



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ & ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας

Πτυχιακή Εργασία
«Απομόνωση γονιδίου μεταφοράς της γλουταθειόνης
(GST) από φασόλι *Phaseolus coccineus* τύπου γίγαντες -
ελέφαντες»

Ονοματεπώνυμο Φοιτητή (Α.Μ.)

Παναγιωτάρα Δήμητρα Άννα, 02198

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Μαδέσης Παναγιώτης
Επίκουρος Καθηγητής Κυτταρικής και Μοριακής Βιολογίας

Βόλος, 2022

**«Απομόνωση γονιδίου μεταφοράς της γλουταθειόνης
(GST) από φασόλι *Phaseolus coccineus* τύπου γίγαντες -
ελέφαντες»**

**«Isolation of GST gen from *Phaseolus coccineus* “gigantes –
elefantes”»**

Παναγιωτάρα Δήμητρα Άννα

Εξεταστική Επιτροπή:

1. **Μαδέσης Παναγιώτης**, Επίκουρος Καθηγητής Κυτταρικής και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Γεωπονίας Φυτική Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
2. **Παυλή Ουρανία**, Επίκουρος Καθηγήτρια Γενετικής Βελτίωσης Φυτών, Τμήμα Γεωπονίας Φυτική Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Λεβίζου Ευθυμία**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας Φυτών, Τμήμα Γεωπονίας Φυτική Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε, στο τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος της σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και συγκεκριμένα στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας, κατά τα έτη 2021 – 2022.

Η ολοκλήρωση της πτυχιακής αυτής εργασίας θα ήταν αδύνατη χωρίς την πολύτιμη υποστήριξη και καθοδήγηση του επιβλέποντα καθηγητή μου Κ. Μαδέση Παναγιώτη, Επίκουρο Καθηγητή Κυτταρικής και Μοριακής Βιολογίας. Του εκφράζω ένα βαθύ ευχαριστώ για όλη την βοήθεια που μου προσέφερε, τόσο για την συμβολή του στην αντιμετώπιση διαφόρων τεχνικών προβλημάτων που προέκυπταν κατά την διάρκεια του πειράματος, όσο και για τον πολύτιμο χρόνο που διέθετε για να μου δίνει σημαντικά στοιχεία και εξηγήσεις πάνω στο θέμα. Ωστόσο, δεν θα μπορούσα να μην εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην Κα. Τσίντζου Γεωργία, Χημικό ΜCs, για την άριστη συνεργασία που είχαμε καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας, αλλά και για την προθυμία της και τη βοήθεια της, που ποτέ δεν αρνήθηκε να μου προσφέρει. Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου, για την αμέριστη υποστήριξη και εμπιστοσύνη που μου προσέφεραν.

Περίληψη

Η παρούσα πτυχιακή διατριβή είχε ως σκοπό την απομόνωση του γονιδίου μεταφοράσης της γλουταθειόνης (GST) από το φασόλι *Phaseolus coccineus* και ειδικά από τους τύπους γίγαντες και ελέφαντες. Οι μεταφοράσες της γλουταθειόνης (GSTs) χαρακτηρίζονται ως μια από τις αρχαιότερες και ποικιλόμορφες υπεροικογένειες φυτικών πρωτεϊνών. Τα φυτικά GSTs διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στην ανάπτυξη των φυτών, στον ενδογενή μεταβολισμό και στην ξενοβιοτική αποτοξίνωση. Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν αποτελέσει ένα από τα μεγαλύτερα γεωργικά ενδιαφέροντα, γεγονός το οποίο οφείλεται πρώτον στην ικανότητα τους να προσδίδουν αντοχή στις βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις και δεύτερον στην ικανότητά τους για αποτοξίνωση των τοξικών χημικών. Η απομόνωση των δυο τμημάτων γονιδίων GST έγινε από δύο τύπους του είδους αυτού τους γίγαντες και τους ελέφαντες. Μέσω της διαδικασίας ηλεκτροφόρησης απομονώθηκαν οι ζώνες των δύο γονιδίων, οι οποίες στην συνέχεια αλληλουχήθηκαν μέσω της μεθόδου Sanger. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης σε συνδυασμό με το πρόγραμμα Blast, οδήγησαν στην ταυτοποίηση των γονιδίων ότι κωδικοποιούν την παραγωγή μιας πρωτεΐνης GST. Τέλος, και τα δύο ζεύγη εκκινητών του *Phaseolus vulgaris* ήταν αποτελεσματικά για την απομόνωση του συγκεκριμένου γονιδίου από τους δύο παραπάνω τύπους.

Λέξεις Κλειδιά: Μεταφοράσης της γλουταθειόνης, *Phaseolus coccineus*, μέθοδος Sanger, Blast, πρωτεΐνη, εκκινητές

ABSTRACT

This study aims at the isolation of the glutathione transporter (GST) gene from *Phaseolus coccineus* bean. GSTs are characterized as one of the most ancient and diverse super-families of plant proteins. Plant GSTs play an important role in plant growth, endogenous metabolism and xenobiotic detoxification. These macromolecules are responsible for one of the greatest agricultural interests, due to their main ability to confer resistance to biotic and abiotic forces and their simultaneous ability to detoxify toxic chemicals. Two types of this particular species (gigantes – elefantes) were used for the isolation of the two GST gene segments. Through the electrophoresis process, the bands were isolated and then Sanger sequencing took place. Results of sequencing combined with the “Blast” program led to the identification of the genes that direct the production of a GST protein. Finally, both *Phaseolus vulgaris* primer pairs were effective for isolating this specific gene from both types.

Keywords: GSTs, *Phaseolus coccineus*, Sanger, method, Blast, protein, primer

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	- 1 -
1.1	Φασόλι.....	- 1 -
1.1.1	Οικολογικές Απαιτήσεις.....	- 2 -
1.2	Αιτίες Καταπόνησης.....	- 2 -
1.2.1	Ενεργές Μορφές Οξυγόνου ROS.....	- 3 -
1.2.2	Αβιοτικές Καταπονήσεις.....	- 3 -
1.2.3	Βιοτικές Καταπονήσεις.....	- 4 -
1.3	Μηχανισμοί Άμυνας.....	- 4 -
1.3.1	Μη Ενζυματικοί Μηχανισμοί Άμυνας.....	- 5 -
1.3.2	Ενζυματικοί Μηχανισμοί Άμυνας.....	- 5 -
1.4	Οι Μεταφοράσες της Γλουταθειόνης (Glutathione-S-transferase GSTs).....	- 6 -
1.4.1	Ταξινόμηση & Ονοματολογία.....	- 7 -
1.4.1.1	Κλάσεις φ & τα.....	- 7 -
1.4.1.2	Κλάσεις θ & ζ.....	- 8 -
1.4.1.3	Κλάσεις DHAR & λ.....	- 8 -
1.4.1.4	TCHQD GST.....	- 8 -
1.4.1.5	Μικροσωμικές GSTs.....	- 8 -
1.4.2	ΔΟΜΗ.....	- 9 -
1.4.3	Λειτουργικός Ρόλος των GSTs.....	- 10 -
1.5	Τεχνικές Μοριακής Βιολογίας.....	- 11 -
1.5.1	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	- 11 -
1.5.2	Αντίστροφη Μεταγραφή - PCR (RT - PCR).....	- 12 -
1.5.2	Ηλεκτροφόρηση με Πηκτή Αγαρόζης.....	- 13 -
1.5.3	Αλληλούχιση Sanger.....	- 14 -
1.6	Σκοπός Πτυχακής Εργασίας.....	- 16 -
2.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	- 17 -
2.1	Υλικά.....	- 17 -

2.2	Όργανα	- 17 -
2.3	Μέθοδοι.....	- 17 -
2.3.1	Ανάπτυξη Φυτών	- 17 -
2.3.2	Απομόνωση RNA.....	- 18 -
2.3.3	Υπολογισμός Συγκέντρωσης RNA με τη βοήθεια Φασματοφωτόμετρου ..	- 19 -
2.3.4	Σύνθεση Συμπληρωματικού Κλώνου DNA (cDNA)	- 20 -
2.3.5	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	- 21 -
2.3.6	Καθαρισμός DNA	- 22 -
2.3.7	NESTED PCR & RT – PCR	- 22 -
2.3.8	Ηλεκτροφόρηση σε Πηκτή Αγαρόζη	- 23 -
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	- 25 -
4.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ	- 36 -
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	- 37 -
5.1	Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία	- 37 -
5.2	Ελληνική Βιβλιογραφία.....	- 48 -
5.3	Βιβλιογραφία Εικόνων	- 48 -

Πίνακας Εικόνων

Εικόνα 1: Παράγοντες στρες, δημιουργία ROS, οξειδωτική βλάβη και αντιοξειδωτική άμυνα (Caverzan et al., 2016)..... - 5 -

Εικόνα 2: Η διαδικασία της κυτταρικής αποτοξίνωσης τόσο των εξωγενών όσο και των ενδογενών παραγόντων συνεπάγεται δύο φάσεις: τη Φάση I (οξειδωτικές αντιδράσεις ενεργοποίησης) και τη Φάση II (συζυγικές αντιδράσεις), που πραγματοποιούνται από αρκετές μεγάλες και διαφορετικές οικογένειες γονιδίων (McElwee et al., 2007). - 6 -

Εικόνα 3: Αναπαράσταση φυλογενετικού δέντρου που επεξηγεί την ποικιλία των GST και την σχέση μεταξύ των κλάσεων (Dixon et al, 2002)..... - 9 -

Εικόνα 4: Απεικόνιση της δομής διμερούς GST. Αναπαράσταση μιας τυπικής υπομονάδας GST (*Z. mays* GSTFI, pdb IBYE), με την αμινοτελική περιοχή βαμμένη πράσινη, την περιοχή σύνδεσης κόκκινη, την καρβοξυτελική περιοχή μπλε και την πρωτεϊνική επιφάνεια γκρι. Η ένωση του γλουταθείου με ένα ζιζανιοκτόνο (atrazine) απεικονίζεται με τα σφαιρίδια στο ενεργό κέντρο. Η περιοχή αυτή ένωσης (G θέση) απεικονίζεται με κίτρινο χρώμα, ενώ η υδρόφοβη περιοχή (H θέση) αντίστοιχα με γαλάζιο(Dixon et al, 2002). - 10 -

Εικόνα 5: Η Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR) πραγματοποιείται σε 3 στάδια τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά (Παπανικολάου & Παλαιολόγου, 2016).	- 12 -
Εικόνα 6: Τα στάδια της Αντίστροφης Μεταγραφής – PCR (RT – PCR) (Bachman, 2013)-	13 -
Εικόνα 7: Ηλεκτροφόρησης με gel Αγαρόζης (Bhatia & Dahiya, 2015).	- 14 -
Εικόνα 8: Η μέθοδος αλληλουχίας Sanger σε 7 βήματα. (1) Το θραύσμα dsDNA μετουσιώνεται σε δύο θραύσματα ssDNA. (2) Ένα θραύσμα ssDNA πολλαπλασιάζεται σε εκατομμύρια αντίγραφα. (3) Πρόσδεση ενός εκκινητή που είναι συμπληρωματικός ως προς το ένα άκρο του τμήματος. (4) Τα θραύσματα προστίθενται σε τέσσερα διαλύματα πολυμεράσης. Κάθε διάλυμα περιέχει τους τέσσερις τύπους βάσεων αλλά μόνο έναν τύπο νουκλεοτιδίου τερματισμού. (5) Η αλυσίδα μεγαλώνει έως ότου προστεθεί τυχαία ένα νουκλεοτίδιο τερματισμού. (6) Τα προκύπτοντα θραύσματα dsDNA αναδιατάσσονται για να ληφθεί μια σειρά ssDNA διαφόρων μηκών. (7) Τα θραύσματα διαχωρίζονται μέσω ηλεκτροφόρησης και προκύπτουν οι αλληλουχίες (Gauthier, 2007).	- 15 -
Εικόνα 9: Τα στάδια ανάπτυξης των σπόρων φασολιού από τις 12, 15, 19 και 26 Οκτωβρίου.	- 18 -
Εικόνα 10: Μηχάνημα ηλεκτροφόρησης μέσα στο οποίο είναι τοποθετημένο το gel αγαρόζης φορτωμένο με τα δείγματα	- 24 -
Εικόνα 11: a) Ζώνες ηλεκτροφόρησης πριν την κοπή b) Ζώνες ηλεκτροφόρησης μετά την κοπή	- 25 -
Εικόνα 12: Οι αλληλουχίες των σπόρων φασολιών του τύπου γίγαντες.....	- 25 -
Εικόνα 13: Οι αλληλουχίες των σπόρων φασολιών του τύπου ελέφαντες.....	- 26 -
Εικόνα 14: Αποτελέσματα στοίχισης των αλληλουχιών από τους δύο τύπους φασολιών. -	28 -
Εικόνα 15: Αποτελέσματα στοίχισης των αλληλουχιών από τους δύο τύπους φασολιών και από το <i>Phaseolus vulgaris</i>	- 29 -
Εικόνα 16: Τελικό γονίδιο γιγάντων. a) Αλληλουχία τελικού γονιδίου, b) παρουσία τελικού γονιδίου παρουσία αμινοξέων και c) απεικονίζονται τα διαφορετικά ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης.....	- 31 -
Εικόνα 17: Τελικό γονίδιο ελεφάντων. a) Αλληλουχία τελικού γονιδίου, b) παρουσία τελικού γονιδίου παρουσία αμινοξέων και c) απεικονίζονται τα διαφορετικά ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης.....	- 33 -
Εικόνα 18: Ανάλυση αλληλουχίας νέων GSTs. A) Η ανάλυση BlastX και των δύο νέων GST, έδειξε ότι αυτές ανήκουν στην κλάση Phi με πιο στενά συνδεδεμένη την XP_014504458.1 γλουταθειόνη S-μεταφοράση από <i>V. radiata</i> var. <i>Radiata</i> (γονίδιο NC_028356.1). Πολλαπλή ευθυγράμμιση αλληλουχιών νουκλεοτιδίων GSTs με NC_028356.1 S-μεταφοράση γλουταθειόνης [<i>V. radiata</i> var. <i>radiata</i>] δείχνει την εξαιρετικά διατηρημένη τοποθεσία G στο N-άκρο που αντιστοιχεί στον τομέα κλάσης με cd03053: GST_N_Phi. Μέρος της τοποθεσίας GST_C_Phi μπορεί να βρεθεί στο καρβοξυτελικό άκρο. B) Πρόβλεψη πολλαπλής	

ευθυγράμμισης και δευτερογενούς δομής των πεπτιδικών αλληλουχιών GST της διατηρημένης θέσης G με cd03053: συναίνεση κλάσης GST_N_Phi και XP_014504458.1 S-μεταφοράση γλουταθειόνης [*V. Radiata* var. *radiata*]. **C)** Κοντινή σε δομή πρωτεΐνης 5F05 που βρέθηκε με βάση την αλληλουχία χρησιμοποιώντας HHPred και το Tuebingen Bioinformatics Toolkit. **D)** Μια αλυσίδα από 5F05 (πράσινο) και 6F05 (κίτρινο) στενής δομής πρωτεϊνών που υπερτοποθετούνται έναντι του δομικού μοντέλου των νέων GSTs (Magenta). **E)** Εστιασμένη υπερθέση μοντέλου..... - 35 -

Πίνακας Πινάκων

Πίνακας 1: Οι τις % ομοιότητες των αλληλουχιών των γιγάντων που προέκυψαν με την μέθοδο Sanger με το *Phaseolus vulgaris*, καθώς και με άλλα φυτά..... - 26 -

Πίνακας 2: Οι τις % ομοιότητες των αλληλουχιών των ελέφαντων που προέκυψαν με την μέθοδο Sanger με το *Phaseolus vulgaris*, καθώς και με άλλα φυτά..... - 27 -

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

DNA: Deoxyribonucleic acid (Δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ)

RNA: Ribonucleic acid (Ριβονουκλεϊκό οξύ)

ROS: Reactive Oxygene Species (Ενεργές Μορφές Οξυγόνου)

GST: Glutathione S- Transferase (Μεταφοράσης της Γλουταθειόνης)

PCR: Polymerase Chain Reaction (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης)

RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction (αντίστροφη μεταγραφή)

cDNA: Complementary DNA (Συμπληρωματικό DNA)

mRNA: Αγγελιοφόρο ριβονουκλεϊκό οξύ

ROS: Ενεργή μορφή οξυγόνου

MDB: Membrane Desalting Buffer

DNase: Deoxyribonuclease (δεοξυριβονουκλεάση)

dNTPs: deoxyriboNucleotide Triphosphates (τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια)

T_M: Θερμοκρασία που περιέχει 50% μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας

DTT: Dithithreitol (Διθειοθρεϊτόλη)

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Φασόλι

Το φασόλι ανήκει στην οικογένεια Fabaceae και στο γένος Phaseolus, του οποίου ο αριθμός των ειδών εκτιμάται ότι ανέρχεται στα 150 είδη περίπου χωρίς αυτό όμως να είναι πλήρως ακριβές (Maiti, 1997). Τα κυριότερα είδη που καλλιεργούνται παγκοσμίως είναι το *P. vulgaris* L., το *P. coccineus* L., το *P. lunatus* L. και το *P. acutifolius* A. (Aramuganathan & Earle, 1991). Στην Ελλάδα όμως δυο είναι κυρίως τα είδη που καλλιεργούνται, με μεγαλύτερο ποσοστό να καταλαμβάνει το κοινό φασόλι (*Phaseolus vulgaris*) και μικρότερο το πολυανθές φασόλι (*Phaseolus coccineus*) (Παπακώστα- Τασοπούλου, 2012). Η προέλευση του *P. vulgaris* είναι από την Αμερική και συγκεκριμένα από το Μεξικό και από την περιοχή των Άνδεων της Νότιας Αμερικής (Graham & Ranali, 1997). Η καλλιέργειά του είναι δυνατή από τις τροπικές έως και τις εύκρατες ζώνες (Hernández, 2018). Το συγκεκριμένο είδος έχει μεγάλο αγρονομικό ενδιαφέρον παγκοσμίως καθώς αποτελεί μια από τις κύριες πηγές πρωτεϊνών, φυτικών ινών, υδατανθράκων και βιταμινών στην ανθρώπινη διατροφή (Beebe et al., 2000). Αναλυτικότερα, αντιπροσωπεύει το 65% της συνολικής πρωτεΐνης που καταναλώνεται και το 32% της ενέργειας (Welch et al., 2000; Blair et al., 2010). Ωστόσο, αποτελεί και μια μικρή πηγή μικροθρεπτικών συστατικών όπως είναι ο σίδηρος, ο ψευδάργυρος η θειαμίνη και το φολικό οξύ (Pennington & Young, 1990; Broughton et al., 2003). Οι θρεπτικές αυτές ιδιότητές του το καθιστούν μια λειτουργική τροφή για την διατήρηση της καλής υγείας λόγω της υψηλής περιεκτικότητας του σε πρεβιοτικά και θρεπτικά στοιχεία (Chávez-Mendoza & Sanchez, 2017). Το είδος *P. Coccineus*, στο οποίο ανήκουν οι ποικιλίες γίγαντες-ελέφαντες εμφανίστηκε για πρώτη φορά στο Μεξικό (πολύ αργότερα από το κοινό φασόλι) και στην συνέχεια επεκτάθηκε στην Ν. Κολομβία. Τέλος, οι διαφορές μεταξύ αυτών των δυο ειδών είναι κυρίως μορφολογικές, καθώς το πολυανθές φασόλι έχει μεγαλύτερα φύλλα και άνθη από το κοινό, αλλά και στο ότι το φυτόμα του είναι υπόγειο και όχι επίγειο (Παπακώστα- Τασοπούλου, 2012).

