλλιέργεια. Ο σκοπός κυρίως είναι η εκμάθηση των τεχνικών αυτών, οι οποίες είναι χρονοβόρες για έναν ερευνητή και μπορεί να αποτελέσουν το αντικείμενο ενός παρασκευαστή εργαστηρίων, και τη σωστή χρήση διάφορων συσκευών και εργαλείων που χρησιμοποιούνται στη βιοτεχνολογία.

Με τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για την απομόνωση DNA έγινε προσπάθεια να βρεθεί ο καλύτερος συνδυασμός συγκεντρώσεων των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται ώστε να δίνουν μεγάλη ποσότητα και καλή ποιότητα DNA.

Με τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για την ιστοκαλλιέργεια παρατηρήθηκε η διαδικασία μαζικής παραγωγής φυτών απαλλαγμένα από παθογόνους οργανισμούς και ο *in vivo* εγκλιματισμός τους στο θερμοκήπιο και μητρικές φυτείες.

## 1.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 1.2.1 Επιλογή φυτικού υλικού

Οι φυτικοί ιστοί ήταν που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονταν από το φυτό σχίνου (*Pistacia lentiscus*) και ήταν ώριμα φύλλα. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν κατά τους μήνες Οκτώβριο ως Μάιο. Συγκεκριμένα, επιλέγονταν φύλλα με βαθύ πράσινο χρώμα και χρησιμοποιούνταν σε χρόνο λιγότερο από 30 λεπτά από τη συγκομιδή τους. Τα φύλλα χρησιμοποιήθηκαν ως πηγή για απομόνωση DNA επειδή κατά κανόνα είναι ευρέως και σχεδόν πάντοτε διαθέσιμα. Το φυτικό υλικό στο σύνολό του συλλέχθηκε από ένα θάμνο σχίνου που υπήρχε κοντά στο εργαστήριο.

### 1.2.2 Χημικά αντιδραστήρια και εργαστηριακές συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων απομόνωσης του DNA και ποσοτικοποίησής του, χρησιμοποιήθηκαν διάφορα χημικά αντιδραστήρια και εργαστηριακές συσκευές, οι οποίες εξοπλίζουν τα εργαστήρια Μοριακής Βιολογίας. Στους Πίνακες 1.2.1. και 1.2.2. συνοψίζονται τα πλήρη στοιχεία του κάθε αντιδραστηρίου, καθώς και η προέλευση αυτών, όπως επίσης και οι τύποι και προέλευση όλων των εργαστηριακών συσκευών. Περισσότερα στοιχεία ή λεπτομέρειες που τυχόν απαιτούνται για το καθένα από αυτά, είναι διαθέσιμα στον αντίστοιχο κωδικό της κάθε εταιρίας.

**Πίνακας 1.2.1.** Χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων

<b>Χημικά Αντιδραστήρια</b>	<b>Εταιρία</b>	<b>Κωδικός</b>
PVP-40 [Poly(vinylpyrrolidone)]	SIGMA	#P6755-100G
NaCl (Sodium chloride)	FLUKA	#71376
EDTA	BIORAD	#161-0729
Tris-HCl (Tris hydrochloride)	INVITROGEN	#15568-025
Activated Charcoal (Ενεργός άνθρακας)	SIGMA	#C6289-500G
Chloroform:Isoamyl alcohol 24:1	SIGMA	#C0549-IQT
Αιθανόλη 100% (Ethanol absolute)	CARLO ERDA	#4146082
Ισοπροπανόλη (2 – Propanol)	FLUKA	#59304
Βρωμιούχο εθίδιο (Ethidium bromide-solution (0,07%))	APPLICHEM	#A2273,0005
TAE (50x) Buffer (2M Tris, 1M Acetic acid, 50mM EDTA, pH 8,5)	ALTERCHEM	#T00012
<u>Loading Dye</u> 1% SDS Sodium Dodecyl Sulphate 1gr 50% Glycerol Sigma Ultra 0,05% Bromophenol Blue	SIGMA	#132363.1207 #G6279-IL #B0126
CTAB (Hexadecyl trimethylammonium bromide, for molecular biology, approx. 99%)	SIGMA	#6269-250G
Αγαρόζη (Agarose)	BIORAD	#161-3102
λDNA	TAKAPA	#3010

**Πίνακας 1.2.2.** Εργαστηριακές συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

Όνομα	Εταιρία	Μοντέλο
Υδατόλουτρο	WB-M5	#610.1005.15
Φυγόκεντρος	EPPENDORF AE	22331 Hamburg #5424
Vortex	SNIJDERS	#34524
Σύστημα φωτογράφισης UV- System	MINI BIS PRO (DNR)	#24-25-PR
Ηλεκτροφόρηση	HORIZON	#11.14 (24x1,5/20ml)
Μηχανικές πιπέτες	Τύπου GILSON	P-2, P-20, P-200, P- 1000, P-5000

### 1.2.3 Περιγραφή διαδικασίας απομόνωσης του γενωμικού DNA

Πλένονται καλά τα γουδιά πορσελάνης (Εικόνα 5.1.). Ρυθμίζεται το υδατόλουτρο στους  $55^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Γίνεται μέτρηση (Εικόνα 5.2.) στη ζυγαριά ακριβείας 250mg φυτικού ιστού και 50 ή 25mg PVP (Εικόνα 5.3.) και προσθέτονται σε κάθε ένα γουδί. Σε πειράματα που χρησιμοποιείται Activated Charcoal ζυγίζεται 7,5mg/ml στο κάθε buffer. Στην παρασκευή του buffer χρησιμοποιούνται τα αντιδραστήρια CTAB, NaCl, Tris-HCl, EDTA και προστίθεται DDW σε συγκεκριμένες για το κάθε πείραμα ποσότητες. Προσθέτονται σε κάθε γουδί 3ml buffer με την πιπέτα (Εικόνα 5.6.). Ακολουθεί ομογενοποίηση (Εικόνα 5.4.) και στη συνέχεια προσθέτονται επιπλέον 3ml buffer. Το περιεχόμενο από το κάθε γουδί μεταφέρεται σε 3 μικροφιαλίδια (tube τύπου erpendorf των 2ml) όταν χρησιμοποιείται ενεργός άνθρακας ή σε φιαλίδια (τύπου Falcon των 15ml) όταν δε χρησιμοποιείται. Ακολουθεί επώαση στους  $55^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  για 2 ώρες με

ανάδευση κάθε 15 λεπτά (Εικόνα 5.5.). Μετά τη δίωρη επώαση, διατηρούνται τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.

Όταν χρησιμοποιείται ενεργός άνθρακας μεταφέρεται το υπερκείμενο σε ένα φιαλίδιο και γίνεται υπολογισμός του συνολικού υπερκειμένου. Αντίθετα όταν δεν έχει προστεθεί ενεργός άνθρακας στα δείγματα έχουν τοποθετηθεί από την προηγούμενη φάση σε φιαλίδια και γίνεται ο υπολογισμός του υπερκειμένου από την κλίμακα που αναγράφεται πάνω στο φιαλίδιο. Στη συνέχεια μεταφέρονται από 700μl σε 4 μικροφιαλίδια. Προσθέτονται σε κάθε μικροφιαλίδιο 700μl Chloroform : Isoamyl alcohol 24:1. (Εικόνες 5.8. και 5.9.) Έπειτα φυγοκεντρώνται (Εικόνα 5.7.) για 10 λεπτά στις 13.000rpm. Μεταφέρονται από 600μl υπερκειμένου σε 4 νέα μικροφιαλίδια των 1,5ml, προσθέτοντας 600μl Chloroform:Isoamyl alcohol 24:1 και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13.000rpm. Στη συνέχεια μεταφέρονται 400-500μl περίπου από το υπερκείμενο σε 4 νέα μικροφιαλίδια των 1,5ml προσθέτοντας 400-500μl Chloroform:Isoamyl alcohol 24:1. Γίνεται φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13.000rpm. Αν το υπερκείμενο είναι καθαρό μεταφέρονται περίπου 400μl σε κάθε ένα καινούργιο μικροφιαλίδιο προσθέτοντας 0,6 όγκους (Volumes) 2-propanol (μl υπερκειμένου x 0,6).

Αν το υπερκείμενο δεν είναι καθαρό προστίθεται χλωροφόρμιο ίδια ποσότητα με το υπερκείμενο και γίνεται φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13.000rpm, ακολουθώντας το στάδιο 2-propanol όπως περιγράφηκε παραπάνω. Τα μικροφιαλίδια των 1,5ml διατηρούνται πάνω στον εργαστηριακό πάγκο σε πλάγια θέση και θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα (Εικόνα 5.10.). Γίνεται φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13.000rpm. Στον κάτω μέρος του από το μικροφιαλίδιο δημιουργείται άσπρο ίζημα. Αφαιρείται προσεκτικά το υπερκείμενο ώστε να μείνει μόνο το ίζημα στο μικροφιαλίδιο. Προστίθεται 1 ml από

70% αιθανόλη σε κάθε μικροφιαλίδιο. Στη συνέχεια αναδεύεται το κάθε δείγμα στο Vortex για να καθαριστεί το ίζημα (Εικόνα 5.11) του DNA από τα άλατα των buffers και έπειτα γίνεται φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στις 13.000rpm. Αφαιρείται προσεκτικά το υπερκείμενο και τοποθετούνται τα μικροφιαλίδια με ανοιχτά τα καπάκια σε πλάγια θέση για 3-4 ώρες μέχρι να στεγνώσουν. Διαλύεται έπειτα το ίζημα DNA σε 50-200μl DDW. Αναδεύονται σύντομα τα δείγματα στο Vortex και στη συνέχεια από τη φυγόκεντρο (σύντομα ως τις 5.000rpm). Ενώνονται τα 4 μικροφιαλίδια σε 1 για κάθε δείγμα και τελευταία αποθηκεύεται το DNA στους -20°C.

#### **1.2.4 Ποσοτικοποίηση γενωμικού DNA**

Η γνώση της ποσότητας του DNA μετά από κάθε πείραμα είναι πολύ σημαντικό. Ο υπολογισμός του DNA γίνεται σε ng ανά μl, όταν είναι σε μικρές ποσότητες, και σε μg ανά μl, όταν είναι σε μεγαλύτερες.

##### **1.2.4.1 Παρασκευή πηκτής αγαρόζης**

Ρυθμίζεται το υδατόλουτρο στους 45°C περίπου. Ζυγίζεται η ποσότητα αγαρόζης σε gr που θα χρησιμοποιηθεί, σε απλή ζυγαριά (δύο δεκαδικών) και στη συνέχεια τοποθετείται σε κωνική φιάλη των 200ml. Γίνεται ογκομέτρηση 120ml Buffer (1 x TAE), μεταφέρονται στην κωνική φιάλη και γίνεται ανάδευση. Τοποθετείται η κωνική φιάλη στο φούρνο μικροκυμάτων για 1 με 2 λεπτά (με τακτική ανάδευση) ώσπου να λιώσει η αγαρόζη και να δημιουργηθούν φυσαλίδες. Στη συνέχεια μεταφέρεται στο υδατόλουτρο, αφού έχει σκεπαστεί με αλουμινόχαρτο, για 10-15 λεπτά.

Τοποθετείται σε έναν επίπεδο εργαστηριακό πάγκο το καλούπι που θα σχηματιστεί η ημίρρευστη πηκτή αγαρόζης (casting tray). Οι άκρες του casting tray κλείνουν με χαρτοταινία. Κατά την εξαγωγή της κωνικής φιάλης από το υδατόλουτρο προσθέτονται 3 σταγόνες βρωμιούχο εθίδιο για 120ml Buffer (1 σταγόνα για 50ml περίπου) και έπειτα γίνεται η ανάδευση αργά για να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες. Έπειτα μεταφέρεται στο casting tray, όπου τοποθετούνται τα χτένια που δημιουργούν τις θέσεις τοποθέτησης των δειγμάτων (πηγαδάκια) και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να πήξει για 10-15 λεπτά. Έπειτα, η πηκτή αγαρόζης μεταφέρεται στο ψυγείο, για 10-15 λεπτά, για να πήξει καλύτερα και για να μην στεγνώσει επικαλύπτεται η επιφάνειά του με λίγο Buffer (1 x TAE). Τέλος, το casting tray τοποθετείται στην ηλεκτροφόρηση που περιέχει Buffer (1 x TAE) για 3-5 λεπτά και στη συνέχεια απομακρύνονται πολύ προσεκτικά τα χτένια.

