



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

**«Απομόνωση γονιδίου μεταφοράς της γλουταθειόνης  
(GST) από καπνό (*Nicotiana tabacum*)»**

**«Isolation of a GST gene from *Nicotiana tabacum*»**

**Όνοματεπώνυμο Φοιτητή (Α.Μ.)**

Πανταζή Ουρανία (02354)

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

Μαδέσης Παναγιώτης

Επίκουρος Καθηγητής Κυτταρικής και Μοριακής Βιολογία

**Βόλος, 2023**

**«Απομόνωση γονιδίου μεταφοράς της γλουταθειόνης  
(GST) από καπνό (*Nicotiana tabacum*)»**

**«Isolation of a GST gene from *Nicotiana tabacum*»**

Η εξεταστική επιτροπή απαρτίζεται από τους:

- Μαδέσης Παναγιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Κυτταρικής και Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος
- Παυλή Ουρανία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής Βελτίωσης Φυτών του Τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος
- Λεβίζου Ευθυμία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας Φυτών του Τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος

## **ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΔΗΛΩΣΗ**

«Βεβαιώνω ότι είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας, η οποία εκπονήθηκε σύμφωνα με τον Κανονισμό Εκπόνησης Πτυχιακής Εργασίας του Τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος»

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα πτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, σχολή Γεωπονικών Επιστημών, στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, κατά τα έτη 2022-2023.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου κ. Μαδέση Παναγιώτη, Επίκουρο Καθηγητή Κυτταρικής και Μοριακής Βιολογίας, για την καθοδήγησή του κατά την διάρκεια του πειράματος, για τον χρόνο και την αμέριστη βοήθειά του σε οποιοδήποτε πρόβλημα αντιμετώπισα. Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην κα. Τσίντζου Γεωργία, Χημικός MSc και υποψήφια διδάκτωρ του τμήματος, καθώς ήταν πάντα πρόθυμη να με βοηθήσει και να μου εξηγήσει όλα όσα χρειαζόταν. Ακόμη, ευχαριστώ και τις καθηγήτριες της επιτροπής αξιολόγησης κα. Παυλή Ουρανία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής Βελτίωσης Φυτών και κα. Λεβίζου Ευθυμία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας Φυτών, για τον χρόνο τους για την αξιολόγηση και την βαθμολόγηση της πτυχιακής μου διατριβής.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι μεταφοράσες της γλουταθειόνης (GSTs) είναι πολυάριθμες πρωτεΐνες που παίζουν βασικό ρόλο στον μηχανισμό άμυνας των φυτών απέναντι σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις, στην αποτοξίνωση από ξενοβιοτικές ουσίες και την ανάπτυξή τους. Αυτές οι ιδιότητες κάνουν τις GSTs να έχουν μεγάλο αγρονομικό ενδιαφέρον για αυτό χρήζουν περαιτέρω μελέτης. Για την εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής εργασίας, έγινε απομόνωση ενός γονιδίου GST από φυτά καπνού του είδους *Nicotiana tabacum* L, αλληλουχήθηκε και μέσω χρησιμοποίησης βάσεων δεδομένων και βιοπληροφορικών προγραμμάτων, ταυτοποιήθηκε και διερευνήθηκε η λειτουργία της παραγόμενης πρωτεΐνης. Βρέθηκε πως το γονίδιο είναι η μεταφοράση της γλουταθειόνης LOC107782951, το οποίο εκφράζεται στο μονοπάτι μεταφοράς και μεταγωγής σήματος που ενεργοποιείται με την αυξίνη. Ακόμα, περιγράφονται όλα τα στάδια της διαδικασίας της απομόνωσης του γονιδίου (φασματοφωτομέτρηση, δημιουργία cDNA βιβλιοθήκης, PCR, ηλεκτροφόρηση) και παρουσιάζονται λεπτομερώς τα αποτελέσματα των βιοπληροφορικών αναλύσεων.

**Λέξεις κλειδιά:** Μεταφοράσες της γλουταθειόνης, glutathione S-transferase, GST, βιοτικές καταπονήσεις, αβιοτικές καταπονήσεις, αποτοξίνωση, απομόνωση γονιδίου, φασματοφωτομέτρηση, δημιουργία cDNA βιβλιοθήκης, PCR, ηλεκτροφόρηση

## **ABSTRACT**

Glutathione transferases (GSTs) are numerous proteins that play a key role in the plant defence mechanism against biotic and abiotic stresses, in detoxification from xenobiotics and in plant growth. These properties render GSTs as proteins of great agronomic interest and therefore they deserve further study. In the present thesis, a GST gene was isolated from tobacco plants of the species *Nicotiana tabacum L.* The gene was sequenced and through the use of databases and bioinformatic programs, the produced protein was identified and its function was investigated. The gene was found to be glutathione S transferase LOC107782951, which is expressed in the auxin-induced signal transduction pathway. Furthermore, all the stages of the gene isolation process (spectrophotometry, cDNA library creation, PCR, electrophoresis) are presented and the results of the bioinformatic analysis are described in detail.

**Key words:** glutathione S transferase, GST, biotic stress, abiotic stress, detoxification, gene isolation, spectrophotometry, cDNA library creation, PCR, electrophoresis

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

|              |  |        |
|--------------|--|--------|
| <b>1</b>     | <b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....  | - 1 -  |
| <b>1.1</b>   | <b>ΚΑΠΝΟΣ</b> .....  | - 1 -  |
| <b>1.1.1</b> | <b>ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΙΣΗ-ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ</b> ....                              | - 1 -  |
| <b>1.1.2</b> | <b>ΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ</b> .....   | - 2 -  |
| <b>1.1.3</b> | <b>ΕΜΠΟΡΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΙΣΗ</b> .....   | - 2 -  |
| <b>1.1.4</b> | <b>ΧΡΗΣΕΙΣ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ</b> .....   | - 2 -  |
| <b>1.2</b>   | <b>ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ</b> .....  | - 3 -  |
| <b>1.2.1</b> | <b>ΒΙΟΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ</b> .....                                       | - 3 -  |
| <b>1.2.2</b> | <b>ΑΒΙΟΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ</b> .....                                      | - 3 -  |
| <b>1.2.3</b> | <b>ΣΥΝΔΙΑΣΜΟΙ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΕΩΝ</b> .....   | - 4 -  |
| <b>1.2.4</b> | <b>ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΜΥΝΑΣ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ</b> .....   | - 4 -  |
| <b>1.3</b>   | <b>ΜΕΤΑΦΟΡΑΣΕΣ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΙΟΝΗΣ - GLUTATHIONE S-<br/>TRANSFERASES (GSTs)</b> ..... | - 5 -  |
| <b>1.3.1</b> | <b>ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΚΑΙ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ GST ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ</b><br>- 6 -                    |        |
| <b>1.3.2</b> | <b>ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ GST ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ</b> .....  | - 7 -  |
| <b>1.4</b>   | <b>ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ</b> .....   | - 9 -  |
| <b>1.4.1</b> | <b>ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA</b> .....   | - 9 -  |
| <b>1.4.2</b> | <b>ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ</b> .....  | - 10 - |
| <b>1.4.3</b> | <b>ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ</b> .....   | - 10 - |
| <b>1.4.4</b> | <b>ΣΥΝΘΕΣΗ cDNA ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ</b> .....  | - 11 - |
| <b>1.4.5</b> | <b>ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)</b> .....                              | - 11 - |
| <b>1.4.6</b> | <b>ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ SANGER</b> .....  | - 12 - |
| <b>1.5</b>   | <b>ΟΜΟΛΟΓΙΑ ΑΚΟΛΟΥΘΙΩΝ</b> .....   | - 14 - |
| <b>2</b>     | <b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....   | - 15 - |
| <b>2.1</b>   | <b>ΥΛΙΚΑ</b> .....   | - 15 - |
| <b>2.2</b>   | <b>ΟΡΓΑΝΑ</b> .....  | - 15 - |

|              |  |        |
|--------------|--|--------|
| <b>2.3</b>   | <b>ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....                             | - 16 - |
| <b>2.3.1</b> | <b>ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ</b> .....                        | - 16 - |
| <b>2.3.2</b> | <b>ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA</b> .....                       | - 16 - |
| <b>2.3.3</b> | <b>ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ</b> .....                  | - 18 - |
| <b>2.3.4</b> | <b>ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ</b> .....                       | - 20 - |
| <b>2.3.5</b> | <b>ΣΥΝΘΕΣΗ cDNA ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ</b> .....            | - 20 - |
| <b>2.3.6</b> | <b>ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ-PCR</b> ..... | - 21 - |
| <b>2.3.7</b> | <b>ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ</b> .....           | - 35 - |
| <b>3</b>     | <b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....                        | - 36 - |
| <b>4</b>     | <b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....                            | - 53 - |
| <b>5</b>     | <b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....                        | - 55 - |
| <b>6</b>     | <b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ</b> .....             | - 57 - |
| <b>6.1</b>   | <b>ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....               | - 57 - |
| <b>6.2</b>   | <b>ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....             | - 57 - |



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

|  |        |
|--|--------|
| Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση των καταλυτικών και των μην καταλυτικών λειτουργιών των GST πρωτεϊνών (Nianiou-Obeidat κ.ά., 2017).....   | - 7 -  |
| Εικόνα 2: Απεικόνιση GST πρωτεΐνης, στην οποία φαίνονται τα διμερή και το τερματικό N και C (Udomsinprasert κ.ά., 2005) .....  | - 8 -  |
| Εικόνα 3: Αλληλούχηση γονιδίου μέσω της μεθόδου Sanger (Estevezj, 2012).....   | - 13 - |
| Εικόνα 4: Σημασία γραμμάτων και συμβόλων που εμφανίζονται στις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες fasta, στα χρωματογράμματα και στις αλληλουχίες αμινοξέων (Χαρίτου Θ., 2023).....  | - 14 - |
| Εικόνα 5: Ανάπτυξη των φυτών καπνού στις 16/8, στις 27/8 και στις 28/9. ....   | - 16 - |
| Εικόνα 6: Η φυγόκεντρος που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια του πειράματος. ....  | - 18 - |
| Εικόνα 7: Το φασματοφωτόμετρο που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια του πειράματος....  | - 19 - |
| Εικόνα 8: Παρατήρηση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης του μάρτυρα (ladder)-1η θέση, KP1-3η θέση και KP2-4η θέση σε UV φως .....  | - 20 - |
| Εικόνα 9: Ο θερμοκυκλοποιητής ρυθμισμένος με ένα πρόγραμμα PCR .....   | - 23 - |
| Εικόνα 10: Η συσκευή ηλεκτροφόρησης με πήκτωμα αγαρόζης στο εσωτερικό της. ....  | - 25 - |
| Εικόνα 11: Παρατήρηση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης του μάρτυρα (ladder)-1η θέση και του DNA προϊόντος με τους εκκινητές F2 GST tobacco R-GST-2η θέση σε UV φως. ....   | - 25 - |
| Εικόνα 12: Παρατήρηση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης του μάρτυρα (ladder)-1η θέση, του DNA προϊόντος με τον εκκινητή F3 GST tobacco-2η θέση και του DNA προϊόντος με τον εκκινητή F2 GST tobacco -3η θέση, σε UV φως ..... | - 28 - |
| Εικόνα 13: Παρατήρηση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης του μάρτυρα (ladder)-1η θέση, του DNA προϊόντος με τον εκκινητή F3 GST tobacco-2η θέση. ....  | - 29 - |
| Εικόνα 14: Παρατήρηση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης του μάρτυρα (ladder)-1η θέση, του DNA προϊόντος με τον εκκινητή F3 GST tobacco-2η θέση και το καθαρισμένο προϊόν με τον F2 εκκινητή-3η θέση. ....                     | - 32 - |
| Εικόνα 15: Παρατήρηση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης του μάρτυρα (ladder)-1η θέση, του DNA προϊόντος με τον εκκινητή F3 GST tobacco-3η θέση .....  | - 34 - |
| Εικόνα 16: Παρατήρηση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης του μάρτυρα (ladder)-1η θέση, του DNA προϊόντος με τον εκκινητή F3 GST tobacco-2η θέση .....  | - 35 - |
| Εικόνα 17: DNA μάρτυρας της εταιρίας NIPPON Genetics Europe (αριστερά) (FastGene 1 Kb DNA Marker Plus, 2018) .....   | - 36 - |
| Εικόνα 18: Σύγκριση της ζώνης στην δεξιά εικόνα με τον μάρτυρα και καθορισμός του μεγέθους της .....   | - 36 - |

|   |        |
|---|--------|
| Εικόνα 19: Χρωματόγραμμα του γονιδίου με τον εκκινητή F3 GST tobacco .....  | - 38 - |
| Εικόνα 20: Χρωματόγραμμα του γονιδίου με τον εκκινητή R-GST.....  | - 39 - |
| Εικόνα 21: Στοιχίση της αλληλουχίας του γονιδίου LOC104108670 με την αλληλουχία με τον εμπρόσθιο εκκινητή F3 GST tobacco.....   | - 45 - |
| Εικόνα 22: Στοιχίση του γονιδίου LOC104108670 με την συμπληρωματική αλυσίδα του ανάστροφου εκκινητή R-GST. ....   | - 46 - |
| Εικόνα 23: Αντίδραση υποκατάστασης της γλουταθειόνης.....   | - 48 - |
| Εικόνα 24: Δομή της μεταφοράς της γλουταθειόνης του είδους <i>Nicotiana tabacum</i> L. Η βαθμολογία εμπιστοσύνης ανά υπόλειμμα-per-residue confidence score (pLDDT), είναι πολύ υψηλό, >90. Για αυτό το χρώμα της πρωτεΐνης είναι κυρίως μπλε. Οι περιοχές με διαφορετικό χρώμα έχουν μικρότερη βαθμολογία και μπορεί να μην είναι καλά δομημένες κατά μια πιθανή απομόνωση ..... | - 48 - |
| Εικόνα 25: Στοιχίση της αλληλουχίας του γονιδίου LOC107782951 με την αλληλουχία με τον πρόσθιο εκκινητή F3 GST tobacco .....  | - 49 - |
| Εικόνα 26: Στοιχίση του γονιδίου LOC107782951 με την συμπληρωματική αλυσίδα του ανάστροφου εκκινητή R-GST. ....   | - 50 - |
| Εικόνα 27: Στοιχίση της αλυσίδας contig με το γονίδιο μεταφοράς της γλουταθειόνης LOC104108670 του είδους <i>Nicotiana tomentosiformis</i> .....  | - 52 - |
| Εικόνα 28: Στοιχίση της αλυσίδας contig με το γονίδιο μεταφοράς της γλουταθειόνης LOC107782951 του είδους <i>Nicotiana tabacum</i> L.....   | - 53 - |