1.1.1 Οικολογικές Απαιτήσεις

Το κοινό φασόλι προσαρμόζονται σε ποικίλα περιβάλλοντα αλλά με τις μεγαλύτερες αποδόσεις να τις εμφανίζει στα εύκρατα κλίματα. Ως προς το έδαφος προτιμάει κυρίως ελαφρά μέσης σύστασης, καλά στραγγιζόμενα με μικρή ή μέτρια περιεκτικότητα σε ασβέστιο και με άριστες τιμές pH κοντά στο 6. Το φυτό είναι ιδιαίτερα ευπαθές στον παγετό σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης του, καθώς η θερμοκρασία επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό διάφορες λειτουργίες του, όπως την αναπνοή και την φωτοσύνθεση. Τόσο η πολύ υψηλή όσο και η πολύ χαμηλή θερμοκρασία έχουν αρνητική επίδραση στην καρπόδεση. Η καλύτερη για την ανάπτυξη του κυμαίνεται μεταξύ 14-24°C. Επιπλέον, το φασόλι χαρακτηρίζεται ως ηλιόφιλο γιατί θεωρείται ένα αρκετά απαιτητικό φυτό ως προς την ένταση του φωτός και την ηλιοφάνεια. Το φασόλι σε συνθήκες καταπόνησης και συγκεκριμένα σε συνθήκες ξηρασίας είναι αρκετά ευαίσθητο. Αυτό που πρέπει να τονιστεί είναι ότι κατά την διάρκεια της άνθισης αν παρουσιαστούν συνθήκες έλλειψης νερού τότε παρατηρείται σημαντική πτώση ανθέων και λοβών (Παπακόστα- Τασοπούλου, 2012; Καζάη, 2015).

1.2 Αιτίες Καταπόνησης

Όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί επηρεάζονται σημαντικά από τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Τα φυτά όμως λόγω έλλειψης κινήσεως εξαρτώνται ιδιαίτερα από τις συνθήκες αυτές και γι' αυτό έχουν αναπτύξει εξελιγμένα συστήματα επιβίωσης και αντιμετώπισης των περιβαλλοντικών αντιξοοτήτων (Nianiou- Obeidat et al., 2017). Οι δύο μεγάλες κατηγορίες στις οποίες διακρίνονται οι περιβαλλοντικές καταπονήσεις είναι οι αβιοτικές όπως η υψηλή ή χαμηλή θερμοκρασία και οι βιοτικές καταπονήσεις όπως οι προσβολές από παθογόνα (Gull et al., 2019). Από αυτές τις δύο κατηγορίες καταπονήσεων οι πιο επιβλαβείς τόσο για την ανάπτυξη όσο και για την παραγωγικότητα των καλλιεργειών σε παγκόσμιο επίπεδο είναι οι αβιοτικές (Gao et al., 2007). Οι καταπονήσεις σε επίπεδο παραγωγής έχουν τη δυνατότητα να προκαλέσουν σε μια καλλιέργεια τη μεγαλύτερη απώλεια σε σύγκριση με οποιονδήποτε άλλο παράγοντα και να οδηγήσουν σε 70% μείωση της αναμενόμενης απόδοσης (Wang et al., 2003; Acquaah, 2007). Επιπλέον, δύναται αυτό το ποσοστό να αυξηθεί με

την πάροδο του χρόνου, εξαιτίας των αναμενόμενων κλιματικών αλλαγών (Lane et al., 2007).

1.2.1 Ενεργές Μορφές Οξυγόνου ROS

Οι ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS) λειτουργούν ως μεταβολικά προϊόντα που ρυθμίζουν την ανάπτυξη των φυτών (Foyer & Noctor, 2009; Mittler, 2017; Noctor et al., 2018) ή ως συστατικά σηματοδότησης σε καταστάσεις στρες (Liu & He, 2016). Τα ROS παράγονται σε διάφορα υποκυτταρικά οργανίδια όπως στους χλωροπλάστες, στα μιτοχόνδρια, στα υπεροξεισώματα και στον αποπλαστικό χώρο, αλλά παράγονται και από πολλές οδούς όπως μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων στη φωτοσύνθεση και στην αναπνοή, οξείδωση λιπαρών οξέων και άλλα (Bose et al., 2014; Moller et al., 2007; Wrzaczek et al., 2013).

Τα ROS διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία των φυτών, συμπεριλαμβανομένης της αβιοτικής και βιοτικής αντοχής, της ανάπτυξης και της κυτταρικής σηματοδότησης (Marino et al., 2012; Suzuki et al., 2011). Ωστόσο, σε υψηλά επίπεδα καθίστανται επιβλαβή για τα φυτά (Liu & He, 2016) προκαλώντας υπεροξειδωση λιπιδίων στις κυτταρικές μεμβράνες, μετουσίωση πρωτεϊνών, οξείδωση υδατανθράκων, διάσπαση της χρωστικής και βλάβη του DNA (Moller et al., 2007; Ivanova et al., 2016). Επομένως, τα επίπεδα ROS καθορίζονται από μια αυστηρά ελεγχόμενη ισορροπία μεταξύ της παραγωγής και της διάσπασης μέσω εξελιγμένων και εξαιρετικά πολύπλοκων αντιοξειδωτικών συστημάτων (Mittler et al., 2011; Noctor et al., 2012).

1.2.2 Αβιοτικές Καταπονήσεις

Το αβιοτικό στρες επηρεάζει αρνητικά την ανάπτυξη και την παραγωγικότητα των φυτών μέσω μιας σειράς μορφολογικών, φυσιολογικών, βιοχημικών και μοριακών αλλαγών (Wang et al., 2000). Οι κυριότερες αβιοτικές καταπονήσεις είναι η ξηρασία, η αλατότητα, η υψηλή και χαμηλή θερμοκρασία, η ακτινοβολία, τα βαρέα μέταλλα, η περίσσεια θρεπτικών στοιχείων καθώς και οι ανθρωπογενείς πηγές όπως είναι τα ζιζανιοκτόνα (Kaur & Gupta, 2005; de Almeida Cançado, 2011). Από αυτούς τους παράγοντες που συμβάλλουν στην ανάπτυξη των φυτών ο σημαντικότερος είναι η διαθεσιμότητα του νερού, η οποία σχετίζεται άμεσα με την αλατότητα του εδάφους (Rodríguez et al., 2005).

Συγκεκριμένα η συγκέντρωση αλάτων προκαλεί μείωση στην πρόληψη νερού και θρεπτικών στοιχείων. Η έκθεση του φυτού στις καταπονήσεις αυτές έχει ως συνέπεια την παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου ROS (Reactive Oxygen Species).

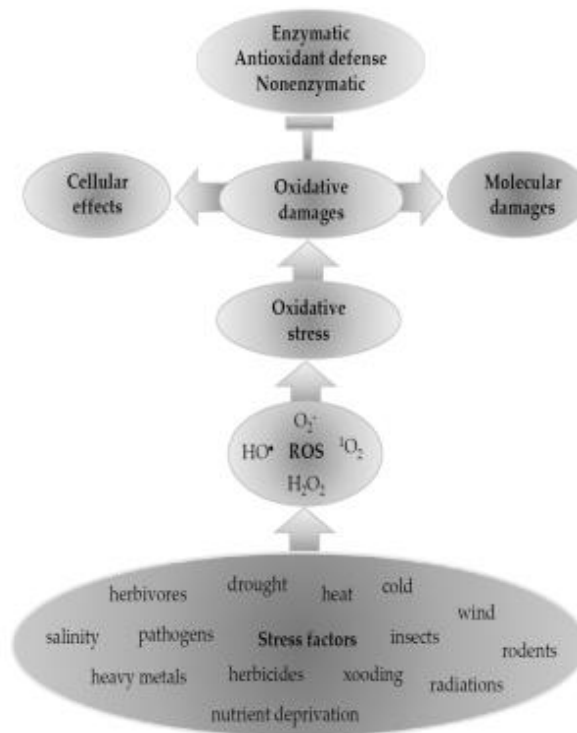
1.2.3 Βιοτικές Καταπονήσεις

Εκτός από το αβιοτικό στρες, υπό φυσικές συνθήκες, τα φυτά καλούνται να ανταπεξέλθουν και έναντι του βιοτικού στρες. Αυτό οφείλεται σε ζωντανούς οργανισμούς και κυρίως μολύνσεις από παθογόνα, συμπεριλαμβανομένων ιών, βακτηρίων, μυκήτων και νηματοειδών (Atkinson & Urwin, 2012). Αυτοί οι παράγοντες στερούν άμεσα από τον ξενιστή τους τα θρεπτικά συστατικά και οδηγούν στην ελαχιστοποίηση της παραγωγής διότι είναι υπεύθυνοι για διάφορους τύπους ασθενειών και μολύνσεων. Επιπλέον, πολλές από αυτές τις καταπονήσεις επηρεάζουν σημαντικά την διαδικασία της φωτοσύνθεσης, καθώς από τις μολύνσεις των ιών μειώνεται ο ρυθμός φωτοσύνθεσης ανά επιφάνεια φύλλου, αλλά και από τα μασητικά έντομα που μειώνουν την φυλλική επιφάνεια (Gull et al., 2019). Τέλος, οι βιοτικές καταπονήσεις συσχετίζονται κατά κάποιο τρόπο με τις αβιοτικές, καθώς έχει αποδειχθεί ότι οι τελευταίες αποδυναμώνουν τους αμυντικούς μηχανισμούς των φυτών και τα καθιστούν πιο ευαίσθητα σε μολύνσεις παθογόνων (Amtmann et al., 2008; Goel et al., 2008; Mittler & Blumwald, 2010; Atkinson & Urwin, 2012)

1.3 Μηχανισμοί Άμυνας

Τα φυτά για να ανταπεξέλθουν στις περιβαλλοντικές καταπονήσεις διαθέτουν μορφολογικούς – φυσιολογικούς μηχανισμούς. Συγκεκριμένα, προστατεύονται μέσω των κήρων, της εφίμενιδας, του κυτταρικού τοιχώματος, τα στομάτια, τις νευρώσεις των φύλλων, την ενδοδερμίδα και τα επιφανειακά τριχίδια (Τζάμος, 2007). Πέρα από αυτά τα φυτά διαθέτουν αμυντικούς μηχανισμούς. Αναλυτικότερα, ενεργοποιούνται οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί κάτω από αυτές τις συνθήκες για να ενισχύσουν τη δομική ακεραιότητα των κυτταρικών συστατικών (Caverzan et al., 2016). Οι αμυντικοί μηχανισμοί διακρίνονται σε δυο κύριες κατηγορίες τους μη ενζυματικούς και τους

ενζυματικούς οι οποίοι επίσης διακρίνονται σε δύο υποκατηγορίες ανάλογα με τα συστατικά τους.



Εικόνα 1: Παράγοντες στρες, δημιουργία ROS, οξειδωτική βλάβη και αντιοξειδωτική άμυνα (Caverzan et al., 2016)

1.3.1 Μη Ενζυματικοί Μηχανισμοί Άμυνας

Ως ισχυρά μη ενζυματικά συστατικά του αντιοξειδωτικού αμυντικού μηχανισμού των φυτών είναι το ασκορβικό οξύ (AsA), η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), τα καροτενοειδή, η α - τοκοφερόλη και τα φλαβονοειδή (Scandalios, 2005; Horie et al., 2009; Gratão et al., 2005).

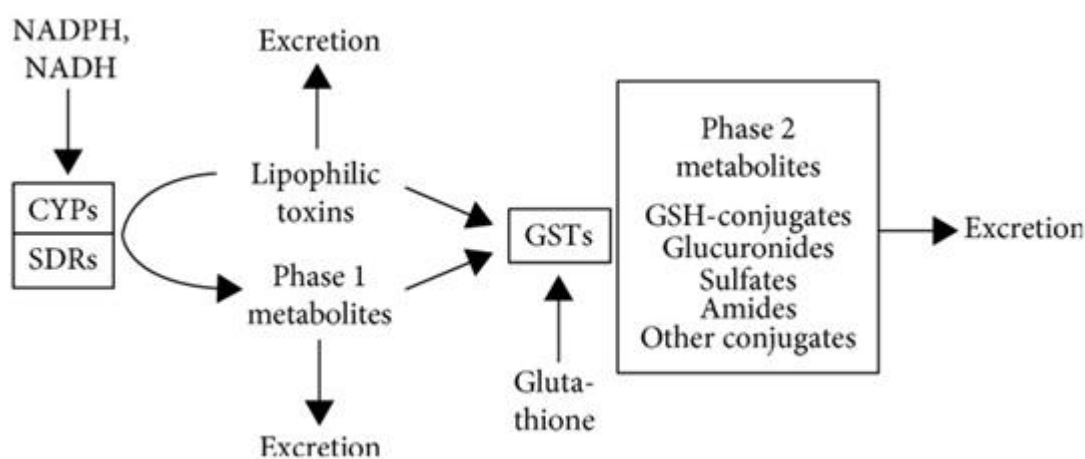
1.3.2 Ενζυματικοί Μηχανισμοί Άμυνας

Τα ενζυματικά συστατικά του αντιοξειδωτικού αμυντικού μηχανισμού περιλαμβάνουν τα ένζυμα όπως, υπεροξειδική δεσμουτάση (Superoxide Dismutase SOD), καταλάση (Catalase CAT), υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Glutathione Peroxidase GPX), S- μεταφοράση της γλουταθειόνης (Glutathione-S-transferase GST), υπεροξειδάση γουαϊακόλης (POX) και ένζυμα του κύκλου ασκορβικού-γλουταθειόνης (AsA-GSH), όπως ασκορβική υπεροξειδάση (Ascorbate Peroxidase APX), μονοδεϋδροασκορβική αναγωγή (MDHAR),

δεϋδροασκορβική αναγωγή (DHAR) και αναγωγή γλουταθειόνης (GR) (Noctor & Foyer, 1998; Mittler, 2002; Gratão et al., 2005; Hwang et al., 2012).

1.4 Οι Μεταφορές της Γλουταθειόνης (Glutathione-S-transferase GSTs)

Οι αρχικές αναφορές σχετικά με το ένζυμο φυτικής μεταφοράσης S-transferase (GST) έγιναν γύρω στο 1970, όταν ανακαλύφθηκε ότι συνέβαλαν στην κατάλυση του ζιζανιοκτόνου atrazine στα φυτά σόργου και καλαμποκιού (Frear & Swanson, 1970; Lamoureaux et al., 1970). Οι GSTs είναι πολυλειτουργικά ένζυμα που κωδικοποιούνται από μεγάλες οικογένειες γονιδίων (Gullner et al., 2018) και συμμετέχουν στο μηχανισμό αποτοξίνωσης του κυττάρου, μια διαδικασία που πραγματοποιείται σε τρία διακριτά στάδια (φάση I, II & III) (Liu et al., 2013). Επιπλέον, καταλύουν μια ποικιλία αντιδράσεων με πολυάριθμα εναλλακτικά υποστρώματα (Chronopoulou & Labrou, 2009; Mannervik 2012). Τεράστιο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη τους, τόσο λόγω του ότι είναι ικανά να προσδώσουν αντοχή στα φυτά έναντι των αβιοτικών και βιοτικών καταπονήσεων, όσο και για την ικανότητά τους να αποτοξινώνουν τα ζιζανιοκτόνα (Nianiou-Obeidat et al., 2017).



Εικόνα 2: Η διαδικασία της κυτταρικής αποτοξίνωσης τόσο των εξωγενών όσο και των ενδογενών παραγόντων συνεπάγεται δύο φάσεις: τη Φάση I (οξειδωτικές αντιδράσεις ενεργοποίησης) και τη Φάση II (συζυγικές αντιδράσεις), που πραγματοποιούνται από αρκετές μεγάλες και διαφορετικές οικογένειες γονιδίων (McElwee et al., 2007).