#### **1.2.4.2 Προετοιμασία δειγμάτων και ηλεκτροφόρηση**

Τα δείγματα βγαίνουν από τους  $-20^{\circ}\text{C}$  που είχαν αποθηκευτεί για να ξεπαγώσουν πρώτα και ακολουθεί η προετοιμασία των διαλύσεών τους σε διαλύσεις των 2x, 5x και 10x ανάλογα με το μέγεθος του ιζήματος DNA. Σε μεγάλα ιζήματα DNA η διάλυση γίνεται τουλάχιστον στις 10x.

Σε 2x διάλυση προσθέτονται σε ένα μικροφιαλίδιο :

10μl Loading Dye

15μl DDW

25μl stock DNA

Σύνολο: 50μl



Σε 5x διάλυση προσθέτονται σε ένα eppendorf tube :

16μl Loading Dye

40μl DDW

14μl stock DNA

Σύνολο: 70 μl

Σε 10x διάλυση προσθέτονται σε ένα eppendorf tube :

20 Loading Dye

70μl DDW

10μl stock DNA

Σύνολο: 100 μl

Αναδεύονται τα δείγματα χρησιμοποιώντας το Vortex και στη συνέχεια γίνεται spin down στη φυγόκεντρο (short ως τις 5000rpm). Γίνεται τοποθέτηση των δειγμάτων στις συγκεντρώσεις των 5, 10 και 15μl και τελευταία τοποθετείται και η κλίμακα σύγκρισης λDNA (5ng/μl) στις συγκεντρώσεις των 5, 10, 15 και 20μl (Εικόνα 5.13.) όπου αντιστοιχούν σε 25, 50, 75 και 100ng. Τίθεται σε λειτουργία η ηλεκτροφόρηση βάζοντας το μαύρο και το κόκκινο καλώδιο στις αντίστοιχες μαύρη και κόκκινη υποδοχές (Εικόνα 5.12. και 5.14.). Τα δείγματα διαχωρίζονται στην πηκτή αγαρόζης σε κατεύθυνση από τον αρνητικό πόλο προς το θετικό (επειδή το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο) για 30-40 λεπτά στα 120 περίπου Volt.

Τα νουκλεϊκά οξέα είναι αρνητικά φορτισμένα λόγω των φωσφορικών τους ομάδων με αποτέλεσμα να κινούνται προς τον θετικό πόλο κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης. Η τελευταία είναι ένας φυτικός πολυσακχαρίτης που παράγεται από θαλάσσια φύκια. Η πηκτή αυτή φέρει στο εσωτερικό της πόρους μεγέθους που εξαρτάται άμεσα από τη συγκέντρωση της αγαρόζης. Όσο χαμηλότερη είναι η συγκέντρωση της χρησιμοποιούμενης αγαρόζης τόσο

μεγαλύτερο είναι το μέγεθος των πόρων του σχηματιζόμενου πλέγματος (Salifoglou, 2008).

Το βρωμιούχο εθίδιο είναι μια φθορίζουσα χρωστική, η οποία παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA. Ο φθορισμός του συμπλέγματος χρωστικής DNA είναι πολύ μεγαλύτερος από αυτόν της μη δεσμευμένης χρωστικής. Η UV ακτινοβολία στα 254nm απορροφάτε από το DNA και μεταδίδεται στη χρωστική και η δεσμευμένη χρωστική με τη σειρά της απορροφά ακτινοβολία στα 302nm και τα 366nm. Αυτή η ενέργεια μεταδίδεται εκ νέου στα 590nm, στην ερυθρή – πορτοκαλί περιοχή του ορατού φάσματος.

Στην περίπτωση των πειραμάτων εκχυλίζοντας γενωμικό DNA από φυτά, τα νουκλεϊκά οξέα διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε μια πηκτή αγαρόζης 0,5–0,8% που περιέχει βρωμιούχο εθίδιο σε τελική συγκέντρωση 0,5mg/ml. Η ποσότητα του DNA μπορεί να εκτιμηθεί με σύγκριση του φθορισμού σειράς δειγμάτων γνωστών συγκεντρώσεων από καθορισμένες ποσότητες λDNA. Αυτό παρέχει ένα πολύ γρήγορο και ευαίσθητο μέσο εκτίμησης της συγκέντρωσης του νουκλεϊκού οξέος. Εκτός από την ποσοτικοποίηση, παρέχει το πλεονέκτημα της ανάλυσης της ποιότητας του παρασκευάσματος DNA (Hoisington *et al.*, 1994).

#### **1.2.4.3 Ψηφιακή καταγραφή αποτελεσμάτων μέσω συστήματος UV και του κατάλληλου ηλεκτρονικού λογισμικού**

Η ανάλυση της UV απορρόφησης από τα νουκλεοτίδια παρέχει μια απλή και ακριβή εκτίμηση της συγκέντρωσης των νουκλεϊκών οξέων σε ένα δείγμα. Οι πουρίνες και οι πυριμιδίνες στο νουκλεϊκό οξύ παρουσιάζουν μέγιστη απορρόφηση γύρω στα 260nm αν το δείγμα DNA είναι καθαρό και χωρίς αξιοσημείωτες επιμολύνσεις από

πρωτεΐνες ή οργανικούς διαλύτες. Η ακριβής ανάλυση του παρασκευάσματος DNA μπορεί να παρεμποδιστεί από την παρουσία προσμίξεων στο δείγμα ή αν το ποσό του DNA είναι πολύ μικρό. Στην εκτίμηση ολόκληρου του DNA, για παράδειγμα, η παρουσία RNA ή τεμαχισμένου DNA θα μπορούσε να παρεμποδίσει την ακριβή εκτίμηση του συνολικού υψηλού μοριακού βάρους γονιδιακού DNA (Hoisington *et al.*, 1994).

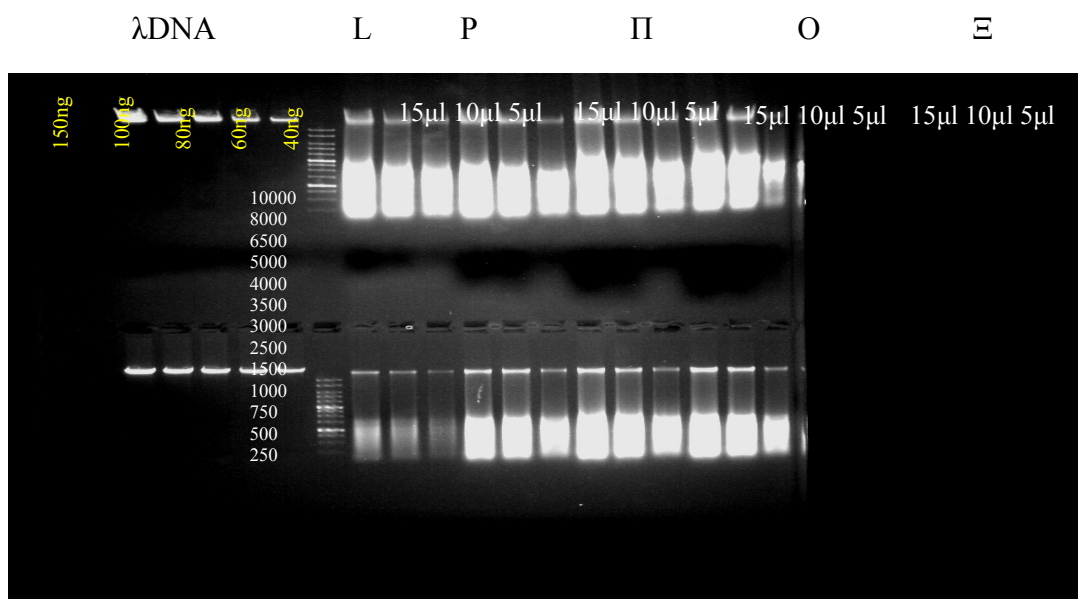
Μετά την ηλεκτροφόρηση η πηκτή αγαρόζης μεταφέρεται στο σύστημα φωτογράφισης UV που είναι συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή. Τίθεται σε λειτουργία η συσκευή. Με τη χρήση του προγράμματος GelCapture (DNR) μεταφέρονται οι εικόνες στον υπολογιστή. Με τις ρυθμίσεις Gain, Braidness και Exposure ρυθμίζεται η εικόνα της πηκτής αγαρόζης. Στο τέλος γίνεται αποθήκευση της εικόνας.

### 1.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στον Πίνακα 1.3.1. παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα των πειραμάτων για το σχίνο (*Pistacia lentiscus*), και στα Ιστογράμματα 1, 2, 3 και 4 απεικονίζονται με τη μορφή γραφήματος η επίδραση που έχουν στην εκχύλιση DNA το NaCl, CTAB, PVP και Activated Charcoal.

#### 1.3.1. Ποσοτικοποίηση γενωμικού DNA χρησιμοποιώντας την κλίμακα λDNA

Συγκρίνοντας κατά προσέγγιση το μέγεθος και την ένταση των ζωνών των δειγμάτων, το ποσό του DNA για το δείγμα P(10μl) ήταν 10ng, για το Π(15μl) 30ng, για το O(15μl) 40ng και για το Ξ(15μl) 50ng.



**Εικόνα 1.3.1.** Ποσοτικοποίηση γενωμικού DNA. Τα δείγματα σε ποσότητες 5μl, 10μl και 15μl από το stock DNA απομονώθηκαν με τη διαδικασία της εκχύλισης και διαχωρίζονται από την ηλεκτροφόρηση μέσω πηκτής αγαρόζης 0,7% σε 1 x TAE. Γνωστές ποσότητες από λDNA (40, 60, 80, 100 και 150ng) και 1kb ladder (δείγμα L) χωρίστηκαν παράλληλα. Η συγκέντρωση του DNA των δειγμάτων P, Π, O, Ξ εκτιμήθηκε σε σύγκριση με την ένταση από τα δείγματα του λDNA και τη ζώνη του 1kb.

Δείγμα	EDTA (mM)	CTAB (mM)	NaCl (M)	Activated Charcoal mg/ml buffer	PVP mg/250mg φυτικού ιστού	Tris-HCl (mM)	Ποσότητα Συνολικού Υπερκειμένου (ml)	Ποσότητα υπερκειμένου που εξετάστηκε	Συνολικός ποσότητα DNA (ng) στο συνολικό Υπερκειμένου του δείγματος	DNA (ng) / mg Φυτικού ιστού	Συνολική Ποσότητα DNA (ng)
A1	20	70	1,5	7,5	50	100	3,7	2,8	635	2,54	480
A2	20	70	1,5	7,5	50	100	3,4	2,8	972	3,9	800
B1	20	70	2	7,5	50	100	2,9	2,8	1243	4,9	1200
B2	20	70	2	7,5	50	100	3	2,8	1285	5,1	1200
Γ1	20	70	2,5	7,5	50	100	2,8	2,1	1400	5,6	1050
Γ2	20	50	2,5	7,5	50	100	2,9	2,8	1243	4,9	1200
Δ1	20	50	1,5	7,5	50	100	4,1	2,8	527	2,1	360
Δ2	20	50	1,5	7,5	50	100	4,1	2,8	746	2,9	510
E1	20	50	2	7,5	50	100	3,8	2,8	475	1,9	350
E2	20	50	2	7,5	50	100	3,8	2,8	475	1,9	350
Z1	20	50	2,5	7,5	50	100	3	2,8	385	1,54	360
Z2	20	50	2,5	7,5	50	100	3,1	2,8	387,5	1,55	360
H1	20	50	1,3	7,5	50	100	4	2,8	857	2,4	600
H2	20	50	1,3	7,5	50	100	3,8	2,8	1465,7	4,32	1080
Θ1	20	50	1,7	7,5	50	100	4	2,8	857	2,4	600
Θ2	20	50	1,7	7,5	50	100	4	2,8	2400	6,72	1680
Ι1	20	50	1,9	7,5	50	100	4	2,8	1200	3,36	840
Ι2	20	50	1,9	7,5	50	100	4	2,8	1200	3,36	840
K1	20	50	1,3	-	50	100	6	2,8	5060	20,24	2380
K2	20	50	1,3	-	50	100	6	2,8	7500	30,00	3500
Λ1	20	50	1,7	-	50	100	6	2,8	9000	36,00	4200
Λ2	20	50	1,7	-	50	100	6	2,8	2700	10,80	1260
M1	20	50	1,9	-	50	100	6	2,8	1500	6	700
M2	20	50	1,9	-	50	100	6	2,8	1500	6	700
Ε	20	50	1,7	-	25	100	6	2,8	1800	7,2	840
Ο	20	50	1,9	-	25	100	6	2,8	1500	6	700
Π	20	40	1,3	-	25	100	6	2,8	900	3,6	420
P	20	40	1,7	-	25	100	6	2,8	450	1,8	210
Σ	20	40	1,9	-	25	100	6	2,8	1800	7,2	840