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Οι τιμές απορρόφησης του μάρτυρα και των δειγμάτων KP1 και KP2, σε μήκος κύματος 260 nm και 280 nm, ο λόγος A280/A260, καθώς και η τιμή της συγκέντρωσής τους.-

19 -

Πίνακας 2: Το πρόγραμμα του θερμοκυκλοποιητή-Set up PCR..... - 22 -

Πίνακας 3: Το πρόγραμμα του θερμοκυκλοποιητή-Set up PCR..... - 24 -

Πίνακας 4 Το πρόγραμμα του θερμοκυκλοποιητή-Set up PCR..... - 27 -

Πίνακας 5: Το πρόγραμμα του θερμοκυκλοποιητή- Set up PCR..... - 29 -

Πίνακας 6: Το πρόγραμμα του θερμοκυκλοποιητή- Set up PCR..... - 30 -

Πίνακας 7: Το πρόγραμμα του θερμοκυκλοποιητή-Set up PCR..... - 31 -

Πίνακας 8: Το πρόγραμμα του θερμοκυκλοποιητή-Set up PCR..... - 32 -

Πίνακας 9: Το πρόγραμμα του θερμοκυκλοποιητή-Set up PCR..... - 33 -

Πίνακας 10: Σύγκριση της εμπρόσθιας αλληλουχίας με γονίδια ίδιων ή γενετικά παρόμοιων φυτικών ειδών ..... - 42 -

Πίνακας 11: Σύγκριση της ανάστροφης αλληλουχίας με γονίδια ίδιων ή γενετικά παρόμοιων φυτικών ειδών. .... - 43 -

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

- BLAST: Basic Local Alignment Sequence Tool (Βασικό εργαλείο τοπικής στοίχισης ακολουθιών)
- cDNA: Complementary DNA (Συμπληρωματικό DNA)
- DHAR: Dehydroascorbate reductase (εξαρτώμενη από την γλουταθειόνη αφυδροασκορβική αναγωγή)
- DNA: Deoxyribonucleic acid (Δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ)
- DNase: Deoxyribonuclease (δεοξυριβονουκλεάση)
- dNTPs: deoxyribonucleotide Triphosphates (τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια)
- EF1B: Elongation factor 1Bγ (Παράγοντας επιμήκυνσης 1Bγ)
- GHR: Glutathionyl hydroquinone reductase (Αναγωγή της γλουταθειονυλδροκινόνης)
- GP: Glutathione Peroxidase (περοξειδάση της γλουταθειόνης)
- GSH: γ-glutamyl-cysteinyl-glycine (τριπεπτίδιο της γλουταθειόνης)
- GST: Glutathione S- Transferase (Μεταφοράς της Γλουταθειόνης)

- mPGES2: microsomal prostaglandin E synthase type 2 (Μικροσωμική προσταγλαδίνη E συνθάση τύπου 2)
- mRNA: Messenger Ribonucleic acid (Αγγελιοφόρο ριβονουκλεϊκό οξύ)
- NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (φωσφορικό δινουκλεοτίδιο νικοτιναμίδης αδενίνης)
- PCR: Polymerase Chain Reaction (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης)
- RNA: Ribonucleic acid (Ριβονουκλεϊκό οξύ)
- RNase: Ribonuclease (ριβονουκλεάση)
- ROS: Reactive Oxygen Species (Ενεργές Μορφές Οξυγόνου)
- RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction (αντίστροφη μεταγραφή)
- TAE: Tris acetate Ethylene diamine tetra acetic acid (Τρισοξικό Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ)
- TCHQD: Tetrachloro-hydroquinone dehalogenase (Δεαλογονάση της τετραχλωρο-υδροκινόνης)
- T<sub>M</sub>: Primer Melting Temperature (θερμοκρασία στην οποία η μισή δίκλωνη αλυσίδα του DNA αποδιατάσσεται για να γίνει μονόκλωνη)

# 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 ΚΑΠΝΟΣ

### 1.1.1 ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΙΣΗ-ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Ο καλλιεργούμενος καπνός κατατάσσεται στην οικογένεια Solanaceae, στο γένος *Nicotiana*, το οποίο διαιρείται σε 3 υπογένη (Rustica, Tabaccum, Petunioides) και περιλαμβάνει περισσότερα από 64 είδη με ποικιλόμορφα χαρακτηριστικά. Προέρχεται από την κεντρική Αμερική παρ' όλα αυτά σήμερα καλλιεργείται σε περισσότερες από 97 χώρες, όπως και στην Ελλάδα, από τον 16<sup>ο</sup> αιώνα (Ren & Timko, 2001). Το κύριο είδος που καλλιεργείται είναι το *Nicotiana tabacum L*, το οποίο είναι αυτογονιμοποιούμενο, αμφιπλοειδές με απλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων  $n=24$ . Το είδος αυτό προέρχεται από υβριδισμό των ειδών *Nicotiana sylvestris*, *Nicotiana tomentosiformis*, και πιθανώς του *Nicotiana otophora* (Kishore, 2014). Ο καλλιεργούμενος καπνός κατατάσσεται σε κλάσεις, με σημαντικότερες τα Virginia, Burley, Ανατολίτικα, Maryland και καπνά πούρων. Τα φυτά καπνού μπορεί να είναι ετήσια, ποώδη ή πολυετή με ημιξυλώδη βλαστό, καλλιεργούνται όμως μόνο ως ετήσια. Είναι ορθοστέλεχα, ταχείας ανάπτυξης, με ύψος ανάλογα την ποικιλία να κυμαίνεται από 45-200 cm. Επίσης, ο αριθμός και το σχήμα των φύλλων παρουσιάζει μεγάλη ποικιλομορφία. Ο αριθμός είναι γενετικά καθορισμένος ενώ το μέγεθος επηρεάζεται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Η μορφολογία των φύλλων αλλάζει ανάλογα με την ποικιλία και την θέση τους πάνω στο φυτό. Το χρώμα τους καθορίζεται γενετικά αλλά και από την εδαφική γονιμότητα και την περιεκτικότητα σε άζωτο. Τα φύλλα όσο πλησιάζουν στην ωρίμανση μετατρέπονται από πράσινα σε κίτρινα. Ακόμα, τα φύλλα και ο βλαστός περιβάλλονται από αδενώδη τριχίδια που εκκρίνουν μια κίτρινη κολλώδη ουσία (γόμμα), η οποία περιέχει ένα αλκαλοειδές, την νικοτίνη, που προσδίδει αρώματα και γεύση στα φύλλα του καπνού. Η ταξιανθία είναι φόβη ή κόρυμβος και τα άνθη τέλεια με κυλινδρικό κάλυκα. Στη στεφάνη παρατηρείται ένας λευκός, μακρύς σωλήνας που στο ανώτερο τμήμα του είναι πεπλατισμένος και καταλήγει στο έλασμα με 5 τριγωνικούς, ροζ, λευκούς ή κόκκινους λοβούς. Στη βάση της στεφάνης φύονται 5 στήμονες και στη βάση του στύλου υπάρχει η ωοθήκη. Ο καρπός είναι κάψα με πολυάριθμους σπόρους (Παπακώστα-Τασοπούλου Δ., 2013).

### **1.1.2 ΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ**

Τα χημικά συστατικά των φύλλων του καπνού περιλαμβάνουν υδατάνθρακες, αζωτούχες ενώσεις, νιτροζαμίνες, οργανικά οξέα, ρητίνες, κηρούς και αιθέρια έλαια. Επίσης, περιέχουν πολλά αλκαλοειδή πυριδίνης, το κυριότερο είναι ένα υγρό αλκαλοειδές, η νικοτίνη. Η νικοτίνη συντίθεται κυρίως στις ρίζες αλλά και στο υπέργειο τμήμα του φυτού και ο ρόλος της είναι η άμυνα έναντι φυτοφάγων ζώων (Gavilano κ.ά., 2006). Άλλα αλκαλοειδή αποτελούν η νορνοκοτίνη και η αναβασίνη. Την χημική σύσταση των φύλλων ολοκληρώνουν οι πολυφαινόλες, κάποια ανόργανα στοιχεία και πισσώδη συστατικά (Παπακώστα-Τασοπούλου Δ., 2013).

### **1.1.3 ΕΜΠΟΡΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΙΣΗ**

Εκτός από την βοτανική ταξινόμηση των ποικιλιών του καπνού, γίνεται και εμπορική ταξινόμηση, ανάλογα με τη γεύση και το άρωμα. Χωρίζονται σε 3 κατηγορίες, στα αρωματικά καπνά (Μπασμάς Ξάνθης), τα ουδέτερα ή γεμίσματος (Σαμσούς, Τσεμπέλια Αγρινίου) και στα βασικά ή γεύσεως (Κλασικά Κάμπα) (Παπακώστα-Τασοπούλου Δ., 2013).

### **1.1.4 ΧΡΗΣΕΙΣ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ**

Η καλλιέργεια του φυτού αποσκοπεί κυρίως στην παραγωγή καπνιστικών προϊόντων όπως τσιγάρα και πούρα. Άλλες χρήσεις αποτελούν η παραγωγή καπνόσπορου, η παραγωγή βιομάζας και βιοκαυσίμων, η παραγωγή νικοτίνης για φαρμακευτική χρήση και η παραγωγή πρωτεϊνών και ενζύμων για χρήση σε φαρμακευτικά προϊόντα και βιοπολυμερή (Fatica κ.ά., 2019; Jube & Borthakur, 2007). Ακόμη, το φυτό έχει βρει χρήση τα τελευταία χρόνια στην μοριακή βιολογία και την γενετική μηχανική. Αυτό συμβαίνει γιατί έχει χαρτογραφηθεί σχεδόν πλήρως το γονιδίωμά του, μπορεί να γίνει σχετικά εύκολα γενετικός μετασχηματισμός και ανταποκρίνεται στην ιστοκαλλιέργεια με υψηλό ρυθμό αναγέννησης. Επίσης, μπορεί να αναπτυχθεί σε συνθήκες εργαστηρίου *in vitro* και σε θερμοκήπια. Ο διαγονιδιακός καπνός αποτελεί πρότυπο οργανισμό για την μελέτη βασικών βιολογικών λειτουργιών, όπως οι αλληλεπιδράσεις φυτού-παθογόνου, οι περιβαλλοντικές αποκρίσεις, η ρύθμιση της ανάπτυξης και η γήρανση (Jube & Borthakur, 2007). Μετασχηματισμένα φυτά καπνού μπορούν να εκφράσουν ξένες προς αυτά πρωτεΐνες στο γονιδίωμα του πυρήνα

και των χλωροπλαστών και να παράγουν θεραπευτικές πρωτεΐνες και αντισώματα, κάτι που μπορεί να βρει χρήση στην φαρμακευτική και την παραγωγή εμβολίων (Budzianowski, 2009).

## **1.2 ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ**

Οι φυτικοί οργανισμοί εκτίθενται σε ένα ευρύ φάσμα βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων τους οποίους θα πρέπει να καταπολεμήσουν για να έχουν οικολογική και αναπαραγωγική επιτυχία, όπως επίσης και υψηλή παραγωγή (Mertens κ.ά., 2021; Saijo & Loo, 2020).

### **1.2.1 ΒΙΟΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ**

Στους βιοτικούς παράγοντες καταπόνησης υπάγονται τα βακτήρια, οι μύκητες, οι ιοί, τα φανερόγυμα παράσιτα, οι νηματώδεις και τα φυτοφάγα έντομα. Αυτά μπορούν να αποκομίζουν θρεπτικά στοιχεία που είναι απαραίτητα στα φυτά, καθώς και να προκαλούν διάφορες ασθένειες και συμπτώματα σε αυτά. Διαταράσσουν την ανάπτυξη, τον κανονικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την μορφογένεση των ιστών και των οργάνων. Επίσης, μπορεί να εμφανιστούν αποκλίσεις στα φυσικά χρώματα φύλλων, ιστών και οργάνων, όπως και διαταραχές λόγω αδυναμίας διακίνησης του νερού (μάρανση). Πολλοί φυτοπαθογόνοι οργανισμοί προκαλούν νέκρωση ή σήψη των φυτών, επάγουν την παραγωγή μη φυσιολογικών εκκρίσεων (κόμμεα, ρητινικές ουσίες) και οδηγούν σε πτώση φυτικών οργάνων και ιστών (Τζάμος Ε. Κ., 2017).

### **1.2.2 ΑΒΙΟΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ**

Οι αβιοτικοί παράγοντες καταπόνησης είναι πολυάριθμοι. Κάποιοι από αυτούς είναι η ξηρασία, η ζέστη, το κρύο, η αλατότητα, η έλλειψη θρεπτικών στοιχείων, τα βαρέα μέταλλα, τα χημικά φυτοπροστατευτικά σκευάσματα και λιπάσματα και οι μηχανικές καταπονήσεις και επηρεάζουν την μορφολογία, την φυσιολογία και την βιοχημεία των φυτών με διάφορους τρόπους. Για παράδειγμα, η ξηρασία και η έλλειψη νερού μειώνουν την φωτοσύνθεση, προκαλούν ωσμωτικό στρες, καθιστούν αδύνατη την παραλαβή θρεπτικών στοιχείων από το έδαφος και

καθιστούν δυσκολότερη έως αδύνατη την κυτταρική διαίρεση (G.-T. Huang κ.ά., 2012). Η αλατότητα του εδάφους προκαλεί ξήρανση των φυτών και τα ιόντα  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  και  $\text{H}^+$  προκαλούν τοξικότητα. Το κρύο επηρεάζει τον μεταβολισμό των φυτών, το οποίο οδηγεί σε ωσμωτική και οξειδωτική καταπόνηση (Zhu, 2002).