Επίσης, μια σειρά λειτουργικών μελετών σε μεμονωμένα ένζυμα GSTs οδήγησε στο συμπέρασμα ότι τα ένζυμα αυτά μπορούν να έχουν θετική επίδραση στην αντιμικροβιακή αντοχή στα φυτά ξενιστές με αγνώστους κυρίως

μηχανισμούς (Dixon et al., 2009; Sappl et al., 2009; Liao et al., 2014; Wahibah et al., 2018). Μια από τις πιο αναγνωρισμένες λειτουργίες των GSTs είναι η συμβολή τους στις αντιοξειδωτικές αντιδράσεις μαζί με το βασικό κυτταρικό αντιοξειδωτικό GSH, με στόχο την εξάλειψη των ROS και των λιπιδικών υδροϋπεροξειδίων που συσσωρεύονται σε μολυσμένους ιστούς (Wagner et al., 2002). Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι η GSH έχει σημαντικό ρόλο στις αντιδράσεις σηματοδότησης αλλά και στις αμυντικές σε μολυσμένα φυτά (Datta et al., 2015; Gullner et al., 2017; Hernandez et al., 2017).

1.4.1 Ταξινόμηση & Ονοματολογία

Οι μεταφοράδες της γλουταθειόνης (GSTs) αρχικά έχουν ταξινομηθεί σε τέσσερις οικογένειες τις κυτταροπλασματικές, τις μεμβρανικές μικροσωμικές, τις μιτοχονδριακές της κ (Kappa) τάξης και τις GSTs που προσδίδουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό φωσφομυκίνη (Chronopoulou & Labrou, 2009; Board & Menon, 2013) και έχουν υποδιαιρεθεί σε οχτώ κλάσεις (Edwards & Dixon, 2005). Συγκεκριμένα, οι επτά από τις οχτώ ανήκουν στις κυτταροπλασματικές και χαρακτηρίζονται ως φ (Phi), τ (Tau), θ (Theta), ζ (Zeta), λ (Lamda), DHAR (Ρεδουκτάση του διϋδροασκορβικού) και TCHQD (Απαλογονάση της τετραχλώρο υδροκινόνης), ενώ η μια κλάση ανήκει στις μικροσωμικές GSTs (Lan et al., 2009; Dixon et al., 2010; Jain et al., 2010; Liu et al., 2013). Για την ονοματολογία τους προτάθηκε από τους Edwards και συν. (2000) να υιοθετηθεί το σύστημα που χρησιμοποιείται για τις GSTs των θηλαστικών.

1.4.1.1 Κλάσεις φ & τα

Οι GSTs που απαντώνται μόνο στους φυτικούς οργανισμούς ανήκουν σε αυτές τις δυο κλάσεις τις φ και τ, οι οποίες είναι και οι πολυπληθέστερες (Βούλγαρη 2014). Το χαρακτηριστικό αυτών των δυο κλάσεων είναι η επαγωγικότητά τους από τις αβιοτικές και βιοτικές καταπονήσεις, κάτι που έχει χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση και την κλωνοποίηση ενός αριθμού γονιδίων GST (Marrs 1996; Dean et al., 2005). Από λειτουργικής απόψεως επηρεάζουν κυρίως την εκλεκτικότητα των ζιζανιοκτόνων σε καλλιεργούμενα φυτά, παρέχουν προστασία έναντι της οξειδωτικής καταπόνησης καθώς συμμετέχουν στον ενδογενή κυτταρικό μεταβολισμό ως υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (Dixon et

al., 2002a) και λειτουργούν τόσο ως πρωτεΐνες σηματοδότησης (Loyal et al., 2000), όσο και ως ρυθμιστικές πρωτεΐνες της απόπτωσης (Kampranis et al., 2000)

1.4.1.2 Κλάσεις θ & ζ

Οι GSTs που κατατάσσονται στις κλάσεις θ και ζ απαντώνται σε φυτικούς και σε ζωικούς οργανισμούς και είναι συντηρημένες πρωτεΐνες. Οι GSTs της κλάσης θ παρουσιάζουν υψηλή δράση υπεροξειδάσης, συμβάλλοντας έτσι στην αποτοξίνωση των υδροϋπεροξειδικών λιπιδίων (Dixon et al., 2009; Cummins et al., 2011). Ενώ, της κλάσης ζ εμπλέκονται κυρίως στον καταβολισμό της τυροσίνης ως ισομεράσες εξαρτώμενες από την γλουταθειόνη (Βούλγαρη, 2014).

1.4.1.3 Κλάσεις DHAR & λ

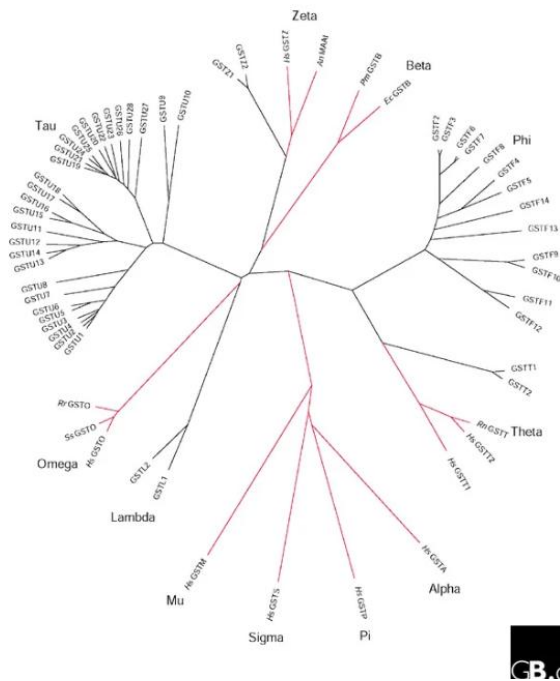
Στις κλάσεις DHAR και λ ανήκουν οι GSTs που δρουν ως θειολοτρανσφεράσες (Βούλγαρη, 2014). Οι GSTs της κλάσης DHAR έχουν την δυνατότητα να ανάγουν το διϋδροασκορβικό σε ασκορβικό οξύ, παράγοντας δισουλφίδιο της GSH ως παραπροϊόν (Dixon et al., 2002a). Οι GSTs της λ κλάσης λειτουργούν ως αντιοξειδωτικά ένζυμα καθώς επάγονται μετά από την έκθεση των ριζών της αραβίδωσης σε χημικές ουσίες ή σε άλλο τύπο οξειδωτικής καταπόνησης (Sapri et al., 2004).

1.4.1.4 TCHQD GST

Στην συγκεκριμένη κλάση μόνο ένα ένζυμο έχει αναγνωριστεί μέχρι στιγμής στην αραβίδωση. Η πρωτεΐνη δεν έχει χαρακτηριστεί λειτουργικά προς το παρόν, αλλά πιθανότατα να είναι παρόμοια με τα ένζυμα των προκαρυωτικών οργανισμών (Βούλγαρη, 2014).

1.4.1.5 Μικροσωμικές GSTs

Το χαρακτηριστικό των μικροσωμικών GSTs είναι ότι μπορούν να καταλύουν αντιδράσεις που εξαρτώνται από την GSH. Συγκεκριμένα ανήκουν στην οικογένεια MAPEG (Membrane Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism) οι οποίες συμμετέχουν στον μεταβολισμό των εικοσανοειδών και της GSH (Jakobsson et al., 2009).



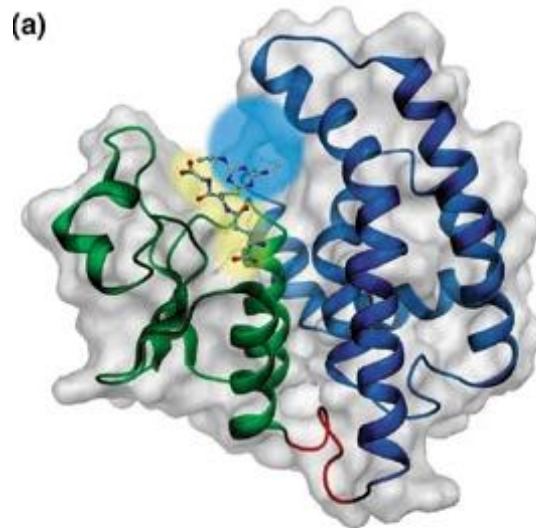
Εικόνα 3: Αναπαράσταση φυλογενετικού δέντρου που επεξηγεί την ποικιλία των GST και την σχέση μεταξύ των κλάσεων (Dixon et al, 2002).

1.4.2 ΔΟΜΗ

Η τρισδιάστατη δομή πολλών GST περιλαμβανομένων των κύριων κατηγοριών (ανθρωπίνων, ζωικών, φυτικών και βακτηριακών), έχουν μελετηθεί εκτενώς με την χρήση κρυσταλλικών δομών υψηλής ανάλυσης (κρυσταλλογραφία ακτίνων X) (Dirr et al., 1994). Μέσω της συγκεκριμένης μεθόδου ανάλυσης έχουν προκύψει αρκετές πληροφορίες γύρω από τις φυτικές GSTs. Συγκεκριμένα, για τις GST φ από το είδος *Arabidopsis thaliana* (Reinemer et al., 1996) για την GST τ από *Triticum aestivum* (Thom et al., 2002), από *Zea mays* (Neufelind et al., 1997a,b), από *Oryza sativa* (Dixon et al., 1998) και από *Glycine max* (Axarli et al., 2009).

Οι GSTs δρουν ως διμερή, αποτελούμενα από δυο υπομονάδες είτε παρόμοιες (ομοδιμερή) είτε διαφορετικές (ετεροδιμερή). Η κάθε υπομονάδα αποτελείται από 200-250 αμινοξικά κατάλοιπα με μοριακό βάρος περίπου 25-28 kDa, οι οποίες τυπικά συνθέτουν μια υδρόφοβη πρωτεΐνη μοριακού βάρους 50 kDa (Dixon et al., 2002). Ωστόσο, υπάρχουν και δυο GSTs που φαίνεται να μπορούν να λειτουργήσουν ως μονομερή και συγκεκριμένα οι GSTLs και οι DHARs (Kumar et al., 2012; Lallement et al., 2014). Κάθε υπομονάδα GSTs έχει δυο ευδιάκριτες θέσεις δέσμευσης του υποστρώματος τουλάχιστον, τη G- θέση

και την H- θέση (Board & Menon, 2013). Η G-θέση βρίσκεται στην N- τελική περιοχή, όπου σχηματίζεται από μια ομάδα υπολειμμάτων αμινοξέων στην N- τελική περιοχή της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και δεσμεύει την γλουταθειόνη. Ενώ, η H- θέση εντοπίζεται στην C- τερματική περιοχή, όπου σχηματίζεται από υπολείμματα και από μια μεταβλητή αμινοξική αλληλουχία όπου δεσμεύονται υδρόφοβα υποστρώματα (Prade et al., 1998; Βούλγαρη, 2014).



Εικόνα 4: Απεικόνιση της δομής διμερούς GST. Αναπαράσταση μιας τυπικής υπομονάδας GST (*Z. mays* GSTFI, pdb IBYE), με την αμινοτελική περιοχή βαμμένη πράσινη, την περιοχή σύνδεσης κόκκινη, την καρβοξυτελική περιοχή μπλε και την πρωτεϊνική επιφάνεια γκρι. Η ένωση του γλουταθείου με ένα ζιζανιοκτόνο (atrazine) απεικονίζεται με τα σφαιρίδια στο ενεργό κέντρο. Η περιοχή αυτή ένωσης (G θέση) απεικονίζεται με κίτρινο χρώμα, ενώ η υδρόφοβη περιοχή (H θέση) αντίστοιχα με γαλάζιο (Dixon et al, 2002).

1.4.3 Λειτουργικός Ρόλος των GSTs

Οι GSTs έχουν ως βασικό λειτουργικό ρόλο την κυτταρική αποτοξίνωση μιας ευρείας κλίμακας ξеноβιοτικών ενώσεων και έχουν μελετηθεί και για την αποτοξίνωση των ζιζανιοκτόνων στα φυτά. Βέβαια, τα ένζυμα αυτά έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιούνται και ως υπεροξειδάσες, ισομεράσες αλλά και θειοτρανσφεράσες (Jowsey et al., 2003). Τα φυτικά ένζυμα GSTs επίσης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική απόκριση των αυξινών αλλά και στον φυσιολογικό μεταβολισμό των δευτερογενών φυτικών προϊόντων (Marrs, 1996).

Έχει εντοπιστεί ότι οι μεταφοράσες της γλουταθειόνης δραστηριοποιούνται τόσο σε ευκαρυωτικούς όσο και σε προκαρυωτικούς οργανισμούς (Wilce & Parker, 1994; Wongsantichon & Ketterman, 2005). Συγκεκριμένα, στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς αποτελούν την κύρια πηγή μη πρωτεϊνικήςθειόλης, η οποία είναι πιθανότατα μια σημαντική ρυθμιστική ουσία της οξειδοαναγωγής (Rouhier et al., 2008). Ωστόσο, έχει την ικανότητα να επιτελέσει και επιπλέον ρόλους, οι οποίοι μεταξύ άλλων και η σωστή ανάπτυξη του οργανισμού, ελέγχοντας την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και η απόκριση στο στρες (Rouhier et al., 2008). Αν και ο ακριβής της ρόλος μπορεί να μην έχει καθοριστεί πλήρως, είναι γνωστό ότι, ανάλογα με την κατάσταση της οξειδοαναγωγής, η γλουταθειόνη μπορεί να αντιδράσει με ενδοκυτταρικά μόρια. Επιπλέον, οι αντιδράσεις γλουταθειονυλίωσης – απογλουταθειονυλίωσης των πρωτεϊνών είναι βασικές για τις λειτουργίες της GSH (Zaffagnini et al., 2012; Lallement et al., 2014).

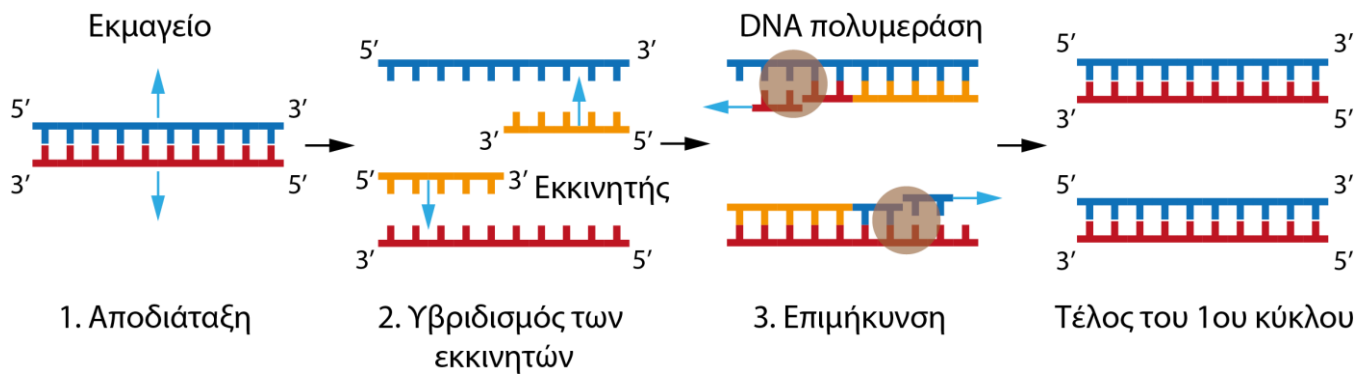
Ένας ακόμη λειτουργικός ρόλος των GSTs είναι η προστασία του κυττάρου από την οξειδωτική καταπόνηση. Καθώς πολλές GSTs έχουν δράση υπεροξειδάσης γλουταθειόνης GPx, τις καθιστούν από τους πιο σημαντικούς μηχανισμούς ενάντια στις ενεργές μορφές οξυγόνου ROS (Prohaska & Ganther, 1976). Επιπλέον, οι φυτικές GSTs συμμετέχουν στην άμυνα κατά των οξειδωτικών τραυμάτων που προκύπτουν κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής καταπόνησης σε αβιοτικές καταπονήσεις αλλά και σε επιθέσεις παθογόνων (Allocati et al., 2003; Moons, 2005).

1.5 Τεχνικές Μοριακής Βιολογίας

1.5.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η μέθοδος της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (PCR) θεωρείται μια από τις σημαντικότερες ανακαλύψεις της μοριακής βιολογίας. Η πρώτη περιγραφή της αλλά και εφαρμογή της έγινε από τους Saiki και συν το 1985 (Saiki et al., 1985) και ολοκληρώθηκε η βελτίωση της αργότερα από τους Mullis και Faloona (Mullis & Faloona, 1987). Η μέθοδος αυτή βρίσκει πληθώρα εφαρμογών σε διάφορες επιστήμες όπως στην ιατρική, στην βιολογία, στην εγκληματολογία, στην γενετική και σε άλλες.

Η βασική αρχή της PCR είναι απλή. Η τεχνική αυτή μπορεί να αντιγράψει ένα τμήμα του DNA *in vitro* κατά εκατομμύρια φορές. Συγκεκριμένα ένα μόριο DNA χρησιμοποιείται για την δημιουργία δυο αντιγράφων αρχικά, μετά τεσσάρων, οκτώ και ούτω καθεξής. Για την επίτευξη αυτού του συνεχή διπλασιασμού είναι απαραίτητη η παρουσία συγκεκριμένων πρωτεϊνών, οι οποίες ονομάζονται πολυμεράσες αλλά και ένα ζεύγος συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων ή εκκινητών, καθένα από τα οποία υβριδοποιείται με έναν κλώνο στόχο (dsDNA) (Mackay et al., 2002; Joshi & Deshrande, 2010). Τα στάδια για την ολοκλήρωση ενός κύκλου PCR είναι τα εξής: i) αποδιάταξη του DNA στους 90-95 °C, ii) προσαρμογή των εκκινητών 50-75 °C και iii) επιμήκυνση των εκκινητών 72-78 °C (Mackay et al., 2002).