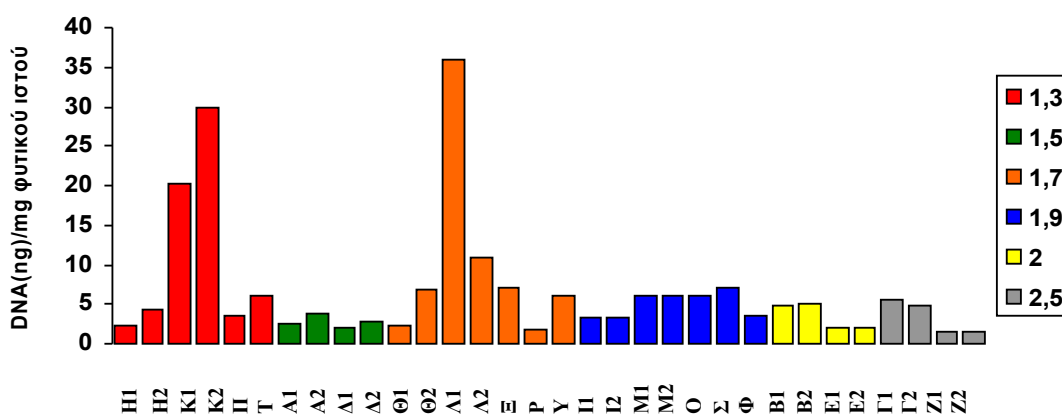
<b>T</b>	20	30	1,3	-	25	100	6	2,8	1500	6	700
<b>Y</b>	20	30	1,7	-	25	100	6	2,8	1500	6	700
<b>Φ</b>	20	30	1,9	-	25	100	6	2,8	900	3,6	420

**Πίνακας 1.3.1** Αποτελέσματα πειραμάτων εκχύλισης DNA από φύλλα του φυτού σχίνος (*Pistacia lentiscus*) χρησιμοποιώντας διάφορες συγκεντρώσεις NaCl, CTAB, PVP και Activated Charcoal. Η στήλη με το κίτρινο φόντο δείχνει τις ποσότητες του DNA που εκχυλίστηκε στους διάφορους συνδυασμούς αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν ανά mg φυτικού ιστού.

### 1.3.2. Επίδραση του NaCl στην εκχύλιση DNA από φύλλα σχίνου (*Pistacia lentiscus*)

Η επίδραση του NaCl στην απομόνωση DNA από φύλλα του φυτού σχίνος (*Pistacia lentiscus*) είναι εμφανής από τις μεγάλες διακυμάνσεις των αποτελεσμάτων όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.3.1. και στο Γράφημα 1.3.1.

Οι αυξημένες συγκεντρώσεις του NaCl άνω του 1.7M παράγουν πάρα πολύ μικρότερες ποσότητες γενωμικού DNA που μπορεί να απομονωθεί σε συνδυασμό με τα υπόλοιπα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν. Οι συγκεντρώσεις των 1.3M και 1.7M έδωσαν τις μεγαλύτερες ποσότητες DNA και πιο συγκεκριμένα οι συνδυασμοί των δειγμάτων K1, K2 (EDTA 20mM, CTAB 50mM, NaCl 1,3M, PVP 50mg, Tris HCL, 100mM), και Λ1 (EDTA 20mM, CTAB 50mM, NaCl 1,7M, PVP 50mg, Tris HCL, 100mM).



**Γράφημα 1.3.1.** Επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων NaCl στην ποσότητα του DNA που απομονώνεται κατά την εκχύλιση φύλλων σχίνου (*Pistacia lentiscus*).

Ωστόσο μπορεί να βελτιωθεί το πρωτόκολλο αυτό, εξετάζοντας περισσότερους συνδυασμούς συγκεντρώσεων NaCl σε σχέση φυσικά με τα υπόλοιπα αντιδραστήρια αλλά αυτό μπορεί να γίνει σε συνέχεια των πειραμάτων μελλοντικά.

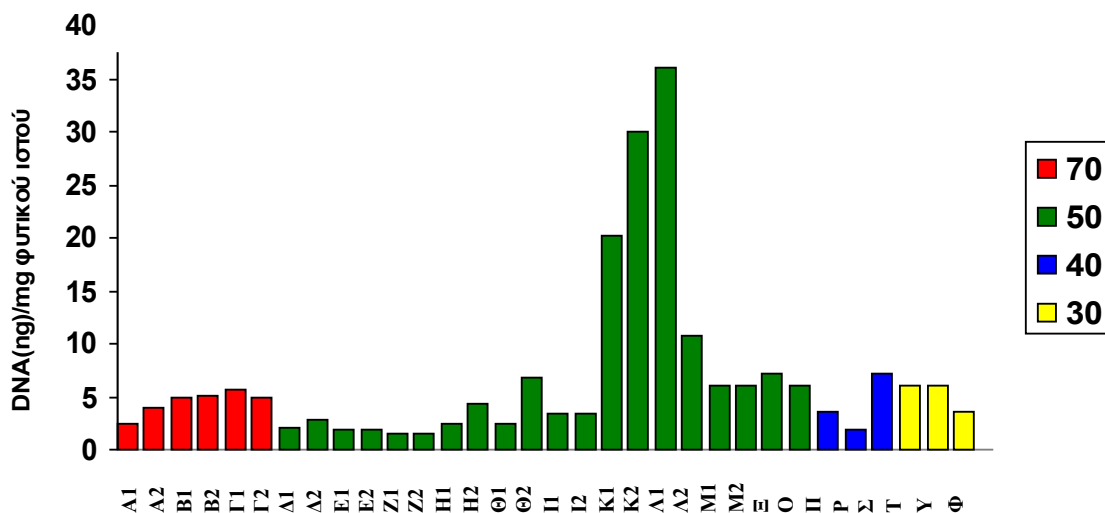
### **1.3.3. Επίδραση του CTAB στην εκχύλιση DNA από φύλλα σχίνου (*Pistacia lentiscus*)**

Η επίδραση του CTAB στην απομόνωση DNA από φύλλα του φυτού σχίνος (*Pistacia lentiscus*) είναι εμφανής από τις μεγάλες διακυμάνσεις των αποτελεσμάτων όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.3.1. και στο Γράφημα 1.3.2.

Οι αυξημένες συγκεντρώσεις του CTAB στα 70mM παράγουν μικρότερες ποσότητες DNA που μπορεί να απομονωθεί σε συνδυασμό με τα υπόλοιπα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν. Οι συγκεντρώσεις των 50mM έδωσαν τις μεγαλύτερες ποσότητες εκχύλισης DNA και πιο συγκεκριμένα οι συνδυασμοί των δειγμάτων K1, K2 (EDTA 20mM, CTAB 50mM, NaCl 1,3M, PVP 50mg, Tris HCL, 100mM), και Λ1, Λ2 (EDTA 20mM, CTAB 50mM, NaCl 1,7M, PVP 50mg, Tris HCL, 100mM).

Ωστόσο μπορεί να βελτιωθεί το πρωτόκολλο αυτό, εξετάζοντας περισσότερους συνδυασμούς συγκεντρώσεων CTAB σε σχέση φυσικά με τα υπόλοιπα αντιδραστήρια αλλά αυτό μπορεί να γίνει σε συνέχεια των πειραμάτων μελλοντικά.





**Γράφημα 1.3.2.** Επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων CTAB στην ποσότητα του DNA που απομονώνεται κατά την εκχύλιση φύλλων σχίνου (*Pistacia lentiscus*).

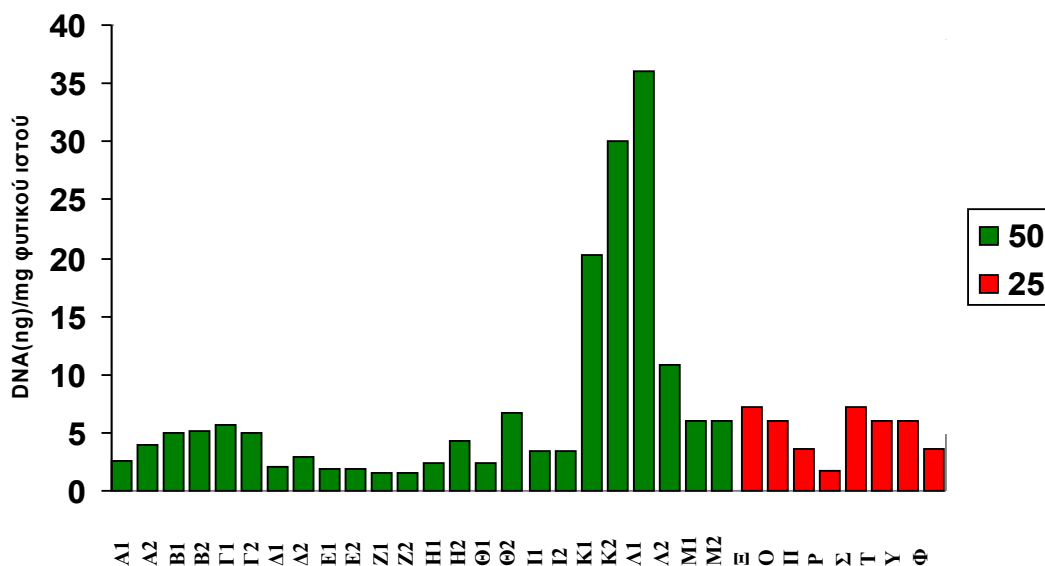
### 1.3.4 Επίδραση PVP στην εκχύλιση DNA από φύλλα σχίνου (*Pistacia lentiscus*)

Η επίδραση του PVP στην απομόνωση DNA από φύλλα του φυτού σχίνος (*Pistacia lentiscus*) είναι εμφανής από τις μεγάλες διακυμάνσεις των αποτελεσμάτων όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.3.1. και στο Γράφημα 1.3.3.

Οι συγκεντρώσεις του PVP στα 25mg/250mg φυτικού ιστού παράγουν μικρότερες ποσότητες DNA που μπορεί να απομονωθεί σε συνδυασμό με τα υπόλοιπα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν. Οι συγκεντρώσεις των 50mg έδωσαν τις μεγαλύτερες ποσότητες γενωμικού DNA και πιο συγκεκριμένα οι συνδυασμοί των δειγμάτων

K1, K2 (EDTA 20mM, CTAB 50mM, NaCl 1,3M, PVP 50mg, Tris HCL, 100mM) και Λ1, Λ2 (EDTA 20mM, CTAB 50mM, NaCl 1,7M, PVP 50mg, Tris HCL, 100mM).

Ωστόσο μπορεί να βελτιωθεί το πρωτόκολλο αυτό, εξετάζοντας περισσότερους συνδυασμούς συγκεντρώσεων PVP σε σχέση φυσικά με τα υπόλοιπα αντιδραστήρια αλλά αυτό μπορεί να γίνει σε συνέχεια των πειραμάτων μελλοντικά.



**Γράφημα 1.3.3.** Επίδραση δύο συγκεντρώσεων PVP στην ποσότητα του DNA που απομονώνεται κατά την εκχύλιση φύλλων σχίνου (*Pistacia lentiscus*).

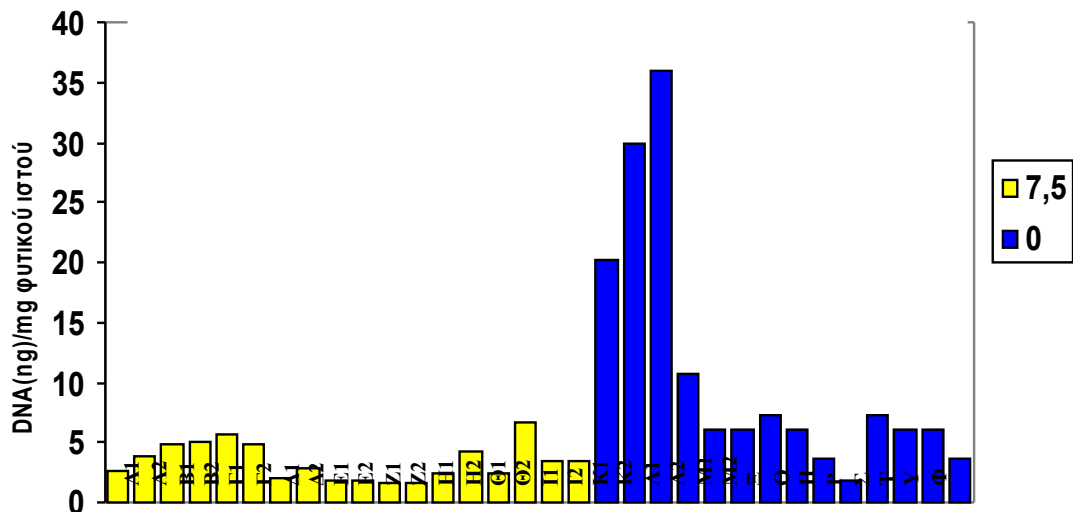
### 1.3.5 Επίδραση Activated Charcoal στην εκχύλιση DNA από φύλλα σχίνου (*Pistacia lentiscus*).