### 1.2.3 ΣΥΝΔΙΑΣΜΟΙ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΕΩΝ

Τα φυτά φυσιολογικά επηρεάζονται από βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες ταυτόχρονα. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στην δράση των φυτοπαθογόνων οργανισμών όσο και στην άμυνα των φυτών-ξενιστών. Η καταπόνηση από αβιοτικούς παράγοντες μειώνει την ικανότητα των φυτών να αντισταθούν σε βιοτικές προσβολές, άρα τα κάνει πιο ευαίσθητα σε βιοτικές καταπονήσεις. Για παράδειγμα, η θερμοκρασία επηρεάζει την αντοχή σε βακτήρια, μύκητες, ιούς και έντομα και ανάλογα με την αλληλεπίδραση του φυτού με το παθογόνο αλλάζει και η απόκριση του σε διαφορετικές τιμές θερμοκρασίας (Wang κ.ά., 2009). Τέλος, η ρύπανση του περιβάλλοντος, η υπερθέρμανση του πλανήτη και η κλιματική αλλαγή εκτείνουν τις δυσμενείς επιπτώσεις των βιοτικών και των αβιοτικών καταπονήσεων, οι οποίες επηρεάζουν αρνητικά την ανάπτυξη και την απόδοση των φυτών (Nejat & Mantri, 2017).

### 1.2.4 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΜΥΝΑΣ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

Για να ανταπεξέλθουν τα φυτά σε κάθε μορφή καταπόνησης, έχουν αναπτύξει συγκεκριμένους μηχανισμούς άμυνας. Αρχικά, υπάρχει η προυπάρχουσα θεμελιώδης άμυνα που βασίζεται τόσο σε δομικούς χαρακτήρες όσο και σε ένα βιοχημικό οπλοστάσιο που αποτελείται από χημικούς μεταβολίτες. Στους δομικούς χαρακτήρες κατατάσσονται οι κηροί, το πάχος της εφυμενίδας, των κυτταρικών τοιχωμάτων και της ενδοδερμίδας, τα στομάτια, οι νευρώσεις των φύλλων και τα επιφανειακά τριχίδια. Το βιοχημικό οπλοστάσιο των φυτών περιλαμβάνει τοξικούς μεταβολίτες, όπως οι φαινολικές ενώσεις, οι ταννίνες και οι σαπωνίνες, και ορισμένες πρωτεΐνες που παρεμποδίζουν ή υδρολύουν ένζυμα που παράγουν τα παθογόνα (Τζάμος Ε. Κ., 2017)

Ακόμη, μετά από κάποια αντίδραση των φυτών με παθογόνους οργανισμούς επάγονται βιοχημικοί μηχανισμοί άμυνας, οι οποίοι χωρίζονται στο βασικό σύστημα άμυνας και το σύστημα μέσω των γονιδίων ανθεκτικότητας. Επίσης, τα φυτά



αναπτύσσουν και την επίκτητη διασυστηματική ανθεκτικότητα η οποία προσδίδει μακροχρόνια αντοχή έναντι πολλών διαφορετικών παθογόνων (Muthamilarasan & Prasad, 2013).

Στο βασικό σύστημα άμυνας των φυτών, αναγνωρίζονται μικροβιακοί διεγέρτες (elicitors), πχ εργαστερόλη, φλατζελίνη, μέσω κάποιων υποδοχέων αναγνώρισης μοτίβων, το οποίο οδηγεί σε ενεργητικές αμυντικές αντιδράσεις, όπως η σύνθεση φυτοαλεξινών, η αντίδραση υπερευαισθησίας, η παραγωγή ενεργών ομάδων οξυγόνου και η εναπόθεση λιγνίνης και καλλόζης για την ενίσχυση των κυτταρικών τοιχωμάτων (Τζάμος Ε. Κ., 2017). Επίσης, επάγουν το κλείσιμο των στομάτων και την παραγωγή ιασμονικού και σαλικυλικού οξέος και αιθυλενίου, τα οποία παράγονται και στο σύστημα στο οποίο επάγονται γονίδια ανθεκτικότητας και στην επίκτητη διασυστηματική ανθεκτικότητα (Muthamilarasan & Prasad, 2013).

Στο σύστημα των γονιδίων ανθεκτικότητας, υπάρχουν πρωτεΐνες στα φυτά που τους προσδίδουν ανθεκτικότητα, με το να αναγνωρίζουν τις πρωτεΐνες (elicitors) των μικροοργανισμών που εισχωρούν στο κυτταρόπλασμα (Cornelis & Van Gijsegem, 2000). Στη συνέχεια, εκφράζεται η αντοχή του φυτού με την παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου, ροή ιόντων  $Ca^{+}$ , παραγωγή κινασών, NADPH οξειδασών, βιοσύνθεση ιασμονικού οξέος, σαλικυλικού οξέος και αιθυλενίου, παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών και ενδυνάμωση των κυτταρικών τοιχωμάτων. Επίσης, ενεργοποιούνται μεταγραφικοί παράγοντες για την επαγωγή γονιδίων άμυνας και προστασίας έναντι των παθογόνων και των καταπονήσεων. Κάποια από τα ένζυμα που παράγονται από τα γονίδια αυτά είναι η μεταφοράση της γλουταθειόνης (GST), η περοξειδάση της γλουταθειόνης (GP), οι υπεροξειδάσες (Peroxidases) και η υδρολάση του υποξειδίου (Epoxide hydrolase) (Τζάμος Ε. Κ., 2017).

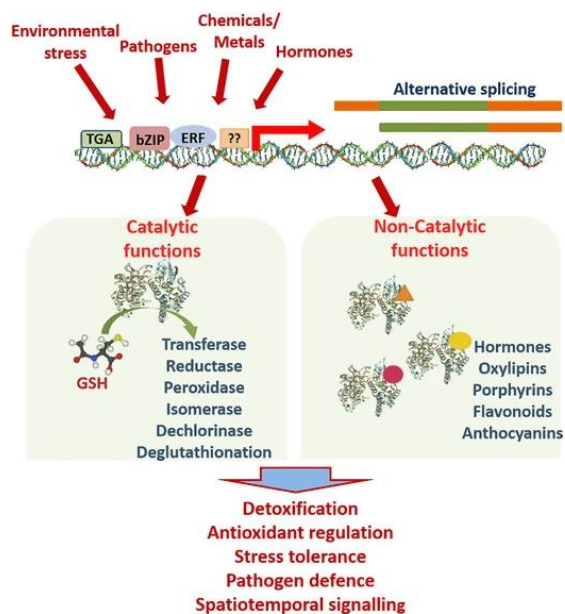
### **1.3 ΜΕΤΑΦΟΡΑΣΕΣ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΙΟΝΗΣ - GLUTATHIONE S-TRANSFERASES (GSTs)**

Οι μεταφοράσες της γλουταθειόνης (GSTs) είναι ένζυμα με διάφορες λειτουργίες, τα οποία κωδικοποιούνται από πολυάριθμα γονίδια. Οι φυτικές GSTs παρουσιάζουν μεγάλο αγρονομικό ενδιαφέρον, καθώς παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των φυτών, στον μεταβολισμό, στην αντίσταση απέναντι σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις και στην αποτοξίνωση διαφόρων ουσιών,

συμπεριλαμβανομένων των ζιζανιοκτόνων και των φυτοφαρμάκων (Nianiou-Obeidat κ.ά., 2017). Ακόμα, μια σημαντική δραστηριότητά τους είναι ο μεταβολισμός των τοξινών που παράγονται λόγω οξειδωτικού στρες. (Chen κ.ά., 2012). GST γονίδια επίσης εμφανίζονται στον άνθρωπο, στα ζώα, στα έντομα, στους μύκητες, στις ζύμες και στα βακτήρια και καταλύουν κυρίως διεργασίες αποτοξίνωσης των κυττάρων και αποβολής φυσιολογικών και ξενοβιοτικών ουσιών (Wilce & Parker, 1994).

### **1.3.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΚΑΙ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ GST ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ**

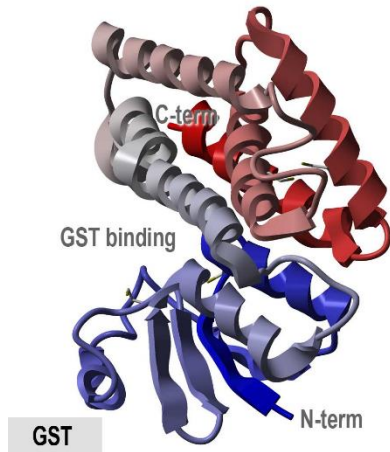
Οι GST είναι υδρόφοβες πρωτεΐνες, με μοριακό βάρος γύρω στα 50 kDa και αποτελούνται συνήθως από 2 πολυπεπτιδικές υπομονάδες-διμερή, με μοριακό βάρος γύρω στα 26 kDa η κάθε μία. Αυτές οι υπομονάδες μπορεί να είναι ίδιες (ομοδιμερή) ή να διαφέρουν (ετεροδιμερή). Κάθε διμερές έχει ένα ενεργό κέντρο που αποτελείται από 2 επιμέρους θέσεις, την θέση δέσμευσης του τριπεπτιδίου της γλουταθειόνης GSH ( $\gamma$ -glutamyl-cysteinyl-glycine) (G-site) στον τερματικό τομέα N και την θέση δέσμευσης του ηλεκτρόφιλου υποστρώματος (H-site) στον τερματικό τομέα C (Dixon κ.ά., 2002). Επίσης μπορεί να υπάρχουν GST πρωτεΐνες που αποτελούνται από ένα μονομερές (Vaish κ.ά., 2022). Επιτελούν την αποτοξίνωση των κυττάρων με την μεταφορά του τριπεπτιδίου της γλουταθειόνης (GSH) σε ένα συνυπόστρωμα που έχει ηλεκτρόφιλο κέντρο και από την αντίδραση αυτή δημιουργείται ένα πολικό προϊόν που περιέχει S-γλουταθειόνη (Dixon κ.ά., 2002). Η αποτοξίνωση πραγματοποιείται σε 3 φάσεις. Τα GST ένζυμα δρουν στην φάση II, καθιστώντας αυτές τις ενώσεις λιγότερο τοξικές και περισσότερο υδατοδιαλυτές (Marrs, 1996). Εκτός από την καταλυτική τους ιδιότητα, οι GST λειτουργούν και μη καταλυτικά, ως πρωτεΐνες που μεταφέρουν διάφορα ένζυμα και ονομάζονται λιγαδίνες (ligandins) (Moons, 2005; Nianiou-Obeidat κ.ά., 2017). Αυτές οι πρωτεΐνες μεταφέρουν φυσικές αυξίνες (IAA), άλλες φυτοορμόνες, φλαβονοειδή και ανθοκυάνες και βοηθούν στο να μην υπάρχει υπερσυσσώρευση των ουσιών αυτών εντός των κυττάρων ή στις μεμβράνες τους (Zhao & Dixon, 2010).



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση των καταλυτικών και των μην καταλυτικών λειτουργιών των GST πρωτεϊνών (Nianiou-Obeidat κ.ά., 2017)

### 1.3.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ GST ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

Αρχικά, οι GST πρωτεΐνες κατηγοριοποιούνται σε 3 υπεροικογένειες, ανάλογα με την τοποθεσία τους στο κύτταρο, την κυτοπλασματική, τη μιτοχονδιακή και τη μικροσωματική. Οι GST που ανήκουν στις δυο πρώτες είναι διαλυτές και κατατάσσονται σε 14 κλάσεις, τις φι, ταυ, θήτα, ζήτα, λάμδα, DHAR (εξαρτώμενη από την γλουταθειόνη αφυδροασκορβική αναγωγάση), TCHQD (Δεαλογονάση της τετραχλωρο-υδροκινόνης), EF1Bγ (Παράγοντας επιμήκυνσης 1Bγ), mPGES2 (Μικροσωμική προσταγλαδίνη E συνθάση τύπου 2), GHR (Αναγωγάση της γλουταθειονυλδροκινόνης), ιώτα, ημεριθρίνη, μεταξίνη και Ure2p (Irimi Nianiou-Obeidat κ.ά., 2010; Vaish κ.ά., 2022). Η μικροσωματική υπεροικογένεια περιλαμβάνει GST πρωτεΐνες που δραστηριοποιούνται στον μεταβολισμό της γλουταθειόνης. Οι πρωτεΐνες των κλάσεων ταυ, φι, ζήτα, θήτα και TCHQD αποτελούνται από δύο διμερή, ενώ οι πρωτεΐνες των υπολοίπων κλάσεων συνιστώνται από ένα μονομερές (Vaish κ.ά., 2022). Γενικά, οι πιο μελετημένες κλάσεις φαίνεται να είναι οι φι, ταυ, θήτα, ζήτα, λάμδα και DHAR.