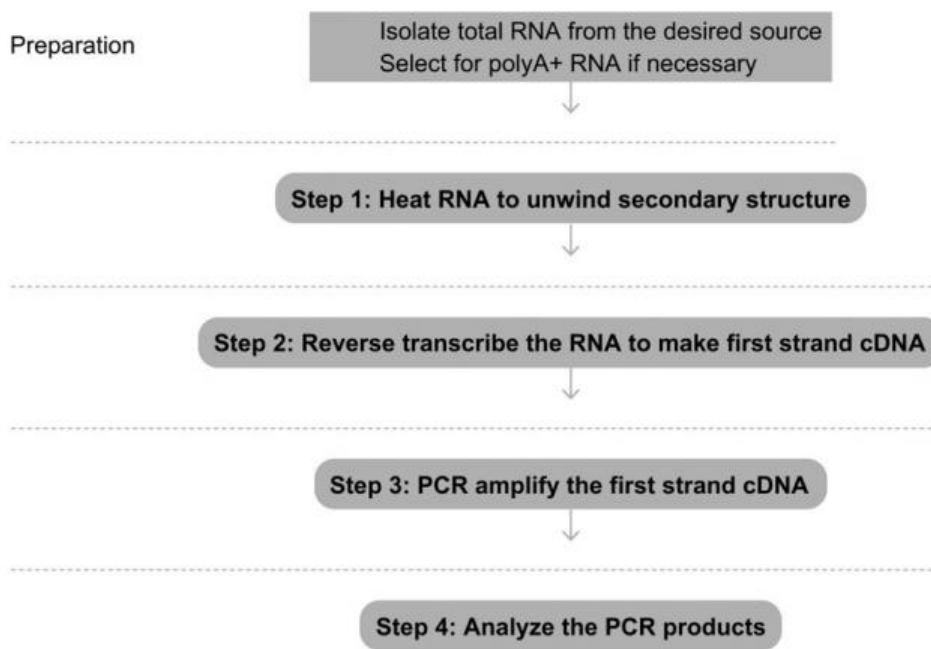


Εικόνα 5: Η Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR) πραγματοποιείται σε 3 στάδια τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά (Παπανικολάου & Παλαιολόγου, 2016).

1.5.2 Αντίστροφη Μεταγραφή - PCR (RT - PCR)

Η PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT – PCR) είναι ουσιαστικά μια τροποποίηση της συμβατής PCR, η οποία χρησιμοποιεί RNA ως υλικό έναρξης και συμβάλει στην ενίσχυση της δημιουργίας συμπληρωματικού DNA (cDNA) από το αγγελιοφόρο RNA (mRNA) (Farkas & Holland, 2009; Bachman, 2013). Η RT – PCR είναι μια διαδικασία που μπορεί να πραγματοποιηθεί ως δυο ξεχωριστές αντιδράσεις ή ως μια μεμονωμένη που απαιτεί την παρουσία ενός ειδικού ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης (Bachman, 2013). Επιπλέον, η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται ολοένα και περισσότερο λόγω της μεγάλης της ευαισθησίας, της υψηλής αναπαραγωγιμότητας αλλά και της μεγάλης κλίμακας της δυναμικής ποσοτικοποίησης (Lockey et al., 1998; Orlando et al., 1998; Bustin, 2000; Pfaffl & Hageleit, 2001). Τέλος, τα πλεονεκτήματα για την

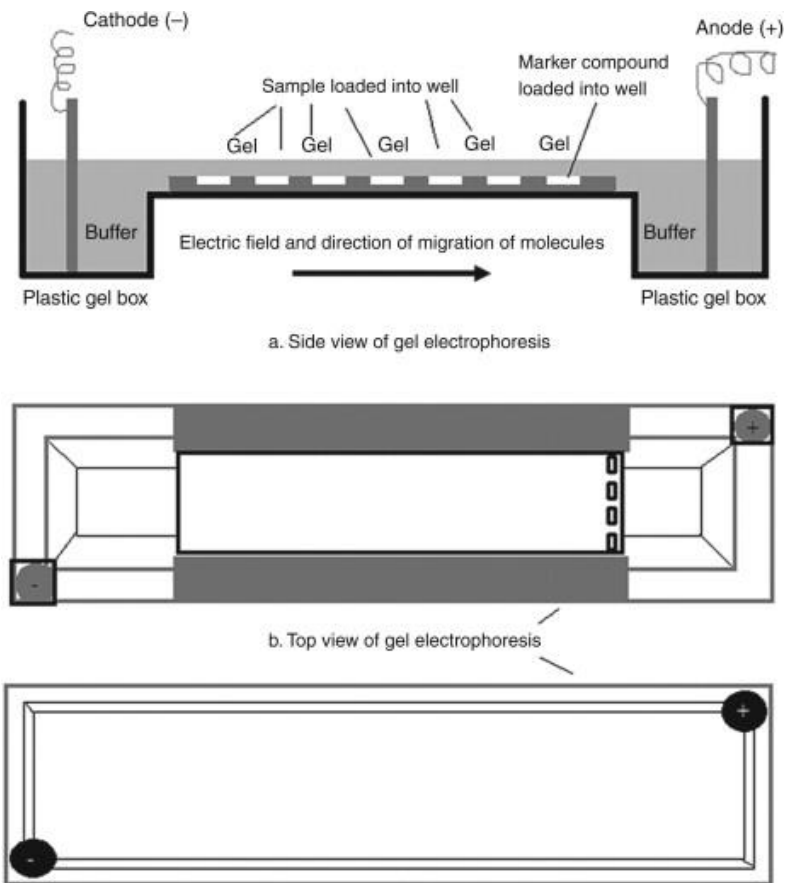
αποτελεσματικότητα της είναι η ειδικότητά της, ο χαμηλός φθορισμός του υποβάθρου, η απότομη αύξηση του φθορισμού και η υψηλή απόδοση ενίσχυσης (Cha & Thilly, 1993).



Εικόνα 6: Τα στάδια της Αντίστροφης Μεταγραφής – PCR (RT – PCR) (Bachman, 2013)

1.5.2 Ηλεκτροφόρηση με Πηκτή Αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση με πηκτή (gel) αγαρόζης έχει χαρακτηριστεί ως μια απλή και ιδιαίτερα αποτελεσματική μέθοδος ταυτοποίησης, διαχωρισμού και καθαρισμού των θραυσμάτων DNA με μοριακό βάρος που κυμαίνεται από 0,5 έως 25 kDa (Finney, 1998). Η διαδικασία για την πραγματοποίηση της ηλεκτροφόρησης μπορεί να διαιρεθεί σε τρεις φάσεις. Η πρώτη είναι η παρασκευή του gel αγαρόζης σε συγκέντρωση που να είναι κατάλληλη για το δείγμα DNA, η δεύτερη είναι η τοποθέτηση των δειγμάτων στις υποδοχές που έχουν δημιουργηθεί στο gel και η τρίτη είναι ο διαχωρισμός των ζωνών οι οποίες είναι ορατές απευθείας με την χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας (Voytas, 2000).



Εικόνα 7: Ηλεκτροφόρησης με gel Αγαρόζης (Bhatia & Dahiya, 2015).

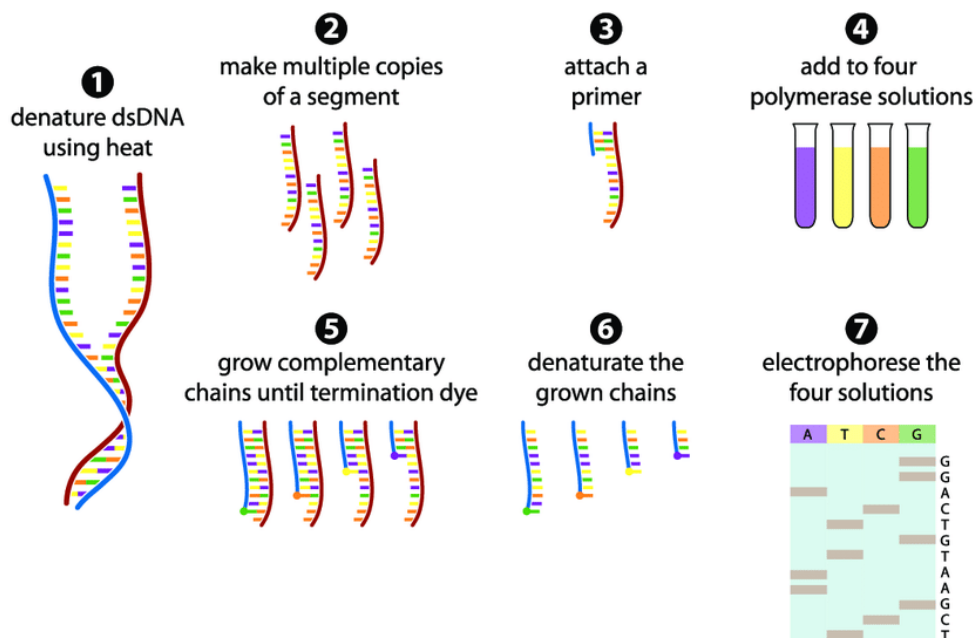
1.5.3 Αλληλούχιση Sanger

Η αλληλουχία του DNA προσδιορίζεται συχνά από τη μέθοδο τερματισμού αλυσίδας διδεοξυνουκλεοτιδίων (Ronaghi, 2001). Η μέθοδος αυτή είναι γνωστή και ως αλληλούχιση Sanger. Η μέθοδος Sanger αναπτύχθηκε το 1977 από τον Frederick Sanger και τους συνεργάτες του (Sanger et al., 1977) και αποτέλεσε μια από τις πιο διαδεδομένες και χρησιμοποιούμενες μεθόδους αλληλούχισης. Συγκεκριμένα, στηρίζεται στην τυχαία αφομοίωση διδεοξυνουκλεοτιδίων που προκαλούν τερματισμό της αλυσίδας από την DNA πολυμεράση καθ'όλη την διάρκεια της αντιγραφής του DNA.

Η αλληλούχιση Sanger έχει την δυνατότητα να προσδιορίζει αλληλουχίες σύντομης ανάγνωσης, όπως αλληλουχίες DNA έως περίπου 1000 νουκλεοτιδίων, με ποσοστό ακρίβειας της τάξης του 99,99% περίπου (Shendure & Ji, 2008). Επιπλέον, μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην δημόσια υγεία, για παράδειγμα εφαρμόστηκε στην αλληλούχιση της πρωτεΐνης ακίδας του SARS-CoV-2

(Daniels et al., 2021), καθώς και μέσω του Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (CDC) για την επίβλεψη εστιών νοροϊών (Vega et al., 2011).

Ωστόσο, αυτή η μέθοδος έχει παρουσιάσει και κάποιους περιορισμούς (Gharizadeh et al, 2007). Από τους μεγαλύτερους περιορισμούς της αλληλούχισης Sanger είναι ότι για μεγαλύτερη ανάγνωση αλληλουχίας απαιτείται η χρήση gel ή πολυμερών ως μέσα διαχωρισμού για τα επισυναπτόμενα θραύσματα DNA. Ακόμη, δεν δύνανται η δυνατότητα παράλληλης ανάλυσης μεγάλου αριθμού δειγμάτων και τα θραύσματα DNA θα πρέπει να κλωνοποιηθούν σε βακτήρια για μεγαλύτερες αλληλουχίες. Τέλος, η Sanger παρουσιάζει δυσκολία στην ολική αυτοματοποίηση των μεθόδων προετοιμασίας των δειγμάτων και είναι μια μέθοδος υψηλού κόστους (Ansorge, 2009; Hall, 2007).



Εικόνα 8: Η μέθοδος αλληλουχίας Sanger σε 7 βήματα. (1) Το θραύσμα dsDNA μετουσιώνεται σε δύο θραύσματα ssDNA. (2) Ένα θραύσμα ssDNA πολλαπλασιάζεται σε εκατομμύρια αντίγραφα (3) Πρόσδεση ενός εκκινήτη που είναι συμπληρωματικός ως προς το ένα άκρο του τμήματος.(4) Τα θραύσματα προστίθενται σε τέσσερα διαλύματα πολυμεράσης. Κάθε διάλυμα περιέχει τους τέσσερις τύπους βάσεων αλλά μόνο έναν τύπο νουκλεοτιδίου τερματισμού. (5) Η αλυσίδα μεγαλώνει έως ότου προστεθεί τυχαία ένα νουκλεοτίδιο τερματισμού. (6) Τα προκύπτοντα θραύσματα dsDNA αναδιατάσσονται για να ληφθεί μια σειρά ssDNA διαφόρων μηκών. (7) Τα θραύσματα διαχωρίζονται μέσω ηλεκτροφόρησης και προκύπτουν οι αλληλουχίες (Gauthier, 2007).

1.6 Σκοπός Πτυχιακής Εργασίας

Ο στόχος της παρούσας πτυχιακής διατριβής ήταν η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός γονιδίων GST από ψυχανθή και συγκεκριμένα από το είδος *Phaseolus coccineous* και ειδικότερα από δύο διαφορετικούς τύπους φασολιών, τους γίγαντες και τους ελέφαντες.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Υλικά

- NucleoSpin[®] RNA Plant της εταιρίας MACHEREY- NAGEL
- ProtoScript[®] II Reverse Transcriptase της εταιρίας NEW ENGLAND BioLabs[®] Inc.
- Monarch[®] PCR & DNA Cleanup Kit της εταιρίας NEW ENGLAND BioLabs[®] Inc.
- Monarch[®] DNA Gel Extraction Kit της εταιρίας NEW ENGLAND BioLabs[®] Inc.
- MIDORI^{Green} Direct της εταιρίας NIPPON Genetics EUROPE
- Taq DNA Polymerase with Standard Taq Buffer της εταιρίας NEW ENGLAND BioLabs[®] Inc.
- 50 bp DNA Ladder της εταιρίας NEW ENGLAND BioLabs[®] Inc.
- Ρυθμιστικό διάλυμα TRIS acetate-EDTA (TAE 1x), recipe:
 - Dilute 1:10
 - 0.4 M tris acetate (pH approximately 8.3)
 - 0.01 M EDTA

2.2 Όργανα

- Φυγόκεντρο
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Θερμοκυκλωποιητής PCR
- Επωαστήρας

2.3 Μέθοδοι

2.3.1 Ανάπτυξη Φυτών

Για την διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν σπόροι φασολιών του είδους *Phaseolus coccineous* και από δυο διαφορετικούς τύπους, τους γίγαντες και τους ελέφαντες. Συγκεκριμένα, τοποθετήθηκαν 18 σπόροι από την κάθε ποικιλία μέσα σε πλαστικά γλαστράκια με χόμα όπως φαίνεται στην εικόνα 4. Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε ελεγχόμενο περιβάλλον και ποτίζονταν κάθε τέσσερις ημέρες.

Μετά από τρεις εβδομάδες τα φυτά είχαν φτάσει στο επιθυμητό στάδιο, δηλαδή είχαν τρία έως τέσσερα ζεύγη πραγματικών φύλλων.



Εικόνα 9: Τα στάδια ανάπτυξης των σπόρων φασολιού από τις 12, 15, 19 και 26 Οκτωβρίου.

2.3.2 Απομόνωση RNA

Για την απομόνωση του RNA από τους γίγαντες και τους ελέφαντες χρησιμοποιήθηκε το κιτ NucleoSpin[®] RNA Plant και απαιτήθηκε ποσότητα φύλλων ίση με 0,1mg και για τα δύο είδη. Η ποσότητα των οποίων ζυγίστηκε με την βοήθεια ηλεκτρικού ζυγού ακριβείας (0,01). Αρχικά, για την ομογενοποίηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε η λειοτρίβηση των φύλλων μέσα σε αποστειρωμένα σωληνάκια (1,5mL) με 350 μ L με ρυθμιστικό διάλυμα RA₁ για το κάθε δείγμα. Στα δείγματα μετά την ολοκλήρωση της διάλυσης προστέθηκαν 3,5 μ L β -mercaptoethanol για να γίνει η λύση των κυττάρων και την αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Έπειτα, ακολούθησε

η μεταφορά του διαλύματος σε NucleoSpin Filter με τη χρήση πιπέτας ακριβείας για να φυγοκεντρηθούν για 1 λεπτό στις 11.000 xg. Μετά την φυγοκέντρωση απορρίφτηκε το φίλτρο από τα δείγματα και προστέθηκαν σε αυτά 350 µL αιθανόλης 70%, για την δέσμευση του RNA. Στην συνέχεια, αφού έγινε ελαφριά ανάμιξη με αναρρόφηση - εκρόφηση, μεταφέρθηκαν σε στήλες NucleoSpin RNA Plant και φυγοκεντρήθηκαν για 30 δευτερόλεπτα στις 11.000 xg. Τα διηθήματα απομακρύνθηκαν και στα φίλτρα προστέθηκαν από 350 µL ρυθμιστικό διάλυμα MDB στο καθένα. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στην φυγόκεντρο για 1 λεπτό στις 11.000 xg. Μετά την ολοκλήρωση της ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με το προηγούμενο βήμα με την μόνη διαφορά ότι σε αυτό το στάδιο προστέθηκαν 95 µL διαλύματος ενζύμου DNase σε κάθε φίλτρο. Μετά από 15 λεπτά πραγματοποιήθηκε η πρώτη πλύση με 200 µL ρυθμιστικού διαλύματος RA₂ στο κάθε σωληνάκι NucleoSpin RNA Plant column και φυγοκέντρωση για 30 δευτερόλεπτα στις 11.000 xg. Στην δεύτερη πλύση προστέθηκαν 600 µL RA₃ και φυγοκέντρωση για 30 δευτερόλεπτα στις 11.000 στροφές, ενώ στην τρίτη προστέθηκαν 250 µL ρυθμιστικού διαλύματος RA₃ και φυγοκέντρωση για 2 λεπτά στις 11.000 xg, Τέλος, τα φίλτρα τοποθετήθηκαν σε σωληνάκια (1,5mL) για την έκλουση του RNA με προσθήκη 60 µL αποστειρωμένου απιονισμένου H₂O και φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στις 11.000 xg.