Η επίδραση του Activated Charcoal στην απομόνωση DNA από φύλλα του φυτού σχίνος (*Pistacia lentiscus*) είναι εμφανής από τις μεγάλες

διακυμάνσεις των αποτελεσμάτων όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.3.1. και στο Γράφημα 1.3.4.

Η συγκέντρωση του Activated Charcoal στα 7,5mg/ml Buffer παρουσιάζουν μικρότερες ποσότητες DNA που μπορεί να απομονωθεί σε συνδυασμό με τα υπόλοιπα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν. Όταν δεν χρησιμοποιείται δίνονται μεγαλύτερες ποσότητες εκχύλισης DNA και πιο συγκεκριμένα οι συνδυασμοί των δειγμάτων K1, K2 (EDTA 20mM, CTAB 50mM, NaCl 1,3M, PVP 50mg, Tris HCL, 100mM), και Λ1, Λ2 (EDTA 20mM, CTAB 50mM, NaCl 1,7M, PVP 50mg, Tris HCL, 100mM).

Ωστόσο μπορεί να βελτιωθεί το πρωτόκολλο αυτό, εξετάζοντας περισσότερους συνδυασμούς συγκεντρώσεων Activated Charcoal σε σχέση φυσικά με τα υπόλοιπα αντιδραστήρια αλλά αυτό μπορεί να γίνει σε συνέχεια των πειραμάτων μελλοντικά.



**Γράφημα 1.3.4:** Επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων Activated Charcoal στην ποσότητα του DNA που απομονώνεται κατά την εκχύλιση φύλλων σχίνου (*Pistacia lentiscus*).

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

**Ιστοκαλλιέργεια αγριογαρυφάλων  
της ελληνικής χλωρίδας**

## 2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 2.1.1. Ιστοκαλλιέργεια και κυτταροκαλλιέργεια φυτικών ιστών

Η θεωρία της ολοδυναμικότητας των φυτικών κυττάρων χρονολογείται από το 1938, όπου οι ερευνητές Schwan και Schleiden θεώρησαν ότι τα κύτταρα είναι αυτόνομα και αυτοδύναμα έτσι ώστε να είναι δυνατή η παραγωγή ενός αναγεννημένου και ολοκληρωμένου φυτού. Παρ' όλα αυτά πέρασε τουλάχιστον ένας αιώνας ώσπου το 1939 οι ερευνητές Nobecourt, Gautheret και White να πετύχουν την πρώτη αναπαραγωγή φυτών με ιστοκαλλιέργεια.

Η ιστοκαλλιέργεια είναι μια καλλιέργεια σε *in vitro* συνθήκες. Μπορεί να χωριστεί σε δυο μεγάλες κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει την καλλιέργεια οργάνων ή ακόμα και σπερμάτων για τη δημιουργία ενός ολόκληρου φυτού, ενώ η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει την *in vitro* καλλιέργεια κυττάρων με απώτερο σκοπό τη δημιουργία αναγεννημένων φυτών.

Η ιστοκαλλιέργεια των φυτικών ιστών διαχωρίζεται από αυτήν των ζωικών κυττάρων. Τα ζωικά κύτταρα μέσα σε *in vitro* συνθήκες καλλιέργειας, μπορούν και διαβιώνουν το φαινότυπό τους και τα χαρακτηριστικά τους, ενώ τα φυτικά κύτταρα, στις περισσότερες περιπτώσεις, που προέρχονται από κάποιον ιστό ή κάποιο όργανο είναι τελείως διαφοροποιημένα. Από τη στιγμή που θα τοποθετηθούν μέσα σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο, αποδιαφοροποιούνται και ταυτόχρονα αρχίζουν να διαιρούνται.

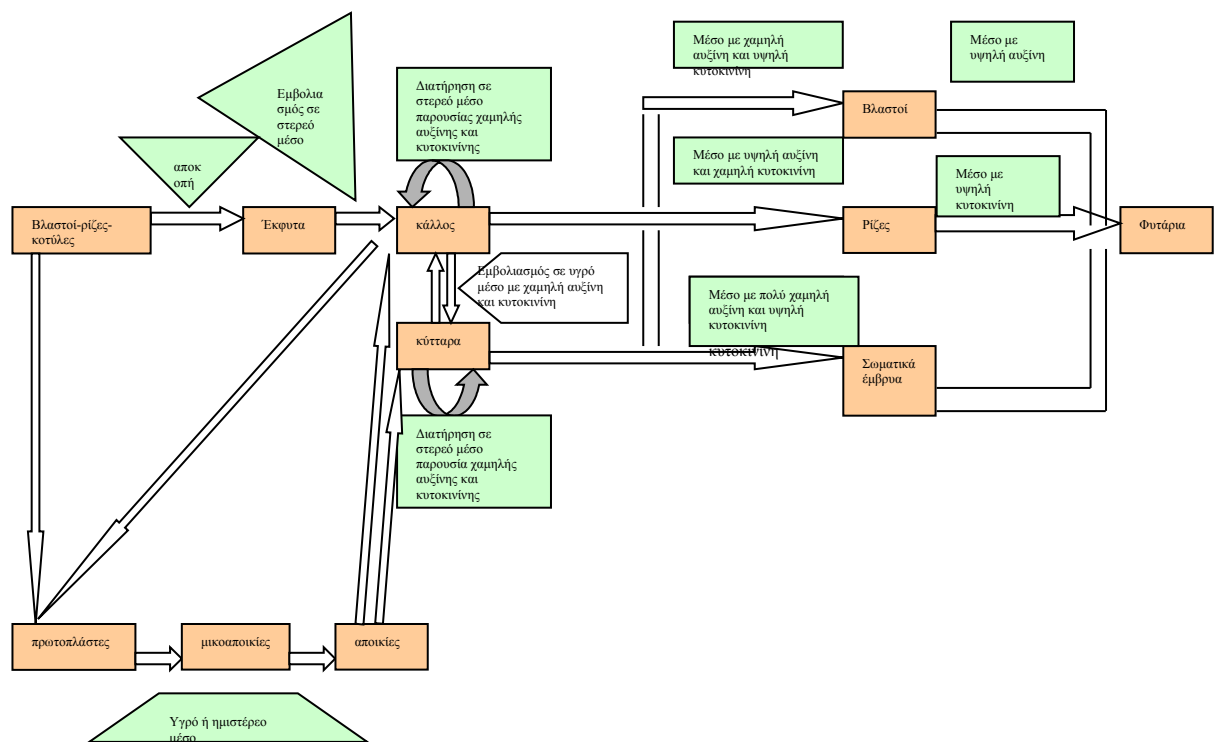
Η *in vitro* καλλιέργεια μπορεί να χωριστεί στις ακόλουθες κατηγορίες:

1. Καλλιέργεια ολόκληρων φυτών, όπου σπέρματα φυτών τοποθετούνται πάνω σε κάποιο θρεπτικό μέσο και απ' όπου αναπτύσσεται το φυτό.

2. Καλλιέργεια οργάνων, όπου τα απομονωμένα όργανα αναπτύσσονται *in vitro*.
3. Καλλιέργεια κάλλου, όπου κάποιο τμήμα του φυτού, που συνήθως ονομάζεται έκφυτο, απομονώνεται και τοποθετείται σε ένα θρεπτικό μέσο με διάφορες συγκεντρώσεις φυτοαυξητικών ρυθμιστών με σκοπό τη δημιουργία συμπλεγμάτων κυττάρων.

Με την ιστοκαλλιέργεια επιτυγχάνεται:

1. Η δημιουργία φυτών κλώνων (με τη χρησιμοποίηση μεριστωμάτων),
2. η ταχεία ανάπτυξη ορισμένων φυτών με τη χρήση των σπερμάτων ή ζυγωτικών εμβρύων,
3. η δημιουργία ολοκληρωμένων φυτών από τις άμορφες μάζες ή τους κάλλους των κυττάρων που μπορούν να αναπαραχθούν μέσω σωματικής εμβρυογένεσης ή οργανογένεσης.



**Εικόνα 2.1.1** Διάγραμμα απεικόνισης τρόπων αναπαραγωγής φυτών με

### 2.1.2. Γενικά για το γαρύφαλλο

Το γαρύφαλλο, ανήκει στην οικογένεια Caryophyllaceae, το γένος είναι το *Dianthus* και το είδος *caryophyllus* ή αλλιώς Ευγενία η καρυόφυλλος και καλλιεργείται πάνω από 2000 χρόνια. Το 300 π.Χ. περίπου ο Θεόφραστος έγραψε για το “*Dianthus*” που μετέφρασε από τα ελληνικά, το λεγόμενο “θείο λουλούδι”, λόγω του ευχάριστου αρώματος του. Το κοινό του όνομα, γαρύφαλλο, είναι πιθανό να προέρχεται από το “coronation”, που σημαίνει στέψη, δεδομένου ότι οι Έλληνες έπλεκαν τα λουλούδια *Dianthus* στις κορώνες για τους αθλητές τους.

Το γαρύφαλλο είναι γηγενές στη μεσογειακή περιοχή. Τα εγγενή είδη ανθίζουν μόνο την άνοιξη ως αντίδραση στις αυξανόμενες περιόδους φωτός και θερμοκρασίας. Η βελτίωση από τον άνθρωπο του εγγενούς *Dianthus* άρχισε το 16<sup>ο</sup> αιώνα. Τα γαρύφαλλα στις μέρες μας έχουν λίγη ομοιότητα με τους προγόνους τους γιατί τώρα ανθίζουν ολόκληρο το χρόνο, έχουν τους μακροχρόνιους ισχυρούς μίσχους, τα πολύ μεγαλύτερα και πληρέστερα λουλούδια, και μια μεγαλύτερη ποικιλία χρωμάτων.

Σήμερα υπάρχουν πάρα πολλές ποικιλίες και συνεχώς, δημιουργούνται νέες πιο βελτιωμένες. Ο αριθμός των χρωμάτων των ανθέων είναι πολύ μεγάλος αλλά τα κόκκινα προτιμούνται περισσότερο. Υπάρχουν επίσης κίτρινες, πορτοκαλί, λευκά και ροζ αποχρώσεις, καθώς και πιτσιλωτές, ποικιλόχρωμες ποικιλίες.

Το υψόμετρο μπορεί να τροποποιήσει το γεωγραφικό πλάτος καλλιέργειας των γαρυφάλλων, για να ευνοηθούν και άλλες κατάλληλες περιοχές καλλιέργειας των γαρύφαλλων. Η θερμοκρασία μεταβάλλεται σπάνια πάνω από τους 18°C ή κάτω από 0°C. Η φωτοπερίοδος είναι επίσης σχεδόν σταθερή για 12 ώρες καθ’ όλη τη

διάρκεια του χρόνου. Αυτό έχει ως επίδραση στις περισσότερες διακλαδώσεις των γαρύφαλλων καθώς επίσης και των μακρύτερων ενδιάμεσων κόμβων, για να αυξηθεί το μήκος των μίσχων των λουλουδιών (Dole and Wilkins, 1999: Barden *et al*, 1987).

Στις μέρες μας υπάρχουν περισσότερα από 250 είδη γαρύφαλλων (Ρούμπος, 2000).

### **2.1.3. Βοτανικοί χαρακτήρες**

Η γαρυφαλλιά είναι φυτό πολυετές, ποώδες, με μεσογονάτιους βλαστούς μήκους 10-80cm. Τα φύλλα είναι στενά, λογχοειδή, τροπιδωτά με ανοιχτό πράσινο χρώμα. Τα ανώτερα άνθη του κάθε βλαστού είναι μικρά σαν βράκτια. Τα άνθη είναι μεγάλα με πολλές σειρές πετάλων.