Εικόνα 2: Απεικόνιση GST πρωτεΐνης, στην οποία φαίνονται τα διμερή και το τερματικό N και C (Udomsinprasert κ.ά., 2005)

Οι κλάσεις θήτα και ζήτα εντοπίζονται τόσο στα φυτά όσο και στα ζώα, ενώ οι κλάσεις ταυ και φι υπάρχουν αποκλειστικά στα φυτά (Dixon κ.ά., 2002). Τα γονίδια των κλάσεων ταυ και φι επάγονται κάτω από βιοτικές καταπονήσεις που ενεργοποιούν τους μηχανισμούς άμυνας των φυτών, όπως επίσης και κάτω από ωσμωτικό στρες, οξειδωτικό στρες και ακραίες θερμοκρασίες. Χημικά, όπως ζιζανιοκτόνα και αντιφυτοτοξικές ενώσεις (safeners), μπορούν επίσης να ενεργοποιήσουν τα γονίδια (Dixon κ.ά., 2002; Edwards & Dixon, 2005). Ορισμένα γονίδια της κλάσης θήτα βρέθηκαν ότι παράγουν πρωτεΐνες μεταφορείς (ligandins) που δεσμεύουν αυξίνες και κυτοκινίνες (Gonneau κ.ά., 1998). Επιπροσθέτως, ταυ, φι και θήτα γονίδια έχουν δράση υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και προστατεύουν από την οξείδωση και την παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου, καθώς μειώνουν τις οργανικές υπεροξειδάσες των λιπιδίων και των νουκλεϊκών οξέων. Αυτό έχει αποδειχθεί πως βοηθάει στην άμυνα έναντι χαμηλών θερμοκρασιών και αλατότητας σε φυτά καπνού (Roxas κ.ά., 1997). Έχουν αναφερθεί λίγα γονίδια της κλάσης ζήτα, η κύρια δράση τους εντοπίζεται στο καταβολικό μονοπάτι τυροσίνης/φαινυλαλανίνης και πιο συγκεκριμένα στον μεταβολισμό της τυροσίνης (Thom κ.ά., 2001). Η κλάση λάμδα βρίσκεται και αυτή αποκλειστικά στα φυτά και βοηθάει στην επιβίωση των φυτών σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων, ειδικά της αλατότητας, αφού μειώνει την παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου (Chan & Lam, 2014). Οι GSTs της κλάσης DHAR ανάγουν το διϋδροασκορβικό σε ασκορβικό οξύ, και παράγεται δισουλφίδιο της GSH μέσα από την αντίδραση αυτή (Παναγιωτάρα Δήμητρα – Άννα, 2022). Το ασκορβικό οξύ έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες, καθώς παίζει σημαντικό ρόλο στην εξάλειψη ενεργών ριζών

οξυγόνου, στην μείωση του γηρασμού και στην ανάπλαση των φυτικών κυττάρων (Arrigoni & De Tullio, 2002).

Τα φυτικά GST γονίδια, επίσης χωρίζονται σε 3 τύπους ανάλογα με τον αριθμό των ιντρονίων, εξωνίων και ιδιοτήτων τους. Τα γονίδια του τύπου I έχουν 2 ιντρόνια και 3 εξώνια και προστατεύουν από παθογόνα, τραυματισμούς, γηρασμό και παράγονται ως απόκριση στις αυξίνες. Τα γονίδια του τύπου II έχουν 10 εξώνια και 9 ιντρόνια και σχετίζονται με την παραγωγή αιθυλενίου και την προστασία από τον γηρασμό. Τα γονίδια τύπου III έχουν 1 ιντρόνιο και 2 εξώνια. Παράγονται ως απόκριση στην αυξίνη, στο αιθυλένιο, στην μόλυνση από παθογόνα, στα βαρέα μέταλλα και την καταπόνηση από υψηλές θερμοκρασίες (Marrs, 1996).

## **1.4 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

### **1.4.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA**

Η απομόνωση βιομορίων, δηλαδή νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών, είναι μια από τις σημαντικότερες διαδικασίες που χρησιμοποιούνται στη μοριακή βιολογία και επιτρέπει περαιτέρω αναλύσεις των μορίων αυτών. Η απομόνωση RNA είναι ιδιαίτερα απαιτητική, διότι το RNA έχει μικρή διάρκεια ζωής αφότου εξαχθεί από τα κύτταρα ή τους ιστούς. Επίσης, δεν είναι τόσο σταθερό μόριο, σε αντίθεση με το DNA, κυρίως λόγω των ριβονουκλεασών (RNάσες), τα οποία είναι ένζυμα που υπάρχουν άπλετα στο περιβάλλον και στους ζωντανούς οργανισμούς (Tan & Yiar, 2009). Ο ρόλος τους είναι να αποικοδομούν μόρια RNA σε μικρότερα τμήματα, με το να σπάζουν τους δεσμούς ανάμεσα στα νουκλεοτίδια (Excedr, 2022). Για αυτό τον λόγο πρέπει να λαμβάνονται μέτρα κατά την απομόνωση, όπως η τήρηση των σωστών πρακτικών στο εργαστήριο και η καθαριότητά του, έτσι ώστε να μην κινδυνεύει από διάσπαση το δείγμα. Η απομόνωση RNA μπορεί να πραγματοποιηθεί με πρωτόκολλα με βάση τη λύση των ιστών ή με την χρήση στηλών απομόνωσης. Έχουν δημιουργηθεί κιτ απομόνωσης που βασίζονται σε αυτά τα πρωτόκολλα, τα οποία είναι εμπορικά διαθέσιμα και διευκολύνουν την όλη διαδικασία (Tan & Yiar, 2009).

#### 1.4.2 ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ

Για την ποσοτικοποίηση νουκλεϊκών οξέων, όπως του DNA και του RNA, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος της φασματοφωτομέτρησης. Μέσω αυτής, μπορεί να υπολογιστεί η συγκέντρωση της ουσίας μέσω του καθορισμού της υπεριώδους ακτινοβολίας που απορροφάτε από τις βάσεις (Morris, 2015). Η μέτρηση γίνεται σε ειδικά όργανα που ονομάζονται φασματοφωτόμετρα. Το δείγμα νουκλεϊκού οξέος που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι όσο πιο καθαρό γίνεται, γιατί οποιαδήποτε ξένη ουσία μπορεί να επηρεάσει την ακρίβεια των αποτελεσμάτων. Μετρούνται οι τιμές απορρόφησης στα 260 nm και στα 280 nm και υπολογίζεται ο λόγος  $A_{260}/A_{280}$ . Ιδανικές τιμές  $A_{260}/A_{280}$  που υποδεικνύουν την καθαρότητα του δείγματος είναι περίπου 1,8 για το DNA και 2,0 για το RNA. Τιμές κάτω από αυτές υποδεικνύουν την ύπαρξη πρωτεϊνών ή φαινολών στο δείγμα (Barbas κ.ά., 2007).

#### 1.4.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζη είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος διαχωρισμού δειγμάτων DNA, με βάση το μέγεθός τους. Μπορούν να διαχωριστούν δείγματα 100-10.000 ζευγών βάσεων με τον τρόπο αυτό. Η αгарόζη είναι πολυσακχαρίτης που προέρχεται από την επεξεργασία φυκιών. Σε θερμοκρασία 50-55°C είναι σε υγρή μορφή, αλλά καθώς κρύνει δημιουργεί ένα πήκτωμα, το οποίο έχει πόρους διαφόρων μεγεθών που επιτρέπουν την μετακίνηση του νουκλεϊκού οξέος διαμέσου αυτού (Lee κ.ά., 2012; Sonagra & Dholariya, 2023). Παρασκευάζεται πάνω σε ένα γυάλινο ή πλαστικό υπόστρωμα και τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης που έχει πληρωθεί με ρυθμιστικό διάλυμα. Το DNA τοποθετείται σε εσοχές (πηγάδια) που έχουν δημιουργηθεί στην μια άκρη του πηκτώματος. Στη συνέχεια, περνάει ηλεκτρικό ρεύμα και επειδή το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο, κινείται προς τον θετικά φορτισμένο πόλο. Ανάλογα με το μοριακό τους βάρος τα δείγματα θα διαχωριστούν, αφού είναι καθορισμένος ο λόγος μάζας/ ηλεκτρικού ρεύματος. Η απόσταση που θα διανύσουν τα δείγματα καθορίζεται επίσης από τον τύπο της αгарόζης, την συγκέντρωσή της, τα Volt του ρεύματος που εφαρμόζονται και το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται (Lee κ.ά., 2012). Το ρυθμιστικό διάλυμα που τοποθετείται μέσα στην συσκευή ηλεκτροφόρησης, βοηθά στην μετακίνηση του ηλεκτρικού ρεύματος, την διατήρηση του pH της πηκτής αгарόζης και παράγει θερμότητα που διευκολύνει στον διαχωρισμό του DNA (Sonagra & Dholariya, 2023).

Μετά τον διαχωρισμό, τα τμήματα του DNA μπορούν να παρατηρηθούν σε θάλαμο με UV φωτισμό, καθώς στα πηγαδάκια έχει προστεθεί χρωστική υψηλού φθορισμού (Lee κ.ά., 2012). Για να προσδιοριστεί το μέγεθος του DNA σε ζεύγη βάσεων συγκρίνεται η απόστασή που διένυσε με την απόσταση τμημάτων DNA γνωστού μοριακού βάρους, που χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες (ladder) (Tropp, 2013).

#### **1.4.4 ΣΥΝΘΕΣΗ cDNA ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ**

Η δημιουργία cDNA βιβλιοθηκών βοηθάει στην μελέτη της έκφρασης γονιδίων και την παραγωγή πρωτεϊνών από τα γονίδια αυτά (Kooiker & Xue, 2014). Για την σύνθεσή της χρησιμοποιούνται οποιοδήποτε από τα μόρια RNA ενός κυττάρου, κυρίως το mRNA, ή το μεταγράφομα του. Το RNA μετατρέπεται στο συμπληρωματικό cDNA με την βοήθεια του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης. Για να ξεκινήσουν την αντίστροφη μεταγραφή χρησιμοποιείται ένας ολίγο-(dT) εκκινητής, που συνδέεται με την πολυΑ ουρά του mRNA. Έτσι, δημιουργείται ένα υβρίδιο cDNA και mRNA, το οποίο υδρολύεται ή πέπτεται από RNάση, και απομένει το μονόκλωνο cDNA, το οποίο χρησιμεύει ως εκμαγείο για την παραγωγή δίκλωνου DNA. Η συμπληρωματική αλυσίδα του cDNA συντίθεται με την βοήθεια ενός ολίγο-(dG) εκκινητή και το ένζυμο DNA πολυμεράση (Tropp, 2013). Τέλος, μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης, η αλυσίδα DNA πολλαπλασιάζεται, εισάγεται σε έναν φορέα κλωνοποίησης, δηλαδή ένα πλασμίδιο, και μετά από μετασχηματισμό βακτηρίων δημιουργείται η βιβλιοθήκη (Belyavsky κ.ά., 1989).

#### **1.4.5 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)**

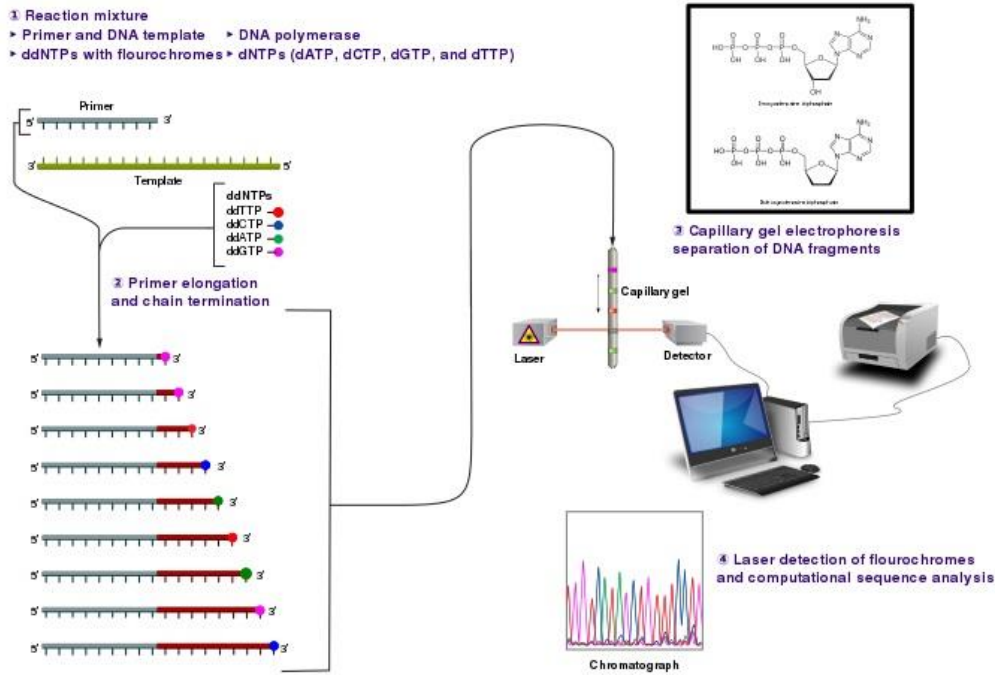
Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό ενός κομματιού DNA in vitro. Κατά την διάρκεια της αντίδρασης, το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται μέσω θέρμανσης. Η θερμοκρασία αποδιάταξης ( $T_m$ ) είναι η θερμοκρασία στην οποία το 50% των μορίων DNA είναι μονόκλωνα. Σε κάποιο συγκεκριμένο σημείο αυτών των μονόκλωνων αλυσίδων, προσδένεται ένας εκκινητής, που αποτελεί μια συμπληρωματική αλυσίδα λίγων νουκλεοτιδίων. Τα 3' άκρα των εκκινητών είναι προσανατολισμένα το ένα προς το άλλο, έτσι ώστε να πολλαπλασιαστεί η μεταξύ τους περιοχή. Οι εκκινητές σχεδιάζονται κατάλληλα, ανάλογα με το κομμάτι του DNA που είναι επιθυμητό να αντιγραφεί. Η επιμήκυνση

των εκκινητών επιτελείται με την βοήθεια της DNA πολυμεράσης. Οι εκκινητές υβριδίζονται με τα μόρια DNA σε μια συγκεκριμένη θερμοκρασία, την θερμοκρασία υβριδισμού ( $T_a$ ), που εξαρτάται από το μήκος και την περιεκτικότητα των εκκινητών σε C και G. Τα υπόλοιπα συστατικά που χρειάζονται για την πραγματοποίηση της αντίδρασης είναι τα dNTPs, δηλαδή οι βάσεις που χρειάζονται για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας του DNA, το ρυθμιστικό διάλυμα της PCR, το οποίο διατηρεί σταθερό το pH του μίγματος της αντίδρασης και τα ιόντα  $Mg^{+2}$ . Τα 3 αυτά στάδια, δηλαδή η αρχική αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, η υβριδοποίηση των εκκινητών με τις μονόκλωνες αλυσίδες DNA και η επιμήκυνση των δεσμευμένων εκκινητών, συνιστούν ένα κύκλο, ο οποίος επαναλαμβάνεται 30-40 φορές. Έτσι, η αρχική αλυσίδα πολλαπλασιάζεται εκθετικά. Τέλος, γίνεται επώαση για 10 λεπτά στους  $72^{\circ}C$  για να ολοκληρωθεί η σύνθεση όλων των τυχόν ημιτελών αλυσίδων (Μαδέσης Π., 2020). Η PCR πραγματοποιείται σε συσκευές που ονομάζονται θερμοκυκλοποιητές, οι οποίοι προγραμματίζονται και αλλάζουν αυτόματα την θερμοκρασία ανάλογα το στάδιο της αντίδρασης (Tropp, 2013).