2.3.3 Υπολογισμός Συγκέντρωσης RNA με τη βοήθεια Φασματοφωτόμετρου

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των δειγμάτων RNA αρχικά τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένους μικροσωληνίσκους (τύπου erpendorf 1,5mL) 495 µL ddH₂O μαζί με 5µL από το RNA που απομονώθηκε. Στην συνέχεια, αφού ρυθμιστεί το όργανο για φωτομέτρηση RNA, τοποθετούμε στο φασματοφωτόμετρο κυψελίδα με ddH₂O για να μηδενίσουμε την ένδειξη. Τα δείγματα από τους μικροσωληνίσκους αναδεύονται και μεταφέρονται στην κυψέλη του φασματοφωτόμετρου. Λαμβάνουμε την μέτρηση στα 260 nm όπου απορροφά το RNA και υπολογίζουμε την συγκέντρωση του με τον παρακάτω τύπο:

$$C \text{ (ng / } \mu\text{l)} = A_{260} \times 40 \times 100$$

- Για τους γίγαντες:

$$A_{260}: 0,005$$

$$C = 0,005 \times 40 \times 100 = 20 \text{ ng / } \mu\text{l}$$

- Για τους ελέφαντες:
 $A_{260} = 0,012$
 $C = 0,012 \times 40 \times 100 = 48 \text{ ng} / \mu\text{l}$

2.3.4 Σύνθεση Συμπληρωματικού Κλώνου DNA (cDNA)

Για την σύνθεση του κλώνου cDNA χρησιμοποιήθηκε το kit ProtoScript® II Reverse Transcriptase και απαιτήθηκε η ανάμειξη των δειγμάτων RNA και των εκκινητών (primers). Συγκεκριμένα, τοποθετήθηκαν μέσα σε αποστειρωμένους μικροσωληνίσκους (τύπου eppendorf 1,5mL) τα εξής αντιδραστήρια:

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
RNA	7 Ml
d(T)23 VN(0,5μg/t)	2 μL
dNTP (4mM)	1 μL
Nuclease – Free H₂O	10 μL

Τα οποία τοποθετήθηκαν για 5 λεπτά στους 65 °C και στην συνέχεια στον πάγο.

Έπειτα, έγινε προσθήκη των εξής αντιδραστηρίων:

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
5x ProtoScript II Buffer	4 μL
DTT	2 μL
ProtoScript II RT (200 U/mL)	1 μL
Nuclease – Free H₂O	3 μL

Από τους κλώνους cDNA που παράχθηκαν 20 μL, από το κάθε είδος, επώαστηκαν στους 42 °C για 1 ώρα και μετά το πέρας της απαιτούμενης επώασης πραγματοποιήθηκε η απενεργοποίηση των ενζύμων στους 65 °C για 20 λεπτά.

2.3.5 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) αρχικά πραγματοποιήθηκε η αραίωση του εκκινητή PHAVU_001G002000g_F1 με αλληλουχία ACTCAACCAAATCGGAAGATGGCG (0,5 μM) και T_M: 65,2 °C, σε ποσότητα των 5 μL μαζί με 45 μL H₂O και στην συνέχεια απαιτήθηκε η δημιουργία ενός Master Mix που περιείχε τα παρακάτω αντιδραστήρια:

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
Buffer	10 μL
H₂O	65 μL
MgCl₂ (1,5mM)	3 μL
d-NTPs (0,2mM)	2 μL
Taq (5 Unit)	2 μL
(AMP)R (0,5μM)	5 μL
Εκκινητής (0,5μM)	5 μL

Έπειτα, το μίγμα διαχωρίστηκε σε δύο ίσες ποσότητες των 46 μL, η οποίες τοποθετήθηκαν η κάθε μια σε ένα ειδικό σωλήνα PCR (100 μL) και στον έναν από αυτούς τοποθετήθηκαν 4 μL cDNA από τους γίγαντες και στον άλλον 4 μL cDNA από τους ελέφαντες. Οι σωλήνες PCR τοποθετήθηκαν στον θερμοκυκλωποιητή για την διεξαγωγή της αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Το μηχάνημα εκτέλεσε 35 κύκλους (των βημάτων 2-4), εκ των οποίων ο κάθε ένας κύκλος έθετε τα δείγματα στις παρακάτω συνθήκες:

	Βήματα	Θερμοκρασίες	Χρόνος
1	Αρχική Αποδιάταξη	95 °C	5min
2	Αποδιάταξη	95 °C	20sec

3	Θερμοκρασία Υβριδισμού	55 °C	20sec
4	Επιμήκυνση	72 °C	1,5min
5	Τελική Επιμήκυνση	72 °C	5min

2.3.6 Καθαρισμός DNA

Για την πραγματοποίηση της διαδικασίας καθαρισμού των προϊόντων της που προέκυψαν από την διαδικασία της PCR χρησιμοποιήθηκε το kit Monarch[®] PCR & DNA Cleanup. Αρχικά, απαιτήθηκε αραιώση των DNA με Binding Buffer, στο οποίο είχαν προστεθεί 14 mL isopropanol, σε αναλογία 1:5, δηλαδή 200 μL Binding και 40 μL DNA. Τα αραιωμένα δείγματα μεταφέρθηκαν με πιπέτα ακριβείας σε στήλες οι οποίες είχαν τοποθετηθεί μέσα σε σωληνάκια συλλογής (collection tubes), και φυγοκεντρήθηκαν για 1 λεπτό στις 13.000 rpm. Στην συνέχεια, αφαιρέθηκε το διήθημα από τα σωληνάκια συλλογής και έγινε προσθήκη 200 μL DNA Wash Buffer στις στήλες. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 13.000 rpm και το στάδιο επαναλήφθηκε ακόμα 1 φορά. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης οι στήλες μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένα σωληνάκια (eppendorf tubes 1,5 mL), όπου προστέθηκαν στο κέντρο κάθε φίλτρου 10μL DNA elution Buffer, για την έκλυση του DNA. Μετά το πέρας 1 λεπτού τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 1 λεπτό στις 13.000 rpm. Τα προϊόντα που συλλέχτηκαν στα eppendorf tubes αποτελούσαν τα καθαρά προϊόντα DNA.

2.3.7 NESTED PCR & RT – PCR

Για την Nested PCR αρχικά πραγματοποιήθηκε η αραιώση του εκκινητή PHAVU_001G002000g_F₂ με αλληλουχία ATGGCGGCGCCGCCA (0,5 μM) και T_M: 69 °C, σε ποσότητα των 5 μL μαζί με 45 μL H₂O και στην συνέχεια απαιτήθηκε η δημιουργία ενός Master Mix που περιείχε τα παρακάτω αντιδραστήρια.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
Buffer	10 μL

H₂O	65 μ L
MgCl₂ (1,5mM)	3 μ L
d-NTPs (0,2mM)	2 μ L
Taq (5 Unit)	2 μ L
(AMP)R (0,5μM)	5 μ L
Εκκινητής (0,5μM)	5 μ L

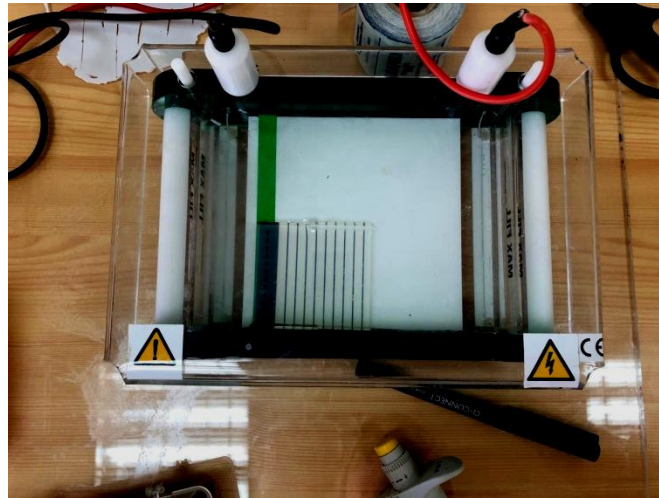
Έπειτα, το μίγμα διαχωρίστηκε σε δύο ίσες ποσότητες των 46 μ L, η οποίες τοποθετήθηκαν η κάθε μια σε ένα ειδικό σωλήνα PCR (100 μ L) και στον έναν από αυτούς τοποθετήθηκαν 4 μ L PCR product από τους γίγαντες και στον άλλον 4 μ L PCR product από τους ελέφαντες. Οι σωλήνες PCR τοποθετήθηκαν στον θερμοκυκλωποιητή για την διεξαγωγή της αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Το μηχάνημα εκτέλεσε 35 κύκλους (των βημάτων 2-4), εκ των οποίων ο κάθε ένας κύκλος έθετε τα δείγματα στις παρακάτω συνθήκες:

	Βήματα	Θερμοκρασίες	Χρόνος
1	Αρχική Αποδιάταξη	95 °C	5min
2	Αποδιάταξη	95 °C	20sec
3	Θερμοκρασία Υβριδισμού	55 °C	20sec
4	Επιμήκυνση	72 °C	1,5min
5	Τελική Επιμήκυνση	72 °C	5min

2.3.8 Ηλεκτροφόρηση σε Πηκτή Αγαρόζη

Αρχικά, σε ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας (0,01) ζυγίστηκε ποσότητα των 0,2g αγαρόζης, η οποία προστέθηκε σε κωνική φιάλη (100 mL) μαζί με 20 mL Buffer (TAE 1%) χωρίς να αναδευτούν. Στην συνέχεια, η κωνική φιάλη τοποθετήθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων και στους 50°C περίπου πραγματοποιήθηκε η πρώτη ανάδευση και ξανά τοποθετήθηκε στον φούρνο μέχρι να φτάσει τους 85 °C για να

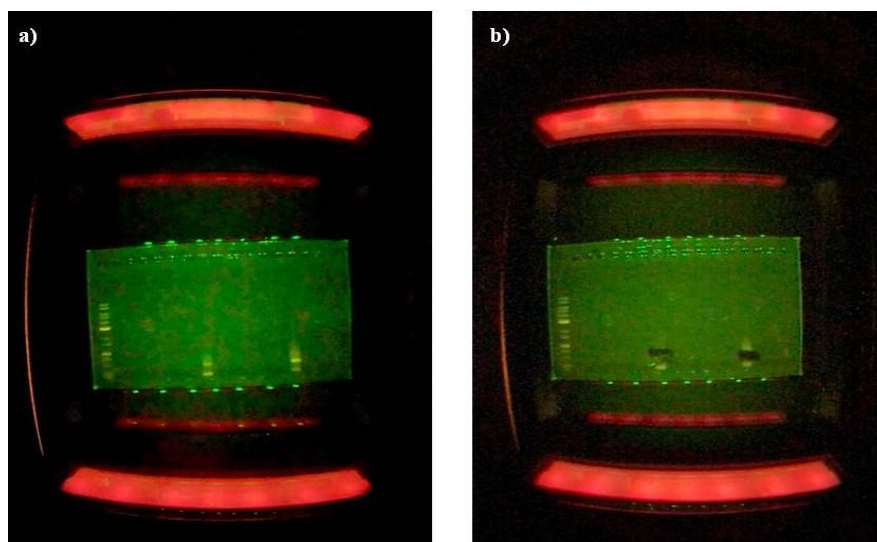
διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη. Το διάλυμα της αγαρόζης αφέθηκε να κρυώσει μέχρι να φτάσει την θερμοκρασία των 50 °C και έπειτα τοποθετήθηκε σε ειδικό καλούπι με πηγαδάκια έως ότου σταθεροποιηθεί. Σε ένα κομμάτι parafilm προστέθηκαν 5 μ L Ladder μαζί με 0,5 μ L Midori green direct, 5 μ L δείγματος DNA από τους γίγαντες μαζί με 0,5 μ L Midori green direct και 5 μ L δείγματος DNA από τους ελέφαντες μαζί με 0,5 μ L Midori green direct. Τέλος, η πηκτή αγαρόζη τοποθετήθηκε στο μηχάνημα της ηλεκτροφόρησης και με την βοήθεια της πιπέτας τα 3 δείγματα τοποθετήθηκαν στα πηγαδάκια, η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 100 Volt και στα 95 mA για 20 λεπτά.



Εικόνα 10: Μηχάνημα ηλεκτροφόρησης μέσα στο οποίο είναι τοποθετημένο το gel αγαρόζης φορτωμένο με τα δείγματα

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζη προέκυψαν οι ζώνες ηλεκτροφόρησης μια του Ladder και δύο από τα δείγματα του DNA και οι οποίες στην συνέχεια κοπήκανε για να σταλθούν για αλληλούχιση (εικόνα 11).



Εικόνα 11: a) Ζώνες ηλεκτροφόρησης πριν την κοπή b) Ζώνες ηλεκτροφόρησης μετά την κοπή

Οι ζώνες ηλεκτροφόρησης που απομονώθηκαν στάλθηκαν για αλληλούχιση στο εργαστήριο CEMIA στη Λάρισα για τον προσδιορισμό των αλληλουχιών. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η αλληλούχιση κατά Sanger και για τους δύο τύπους φασολιών. Για κάθε ζώνη προκύπτουν δυο αλληλουχίες όπου η μια είναι η Forward και η άλλη η Reverse. Οι αλληλουχίες για τους γίγαντες απεικονίζονται στην εικόνα 12 και οι αλληλουχίες για τους ελέφαντες στην εικόνα 13.

a)

>20220412DS1P1_E08_2022-04-15.ab1

```
TATTGGCCTGTCTGCTGGAGAAAGACGTCCAATTTCAACTGATTCCGGTGAACATGGCCAAAGGGGAACAC
AGAAGCCCTGATGATMRAWWGYYCACCCCTTCGGACAAGWACCTGCATTTCAAGATGGCGACAACATT
TCCCTCTTCGGTAGGTTCACTTAGCTTCTCCTCTTTCATTGCTTCTAACTCTAACACCAGATTCAAATCAGAGT
CCAGAGCTATATGCCGCTACGTGTGCGAGAAATACGGCGACAGGGGAAACAAGGAGCTCTACGGAAGAA
ACCCTTTGGTGAAGGCCTCCATAGATCAATGGCTGGAGGCAGAAGCTCAGAACTTCAACCCACCTTCTCCTC
ACCTTGGTCTTCCAGCTCGCATTCCGCCCCCGAGTGA
```

b)

>20220412DS1P2_F08_2022-04-15.ab1

```
AGGACTTCAGCGGAGGTGGTTGGCCCCGAAGCTTTCTGTGGCGGCSCCCCCCTCATTTCTCGCACRCKAA
SCGKAATATAGCTCTGGACTCTGATATGAATCTGGTGTAGAGTTARAAGCAATGAAAGAGGAGAAGCTA
GTGAACCTACCGAAGAGGGAAATGTTGTGCGCCATCTTGAATGCAGGTTACTTGTCCGAAGGGGTGAAGC
TTTCGATACTCAGGGCTTCTGTGTTCCCTTTGGCCATGTTACCCGGAATCAGTTGAAATTGGACGTCTTT
CTCCAGCAGACAGGCCAATACCCTGGAGACGGCAGTGGACATGGGTGGTCCGTACACCTTCACTGGCG
GGCC
```

Εικόνα 12: Οι αλληλουχίες των σπόρων φασολιών του τύπου γίγαντες.

a)

>20220412DS2P1_G08_2022-04-15.ab1

```
ATTGGMCTGTCTGCTGGAGAAAGACGTCCAATTTCAACTGATTCCGGTGAACATGGCCAAAGGGGAAC
ACAGAAGCCCTGAGTATCGAAAGCTTCACCCCTTCGGACAAGTACCTGCATTTCAAGATGGCGACAACA
TTTCCCTCTTCGGTAGGTTCACTTAGCTTCTCCTCTTTCATTGCTTCTAACTCTAACACCAGATTCAAATCA
GAGTCCAGAGCTATATGCCGCTACGTGTGCGAGAAATACGGCGACAGGGGAAACAAGGAGCTCTACGG
AAGAAACCCTTTGGTGAAGGCCTCCATAGATCAATGGCTGGAGGCAGAAGCTCAGAACTTCAACCCAC
CTTCCCTCCACCTTGGTCTTCCAGCTCGCATTGCCCCCCGAGTGARAAGTTGCC
```

b)

>20220412DS2P2_H08_2022-04-15.ab1

```
GAGCTTCTGCCTCCAGCCTTGATCTAKGGAAGCCTTACCAAAGGGTTTCTCCGTAAAGCTCCTTGTTC
CCCTGTCGCCGATTTCTCGCACACGTAGCGGCATATAGCTCTGGACTCTGATTTGAATCTGGTGTAGAG
TTAGAAGCAATGAAAGAGGAGAAGCTAAGTGAACCTACCGAAGAGGGAAATGTTGTCGCCATCTTGAA
ATGCAGGTACTTGTCCGAAGGGGTGAAGCTTTCGATACTCAGGGCTTCTGTGTTCCCTTTGGCCATGTT
CACCGGAATCAGTTGAAATTGGACGTCTTCTCCAGCAGACAGGCCAATACCCTGGAGACGGCAGTGGA
CATGGGTGGTCCGTACACCTTCACTGGCGGG
```

Εικόνα 13: Οι αλληλουχίες των σπόρων φασολιών του τύπου ελέφαντες

Με την χρήση του προγράμματος Blast, εντοπίστηκαν οι επί της % ομοιότητες των παραπάνω αλληλουχιών με το *Phaseolus vulgaris*, καθώς και με άλλα είδη φυτών. (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Όπως παρατηρείται και στον πίνακα 1 το γονίδιο που απομονώθηκε από τους γίγαντες έχει πολύ υψηλή ομοιότητα με το *Phaseolus vulgaris* της κλίμακας του 97,79% - 98,08%. Ωστόσο, μεγάλη ομοιότητα παρουσιάζει με το *Vigna radiate* στο 90,06% αλλά και με τα υπόλοιπα είδη του είδους *Vigna* σε ποσοστό περίπου 87,38%. Για το γονίδιο που απομονώθηκε από τους ελέφαντες ισχύει ότι και αυτό έχει μεγάλη τις % ομοιότητα με το *Phaseolus vulgaris* σε ποσοστό που κυμαίνεται από 97,79% - 97,61% και επίσης έχει ακριβώς την ίδια ομοιότητα με αυτήν που παρουσιάζουν οι γίγαντες με το *Vigna radiate* και τα άλλα είδη του, όπως φαίνεται στον πίνακα 2.