Τα φύλλα είναι τοποθετημένα αντίθετα στο βλαστό και από τη βάση του κάθε φύλλου μπορεί να αναπτυχθεί ένας πλάγιος βλαστός που θα είναι ανθοφόρος η φυλλοφόρος. Τα άνθη σχηματίζονται στην κορυφή του κάθε βλαστού όταν αναπτύξει ένα ορισμένο μήκος καθώς και στους ανώτερους πλάγιους. Οι κατώτεροι πλάγιοι είναι φυλλοφόροι που αφού αναπτύξουν ένα ορισμένο μήκος έχουν και αυτοί την εξέλιξη του κεντρικού βλαστού. Οι πλάγιοι ανθοφόροι στις μονοανθείς ποικιλίες αφαιρούνται οι ανώτεροι. Οι κατώτεροι φυλλοφόροι αφαιρούνται για να δώσουν την επόμενη παραγωγή. Το κόψιμο του άνθους γίνεται ακριβώς πάνω από αυτούς (Γιατράκης και Κέκης, 1954: Κανταρτζής, 1992).



**2.1.4. Βοτανική κατάταξη**

Βασίλειο : Φυτά

Άθροισμα : Σπερματόφυτα

Υποάθροισμα : Αγγειόσπερμα

Υποδιαίρεση : Γυμνόσπερμα

Κλάση : Δικοτυλήδονα

Τάξη : Κεντρόσπερμα

Οικογένεια : Caryophyllaceae (Καρυοφυλλίδες)

Γένος : *Dianthus*

Είδος : *giganteus, gracilis, crinitus, sp.*

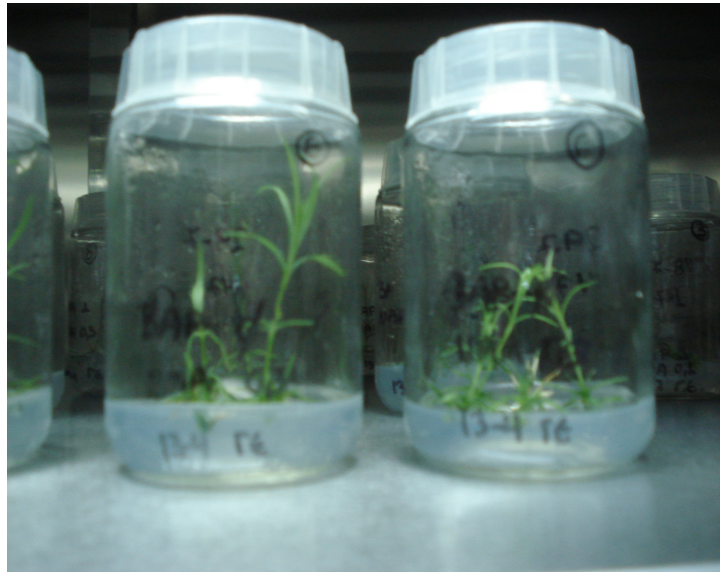
### 2.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Με τις τεχνικές της ιστοκαλλιέργειας παράγονται φυτά υγιά απαλλαγμένα από παθογόνους οργανισμούς. Μετά την εγκατάσταση των εκφύτων ή την ανανέωση των καλλιεργειών *in vitro*, τα φυτά τοποθετούνται και διατηρούνται στο θάλαμο ανάπτυξης και αναπτύσσονται κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και φωτισμού.

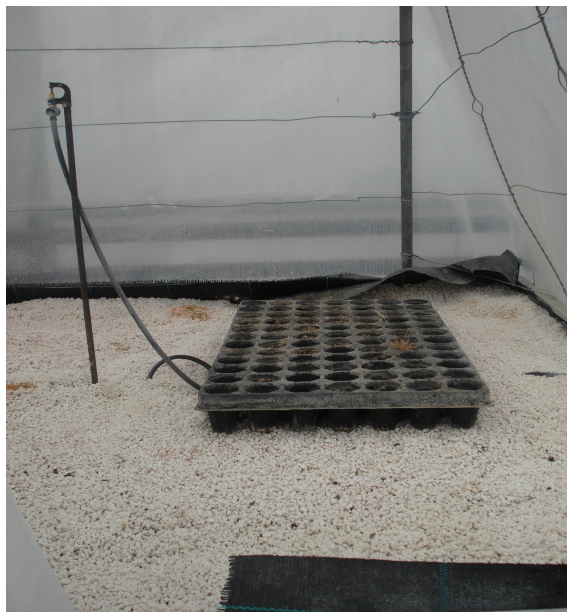
Η ανανέωση των φυτών που γίνεται κάθε 4-6 εβδομάδες. Σε κάθε βαζάκι τοποθετούνται 5 έκφυτα. Με την ανακαλλιέργεια μπορούν τα μικρόφυτα να τεμαχιστούν σε πολυάριθμα κομμάτια όπου το καθένα θα δώσει και ένα φυτό. Έτσι τα φυτά πολλαπλασιάζονται σε μεγάλες ποσότητες και με μεγάλη ασφάλεια, απαλλαγμένα από παθογόνα. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, ορισμένες από τις καλλιέργειες μολύνθηκαν από μύκητες και βακτήρια με αποτέλεσμα να υπάρχουν απώλειες και την ανάγκη αναζήτησης τρόπων αποφυγής των μολύνσεων.

Στο θάλαμο ανάπτυξης υπάρχει stock από το κάθε φυτό και έτσι μπορεί να πολλαπλασιαστεί το κάθε είδος φυτού, στην απαραίτητη ποσότητα και μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα.

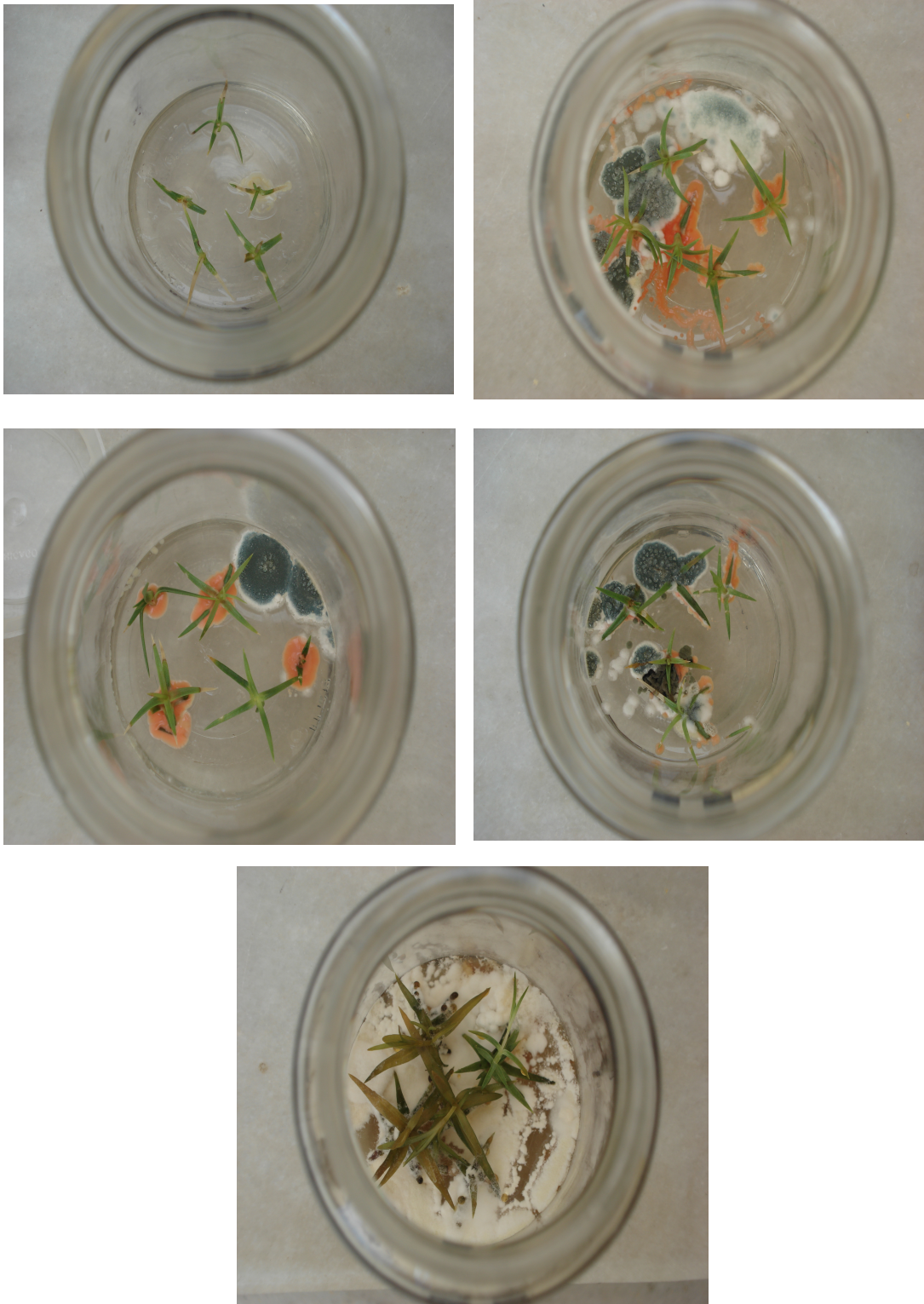
Όταν τα φυτά αποκτήσουν ικανοποιητικό μέγεθος (5-6 εκατ.) και ρίζες μπορεί να γίνει μεταφύτευση σε τελάρα πολλαπλών θέσεων τα οποία τοποθετούνται στην υδρονέφωση, για να μην αφυδατωθούν. Μόλις τα φυτά σκληραγωγηθούν και μεγαλώσουν αρκετά, μεταφυτεύονται σε γλαστράκια των 0,75L και διατηρούνται μέσα στο θερμοκήπιο. Στη συνέχεια όταν μεγαλώσουν μεταφυτεύονται σε γλάστρες των 2L και μεταφέρονται έξω στις μητρικές φυτείες.



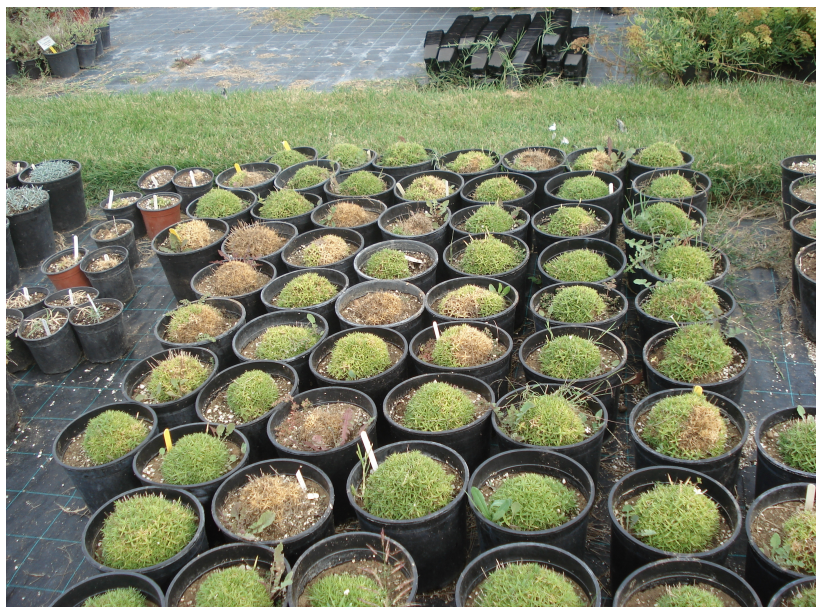
**Εικόνα 2.3.1.** Φυτά του γένους *Dianthus* στο θάλαμο ανάπτυξης των 22°C που πολλαπλασιάστηκαν με τη διαδικασία της ιστοκαλλιέργειας.



**Εικόνα 2.3.2.** Τελάρο πολλαπλών θέσεων στο οποίο φυτεύονται φυτά του γένους *Dianthus* που έχουν αναπτυχθεί με τη διαδικασία της ιστοκαλλιέργειας και τοποθετείται στη υδρονέφωση.



**Εικόνα 2.3.3.** Μολύνσεις από βακτήρια και μύκητες σε καλλιέργειες του γένους *Dianthus* με τη διαδικασία της ιστοκαλλιέργειας.