#### **1.4.6 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ SANGER**

Η αλληλούχιση Sanger είναι μια μέθοδος προσδιορισμού αλληλουχιών, η οποία περιλαμβάνει την ενίσχυση ενός τμήματος νουκλεϊκού οξέος με φθορίζοντα δεσοξυριβονουκλεοτίδια και ανάλυση μέσω ηλεκτροφόρησης σε τριχοειδές πήκτωμα (Crossley κ.ά., 2020). Το δείγμα φορτώνεται στο πήκτωμα αυτοματοποιημένα σε αυτόν τον τύπο ηλεκτροφόρησης, για αυτό είναι δυνατή η παραλαβή ποσοτικών αποτελεσμάτων (Tropp, 2013). Στη συνέχεια, μέσω της ανίχνευσης και της επισήμανσης του υπεριώδους φθορισμού των νουκλεοτιδίων, ποσοτικοποιούνται τα αποτελέσματα και μπορεί να αναλυθεί η αλληλουχία. Η μέθοδος Sanger είναι γρήγορη και οικονομική για δείγματα με μικρό αριθμό ζευγών βάσεων (<800-1000 ζεύγη βάσεων) και για μεμονωμένα γονίδια (Shendure & Ji, 2008).





Εικόνα 3: Αλληλούχιση γονιδίου μέσω της μεθόδου Sanger (Estevezj, 2012).

Τα αποτελέσματα που παραλαμβάνονται από την αλληλούχιση Sanger βρίσκονται σε μορφή FASTA και σε μορφή χρωματογράμματος. Τα χρωματογράμματα έχουν την μορφή γραφήματος και περιέχουν κορυφές που αντιστοιχούν στις βάσεις της αλληλουχίας που αναλύεται. Οι περισσότερες αλληλουχίες έχουν περιοχές που δεν μπορούν να ταυτοποιηθούν, ειδικά στις περιοχές πρόσδεσης των εκκινητών. Αυτές πρέπει να αφαιρούνται για την καλύτερη ανάλυση. Επίσης, μπορεί να εμφανίζονται επικαλυπτόμενες κορυφές και να υπάρχουν άλλα γράμματα εκτός από τα A,T,C,G. Αυτό σημαίνει ότι δεν μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια το νουκλεοτίδιο και θα πρέπει να ερμηνευτεί και να αλλαχθεί χειροκίνητα στο χρωματόγραμμα.

| Nucleic Acid Code | Meaning                                |
|-------------------|--|
| A                 | Adenosine                              |
| C                 | Cytidine                               |
| G                 | Guanine                                |
| T                 | Thymidine                              |
| U                 | Uracil                                 |
| R                 | G A (puRine)                           |
| Y                 | T C (pYrimidine)                       |
| K                 | G T (Ketone)                           |
| M                 | A C (aMino group)                      |
| S                 | G C (Strong interaction)               |
| W                 | A T (Weak interaction)                 |
| B                 | G T C (not A) (B comes after A)        |
| D                 | G A T (not C) (D comes after C)        |
| H                 | A C T (not G) (H comes after G)        |
| V                 | G C A (not T, not U) (V comes after U) |
| N                 | A G C T (aNy)                          |
| -                 | gap of indeterminate length            |

| Amino Acid Code | Meaning                     |
|-----------------|-----------------------------|
| A               | Alanine                     |
| B               | Aspartic acid or Asparagine |
| C               | Cysteine                    |
| D               | Aspartate                   |
| E               | Glutamate                   |
| F               | Phenylalanine               |
| G               | Glycine                     |
| H               | Histidine                   |
| I               | Isoleucine                  |
| K               | Lysine                      |
| L               | Leucine                     |
| M               | Methionine                  |
| N               | Asparagine                  |
| P               | Proline                     |
| Q               | Glutamine                   |
| R               | Arginine                    |
| S               | Serine                      |
| T               | Threonine                   |
| U               | Selenocysteine              |
| V               | Valine                      |
| W               | Tryptophan                  |
| Y               | Tyrosine                    |
| Z               | Glutamate or Glutamine      |
| X               | any                         |
| *               | translation stop            |
| -               | gap of indeterminate length |

Εικόνα 4: Σημασία γραμμάτων και συμβόλων που εμφανίζονται στις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες *fasta*, στα χρωματογράμματα και στις αλληλουχίες αμινοξέων (Χαρίτου Θ., 2023).

Μετά τον ποιοτικό έλεγχο και τις αλλαγές στις 2 αλυσίδες του τμήματος DNA που αναλύεται, συναρμολογείτε μια αλληλουχία από την εμπρόσθια και την ανάστροφη αλυσίδα. Η συναρμολόγηση μιας ακολουθίας είναι η διάταξη 2 ή περισσότερων αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων με σκοπό την δημιουργία ενός ολοκληρωμένου τμήματος (contig) χρησιμοποιώντας τις επικαλυπτόμενες περιοχές τους (Crossley κ.ά., 2020).

## 1.5 ΟΜΟΛΟΓΙΑ ΑΚΟΛΟΥΘΙΩΝ

Η ομολογία 2 αλληλουχιών (νουκλεοτιδικών ή πρωτεϊνικών) αποτελεί ένδειξη της κοινής εξέλιξης και λειτουργίας των αλληλουχιών αυτών. Ο υψηλός βαθμός ομοιότητας υποδηλώνει την παρόμοια λειτουργία, ενώ ο χαμηλός δείχνει πως οι αλληλουχίες έχουν διαφορετικές λειτουργίες. Για να βρεθεί η ομολογία, μια αλληλουχία εισάγεται σε μια βάση δεδομένων, που περιέχει γονίδια ή ολόκληρα γονιδιώματα πολλών οργανισμών και συγκρίνεται με αυτά. Η ομολογία υπολογίζεται

από αλγόριθμους (FASTA, BLAST) που στοιχίζουν βέλτιστα τις ακολουθίες, βαθμονομούν την στοίχιση και υπολογίζουν τη στατιστική της σημαντικότητα σε μικρό χρονικό διάστημα (Μπάγκος, 2015). Δυο αλληλουχίες θεωρούνται ομόλογες όταν πάνω από το 30% του μήκους τους είναι ίδιο. Για πιο έγκυρα αποτελέσματα θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν το bit-score και η τιμή E της στοίχισης. (Pearson, 2013). Το bit-score δηλώνει την ποιότητα της στοίχισης, όσο μεγαλύτερο είναι τόσο καλύτερη. Η τιμή E υποδηλώνει την πιθανότητα το αποτέλεσμα της στοίχισης να είναι τυχαίο, άρα για μια καλή στοίχιση 2 αλληλουχιών, η τιμή E πρέπει να είναι χαμηλή, με ανώτατο όριο 0,01-0,05, δηλαδή να υπάρχει 1%-5% τυχαιότητα (Μπάγκος, 2015).

## 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 ΥΛΙΚΑ

- Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit (5 µg) (NEW ENGLAND BioLabs® Inc)
- Monarch® DNA Gel Extraction Kit (NEW ENGLAND BioLabs® Inc)
- Monarch® Total RNA Miniprep Kit (NEW ENGLAND BioLabs® Inc)
- ProtoScript® II Reverse Transcriptase (NEW ENGLAND BioLabs® Inc)
- Taq DNA Polymerase με Standard Taq Buffer (NEW ENGLAND BioLabs® Inc)
- MIDORI Green Direct (NIPPON Genetics EUROPE)
- Ρυθμιστικό διάλυμα TRIS acetate-EDTA (TAE 1x)
- FastGene® DNA ladder (NIPPON Genetics EUROPE)
- Πιστοποιημένοι σπόροι καπνού *Nicotiana tabacum L.* της ποικιλίας ΜΠΑΣΜΑΣ ΞΑΝΘΗΣ 81 (ΒΞ81)

### 2.2 ΟΡΓΑΝΑ

- Φασματοφωτόμετρο
- Φυγόκεντρος
- Vortex
- Θερμαντικό σώμα Dry bath
- Θερμοκυκλοποιητής
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Θάλαμος με φως led

## 2.3 ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.3.1 ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Η πειραματική διαδικασία ξεκίνησε με την σπορά πιστοποιημένων σπόρων καπνού *Nicotiana tabacum L.* της ποικιλίας ΜΠΑΣΜΑΣ ΞΑΝΘΗΣ 81 (ΒΞ81). Η σπορά έγινε στις 5 Αυγούστου, σε πλαστικά δοχεία με τρύπες στο κάτω μέρος τους έτσι ώστε να απομακρύνεται το περίσσιο νερό. Τα φυτά αναπτύχθηκαν για 2 περίπου μήνες, μέχρι τις 29 Σεπτεμβρίου, ενώ βρίσκονταν σε ελεγχόμενο περιβάλλον με θερμοκρασία 25-28°C και ποτιζόντουσαν κάθε 5 μέρες.



Εικόνα 5: Ανάπτυξη των φυτών καπνού στις 16/8, στις 27/8 και στις 18/9.

### 2.3.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA

Η απομόνωση RNA έγινε σε δύο δείγματα φύλλων καπνού (KP1, KP2) με το Monarch Total RNA Miniprep Kit.

#### A. Ομογενοποίηση με μικρολειοτρίβηση

Αρχικά, ζυγίστηκαν 100 mg φύλλων καπνού σε ζυγό ακριβείας. Επίσης ετοιμάστηκε 1X προστατευτικού αντιδραστηρίου (Protection Reagent) 800 mL εκείνη την ώρα καθώς ήταν έτοιμο μείγμα (stock) 2X άρα χρειαζόταν να γίνει αραιώση.

$$C1 * V1 = C2 * V2 \Rightarrow 2X * V1 = 1X * 800 \mu\text{L} \Rightarrow V1 = 400 \text{ mL}.$$

Τα 400 mL του προστατευτικού αντιδραστηρίου (Protection Reagent) τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένο σωληνάριο eppendorf 1.5 mL με μια πιπέτα ακριβείας και μετά στο σωληνάριο αυτό προστέθηκαν 400 mL αποστειρωμένο και απιονισμένο νερό έγχυσης (injection water) . Σε 2 mL σωληνάριο eppendorf

τοποθετήθηκαν το δείγμα φύλλων και 400mL προστατευτικού αντιδραστηρίου 1X και έγινε μικρολειοτρίβηση (μέχρι να γίνει σαν ζελέ). Στην συνέχεια προστέθηκαν και τα υπόλοιπα 400μL του προστατευτικού αντιδραστηρίου 1X. Επακολούθως, έγινε φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 2 λεπτά στις 16.000xg στροφές. Το ίζημα απορρίφθηκε και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο eppendorf σωληνάριο. Τέλος, προστέθηκε ίσος όγκος του ρυθμιστικού διαλύματος λύσης του RNA (RNA Lysis Buffer) και μετά αναμείχθηκε για σύντομο χρονικό διάστημα σε αναδευτήριο vortex.

## B. Πρόσδεση RNA και πλύσεις

Αρχικά έγινε μεταφορά μέχρι 800 mL δείγματος σε G DNA στήλη απομάκρυνσης (γαλάζια), ενωμένη σε σωληνάριο συλλογής, αφού έχει γίνει τιτλοφόρηση σε αυτά. Στην συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 16.000xg στροφές για 30 δευτερόλεπτα, απομακρύνθηκε η στήλη και κρατήθηκε το διήθημα. Προστέθηκε ίσος όγκος με το διήθημα αιθανόλη  $\geq 95\%$  και έγινε ανάμειξη με την βοήθεια μιας πιπέτας ακριβείας. Το δείγμα μεταφέρθηκε σε στήλη καθαρισμού του RNA (RNA purification column) (σκούρο μπλε) μαζί με το σωληνάριο συλλογής στο οποίο βρισκόταν. Ύστερα, έγινε φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα στις 16.000xg στροφές. Το διήθημα απορρίφθηκε και το RNA είχε πλέον προσκολληθεί πάνω στη στήλη. Για περαιτέρω καθαρισμό από την στήλη G DNA έγινε προσθήκη 500 μL ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης του RNA (RNA Wash Buffer) και φυγοκεντρήθηκε για 30 δευτερόλεπτα. Απορρίφθηκε το διήθημα. Σε eppendorf σωληνάριο 1,5 mL έγινε ανάμειξη 5mL Dnase I με 75 mL ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης της Dnase I (Dnase I Reaction Buffer) και μεταφέρθηκε με πιπέτα κατευθείαν πάνω στην στήλη. Στην συνέχεια, έγινε επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά τα 15 λεπτά, προστέθηκαν 500μl ρυθμιστικού διαλύματος δέσμευσης RNA (RNA Priming Buffer), αφού έχει τοποθετηθεί σωληνάριο συλλογής και έγινε φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα. Απορρίφθηκε το διήθημα. Η διαδικασία επαναλήφθηκε με την προσθήκη 500 μL ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης του RNA (RNA Wash Buffer), φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα και απόρριψη του διηθήματος. Κατόπιν προστέθηκαν 500μL ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης του RNA (RNA Wash Buffer) και έγινε φυγοκέντρηση για 2 λεπτά. Η στήλη μεταφέρθηκε σε νέο eppendorf σωληνάριο. Τέλος προστέθηκαν 100 μL νερού απαλλαγμένου από νουκλεάσες στο κέντρο της στήλης και έγινε φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα. Για την φασματοφωτομετρική ανάλυση χρειάστηκε να ξαναγίνει φυγοκέντρηση και να

παραληφθεί με την πιπέτα διάλυμα από την κορυφή του διαλύματος για να μην διαταραχθεί ο λόγος  $A_{260}/A_{280}$  λόγω έκλυσης των μορίων πυριτίου. Τα δυο δείγματα RNA αποθηκεύτηκαν στους  $-70^{\circ}\text{C}$ .