Πίνακας 1: Οι τις % ομοιότητες των αλληλουχιών των γιγάντων που προέκυψαν με την μέθοδο Sanger με το *Phaseolus vulgaris*, καθώς και με άλλα φυτά.

Περιγραφή	Max score	E- value	Per. Ident	Accession number
<i>Vigna angularis</i> var. <i>angularis</i> DNA, chromosome 3, almost complete sequence, cultivar: <i>Shumari</i>	313	2e-80	89,50%	XM_007160550.1

Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_001G002000g) mRNA, complete cds	235	4e-57	97,79%	XM_014648972.2
Vigna radiate var. radiate glutathione S- transferase (LOC106764656), mRNA	230	2e-55	90,06%	XM_017575386.1
Vigna angularis glutathione S- transferase- like (LOC108338484), mRNA	224	8e-54	88,95%	XM_047321045.1
Vigna umbellate glutathione S- transferase- like (LOC124844164), mRNA	224	8e-54	88,95%	XM_047303980.1
Vigna umbellate glutathione S- transferase- like (LOC124830307), mRNA	364	4e-96	83,29%	AP015036.1

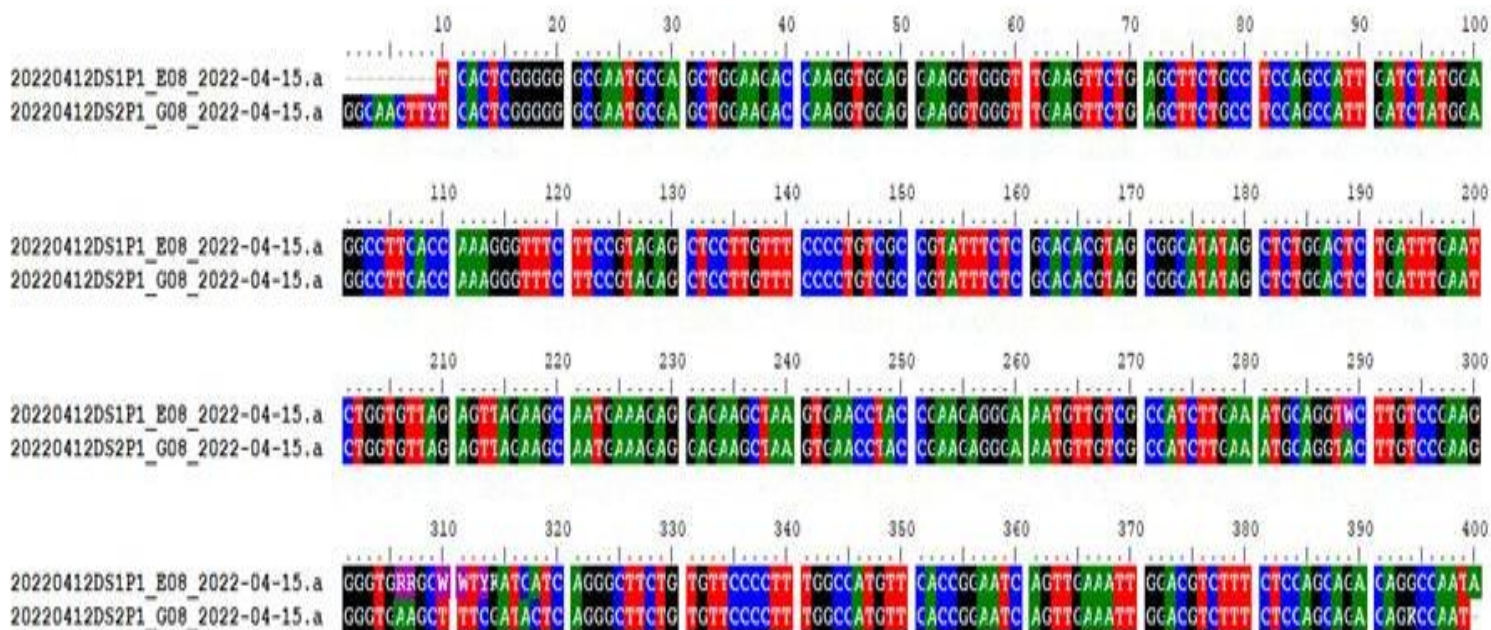
Πίνακας 2: Οι τις % ομοιότητες των αλληλουχιών των ελέφαντων που προέκυψαν με την μέθοδο Sanger με το Phaseolus vulgaris, καθώς και με άλλα φυτά.

Περιγραφή	Max score	E- value	Per. Ident	Accession number
Vigna angularis var. angularis DNA, chromosome 3, almost complete sequence, cultivar: Shumari	387	9e-103	84,50%	AP015036.1
Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_001G002000g) mRNA, complete cds	313	2e-80	97,79%	XM_007160550.1
Vigna radiate var. radiate glutathione S- transferase (LOC106764656), mRNA	235	4e-57	90,06%	XM_014648972.2
Vigna angularis glutathione S- transferase- like (LOC108338484), Mrna	230	2e-55	89,50%	XM_017575386.1

Vigna umbellate glutathione S-transferase- like (LOC124844164), mRNA	224	8e-54	88,95%	XM_047321045.1
Vigna umbellate glutathione S-transferase- like (LOC124830307), mRNA	224	8e-54	88,95%	XM_047303980.1

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε στοίχιση των αλληλουχιών στο βιοπληροφορικό πρόγραμμα Bioedit ώστε να οπτικοποιηθούν οι ομοιότητες και οι διαφορές που υπάρχουν ανάμεσα στις αλληλουχίες των γονιδίων από τους γίγαντες και τους ελέφαντες.

Στην εικόνα 14 απεικονίζεται η στοίχιση μεταξύ των αλληλουχιών των δύο γονιδίων. Τα δύο γονίδια έχουν μεγάλη ομοιότητα μεταξύ τους με τις μόνες διαφορές τους να είναι σε 18 θέσεις, εκ των οποίων στις θέσεις 1-9,289,306,307,310,311,313 και 400 δεν έχει γίνει καθορισμός των βάσεων στα γονίδια, ενώ στις θέσεις 317 και 318 υπάρχει διαφορά στις βάσεις.



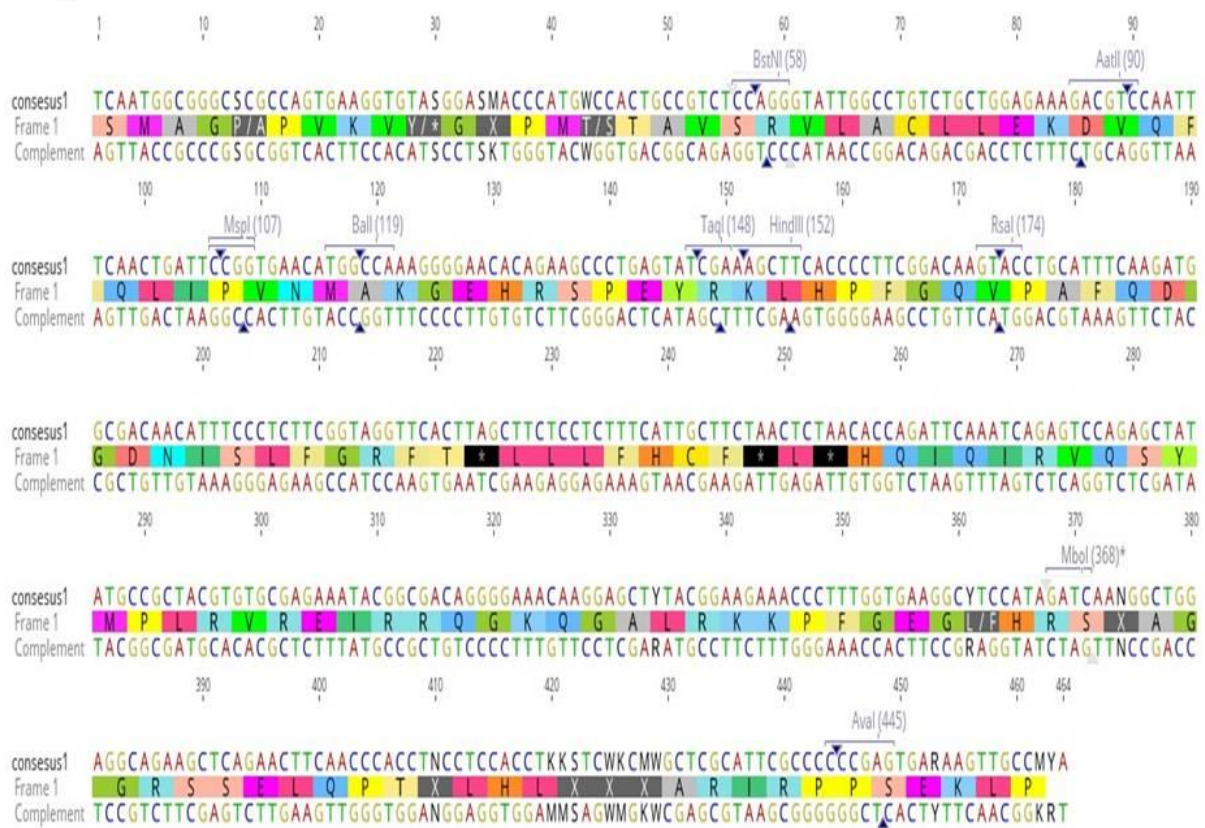
Εικόνα 14: Αποτελέσματα στοίχισης των αλληλουχιών από τους δύο τύπους φασολιών

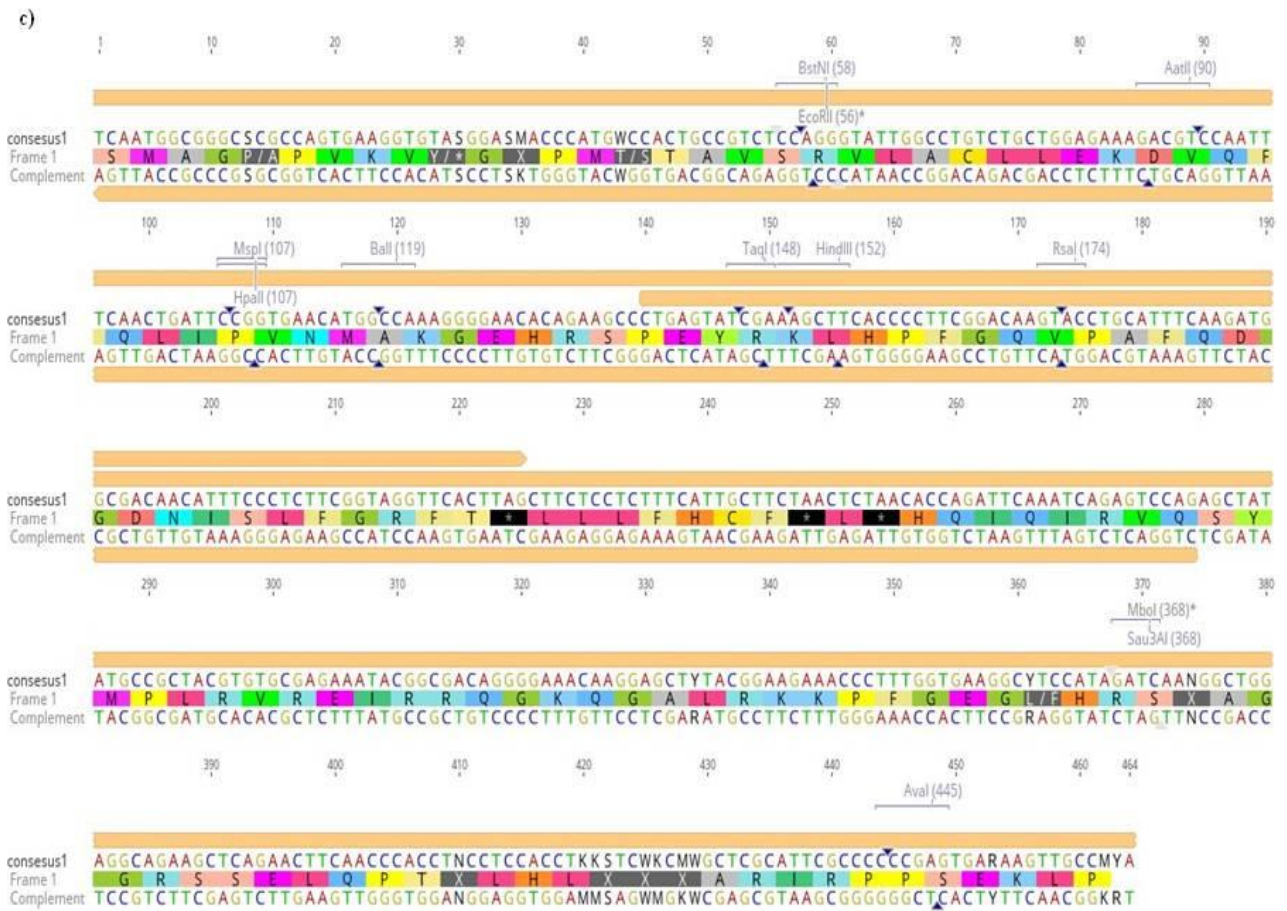
Από τις δύο αλληλουχίες που προέκυψαν από την αλληλούχιση Sanger για το γονίδιο από τους γίγαντες, δημιουργήθηκε το τελικό γονίδιο με την χρήση του προγράμματος Geneious Prime, το οποίο έχει την αλληλουχία που παρουσιάζεται στην εικόνα (16).

a)

TCAATGGCGGGCSCGCCAGTGAAGGTGTASGGASMACCCATGWCCACTGCCGTCTCCAGGGTATTGGCCTGTCTGCTGGAGAAAAGACGTCCAATTTCAACTGATTCCGGTGAAACATGGCCAAAGGGGAAACACAGAAAGCCCTGAGTATCGAAAAGCTTCAACCCCTTCGGACAAGTACCTGCATTTCAAAGATGGCGACAAACATTTCCCTCTTCGGTAGGGTTCACTTACGCTTCTCCTCTTTTCATTTGCTTCTAACTCTAACACCCAGATTCAAATCAGAGTCAAGCTATATGCCGCTACGTGTGCGAGAAATACGGCGACAGGGGAAAACAAAGGAGCTYTAACGGAAGAAAACCCTTTGGTGAAAGGCYTCATAGATCAANNGCTGGAGGCAGAAAGCTCAGAACTTCAAACCCACCTNCCTCCACCTKKSTCWKCMWGCTCGCATTGCCCCCGAGTGARAAATTGCCMYA