Εικόνα 2.3.4. Μητρικές φυτείες φυτών του γένους *Dianthus*.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

**Συμπεράσματα**

- Η καλύτερη μεταχείριση για την εκχύλιση DNA από το φυτό σχίνο (*Pistacia lentiscus*) είναι οι εξής συγκεντρώσεις: EDTA 20mM, CTAB 50mM, NaCl 1,7M, PVP 50mg/250mg φυτικού ιστού, Tris-HCl 100mM.
- Η προσθήκη Activated Charcoal επιδρά αρνητικά στην εκχύλιση DNA επειδή παραγόταν μικρές ποσότητες DNA σε σύγκριση με τα πειράματα που δεν έχει προστεθεί.
- Οι μικρότερες τιμές NaCl επιδρούν καλύτερα στην εκχύλιση DNA σε σύγκριση με τις μεγαλύτερες των 2M και 2,5M που χρησιμοποιήθηκαν.
- Είναι επιθυμητό τα πειράματα να συνεχιστούν για να βρεθεί ο καλύτερος συνδυασμός αντιδραστηρίων που θα δώσουν μεγαλύτερη ποσότητα και καλή ποιότητα DNA.
- Πριν την εργασία στην τράπεζα νηματικής ροής είναι απαραίτητο να αποστειρώνονται όλα τα υλικά που χρησιμοποιούνται μέσα στην τράπεζα, πλάκα, χαρτιά, νυστέρια, λαβίδες, βαζάκια με υπόστρωμα που προορίζονται για τα καινούρια έκφυτα, για να μην υπάρχει κίνδυνος μόλυνσεων στις επόμενες καλλιέργειες.
- Κατά τη διάρκεια της εργασίας στην τράπεζα νηματικής ροής χρειάζεται σχολαστικός καθαρισμός με αιθανόλη της τράπεζας νηματικής ροής και αποστείρωση των εργαλείων στον επιτραπέζιο αποστειρωτή ώστε να αποφεύγονται οι μολύνσεις από μύκητες και από βακτήρια όπως συνέβη σε ορισμένες περιπτώσεις κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

## Βιβλιογραφία



- Γιατράκης, Γ.Ι. και Κέκης, Γ.Ι., 1954.** Ανθοκηπευτικές καλλιέργειες. Τόμος Β Ανθοκομικές καλλιέργειες. Ίδρυμα Ευγενίδου, Αθήνα.
- Κανταρτζής, Ν.Α., 1992.** Ανθοκομία πολυετή ποώδη φυτά για αρχιτεκτονική τοπίου, Αθήνα
- Μπόσκου Δ., 2004.** Χημεία τροφίμων. Εκδόσεις Γαρταγάνη, Θεσσαλονίκη.
- Ρούμπος, Α.Κ., 2002.** Σημειώσεις Ανθοκομίας, ΑΤΕΙ Θεσσαλονίκης.
- Ρούμπος, Α.Κ., 2004.** Σημειώσεις Πολλαπλασιασμού οπωροκηπευτικών φυτών, ΑΤΕΙ Θεσσαλονίκης.
- Τσέκος Ι., 2004.** Φυσιολογία φυτών. Εκδόσεις Αδερφών Κυριακίδη Α.Ε, Θεσσαλονίκη.
- Χατζόπουλος Π., 2004.** Βιοτεχνολογία φυτών. Εκδόσεις ΕΜΒΡΥΟ, Αθήνα.
- Barder, Halfarce, Parrish, 1987.** Plant Science, MCGraw Book Company, USA.
- Dole, J.M., and H.F. Wilkins, 1999.** Floriculture: Principles and species, UPPER SANDDLE RIVER, Prentice-Hall, Co, N.J., USA.
- Hoisington D., Khairalan M., and Gonzalez-de-Leon D., 1994.** Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Biotechnology Center. Second Edition, Mexico. Διαθέσιμο στο διαδίκτυο: <http://164.233.183.104/search?q=canche:CkvutpMjrpj4J:www.generationcp.org/>
- Salifoglou A., 2008.** Πέψη DNA με χρήση περιοριστικών ενζύμων, Lab 3. Διαθέσιμο στο διαδίκτυο: [http://aries.cheng.auth.gr/-salif/gr\\_site/Genetic%20Engineering/LabsII/BioLab/S2008/](http://aries.cheng.auth.gr/-salif/gr_site/Genetic%20Engineering/LabsII/BioLab/S2008/)

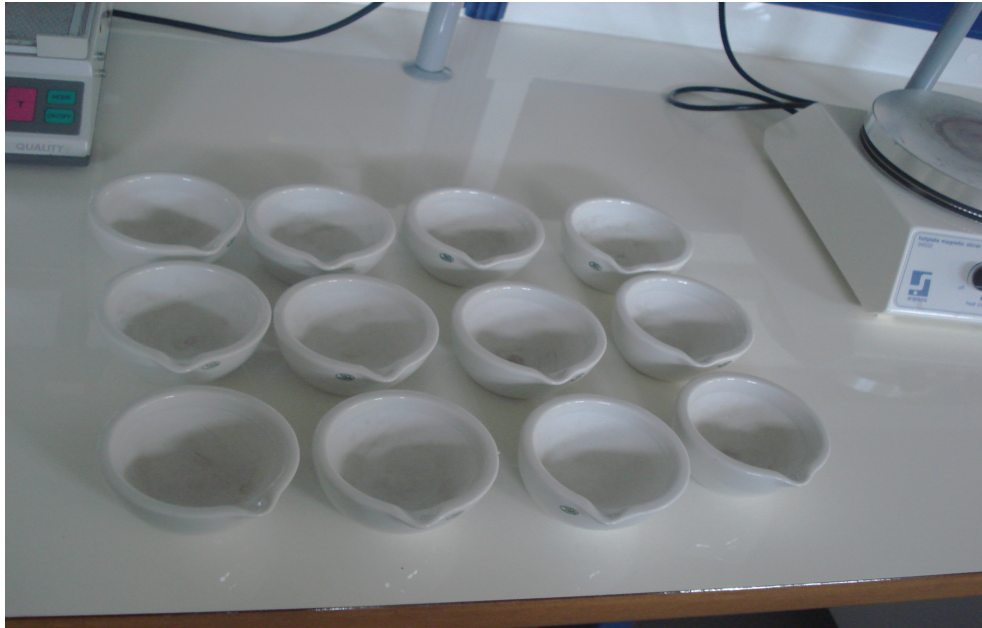
---

**Valma A., Padh H., Shrivastava N., 2007.** Review plant genomic DNA isolation: An art or a science *Biotechnology Journal DOI 2: 386–392*

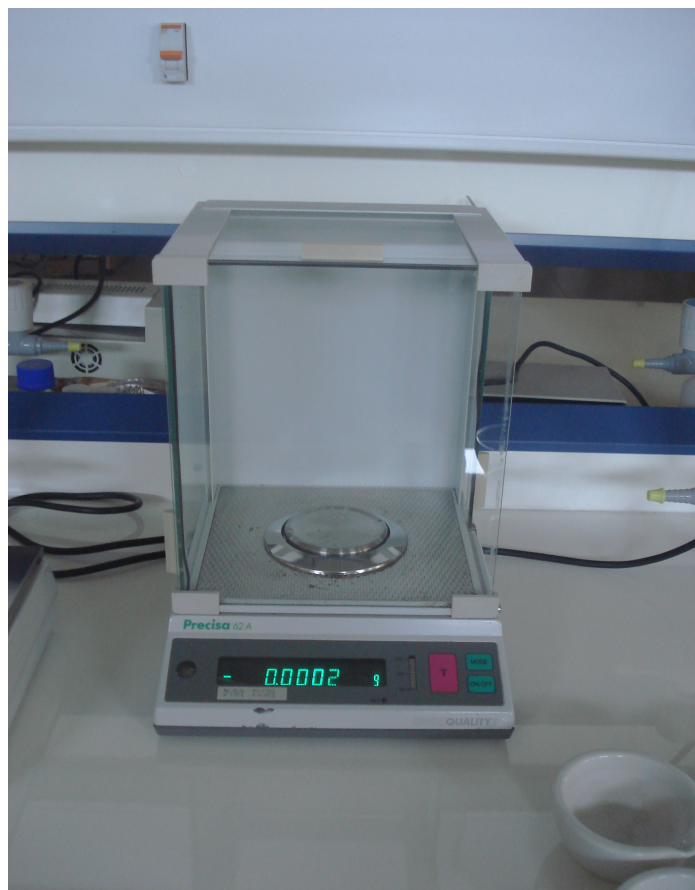
# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

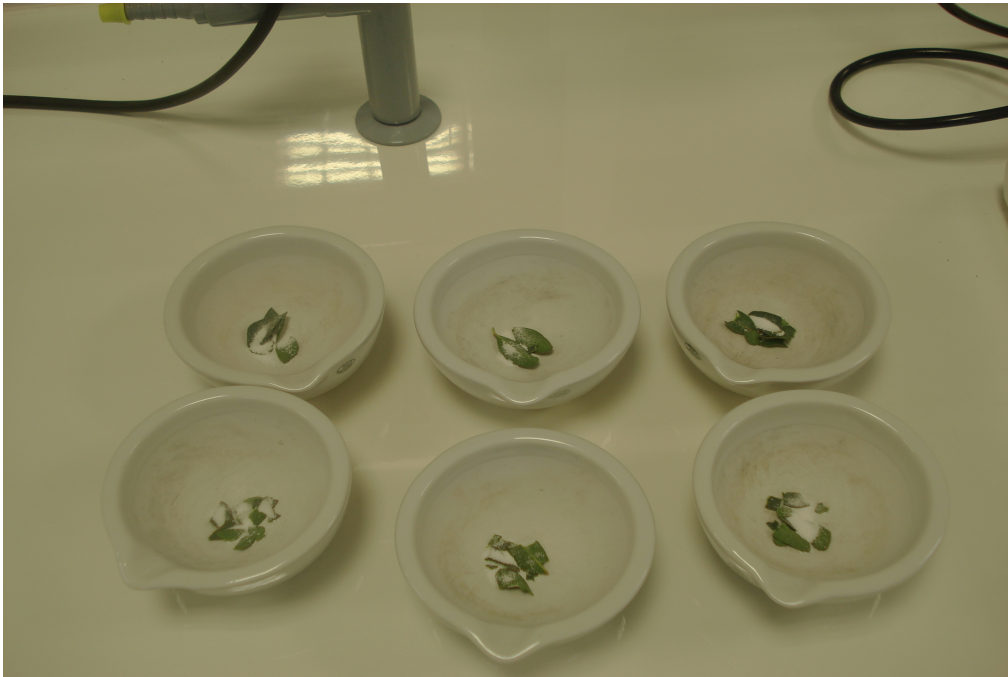
**Παραρτήματα**



**Εικόνα 5.1.** Καθαρά γουδιά πορσελάνης που θα χρησιμοποιηθούν για την ομογενοποίηση των φυτικών ιστών του σχίνου (*Pistacia lentiscus*) με το PVP και το Buffer εκχύλισης DNA.



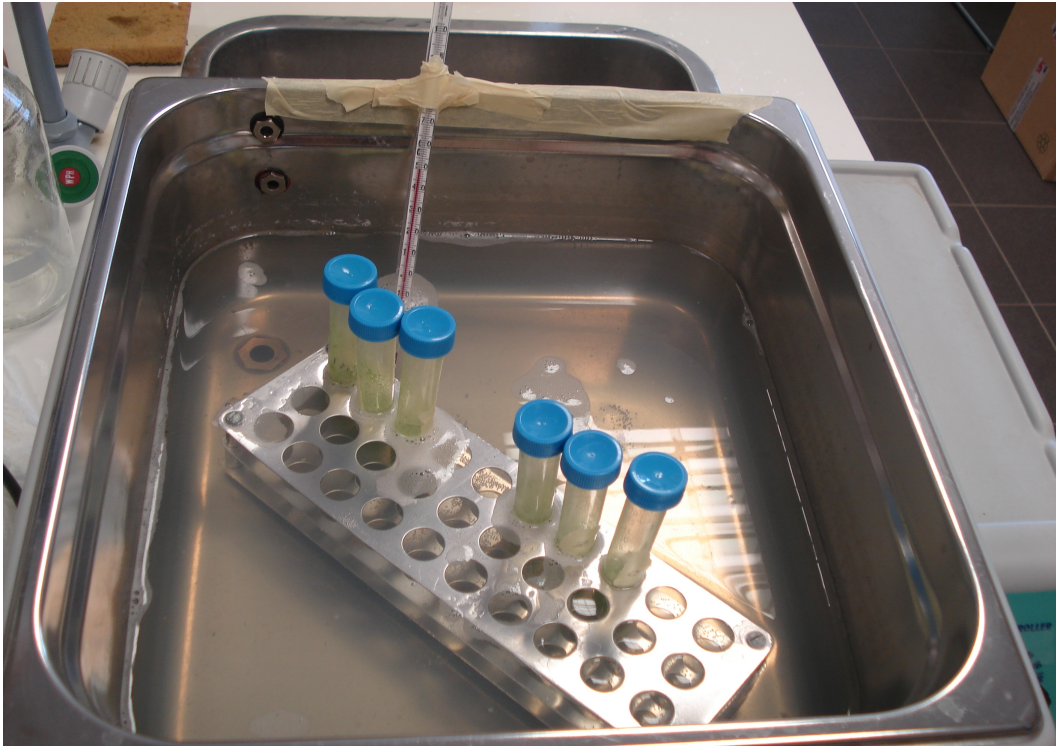
**Εικόνα 5.2.** Ζυγαριά ακριβείας με 4 δεκαδικά ψηφία για τη μέτρηση των 250mg φυτικών ιστών του σχίνου (*Pistacia lentiscus*), του PVP και του Activated Charcoal.