Εικόνα 6: Η φυγόκεντρος που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια του πειράματος.

### 2.3.3 ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ

Για να καθοριστεί η ποσότητα και η καθαρότητα του RNA των δύο δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομετρική ανάλυση. Σε αποστειρωμένα erpendorf σωληνάρια προστέθηκαν με πιπέτα 495  $\mu\text{L}$  νερό έγχυσης και 5  $\mu\text{L}$  δείγματος. Για την ανάμειξη των δειγμάτων έγινε ανάδευση σε vortex για μερικά δευτερόλεπτα. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν από τα erpendorf σωληνάρια σε αποστειρωμένες κυψελίδες πλάτους 1 cm ειδικά κατασκευασμένες για UV ακτινοβολία. Για την βαθμονόμηση του οργάνου χρησιμοποιήθηκε δείγμα μάρτυρας που περιείχε 500  $\mu\text{L}$  νερού έγχυσης, το οποίο τοποθετήθηκε σε όμοια κυψελίδα. Οι μετρήσεις που λήφθηκαν ήταν οι τιμές της απορρόφησης στο μήκος κύματος  $\lambda=260$  nm, η οποία αντιστοιχεί στην απορρόφηση των νουκλεϊκών οξέων και στα 280 nm, που αντιστοιχεί στην απορρόφηση των πρωτεϊνών. Επίσης, σημειώθηκε ο λόγος  $A_{260}/A_{280}$ , ο οποίος υποδηλώνει την καθαρότητα του δείγματος, με ιδανικές τιμές  $A_{260}/A_{280}$  να είναι ίσες με 1,8-2. Τα 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  διαλύματος RNA έχουν απορρόφηση ίση με 1 για  $A_{260}$ . Έτσι, υπολογίστηκε η τιμή της συγκέντρωσης των δειγμάτων σύμφωνα με τον τύπο  $C(\text{ng}/\mu\text{L})=A_{260} \cdot 40 \cdot 100$ , όπου 100 ο παράγοντας αραίωσης (Andris-Widhopf κ.ά., 2011; Barbas κ.ά., 2007).

Αρχικά, έγινε μέτρηση του μάρτυρα, αφού έγινε η ρύθμιση του φασματοφωτομέτρου για το δείγμα μάρτυρα, και έδωσε τιμή απορρόφησης στα 260 nm και στα 280 nm ίση με 0, όπως ήταν και η τιμή της συγκέντρωσής του. Στη συνέχεια, οι ρυθμίσεις του οργάνου τροποποιήθηκαν για την μέτρηση των δειγμάτων. Λήφθηκαν τιμές για την απορρόφηση στα 260 nm και στα 280 nm, ο λόγος  $A_{260}/A_{280}$ , καθώς επίσης υπολογίστηκαν και οι τιμές των συγκεντρώσεων των δειγμάτων, όπως φαίνεται στον πίνακα παρακάτω:

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗΣ

Πίνακας 1: Οι τιμές απορρόφησης του μάρτυρα και των δειγμάτων KP1 και KP2, σε μήκος κύματος 260 nm και 280 nm, ο λόγος  $A_{280}/A_{260}$ , καθώς και η τιμή της συγκέντρωσής τους.

|       | $A_{260}$ | $A_{280}$ | $A_{260}/A_{280}$ | C(ng/μl) |
|-------|-----------|-----------|-------------------|----------|
| BLANK | 0         | 0         | -                 | 0        |
| KP1   | 0         | 0,01      | 0                 | 0        |
| KP2   | 0,047     | 0,034     | 1,41              | 188      |

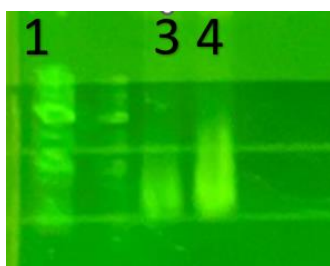
Όπως φαίνεται και στον πίνακα, το δείγμα KP1 δεν είχε καθόλου απορρόφηση στα 2 μήκη κύματος, οπότε απορρέει ως συμπέρασμα πως δεν είχε απομονωθεί νουκλεϊκό οξύ. Στο δείγμα KP2 ο λόγος  $A_{260}/A_{280}$  είναι ίσος με 1,41, ο οποίος είναι μικρότερος από τον ιδανικό (1,8-2), που σημαίνει πως το δείγμα δεν περιείχε μόνο το νουκλεϊκό οξύ, αλλά και κάποιες φαινόλες ή πρωτεΐνες. Παρόλα αυτά χρησιμοποιήθηκε για τις περαιτέρω αναλύσεις καθώς κρίθηκε κατάλληλο.



Εικόνα 7: Το φασματοφωτόμετρο που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια του πειράματος.

### 2.3.4 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Για να πραγματοποιηθεί η ηλεκτροφόρηση, ετοιμάστηκε πηκτή αγαρόζη 20 mL. Προστέθηκαν 0,2 g αγαρόζης μέσα σε μια κωνική φιάλη και έγινε πλήρωση της φιάλης με ρυθμιστικό διάλυμα buffer TAE. Το διάλυμα θερμάνθηκε για την διάλυση της αγαρόζης σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι λίγο πριν το σημείο βρασμού. Στην συνέχεια μεταφέρθηκε σε καλούπι (cast) και τοποθετήθηκαν τα χτενάκια για να δημιουργηθούν οι εσοχές-πηγαδάκια. Μετά από 45 λεπτά, αφού έχει κρυώσει και σταθεροποιηθεί το πήκτωμα, απομακρύνθηκαν τα χτενάκια και τοποθετήθηκε στην συσκευή ηλεκτροφόρησης. Πάνω σε ένα κομμάτι parafilm έγινε ανάμειξη με την βοήθεια πιπέτας 5  $\mu$ L του μάρτυρα FastGene 1Kb DNA Ladder και 1  $\mu$ L της χρωστικής MIDORI Green Direct, 5  $\mu$ L του KP1 και 1  $\mu$ L της χρωστικής και 5  $\mu$ L του KP2 και 1  $\mu$ L της χρωστικής. Στη συνέχεια, έγινε πλήρωση των πηγαδιών, στην 1η θέση μπήκε ο μάρτυρας γνωστού μεγέθους (ladder), η 2η έμεινε κενή, στην 3η μπήκε το KP1 και στην 4η το KP2. Επίσης, προστέθηκε TAE στην συσκευή ηλεκτροφόρησης έτσι ώστε να καλύπτεται το πήκτωμα αγαρόζης. Η συσκευή συνδέθηκε στο ρεύμα στα 120V, και λειτούργησε για 20 λεπτά. Έπειτα, παρατηρήθηκαν οι ζώνες, με τον ειδικό φακό σε φως led, οι οποίες είχαν φτάσει περίπου στο μέσω του μάρτυρα (ladder), το KP2 είχε μεγαλύτερη ζώνη άρα είχε απομονωθεί πιο πολύ RNA. Μέσω αυτής της διαδικασίας επιβεβαιώθηκαν τα αποτελέσματα της φασματοφωτομέτρησης, επομένως, οι επόμενες αναλύσεις έγιναν με το προϊόν που είχε απομονωθεί στο δείγμα KP2.



Εικόνα 8: Παρατήρηση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης του μάρτυρα (ladder)-1η θέση, KP1-3η θέση και KP2-4η θέση σε UV φως

### 2.3.5 ΣΥΝΘΕΣΗ cDNA ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ

Για την σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου cDNA χρησιμοποιήθηκαν 5  $\mu$ L RNA από το δείγμα KP2, 2  $\mu$ L του εκκινητή Race-RT (50  $\mu$ M), 1 $\mu$ L dNTPs (10



μM) και 2 μL νερού απαλλαγμένου από νουκλεάσες καθώς έπρεπε να φτάσει ο όγκος του μείγματος τα 10 μL.

Η αλληλουχία του Race-RT: GGGCAACTTCTTCTCACTCGGGTTTTTTTTTTTTTTT.

Τα αντιδραστήρια αυτά τοποθετήθηκαν σε erpendorf tube 1.5 mL για να γίνει η ανάμειξή τους, με πρώτο να προστίθεται το νερό απαλλαγμένο από νουκλεάσες και τελευταίο το RNA. Στην συνέχεια έγινε επώαση του του μείγματος στους 65°C για 5 λεπτά στο θερμομαντικό σώμα Dry bath, έτσι ώστε να αποδιαταχθεί το RNA. Μέχρι να ετοιμαστούν τα επόμενα αντιδραστήρια, το μείγμα τοποθετήθηκε σε πάγο. Στο ίδιο erpendorf σωληνάριο προστέθηκαν 4 μL ρυθμιστικού διαλύματος ProtoScript II (5X), 2 μL DTT για να σταθεροποιηθούν τα ένζυμα, 1 μL της αντίστροφης μεταγραφάσης ProtoScript II RT (200 μονάδες) και 3 μL νερού απαλλαγμένου από νουκλεάσες, έτσι ώστε ο τελικός όγκος όλου του μείγματος να είναι 20 μL. Έπειτα, έγινε επώαση του μείγματος για 1 ώρα στους 42 °C για να δραστηριοποιηθεί το ένζυμο. Τέλος, για την απενεργοποίηση των ενζύμων τοποθετήθηκε στους 65°C για 20 λεπτά. Η διατήρηση του μείγματος έγινε σε καταψύκτη στους -20°C.

### 2.3.6 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ-PCR

Για την πραγματοποίηση της 1<sup>ης</sup> PCR αντίδρασης χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές F GST tobacco, ο οποίος είναι εμπρόσθιος και ο ανάστροφος Race-amp. Ο F GST tobacco βρισκόταν σε μορφή σκόνης οπότε έγινε διάλυσή του με νερό έγχυσης. Η συγκέντρωση του F GST tobacco ήταν 39.7 nmol, οπότε διαλύθηκε σε  $39,7 \cdot 10 = 397$  μL νερό για να παραχθεί μείγμα 100 μM εκκινητή, το οποίο θα αποτελέσει το έτοιμο μείγμα (stock). Για να δημιουργηθεί το διάλυμα εργασίας έγινε αραιώση 1/10, οπότε προστέθηκαν σε erpendorf σωληνάριο 1,5 mL, 5 μL του εκκινητή από το έτοιμο μείγμα και 45 μL νερό έγχυσης.

Πριν την ετοιμασία του μείγματος της PCR, ρυθμίστηκε ο θερμοκυκλοποιητής με τις κατάλληλες συνθήκες.

Πίνακας 2: Το πρόγραμμα του θερμοκυκλοποιητή-Set up PCR

|   |     |      |        |
|---|-----|------|--------|
| Αρχική αποδιάταξη αλυσίδας                  |     | 95°C | 5 min  |
| Αποδιάταξη αλυσίδας                         |     | 95°C | 20 sec |
| Θερμοκρασία<br>Υβριδισμού-Σύνδεση εκκινητών | 35x | 52°C | 20 sec |
| Επιμήκυνση αλυσίδας                         |     | 72°C | 60 sec |
| Τελική επώαση                               |     | 72°C | 5 min  |
| Παραμονή προϊόντος                          |     | 4°C  | ∞      |

Η θερμοκρασία  $T_m$  υπολογίστηκε από πρόγραμμα ανάλογα με τις βάσεις των εκκινητών (δηλαδή ανάλογα από πόσες A,T ή G,C αποτελούνται). Χρησιμοποιήθηκε η σελίδα [Biotoools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html](http://Biotoools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html).

Οι αλληλουχίες των εκκινητών είναι:

Race-amp: GGGCAACTTCTTCTCACTCGGG

F GST tobacco: CAATTCTGAAATTTCTTATTCTTCTTCTCGCTTG

Τα  $T_m$  που προέκυψαν από το πρόγραμμα ήταν:

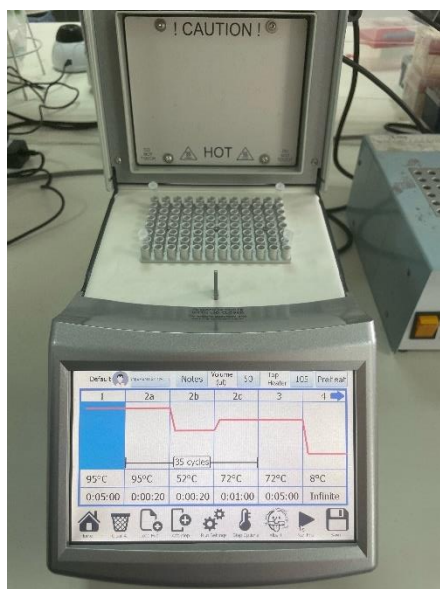
$T_{mF} = 61^\circ\text{C}$  (Nearest neighbor)

$T_{m\text{Race amp}} = 57^\circ\text{C}$  (Nearest neighbor)

Για την διαδικασία της PCR αφαιρέθηκαν  $5^\circ\text{C}$  από τις 2 θερμοκρασίες, οπότε η  $T_{mF} = 56^\circ\text{C}$  και  $T_{m\text{Race amp}} = 52^\circ\text{C}$ . Από αυτές τις 2 θερμοκρασίες επιλέχθηκε η χαμηλότερη για να χρησιμοποιηθεί στον θερμοκυκλοποιητή, δηλαδή οι  $52^\circ\text{C}$ .