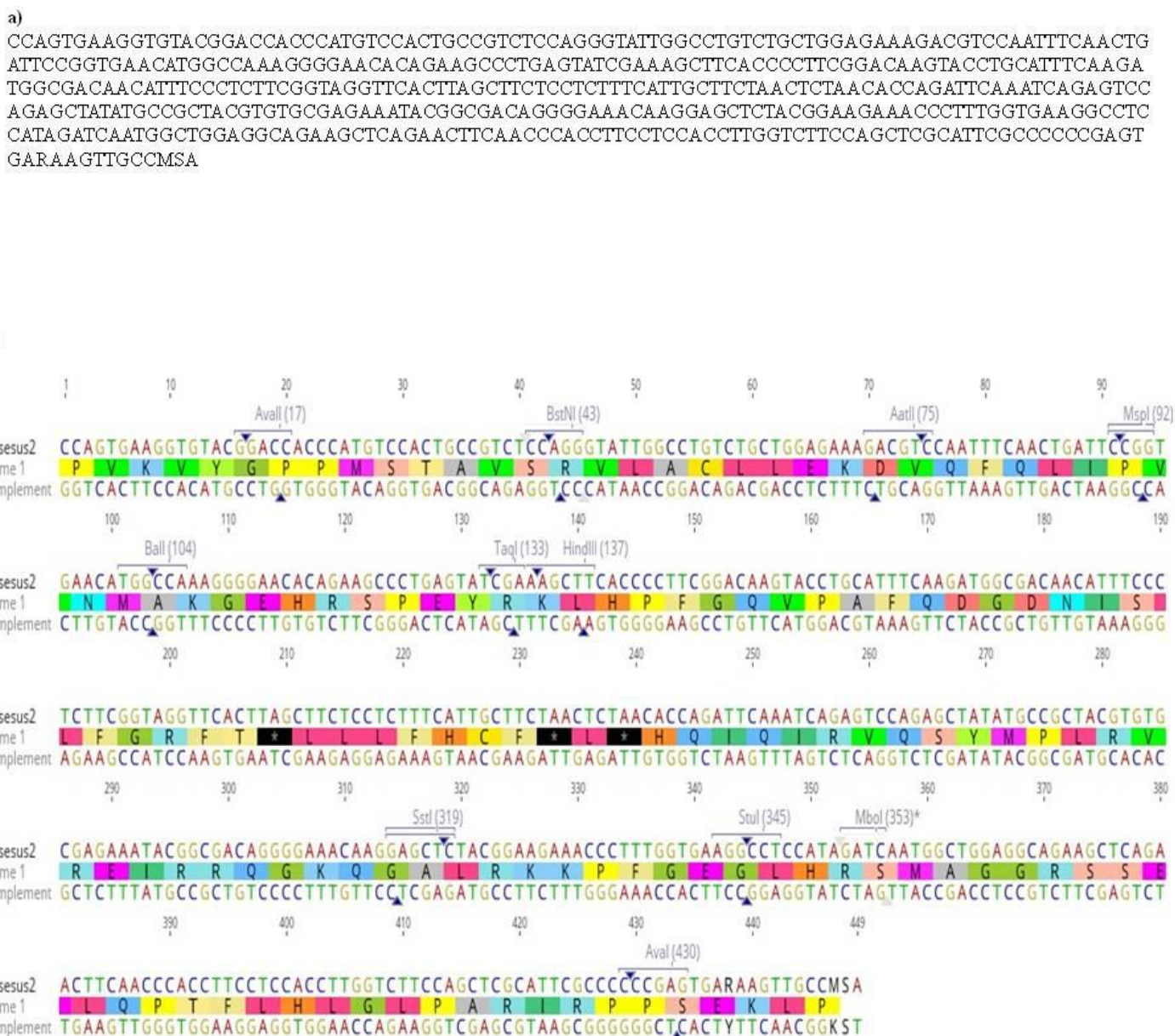
b)

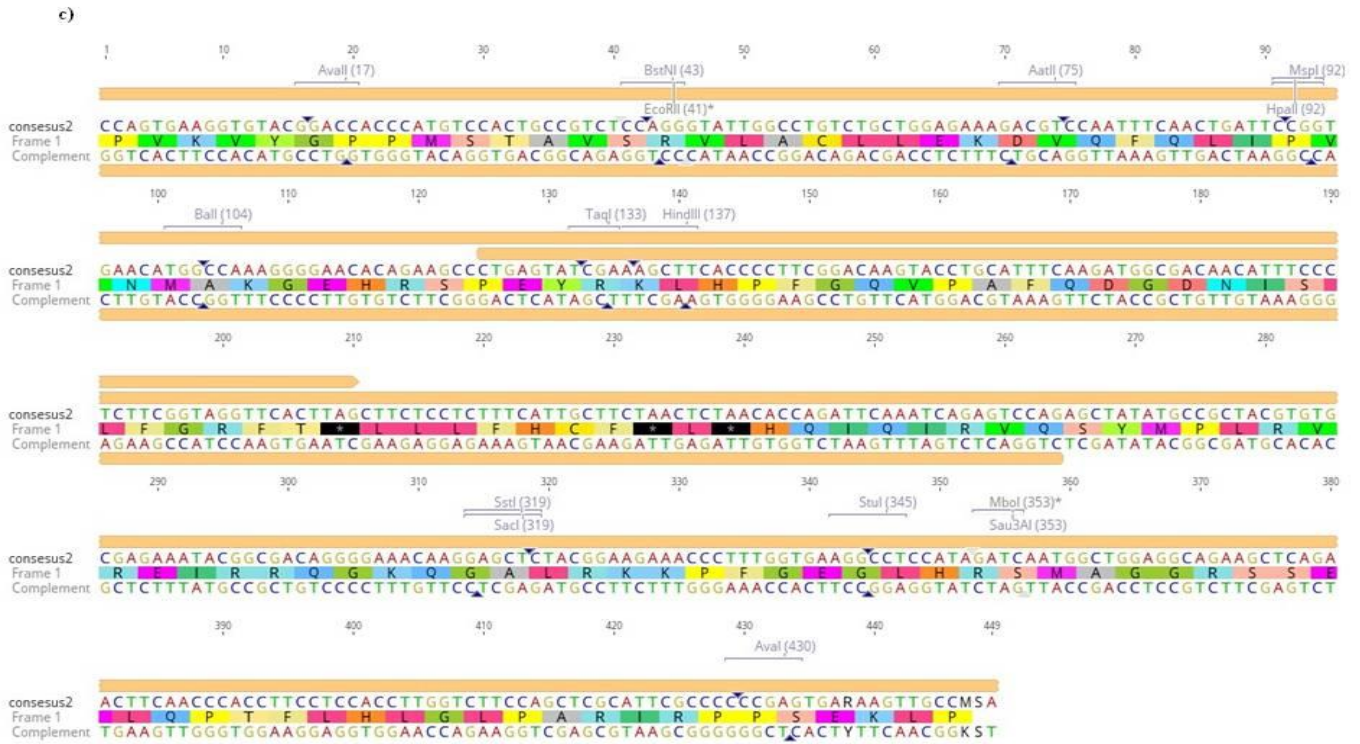




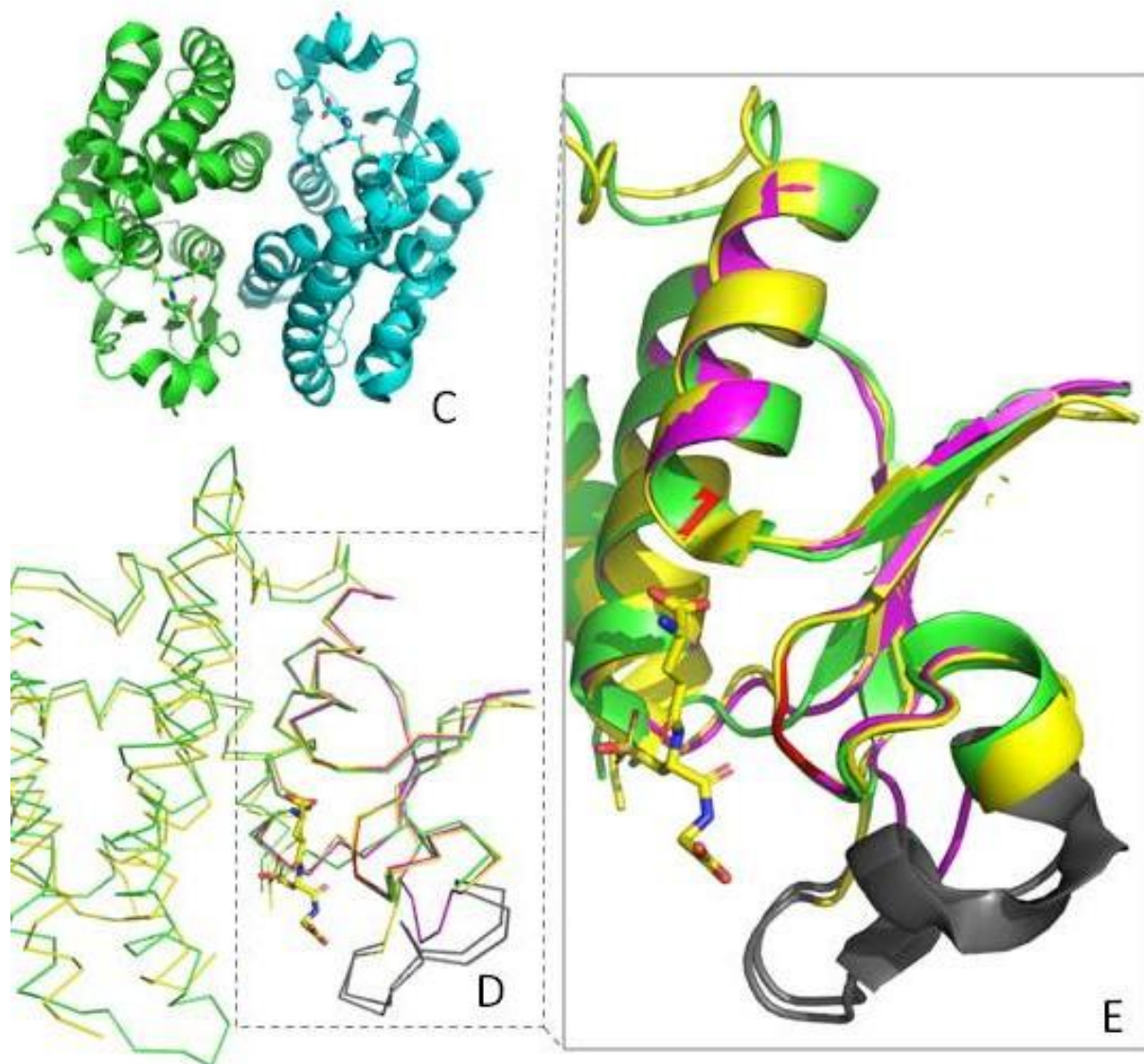
Εικόνα 16: Τελικό γονίδιο γιγάντων. α) Αλληλουχία τελικού γονιδίου, β) παρουσία τελικού γονιδίου παρουσία αμινοξέων και γ) απεικονίζονται τα διαφορετικά ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης.

Από τις δύο αλληλουχίες που προέκυψαν από την αλληλούχιση Sanger για το γονίδιο από τους ελέφαντες, δημιουργήθηκε το τελικό γονίδιο με την χρήση του προγράμματος Geneious Prime, το οποίο έχει την αλληλουχία που παρουσιάζεται στην εικόνα (17).





Εικόνα 17: Τελικό γονίδιο ελεφάντων. **α)** Αλληλουχία τελικού γονιδίου, **β)** παρουσία τελικού γονιδίου παρουσία αμινοξέων και **γ)** απεικονίζονται τα διαφορετικά ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης.



Εικόνα 18: Ανάλυση αλληλουχίας νέων GSTs. **A)** Η ανάλυση BlastX και των δύο νέων GST, έδειξε ότι αυτές ανήκουν στην κλάση Phi με πιο στενά συνδεδεμένη την XP_014504458.1 γλουταθειόνη S-μεταφοράση από *V. radiata* var. *Radiata* (γονίδιο NC_028356.1). Πολλαπλή ευθυγράμμιση αλληλουχιών νουκλεοτιδίων GSTs με NC_028356.1 S-μεταφοράση γλουταθειόνης [*V. radiata* var. *radiata*] δείχνει την εξαιρετικά διατηρημένη τοποθεσία G στο N-άκρο που αντιστοιχεί στον τομέα κλάσης με cd03053: GST_N_Phi. Μέρος της τοποθεσίας GST_C_Phi μπορεί να βρεθεί στο καρβοξυτελικό άκρο. **B)** Πρόβλεψη πολλαπλής ευθυγράμμισης και δευτερογενούς δομής των πεπτιδικών αλληλουχιών GST της διατηρημένης θέσης G με cd03053: συναίνεση κλάσης GST_N_Phi και XP_014504458.1 S-μεταφοράση γλουταθειόνης [*V. Radiata* var. *radiata*]. **C)** Κοντινή σε δομή πρωτεΐνης 5F05 που βρέθηκε με βάση την αλληλουχία χρησιμοποιώντας HHPred και το Tuebingen Bioinformatics Toolkit. **D)** Μια αλυσίδα από 5F05 (πράσινο) και 6F05 (κίτρινο) στενής δομής πρωτεϊνών που υπερτοποθετούνται έναντι του δομικού μοντέλου των νέων GSTs (Magenta). **E)** Εστιασμένη υπερθέση μοντέλου.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Από τα πειραματικά αποτελέσματα της παρούσας πτυχιακής εργασίας προέκυψε το συμπέρασμα ότι κατέστη δυνατή η απομόνωση των GSTs πρωτεϊνών από το είδος *Phaseolus coccineous*. Αναλυτικότερα, μέσα από μια σειρά μοριακών τεχνικών απομονώθηκε ένα κομμάτι ενός γονιδίου που κωδικοποιεί την παραγωγή μιας πρωτεΐνης GST που συμμετείχε στις διαδικασίες αποτοξίνωσης του φασολιού. Μέσω της αλληλούχισης με την μέθοδο Sanger επετεύχθη η ταυτοποίηση του γονιδίου με την βοήθεια του προγράμματος Blast η οποία έδειξε ότι οι απομονωμένες αλληλουχίες DNA, ανήκουν σε γονίδιο GST . Ακόμη, συμπεραίνουμε ότι τα δύο ζεύγη εκκινητών, που σχεδιάστηκαν σε αλληλουχίες GST από το γένος *Phaseolus vulgaris* που χρησιμοποιήθηκαν είναι αποτελεσματικά για την απομόνωση του συγκεκριμένου γονιδίου από τους δύο τύπους φασολιών γίγαντες και ελέφαντες. Συνεπώς, η έρευνα θα μπορούσε να συνεχιστεί περαιτέρω αφενός και για άλλα ζεύγη εκκινητών του ίδιου γένους και αφετέρου με την κλωνοποίηση του γονιδίου σε κατάλληλο πλασμίδιο. Επιπλέον, μπορεί να πραγματοποιηθεί η ολοκλήρωση της απομόνωσης του γονιδίου και η κλωνοποίηση του σε κατάλληλους φορείς για τη μελέτη του γονιδίου σε ετερόλογα συστήματα.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

5.1 Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

Acquaah G (2007) Transgenic plants for abiotic stress resistance In Principles of plant genetics and breeding. pp 67-169

Allocati, N., Favaloro, B., Masulli, M., Alexeyev, M. F., & Di Ilio, C. (2003). Proteus mirabilis glutathione S-transferase B1-1 is involved in protective mechanisms against oxidative and chemical stresses. *Biochemical Journal*, 373(1), 305-311.

Amtmann, A., Troufflard, S., & Armengaud, P. (2008). The effect of potassium nutrition on pest and disease resistance in plants. *Physiologia plantarum*, 133(4), 682-691.

Ansorge, W. J. (2009). Next-generation DNA sequencing techniques. *New biotechnology*, 25(4), 195-203.

Arumuganathan, K. and Earle, D.E. (1991). Nuclear DNA content of some important species. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9, pp. 208-218.

Atkinson, N. J., & Urwin, P. E. (2012). The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of experimental botany*, 63(10), 3523-3543.

Axarli, I., Dhavala, P., Papageorgiou, A. C., & Labrou, N. E. (2009). Crystallographic and functional characterization of the fluorodifen-inducible glutathione transferase from Glycine max reveals an active site topography suited for diphenylether herbicides and a novel L-site. *Journal of molecular biology*, 385(3), 984-1002.

Bachman, J. (2013). Reverse-transcription PCR (rt-PCR). In *Methods in enzymology* (Vol. 530, pp. 67-74). Academic Press.

Beebe, S., Skroch, P. W., Tohme, J., Duque, M. C., Pedraza, F., & Nienhuis, J. (2000). Structure of genetic diversity among common bean landraces of Middle American origin based on correspondence analysis of RAPD. *Crop science*, 40(1), 264-273.

Blair, M. W., González, L. F., Kimani, P. M., & Butare, L. (2010). Genetic diversity, inter-gene pool introgression and nutritional quality of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) from Central Africa. *Theoretical and Applied Genetics*, 121(2), 237-248.

Board, P. G., & Menon, D. (2013). Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochimica et biophysica acta (bba)-general subjects*, 1830(5), 3267-3288.

Bose, J., Rodrigo-Moreno, A., & Shabala, S. (2014). ROS homeostasis in halophytes in the context of salinity stress tolerance. *Journal of experimental botany*, 65(5), 1241-1257.

Broughton, W. J., Hernandez, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., & Vanderleyden, J. (2003). Beans (*Phaseolus* spp.)—model food legumes. *Plant and soil*, 252(1), 55-128.

Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology*, 25(2), 169-193.

Caverzan, A., Casassola, A., & Brammer, S. P. (2016). Reactive oxygen species and antioxidant enzymes involved in plant tolerance to stress. *Abiotic and biotic stress in plants-recent advances and future perspectives*, 17, 463-480.

Cha, R. S., & Thilly, W. G. (1993). Specificity, efficiency, and fidelity of PCR. *Genome Research*, 3(3), S18-S29.

Chávez-Mendoza, C., & Sánchez, E. (2017). Bioactive compounds from Mexican varieties of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): Implications for health. *Molecules*, 22(8), 1360.

Chronopoulou, E. G., & Labrou, N. E. (2009). Glutathione transferases: emerging multidisciplinary tools in red and green biotechnology. *Recent patents on biotechnology*, 3(3), 211-223.

Cummins, I., Dixon, D. P., Freitag-Pohl, S., Skipsey, M., & Edwards, R. (2011). Multiple roles for plant glutathione transferases in xenobiotic detoxification. *Drug metabolism reviews*, 43(2), 266-280.

Daniels, R. S., Harvey, R., Ermetal, B., Xiang, Z., Galiano, M., Adams, L., & McCauley, J. W. (2021). A Sanger sequencing protocol for SARS-CoV-2 S-gene. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 15(6), 707-710.