**Εικόνα 5.3.** Γουδιά πορσελάνης με PVP και φυτικό ιστό του φυτού *Pistacia lentiscus* (250mg) έτοιμα για την προσθήκη του Buffer εκχύλισης DNA και ομογενοποίηση.



**Εικόνα 5.4.** Ομογενοποίηση φυτικού ιστού του φυτού *Pistacia lentiscus*, με το PVP και το Buffer εκχύλισης DNA σε γουδιά πορσελάνης.



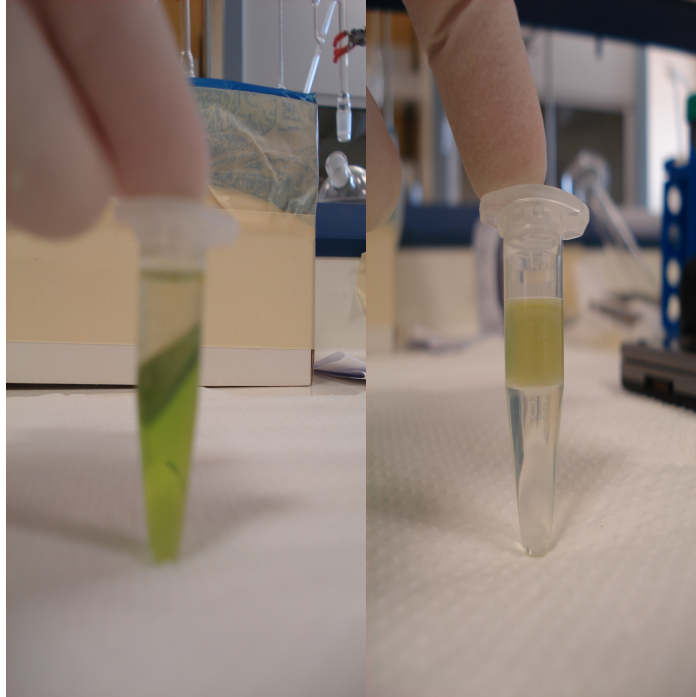
**Εικόνα 5.5.** Επώαση δειγμάτων σε υδατόλουτρο για 2 ώρες στους  $55^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  με ανακίνηση κάθε 15 λεπτά.



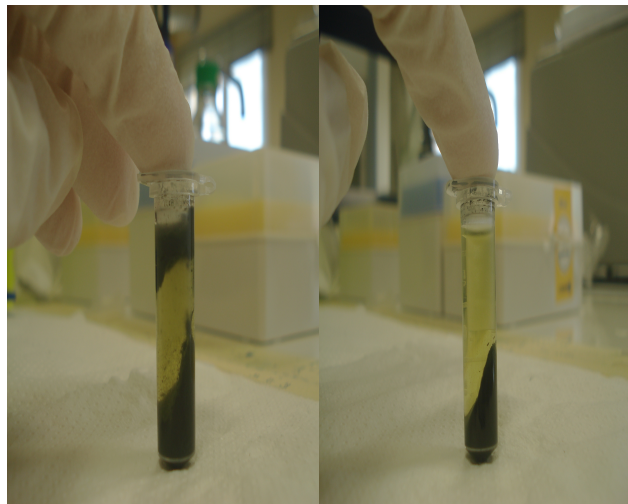
**Εικόνα 5.6.** Μηχανική πιπέτα τύπου Gilson για τη μεταφορά διαλυμάτων και αντιδραστηρίων



**Εικόνα 5.7.** Φυγόκεντρος 24 θέσεων για μικροφιαλίδια των 1,5μl και 2μl που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό διαλυμάτων εκχύλισης DNA.

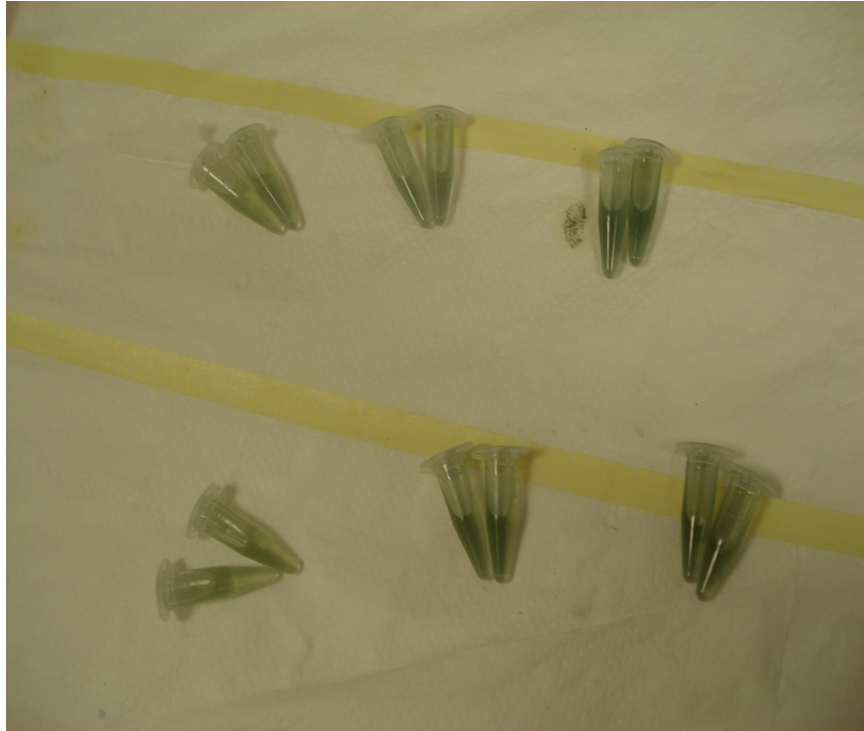


**Εικόνα 5.8.** Φάσεις διαχωρισμού υπερκειμένου όταν δε χρησιμοποιείται Activated Charcoal στο Buffer εκχύλισης DNA.

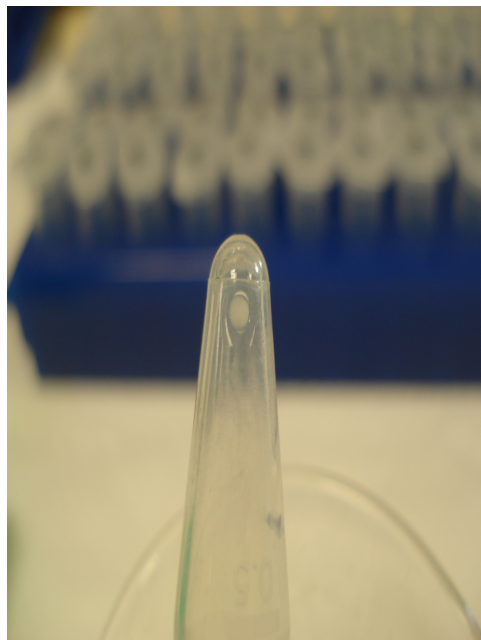


**Εικόνα 5.9.** Φάσεις διαχωρισμού υπερκειμένου όταν χρησιμοποιείται Activated Charcoal Buffer εκχύλισης DNA

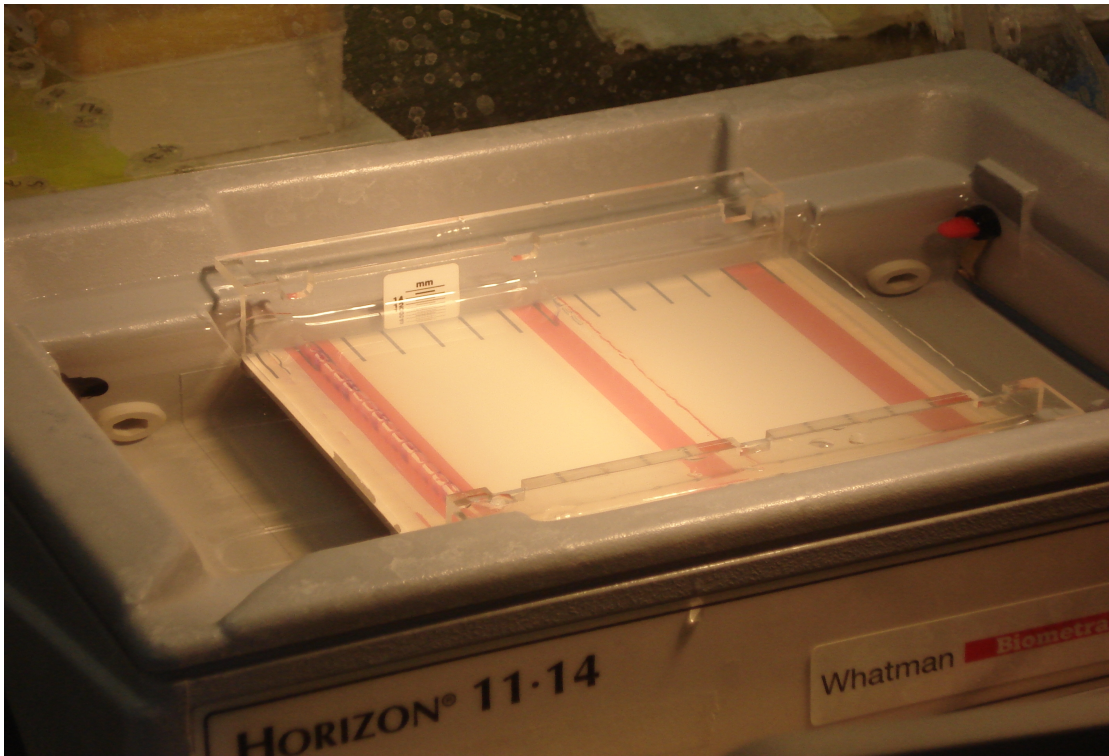




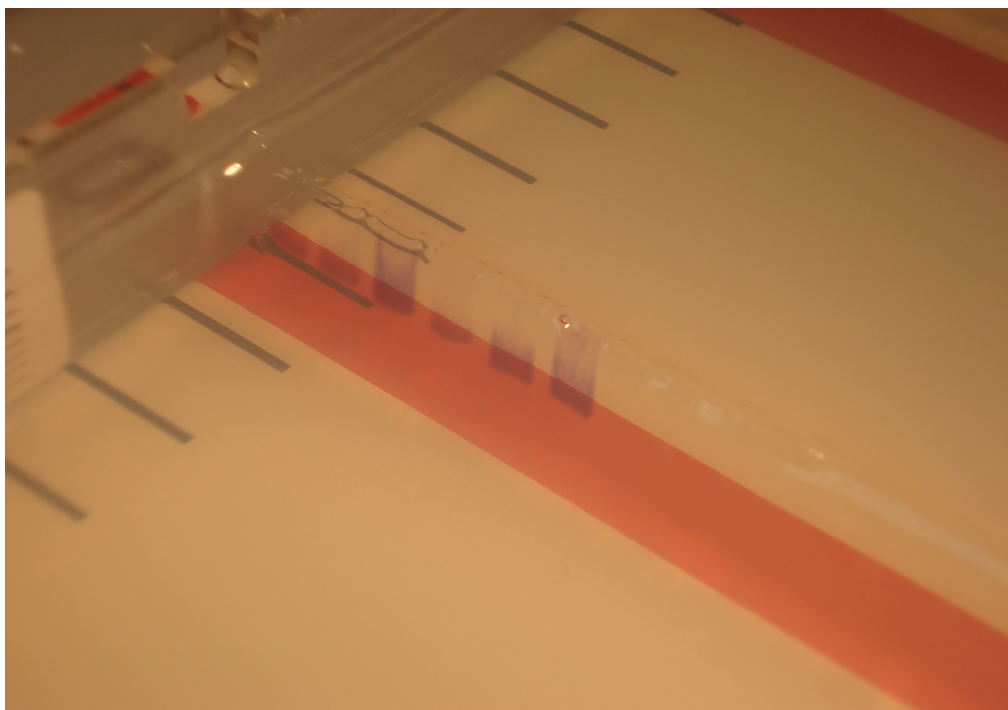
**Εικόνα 5.10.** Δείγματα όπου έγινε η προσθήκη 2-propanol για επώαση μιας ώρας σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να δημιουργηθεί το άσπρο ίζημα του DNA.