Στην συνέχεια ετοιμάστηκε το μείγμα της PCR. Σε PCR σωληνάριο τοποθετήθηκαν 4  $\mu\text{L}$  cDNA, 5  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικό διάλυμα 1X, 1.5  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  (1.5 mM), 1  $\mu\text{L}$  dNTPs (0,2 mM), 2.5  $\mu\text{L}$  εκκινητή F GST tobacco (0.5  $\mu\text{M}$ ), 2,5  $\mu\text{L}$  εκκινητή Race

amp (0.5  $\mu$ M), 1  $\mu$ L Taq απλή (5 μονάδες) και 32,5  $\mu$ L απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό έγχυσης. Το νερό τοποθετήθηκε πρώτο στο PCR σωληνάριο, ενώ το προϊόν της προηγούμενης PCR τελευταίο. Όλα τα αντιδραστήρια ήταν αποθηκευμένα σε κουτί με πάγο κατά την διάρκεια της διαδικασίας. Ο τελικός όγκος του μείγματος είναι 50  $\mu$ L. Το μείγμα τοποθετήθηκε στον ρυθμισμένο θερμοκυκλοποιητή και όταν τελείωσε η διαδικασία αποθηκεύτηκε στους -20 °C.



Εικόνα 9: Ο θερμοκυκλοποιητής ρυθμισμένος με ένα πρόγραμμα PCR

Για την επόμενη PCR χρησιμοποιήθηκαν ο εμπρόσθιος εκκινητής F<sub>2</sub> GST tobacco και ο ανάστροφος R-GST. Ο F<sub>2</sub> GST tobacco βρισκόταν σε μορφή σκόνης, οπότε για να χρησιμοποιηθεί χρειάστηκε να φυγοκεντρηθεί και να γίνει διάλυση σε νερό. Το μοριακό του βάρος ήταν 39,0 nmol και προστέθηκαν 390  $\mu$ L νερό έγχυσης για να δημιουργηθεί το έτοιμο (stock) διάλυμα (100  $\mu$ M) του εκκινητή. Σε αυτό έγινε αραιώση 1/10 για την δημιουργία του διαλύματος εργασίας, άρα χρησιμοποιήθηκαν 5  $\mu$ L από το έτοιμο μείγμα (stock) και 45  $\mu$ L νερό έγχυσης, τα οποία τοποθετήθηκαν σε eppendorf σωληνάριο 1.5 mL. Η διαδικασία επαναλήφθηκε και για τον εκκινητή R-GST. Το μοριακό του βάρος ήταν 43,9 nmol οπότε χρησιμοποιήθηκαν 432  $\mu$ L αποστειρωμένο και απιονισμένο νερό για την παρασκευή του έτοιμου μείγματος (100  $\mu$ M). Στην συνέχεια, έγινε αραιώση για να δημιουργηθεί το διάλυμα εργασίας.

Η θερμοκρασία T<sub>m</sub> για τον θερμοκυκλοποιητή βρέθηκε από τις αλληλουχίες των εκκινητών.

F2 GST tobacco: CTTCTCGCTTGCCTTTTCATAACAATGGCGAACG

Τα  $T_m$  που προέκυψαν από το πρόγραμμα ήταν:

R-GST: GTTTACTCAAGTCCAAACTTTTGCCTAAGCACTTT

$T_{mF_2 \text{ GST tobacco}}$  (Nearest neighbor) =66°C

$T_{mR-GST}$  (Nearest neighbor) =63°C

Για την διαδικασία της PCR αφαιρέθηκαν 5°C από τις 2 θερμοκρασίες, οπότε η  $T_{mF_2 \text{ GST tobacco}}$  = 61 °C. και  $T_{mR-GST}$  = 58 °C. Από αυτές τις 2 θερμοκρασίες επιλέχθηκε η χαμηλότερη για να χρησιμοποιηθεί στον θερμοκυκλοποιητή, δηλαδή οι 58 °C.

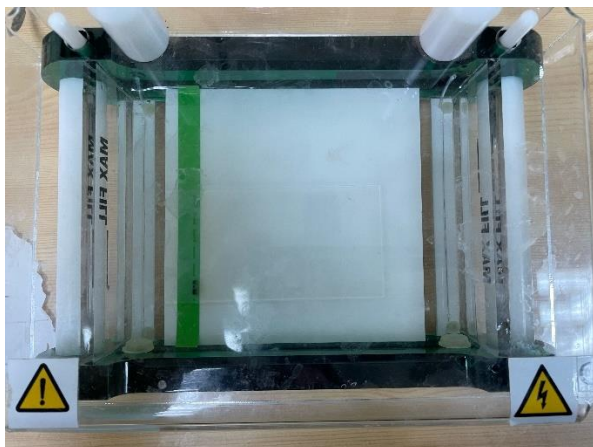
Πίνακας 3: Το πρόγραμμα του θερμοκυκλοποιητή-Set up PCR

|   |     |       |        |
|---|-----|-------|--------|
| Αρχική αποδιάταξη αλυσίδας                  |     | 95 °C | 5 min  |
| Αποδιάταξη αλυσίδας                         | 35x | 95 °C | 20 sec |
| Θερμοκρασία<br>Υβριδισμού-Σύνδεση εκκινητών |     | 58 °C | 20 sec |
| Επιμήκυνση αλυσίδας                         |     | 72 °C | 60 sec |
| Τελική επώαση                               |     | 72 °C | 5 min  |
| Παραμονή προϊόντος                          |     | 4 °C  | ∞      |

Μετά την ρύθμιση του οργάνου, ετοιμάστηκε το μείγμα της PCR. Σε PCR σωληνάριο τοποθετήθηκαν 4  $\mu\text{L}$  DNA προϊόν από την προηγούμενη PCR, 5  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικό διάλυμα 1X, 1.5  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  (1.5 mM), 1 $\mu\text{L}$  dNTPs (0,2 mM), 2.5 $\mu\text{L}$  εκκινητή  $F_2 \text{ GST tobacco}$  (0.5  $\mu\text{M}$ ), 2,5  $\mu\text{L}$  εκκινητή R-GST (0.5  $\mu\text{M}$ ), 1  $\mu\text{L}$  Taq απλή (5 μονάδες) και 32,5  $\mu\text{L}$  νερό έγχυσης. Το νερό τοποθετήθηκε πρώτο στο σωληνάριο PCR, ενώ το προϊόν της προηγούμενης PCR τελευταίο. Όλα τα αντιδραστήρια ήταν αποθηκευμένα σε κουτί με πάγο κατά την διάρκεια της διαδικασίας. Ο τελικός όγκος

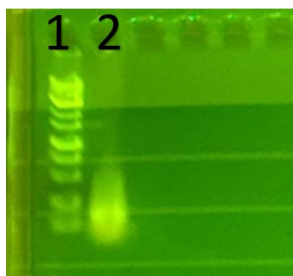
του μείγματος ήταν 50  $\mu\text{L}$ . Το μείγμα τοποθετήθηκε στον ρυθμισμένο θερμοκυκλοποιητή και όταν τελείωσε η διαδικασία αποθηκεύτηκε στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Στην συνέχεια, έγινε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζη 20 mL.



Εικόνα 10: Η συσκευή ηλεκτροφόρησης με πήκτωμα αγαρόζης στο εσωτερικό της.

Χρησιμοποιήθηκαν τα χτενάκια μικρού μεγέθους, στην πρώτη θέση τοποθετήθηκε ο μάρτυρας (ladder) (5  $\mu\text{L}$ ) με την χρωστική (1  $\mu\text{L}$ ) και στην δεύτερη το PCR προϊόν από την τελευταία PCR (5  $\mu\text{L}$ ) μαζί με χρωστική (1  $\mu\text{L}$ ).



Εικόνα 11: Παρατήρηση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης του μάρτυρα (ladder)-1η θέση και του DNA προϊόντος με τους εκκινητές F2 GST tobacco R-GST-2η θέση σε UV φως.

Στο προϊόν της PCR με τους εκκινητές F<sub>2</sub> GST tobacco και R-GST έγινε καθαρισμός από πρωτεΐνες και τυχόν άλλα ένζυμα με το Monarch PCR and DNA Clean-up kit. Πριν ξεκινήσει η χρήση του κιτ προστέθηκαν 14 mL ισοπροπανόλης στο ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης του DNA (DNA Clean-up Binding Buffer) και 4X όγκος αιθανόλης (>95%) σε 1X όγκο ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης του DNA (DNA Wash Buffer). Επίσης, όλες οι φυγοκεντρήσεις έγιναν στις 16.000xg (13.000 RPM).

Αρχικά, έγινε διάλυση του δείγματος με DNA ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης του DNA (Clean-up Binding Buffer). Αναμείχθηκε με την βοήθεια πιπέτας και με ελαφρύ κτύπημα (όχι με αναδευτήρα vortex). Η αραιώση είναι 5 (ρυθμιστικό διάλυμα):1 (δείγμα) καθώς το δείγμα είναι dsDNA < 2 kb. Το δείγμα είναι 45  $\mu$ L, άρα μπαίνουν 225  $\mu$ L:45  $\mu$ L. Η στήλη εισήχθη σε σωληνάριο συλλογής και μεταφέρθηκε το αραιωμένο δείγμα στη στήλη. Έγινε φυγοκέντρηση για 1 λεπτό και απορρίφθηκε το διήθημα. Επανεισήχθη η στήλη στο σωληνάριο συλλογής, προστέθηκαν 200  $\mu$ L ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης του DNA (DNA Wash Buffer) και έγινε φυγοκέντρηση για 1 λεπτό (η απόρριψη του διηθήματος δεν ήταν υποχρεωτική αλλά έγινε). Ύστερα, επαναλήφθηκε η πλύση του δείγματος με το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης του DNA (DNA Wash Buffer) και η φυγοκέντρηση. Η στήλη μεταφέρθηκε σε ένα καθαρό eppendorf σωληνάριο των 1,5 mL με προσοχή να μην ακουμπήσει η μύτη της στήλης στο διήθημα. Τέλος, προστέθηκαν 10  $\mu$ L ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης του DNA (DNA Elution Buffer) στο κέντρο της στήλης, επώαστηκε για 1 λεπτό και μετά φυγόκεντρήθηκε για 1 λεπτό για να γίνει έκλυση του DNA. Η στήλη απορρίφθηκε.

Στην επόμενη PCR χρησιμοποιήθηκε το καθαρό DNA προϊόν από το Clean-up kit. Οι εκκινητές που επιλέχθηκαν ήταν εμπρόσθιος ο F<sub>3</sub> GST tobacco με αλληλουχία ATGGCGAACCGAAAGGAGGTGATTCTGTTGGATTTTC και ανάστροφος ο R-GST, όπως και προηγουμένως. Για την θερμοκρασία του θερμοκυκλοποιητή συγκρίθηκαν οι θερμοκρασίες T<sub>m</sub> των 2 εκκινητών και επιλέχθηκε η μικρότερη.

T<sub>m</sub>F<sub>3</sub> GST tobacco (Nearest neighbor) =64°C

T<sub>m</sub>R-GST =63°C

Για την διαδικασία της PCR αφαιρέθηκαν 5°C από τις 2 θερμοκρασίες, οπότε η T<sub>m</sub>F<sub>3</sub> GST tobacco=61 °C. και T<sub>m</sub>R-GST= 58 °C. Από αυτές τις 2 θερμοκρασίες επιλέχθηκε η χαμηλότερη για να χρησιμοποιηθεί στον θερμοκυκλοποιητή, δηλαδή οι 58 °C.

Πίνακας 4 Το πρόγραμμα του θερμοκυκλοποιητή-Set up PCR

|   |     |       |        |
|---|-----|-------|--------|
| Αρχική αποδιάταξη αλυσίδας                  |     | 95 °C | 5 min  |
| Αποδιάταξη αλυσίδας                         | 35x | 95 °C | 20 sec |
| Θερμοκρασία<br>Υβριδισμού-Σύνδεση εκκινητών |     | 58 °C | 20 sec |
| Επιμήκυνση αλυσίδας                         |     | 72 °C | 60 sec |
| Τελική επώαση                               |     | 72 °C | 5 min  |
| Παραμονή προϊόντος                          |     | 4 °C  | ∞      |

Ο F<sub>3</sub> GST tobacco βρισκόταν σε μορφή σκόνης, οπότε έπρεπε να γίνει διάλυση σε νερό. Το μοριακό του βάρος είναι 41,0 nmol, οπότε χρησιμοποιήθηκαν 410 μL νερού έγχυσης για την δημιουργία του stock διαλύματος (100 μM). Μετά αραιώθηκαν  $C1 * V1 = C2 * V2 \Rightarrow 100 \mu M * V1 = 10 \mu M * 50 \mu M \Rightarrow V1 = 5 \mu L$  F<sub>3</sub> GST tobacco με 45 μL νερού έγχυσης για την δημιουργία του διαλύματος εργασίας.

Στη συνέχεια, ετοιμάστηκε το μείγμα της PCR. Σε σωληνάριο PCR τοποθετήθηκαν 4 μL καθαρισμένου DNA προϊόντος, 5 μL Buffer 1X, 1.5 μL MgCl<sub>2</sub> (1.5 mM), 1μL dNTPs (0,2 mM), 2.5 μL εκκινητή F<sub>3</sub> GST tobacco (0.5 μM), 2,5 μL εκκινητή R-GST (0.5 μM), 1 μL Taq απλή (5 μονάδες) και 32,5 μL νερό έγχυσης. Το νερό τοποθετήθηκε πρώτο στο σωληνάριο PCR, ενώ το προϊόν της προηγούμενης PCR τελευταίο. Όλα τα αντιδραστήρια ήταν αποθηκευμένα σε κουτί με πάγο κατά την διάρκεια της διαδικασίας. Ο τελικός όγκος του μείγματος ήταν 50 μL. Το μείγμα τοποθετήθηκε στον ρυθμισμένο θερμοκυκλοποιητή και όταν τελείωσε η διαδικασία αποθηκεύτηκε στους -20 °C.

Μετά παρασκευάστηκε πήκτωμα αγαρόζης και ηλεκτροφόρηση. Στην 1η θέση τοποθετήθηκε ο μάρτυρας (ladder) με την χρωστική, στην 2η θέση μπήκε το προϊόν της PCR με τον F<sub>3</sub> GST tobacco εκκινητή με την χρωστική και στην τελευταία

το προϊόν με τον F<sub>2</sub> GST tobacco, το οποίο είχε περάσει από το Clean-up kit μαζί με χρωστική (για σύγκριση των ζωνών και των ζευγών βάσεων ανάμεσα στις 2 PCR).