Datta, R., Kumar, D., Sultana, A., Hazra, S., Bhattacharyya, D., & Chattopadhyay, S. (2015). Glutathione regulates 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase transcription via WRKY33 and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase by modulating messenger RNA stability to induce ethylene synthesis during stress. *Plant physiology*, 169(4), 2963-2981.

de Almeida Cançado, G. M. (2011). The importance of genetic diversity to manage abiotic stress. *Abiotic stress in plants—mechanisms and adaptations*, 351

Dean, J. D., Goodwin, P. H., & Hsiang, T. (2005). Induction of glutathione S-transferase genes of *Nicotiana benthamiana* following infection by *Colletotrichum destructivum* and *C. orbiculare* and involvement of one in resistance. *Journal of Experimental Botany*, 56(416), 1525-1533.

Dirr, H., Reinemer, P., & Huber, R. (1994). X-ray crystal structures of cytosolic glutathione S-transferases: Implications for protein architecture, substrate recognition and catalytic function. *European journal of biochemistry*, 220(3), 645-661.

Dixon, D. P., Cummins, I., Cole, D. J., & Edwards, R. (1998). Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Current opinion in plant biology*, 1(3), 258-266.

Dixon DP, Laphorn A, Edward R (2002a) Plant glutathione transferases. *Genome Biology* 3:3004.1–3004.10

Dixon, D. P., & Edwards, R. (2009). Selective binding of glutathione conjugates of fatty acid derivatives by plant glutathione transferases. *Journal of Biological Chemistry*, 284(32), 21249-21256.

Dixon, D. P., Hawkins, T., Hussey, P. J., & Edwards, R. (2009). Enzyme activities and subcellular localization of members of the Arabidopsis glutathione transferase superfamily. *Journal of experimental botany*, 60(4), 1207-1218.

Dixon, D. P., Skipsey, M., & Edwards, R. (2010). Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 71(4), 338-350.

Edwards, R., Dixon, D. P., & Walbot, V. (2000). Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends in plant science*, 5(5), 193-198.

Edwards, R., & Dixon, D. P. (2005). Plant glutathione transferases. *Methods in enzymology*, 401, 169-186.

Farkas, D. H., & Holland, C. A. (2009). Overview of molecular diagnostic techniques and instrumentation. In *Cell and Tissue based Molecular Pathology* (pp. 19-32). Churchill Livingstone.

Finney, M. 1988. Pulsed-field gel electrophoresis. In *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl, eds.) pp. 2.5.9-2.5.15. Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York.

Foyer, C. H., & Noctor, G. (2009). Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants & redox signaling*, 11(4), 861-905.

Frear, D. S., & Swanson, H. R. (1970). Biosynthesis of S-(4-ethylamino-6-isopropylamino-2-s-triazino) glutathione: partial purification and properties of a glutathione S-transferase from corn. *Phytochemistry*, 9(10), 2123-2132.

Gao, J. P., Chao, D. Y., & Lin, H. X. (2007). Understanding abiotic stress tolerance mechanisms: recent studies on stress response in rice. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49(6), 742-750.

Gharizadeh, B., Ghaderi, M., & Nyrén, P. (2007). Pyrosequencing technology for short DNA sequencing and whole genome sequencing. *生物物理*, 47(2), 129-132.

Goel, A. K., Lundberg, D., Torres, M. A., Matthews, R., Akimoto-Tomiya, C., Farmer, L., ... & Grant, S. R. (2008). The *Pseudomonas syringae* type III effector HopAM1 enhances virulence on water-stressed plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(3), 361-370.

Graham, P. H., & Ranalli, P. (1997). Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Field Crops Research*, 53(1-3), 131-146.

Gratão, P. L., Polle, A., Lea, P. J., & Azevedo, R. A. (2005). Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional plant biology*, 32(6), 481-494.

Gull, A., Lone, A. A., & Wani, N. U. I. (2019). Biotic and abiotic stresses in plants. *Abiotic and biotic stress in plants*, 1-19.

Gullner, G., Zechmann, B., Künstler, A., & Király, L. (2017). The signaling roles of glutathione in plant disease resistance. In *Glutathione in plant growth, development, and stress tolerance* (pp. 331-357). Springer, Cham.

Gullner, G., Komives, T., Király, L., & Schröder, P. (2018). Glutathione S-transferase enzymes in plant-pathogen interactions. *Frontiers in plant science*, 9, 1836.

Hall, N. (2007). Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. *Journal of experimental biology*, 210(9), 1518-1525.

Hernandez Ramos, A. (2018). Insectos plaga y enfermedades asociadas a cuatro cultivares de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) (Doctoral dissertation, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Agronomía).

Hernández, J. A., Barba-Espín, G., & Diaz-Vivancos, P. (2017). Glutathione-mediated biotic stress tolerance in plants. In *Glutathione in plant growth, development, and stress tolerance* (pp. 309-329). Springer, Cham.

Horie, T., Hauser, F., & Schroeder, J. I. (2009). HKT transporter-mediated salinity resistance mechanisms in *Arabidopsis* and monocot crop plants. *Trends in plant science*, 14(12), 660-668.

Hwang, J. E., Lim, C. J., Chen, H., Je, J., Song, C., & Lim, C. O. (2012). Overexpression of *Arabidopsis* dehydration-responsive element-binding protein 2C confers tolerance to oxidative stress. *Molecules and cells*, 33(2), 135-140.

Jain, M., Ghanashyam, C., & Bhattacharjee, A. (2010). Comprehensive expression analysis suggests overlapping and specific roles of rice glutathione S-

transferase genes during development and stress responses. *BMC genomics*, 11(1), 1-17.

Joshi, M., & Deshpande, J. D. (2010). Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *International Journal of Biomedical Research*, 2(1), 81-97.

Jowsey, I. R., Thomson, R. E., Orton, T. C., Elcombe, C. R., & Hayes, J. D. (2003). Biochemical and genetic characterization of a murine class Kappa glutathione S-transferase. *Biochemical journal*, 373(2), 559-569.

Kampranis, S. C., Damianova, R., Atallah, M., Toby, G., Kondi, G., Tsihchlis, P. N., & Makris, A. M. (2000). A novel plant glutathione S-transferase/peroxidase suppresses Bax lethality in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 275(38), 29207-29216.

Kaur, N., & Gupta, A. K. (2005). Signal transduction pathways under abiotic stresses in plants. *Current Science*, 1771-1780.

Kumar, A., Singh, B. K., Ahmad, I., Shukla, S., Patel, D. K., Srivastava, G., ... & Singh, C. (2012). Involvement of NADPH oxidase and glutathione in zinc-induced dopaminergic neurodegeneration in rats: similarity with paraquat neurotoxicity. *Brain research*, 1438, 48-64.

Lallement, P. A., Brouwer, B., Keech, O., Hecker, A., & Rouhier, N. (2014). The still mysterious roles of cysteine-containing glutathione transferases in plants. *Frontiers in pharmacology*, 5, 192.

Lamoureux, G. L., Shimabukuro, R. H., Swanson, H. R., & Frear, D. S. (1970). Metabolism of 2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-s-triazine (atrazine) in excised sorghum leaf sections. *Journal of agricultural and food chemistry*, 18(1), 81-86.

Lan, T., Yang, Z. L., Yang, X., Liu, Y. J., Wang, X. R., & Zeng, Q. Y. (2009). Extensive functional diversification of the *Populus* glutathione S-transferase supergene family. *The Plant Cell*, 21(12), 3749-3766.

Lane, A., & Jarvis, A. (2007). Changes in climate will modify the geography of crop suitability: agricultural biodiversity can help with adaptation.

Liao, W., Ji, L., Wang, J., Chen, Z., Ye, M., Ma, H., & An, X. (2014). Identification of glutathione S-transferase genes responding to pathogen infestation in *Populus tomentosa*. *Functional & integrative genomics*, 14(3), 517-529.

Liu, Y. J., Han, X. M., Ren, L. L., Yang, H. L., & Zeng, Q. Y. (2013). Functional divergence of the glutathione S-transferase supergene family in *Physcomitrella patens* reveals complex patterns of large gene family evolution in land plants. *Plant physiology*, 161(2), 773-786.

Liu, Y., & He, C. (2016). Regulation of plant reactive oxygen species (ROS) in stress responses: learning from AtRBOHD. *Plant Cell Reports*, 35(5), 995-1007.

Lockey, C., Otto, E., & Long, Z. (1998). Real-time fluorescence detection of a single DNA molecule. *Biotechniques*, 24(5), 744-746.

Loyall, L., Uchida, K., Braun, S., Furuya, M., & Frohnmeyer, H. (2000). Glutathione and a UV light-induced glutathione S-transferase are involved in signaling to chalcone synthase in cell cultures. *The Plant Cell*, 12(10), 1939-1950.

Mackay, I. M., Arden, K. E., & Nitsche, A. (2002). Real-time PCR in virology. *Nucleic acids research*, 30(6), 1292-1305.

Maiti, R. K. (1997). *Phaseolus spp. bean science*. Science Publishers, Inc..

Mannervik, B. (2012). Five decades with glutathione and the GSTome. *Journal of Biological Chemistry*, 287(9), 6072-6083.

Marino, D., Dunand, C., Puppo, A., & Pauly, N. (2012). A burst of plant NADPH oxidases. *Trends in plant science*, 17(1), 9-15.

Marrs, K. A. (1996). The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annual review of plant biology*, 47(1), 127-158.

Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, 7(9), 405-410.

Mittler, R., & Blumwald, E. (2010). Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives. *Annual review of plant biology*, 61(1), 443-462.

Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G. A. D., Tognetti, V. B., Vandepoele, K., ... & Van Breusegem, F. (2011). ROS signaling: the new wave?. *Trends in plant science*, 16(6), 300-309.

Mittler, R. (2017). ROS are good. *Trends in plant science*, 22(1), 11-19.

Møller, I. M., Jensen, P. E., & Hansson, A. (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 58, 459-481.

Moons, A. (2005). Regulatory and functional interactions of plant growth regulators and plant glutathione S-transferases (GSTs). *Vitamins & hormones*, 72, 155-202.

Mullis KB, Faloona FA. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymol*, 155: 335-350

Neuefeind, T., Huber, R., Dasenbrock, H., Prade, L., & Bieseler, B. (1997a). Crystal structure of herbicide-detoxifying maize glutathione S-transferase-I in complex with lactoylglutathione: evidence for an induced-fit mechanism. *Journal of molecular biology*, 274(4), 446-453.

Neuefeind, T., Huber, R., Reinemer, P., Knäblein, J., Prade, L., Mann, K., & Bieseler, B. (1997b). Cloning, sequencing, crystallization and X-ray structure of glutathione S-transferase-III from *Zea mays* var. mutin: a leading enzyme in detoxification of maize herbicides. *Journal of molecular biology*, 274(4), 577-587

Nianiou-Obeidat, I., Madesis, P., Kissoudis, C., Voulgari, G., Chronopoulou, E., Tsaftaris, A., & Labrou, N. E. (2017). Plant glutathione transferase-mediated stress tolerance: functions and biotechnological applications. *Plant cell reports*, 36(6), 791-805.

Noctor, G., & Foyer, C. H. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual review of plant biology*, 49(1), 249-279.

Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y. I., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B. E. L. E. N., ... & Foyer, C. H. (2012). Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, cell & environment*, 35(2), 454-484.

Noctor, G., Reichheld, J. P., & Foyer, C. H. (2018, August). ROS-related redox regulation and signaling in plants. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 80, pp. 3-12). Academic Press.

Orlando, C., Pinzani, P., & Pazzagli, M. (1998). Developments in quantitative PCR.

Pennington, J. A. T., & Young, B. (1990). Iron, zinc, copper, manganese, selenium, and iodine in foods from the United States total diet study. *Journal of Food Composition and Analysis*, 3(2), 166-184.

Pfaffl, M. W., & Hageleit, M. (2001). Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechnology Letters*, 23(4), 275-282.

Prade, L., Huber, R., & Bieseler, B. (1998). Structures of herbicides in complex with their detoxifying enzyme glutathione S-transferase—explanations for the selectivity of the enzyme in plants. *Structure*, 6(11), 1445-1452.

Prohaska, J. R., & Ganther, H. E. (1977). Glutathione peroxidase activity of glutathione-S-transferases purified from rat liver. *Biochemical and biophysical research communications*, 76(2), 437-445.

Reinemer, P., Prade, L., Hof, P., Neufeind, T., Huber, R., Zettl, R., ... & Bieseler, B. (1996). Three-dimensional structure of glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana* at 2.2 Å resolution: structural characterization of herbicide-conjugating plant glutathione S-transferases and a novel active site architecture. *Journal of molecular biology*, 255(2), 289-309.

Rodríguez, M., Canales, E., & Borrás-Hidalgo, O. (2005). Molecular aspects of abiotic stress in plants. *Bioteconología Aplicada*, 22(1), 1-10.

Ronaghi, M. (2001). Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome research*, 11(1), 3-11.

Rouhier, N., Lemaire, S. D., & Jacquot, J. P. (2008). The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. *Annual review of plant biology*, 59(1), 143-66.

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732), 1350-1354.

Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74(12), 5463-5467.

Sappl, P. G., Carroll, A. J., Clifton, R., Lister, R., Whelan, J., Harvey Millar, A., & Singh, K. B. (2009). The Arabidopsis glutathione transferase gene family displays complex stress regulation and co-silencing multiple genes results in altered metabolic sensitivity to oxidative stress. *The Plant Journal*, 58(1), 53-68.

Scandalios, J. G. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian journal of medical and biological research*, 38, 995-1014.

Shendure, J., & Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature biotechnology*, 26(10), 1135-1145.

Suzuki, N., Miller, G., Morales, J., Shulaev, V., Torres, M. A., & Mittler, R. (2011). Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Current opinion in plant biology*, 14(6), 691-699.

Thom, R., Cummins, I., Dixon, D. P., Edwards, R., Cole, D. J., & Laphorn, A. J. (2002). Structure of a tau class glutathione S-transferase from wheat active in herbicide detoxification. *Biochemistry*, 41(22), 7008-7020.

Vega, E., Barclay, L., Gregoricus, N., Williams, K., Lee, D., & Vinjé, J. (2011). Novel surveillance network for norovirus gastroenteritis outbreaks, United States. *Emerging infectious diseases*, 17(8), 1389.

Voytas, D. (2000). Agarose gel electrophoresis. *Current protocols in molecular biology*, 51(1), 2-5.

Wagner, U., Edwards, R., Dixon, D. P., & Mauch, F. (2002). Probing the diversity of the Arabidopsis glutathione S-transferase gene family. *Plant molecular biology*, 49(5), 515-532.

Wahibah, N. N., Tsutsui, T., Tamaoki, D., Sato, K., & Nishiuchi, T. (2018). Expression of barley Glutathione S-Transferase13 gene reduces accumulation of reactive oxygen species by trichothecenes and paraquat in Arabidopsis plants. *Plant Biotechnology*, 35(1), 71-79.

Wang, W. X., Vinocur, B., Shoseyov, O., & Altman, A. (2000, July). Biotechnology of plant osmotic stress tolerance physiological and molecular considerations. In IV International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding 560 (pp. 285-292)

Wang, W., Vinocur, B., & Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1), 1-14.

Welch, R. M., House, W. A., Beebe, S., & Cheng, Z. H. I. Q. I. A. N. G. (2000). Genetic selection for enhanced bioavailable levels of iron in bean (*Phaseolus v ulgaris* L.) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3576-3580.

Wilce, M. C., & Parker, M. W. (1994). Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1205(1), 1-18.

Wongsantichon, J., & Ketterman, A. J. (2005). Alternative splicing of glutathione S-transferases. *Methods in enzymology*, 401, 100-116.

Wrzaczek, M., Brosché, M., & Kangasjärvi, J. (2013). ROS signaling loops—production, perception, regulation. *Current opinion in plant biology*, 16(5), 575-582.

Zaffagnini, M., Bedhomme, M., Marchand, C. H., Morisse, S., Trost, P., & Lemaire, S. D. (2012). Redox regulation in photosynthetic organisms: focus on glutathionylation. *Antioxidants & redox signaling*, 16(6), 567-586.

5.2 Ελληνική Βιβλιογραφία

Βούλγαρη, Γ. (2014). Δημιουργία διαγονιδιακών φυτών καπνού (*N.tabacum* L.) που υπερεκφράζουν γονίδια GST απο το είδος *Phaseolus vulgaris* και μελέτη της αντοχής τους σε συνθήκες καταπόνησης: Μεταπτυχιακή Διατριβή. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Παπακώστα- Τασοπούλου, Δ. (2012). Ειδική Γεωργία σιτηρά & ψυχανθή. Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία.

Τζάμος, Ε. (2007). Φυτοπαθολογία Αθήνα: Εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε.

5.3 Βιβλιογραφία Εικόνων

Bachman, J. (2013). Reverse-transcription PCR (rt-PCR). In *Methods in enzymology* (Vol. 530, pp. 67-74). Academic Press.

Bhatia, S., & Dahiya, R. (2015). Concepts and techniques of plant tissue culture science. *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*, 121-156.

Caverzan, A., Casassola, A., & Brammer, S. P. (2016). Reactive oxygen species and antioxidant enzymes involved in plant tolerance to stress. *Abiotic and biotic stress in plants-recent advances and future perspectives*, 17, 463-480.

Dixon D.P., Laphorn A. and Edward R. (2002). Plant glutathione transferases. *Genome Biology* 3(3) reviews 3004, 1-3004, 10.

Gauthier, M. G. (2007). Simulation of polymer translocation through small channels.

McElwee, J. J., Schuster, E., Blanc, E., Piper, M. D., Thomas, J. H., Patel, D. S., ... & Gems, D. (2007). Evolutionary conservation of regulated longevity assurance mechanisms. *Genome biology*, 8(7), 1-16.

Παπανικολάου, Γ., & Παλαιολόγου, Δ. (2016). Τα στάδια της αντίδρασης PCR.