**Εικόνα 5.11.** Άσπρο ίζημα σε μικροφιαλίδιο αφού έχει ξεπλυθεί με διάλυμα αιθανόλης 70%.



**Εικόνα 5.12.** Επιτραπέζια ηλεκτροφόρηση τμημάτων DNA σε πηκτή αγαρόζης.



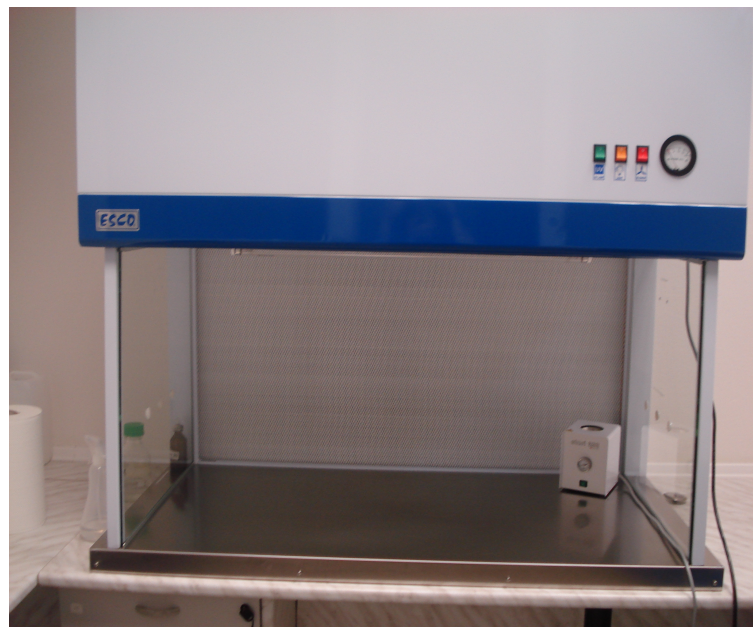
**Εικόνα 5.13.** Τοποθέτηση δειγμάτων DNA στις συγκεντρώσεις των 5μl, 10μl και 15μl σε πηκτή αγαρόζης, μέσα σε επιτραπέζια ηλεκτροφόρηση



**Εικόνα 5.14.** Τροφοδοτικό παροχής ηλεκτρισμού σε μεταβαλλόμενη τάση για τη λειτουργία της επιτραπέζιας ηλεκτροφόρησης.



**Εικόνα 5.15.** Υγρός κλίβανος για την αποστείρωση του θρεπτικού υποστρώματος που είναι τοποθετημένο στα βαζάκια.



**Εικόνα 5.16** Τράπεζα εργασίας που χρησιμοποιήθηκε για την ιστοκαλλιέργεια αγκριογαρυφάλων.



**Εικόνα 5.17.** Επιτραπέζιος αποστειρωτής ξηρού τύπου που χρησιμοποιήθηκε για την αποστείρωση των εργαλείων κατά τη διαδικασία της ιστοκαλλιέργειας αγριογαρυφάλων η οποία βρίσκεται μέσα στην τράπεζα εργασίας.



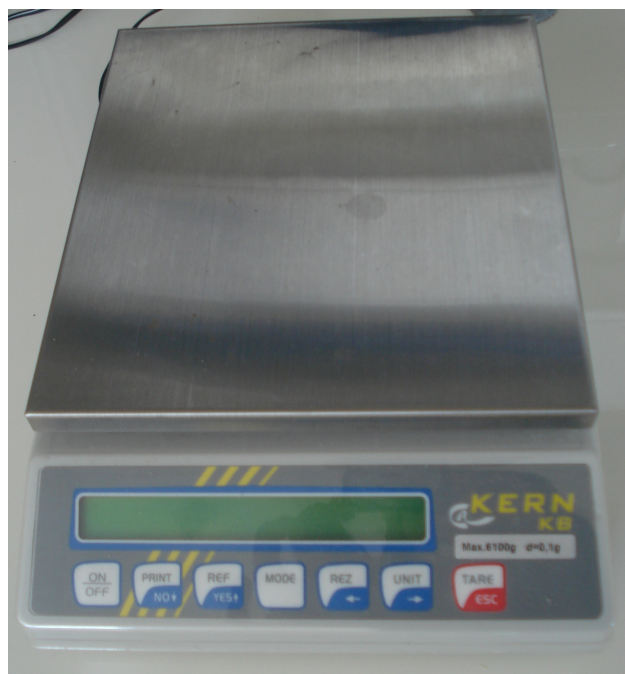
**Εικόνα 5.18.** Ξηρός κλίβανος που χρησιμοποιήθηκε για την αποστείρωση μικροεργαλείων, γυαλικών κ.ά. αντικειμένων που χρησιμοποιούνται στην ιστοκαλλιέργεια.



**Εικόνα 5.19.** pH-μετρο για τη μέτρηση της οξύτητας του θρεπτικού υποστρώματος.



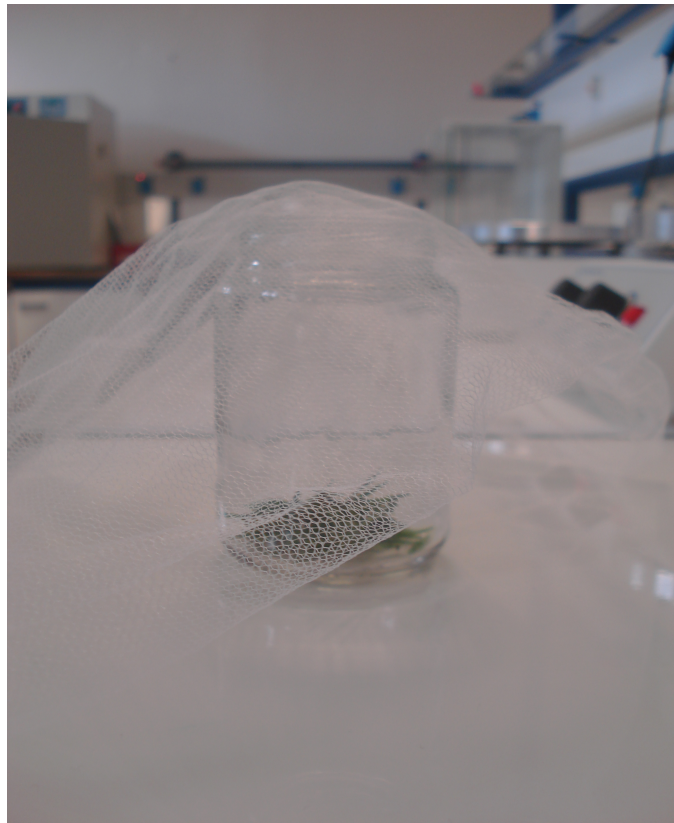
**Εικόνα 5.20.** Θερμική εστία και Μαγνητικός αναδευτήρας για τη παρασκευή του θρεπτικού υποστρώματος.



**Εικόνα 5.21.** Ζυγαριά αναλογική για τη ζύγιση των συστατικών που χρησιμοποιούνται στο θρεπτικό υπόστρωμα.

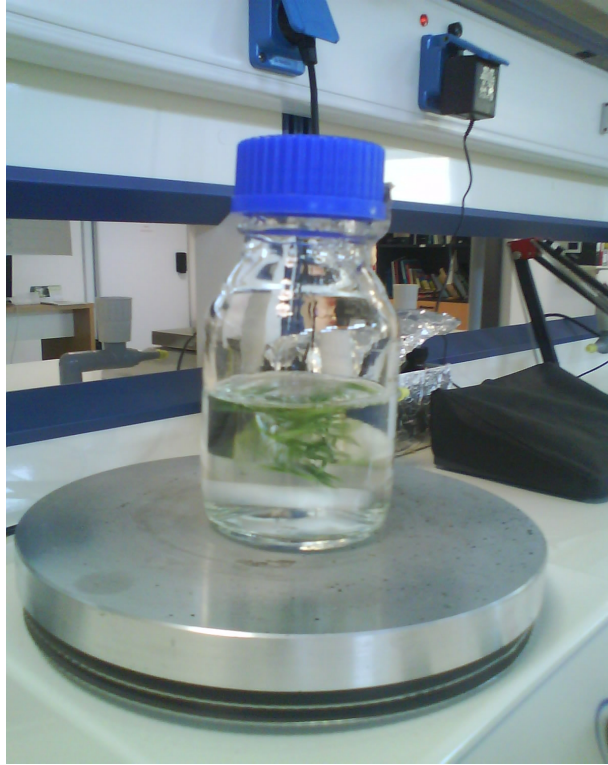


**Εικόνα 5.22.** Μοσχεύματα από φυτά του γένους *Dianthus* τα οποία προορίζονται για εγκατάσταση με τη διαδικασία της ιστοκαλλιέργειας.

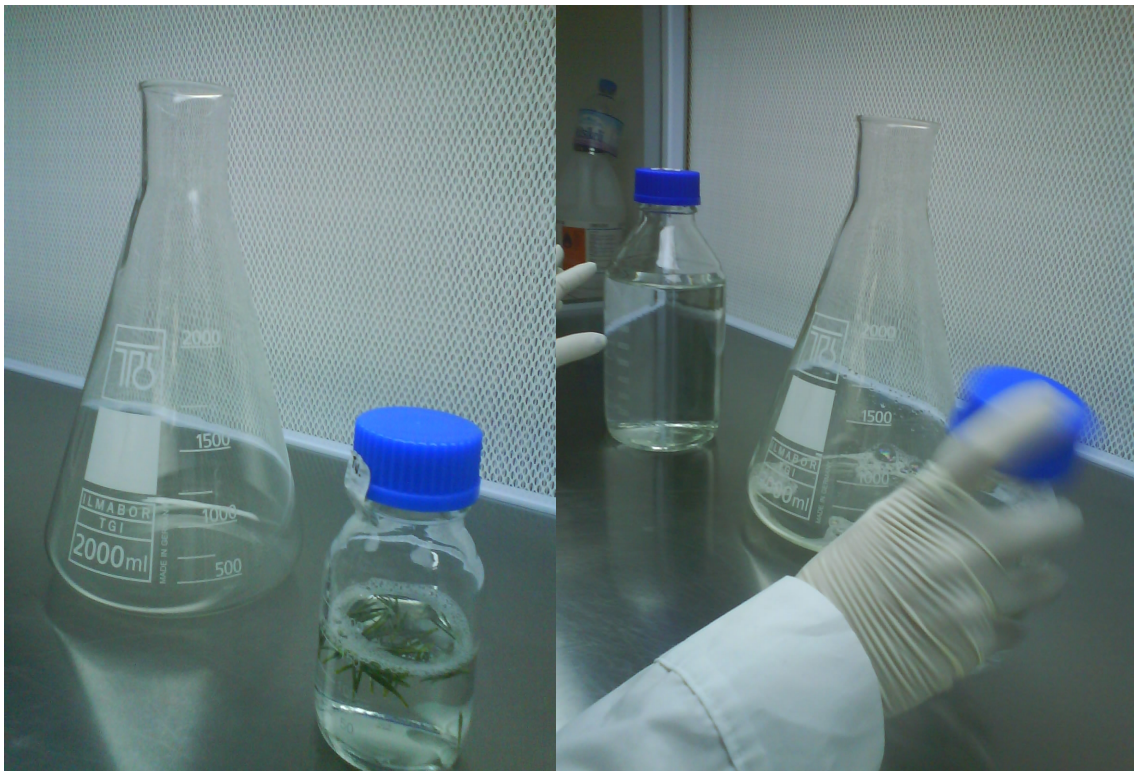


**Εικόνα 5.23.** Καθαρισμός μοσχευμάτων αμέσως μετά την κοπή για την απομάκρυνση των χωμάτων.





**Εικόνα 5.24.** Απολύμανση των μοσχευμάτων με διάλυμα χλωρίνης 20% με τη βοήθεια του μαγνητικού αναδευτήρα.



**Εικόνα 5.25.** Καθαρισμός μοσχευμάτων με απεσταγμένο νερό μέσα στην τράπεζα εργασίας από τη χλωρίνη μετά τη διαδικασία της απολύμανσης με ανακίνηση για 1 λεπτό. ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ *ΖΩΗ ΜΠΑΤΗ* ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2009



**Εικόνα 5.26.** Βαζάκια με θρεπτικό υπόστρωμα στα οποία θα τοποθετηθούν τα μοσχεύματα.