Εικόνα 12: Παρατήρηση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης του μάρτυρα (ladder)-1η θέση, του DNA προϊόντος με τον εκκινητή F<sub>3</sub> GST tobacco-2η θέση και του DNA προϊόντος με τον εκκινητή F<sub>2</sub> GST tobacco -3η θέση, σε UV φως.

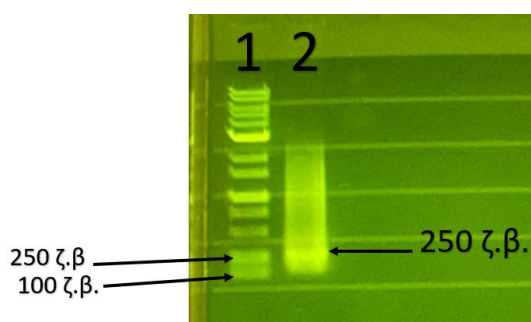
Κόπηκε η ζώνη με τον F<sub>3</sub> GST tobacco από το πήκτωμα (2<sup>η</sup> θέση) και έγινε καθαρισμός με το Monarch DNA Gel Extraction kit.

Πριν την πραγματοποίηση του καθαρισμού προστέθηκαν 4X όγκου αιθανόλης (95%) σε 1X όγκο ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης του DNA (DNA Wash Buffer). Όλες οι φυγοκεντρήσεις έγιναν στα 16.000xg (~13.000 RPM). Αρχικά, κόπηκε η ζώνη του DNA από την πηκτή αγαρόζη όπως επίσης και το πήκτωμα που είχε μείνει γύρω. Αυτό μεταφέρθηκε σε eppendorf σωληνάριο 1,5 ml και ζυγίστηκε. Προστέθηκε 4X όγκος του ρυθμιστικού διαλύματος διάλυσης του πηκτώματος (Gel Dissolving Buffer) στο κομμάτι της πηκτής αγαρόζης, δηλαδή επειδή το δείγμα ζύγιζε 240 mg, προστέθηκαν 960 μL διαλύματος. Το δείγμα επώαστηκε στους 50°C και αναδεύονταν περιοδικά στο vortex μέχρι το πήκτωμα να διαλυθεί εντελώς ( διάρκεια 5-10 λεπτά). Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε η στήλη σε σωληνάριο συλλογής και μεταφέρθηκε το δείγμα στη στήλη. Έγινε φυγοκέντρηση για 1 λεπτό και απορρίφθηκε το διήθημα. Η στήλη επανατοποθετήθηκε στο σωληνάριο συλλογής, προστέθηκαν 200 μL ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης DNA (DNA Wash Buffer) και έγινε φυγοκέντρηση για 1 λεπτό. Το διήθημα απορρίφθηκε. Επαναλήφθηκε η πλύση με το διάλυμα DNA Wash Buffer, η φυγοκέντρηση και η απόρριψη του διηθήματος. Η στήλη μεταφέρθηκε σε ένα καθαρό eppendorf σωληνάριο 1,5 ml και προστέθηκαν 12 μL ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης του DNA (DNA Elution Buffer) στο κέντρο της στήλης. Έγινε επώαση για 1 λεπτό και μετά φυγοκέντρηση για 1 λεπτό για να γίνει έκλυση του DNA.

Στη συνέχεια, έγινε PCR με το DNA που παραλήφθηκε από την εξαγωγή από το πήκτωμα, με τους εκκινητές F<sub>3</sub> GST tobacco και R-GST και με τις ίδιες συνθήκες όπως η προηγούμενη PCR. Το προϊόν που παρήχθη καθαρίστηκε με το Monarch PCR



and DNA Clean-up kit και με το καθαρό πλέον προϊόν έγινε ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη. Γενικά, οι ηλεκτροφορήσεις έδειχναν ότι το δείγμα ήταν πολύ μικρών ζευγών βάσεων για αυτό επαναλήφθηκαν οι αντιδράσεις PCR με αλλαγμένες συνθήκες.



Εικόνα 13: Παρατήρηση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης του μάρτυρα (ladder)-1η θέση, του DNA προϊόντος με τον εκκινητή F3 GST tobacco-2η θέση.

Πραγματοποιήθηκε η PCR με τους οι εκκινητές F GST tobacco και Race-amp. Το μείγμα της PCR αποτελούνταν από 4  $\mu\text{L}$  cDNA, 5 $\mu\text{L}$  ρυθμιστικό διάλυμα 1X, 1.5  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  (1.5 mM), 1  $\mu\text{L}$  dNTPs (0,2 mM), 2.5  $\mu\text{L}$  εκκινητή F GST tobacco (0.5  $\mu\text{M}$ ), 2,5  $\mu\text{L}$  εκκινητή Race amp (0.5  $\mu\text{M}$ ), 1 $\mu\text{L}$  Taq απλή (5 μονάδες) και 32,5  $\mu\text{L}$  αποστειρωμένο και απιονισμένο νερό έγχυσης. Για τις συνθήκες της αντίδρασης αποφασίστηκε να μειωθεί κατά 1°C το  $T_m$ , άρα από 52°C μειώθηκε στους 51°C και να αυξηθεί ο χρόνος που χρειάζεται για την επιμήκυνση της αλυσίδας του DNA από τα 60 στα 90 δευτερόλεπτα.

Πίνακας 5: Το πρόγραμμα του θερμοκυκλοποιητη- Set up PCR

|   |     |      |        |
|---|-----|------|--------|
| Αρχική αποδιάταξη αλυσίδας                  |     | 95°C | 5 min  |
| Αποδιάταξη αλυσίδας                         | 35x | 95°C | 20 sec |
| Θερμοκρασία<br>Υβριδισμού-Σύνδεση εκκινητών |     | 51°C | 20 sec |
| Επιμήκυνση αλυσίδας                         |     | 72°C | 90sec  |
| Τελική επώαση                               |     | 72°C | 5 min  |

|                    |  |      |   |
|--------------------|--|------|---|
| Παραμονή προϊόντος |  | 4 °C | ∞ |
|--------------------|--|------|---|

Το προϊόν του προέκυψε από την PCR καθαρίστηκε με το Monarch PCR and DNA Clean-up kit. Στην συνέχεια, έγινε PCR με το καθαρισμένο DNA και τους εκκινητές F2 GST tobacco και R-GST.

Πίνακας 6: Το πρόγραμμα του θερμοκυκλοποιητή- Set up PCR

|  |     |      |        |
|--|-----|------|--------|
| Αρχική αποδιάταξη αλυσίδας                     |     | 95°C | 5 min  |
| Αποδιάταξη αλυσίδας                            | 35x | 95°C | 20 sec |
| Θερμοκρασία<br>Υβριδισμού-Σύνδεση<br>εκκινητών |     | 59°C | 20 sec |
| Επιμήκυνση αλυσίδας                            |     | 72°C | 90sec  |
| Τελική επώαση                                  |     | 72°C | 5 min  |
| Παραμονή προϊόντος                             |     | 4°C  | ∞      |

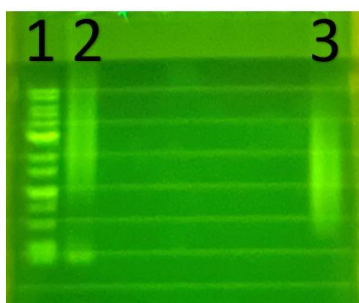
Μετά την ρύθμιση του οργάνου, ετοιμάστηκε το μείγμα της PCR. Σε PCR σωληνάριο τοποθετήθηκαν 4 µL καθαρισμένο DNA προϊόν από την προηγούμενη PCR, 5 µL ρυθμιστικό διάλυμα 1X, 1.5 µL MgCl<sub>2</sub> (1.5 mM), 1 µL dNTPs (0,2 mM), 2.5 µL εκκινητή F<sub>2</sub> GST tobacco (0.5 µM), 2,5 µL εκκινητή R-GST (0.5 µM), 1 µL Taq απλή (5 μονάδες) και 32,5 µL νερό έγχυσης. Το προϊόν που προέκυψε καθαρίστηκε με το Monarch PCR and DNA Clean-up kit. Έγινε η PCR με το προϊόν που προέκυψε με

τους εκκινητές F<sub>3</sub> GST tobacco και R-GST. Ο θερμοκυκλοποιητής ρυθμίστηκε στις συνθήκες.

Πίνακας 7: Το πρόγραμμα του θερμοκυκλοποιητή-Set up PCR

|   |     |      |        |
|---|-----|------|--------|
| Αρχική αποδιάταξη αλυσίδας                  |     | 95°C | 5 min  |
| Αποδιάταξη αλυσίδας                         | 35x | 95°C | 20 sec |
| Θερμοκρασία<br>Υβριδισμού-Σύνδεση εκκινητών |     | 58°C | 20 sec |
| Επιμήκυνση αλυσίδας                         |     | 72°C | 90sec  |
| Τελική επώαση                               |     | 72°C | 5 min  |
| Παραμονή προϊόντος                          |     | 4°C  | ∞      |

Έπειτα, ετοιμάστηκε το μείγμα της PCR. Σε PCR σωληνάρια τοποθετήθηκαν 4 μL καθαρισμένου DNA προϊόντος, 5 μL ρυθμιστικό διάλυμα 1X, 1.5 μL MgCl<sub>2</sub> (1.5 mM), 1 μL dNTPs (0,2 mM), 2.5 μL εκκινητή F<sub>3</sub> GST tobacco (0.5 μM), 2,5 μL εκκινητή R-GST (0.5 μM), 1 μL Taq απλή (5 μονάδες) και 32,5 μL νερό έγχυσης. Το προϊόν καθαρίστηκε με Monarch PCR and DNA Clean-up kit. Στην συνέχεια έγινε ηλεκτροφόρηση, στην 2η θέση τοποθετήθηκε το καθαρισμένο προϊόν της PCR με τον F<sub>3</sub> εκκινητή και στην τελευταία το καθαρισμένο προϊόν με τον F<sub>2</sub> εκκινητή (για σύγκριση ζωνών).



Εικόνα 14: Παρατήρηση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης του μάρτυρα (ladder)-1η θέση, του DNA προϊόντος με τον εκκινητή F3 GST tobacco-2η θέση και το καθαρισμένο προϊόν με τον F2 εκκινητή-3η θέση.

Οι εικόνες από την ηλεκτροφόρηση δεν έδειχναν τα επιθυμητά αποτελέσματα, καθώς οι ζώνες δεν ήταν ορατές. Για τον λόγο αυτό επαναλήφθησαν η PCR με τους εκκινητές F GST tobacco και Race amp και η PCR με τους F<sub>3</sub> GST tobacco και R-GST. Για να γίνει αυτό έπρεπε να δημιουργηθεί ξανά η cDNA βιβλιοθήκη καθώς το προϊόν δεν επαρκούσε για τις μετέπειτα αντιδράσεις. Η διαδικασία σύνθεσης έχει περιγραφεί παραπάνω. Με το προϊόν της cDNA βιβλιοθήκης πραγματοποιήθηκε η αντίδραση PCR με τους εκκινητές F GST tobacco και Race amp. Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν παραλλαγμένοι, δηλαδή το T<sub>m</sub> από 52°C μειώθηκε στους 51°C και ο χρόνος που χρειάζεται για την επιμήκυνση της αλυσίδας του DNA αυξήθηκε από τα 60 στα 90 δευτερόλεπτα.

Πίνακας 8: Το πρόγραμμα του θερμοκυκλοποιητή-Set up PCR

|   |     |      |        |
|---|-----|------|--------|
| Αρχική αποδιάταξη αλυσίδας                  |     | 95°C | 5 min  |
| Αποδιάταξη αλυσίδας                         | 35x | 95°C | 20 sec |
| Θερμοκρασία<br>Υβριδισμού-Σύνδεση εκκινητών |     | 51°C | 20 sec |
| Επιμήκυνση αλυσίδας                         |     | 72°C | 90sec  |

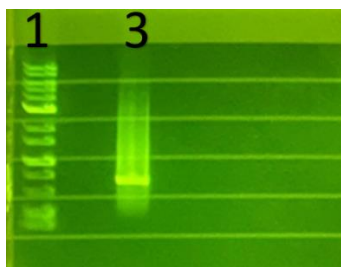
|                    |  |      |       |
|--------------------|--|------|-------|
| Τελική επώαση      |  | 72°C | 5 min |
| Παραμονή προϊόντος |  | 4°C  | ∞     |

Το προϊόν του προέκυψε από την PCR καθαρίστηκε με το Monarch PCR and DNA Clean-up kit. Στην συνέχεια, έγινε PCR με το καθαρισμένο DNA και τους εκκινητές F<sub>3</sub> GST tobacco και R-GST.

Πίνακας 9: Το πρόγραμμα του θερμοκυκλοποιητή-Set up PCR

|   |     |      |        |
|---|-----|------|--------|
| Αρχική αποδιάταξη αλυσίδας                  |     | 95°C | 5 min  |
| Αποδιάταξη αλυσίδας                         | 35x | 95°C | 20 sec |
| Θερμοκρασία<br>Υβριδισμού-Σύνδεση εκκινητών |     | 58°C | 20 sec |
| Επιμήκυνση αλυσίδας                         |     | 72°C | 90sec  |
| Τελική επώαση                               |     | 72°C | 5 min  |
| Παραμονή προϊόντος                          |     | 4°C  | ∞      |

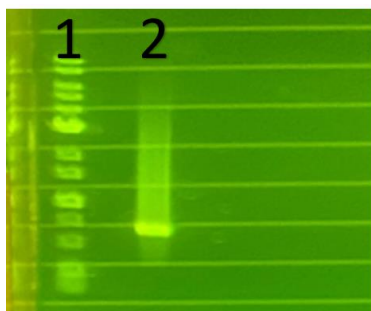
Το προϊόν του προέκυψε από την PCR καθαρίστηκε με το Monarch PCR and DNA Clean-up kit. Έγινε ηλεκτροφόρηση με το καθαρισμένο προϊόν και πλέον η ζώνη του DNA ήταν πλήρως εμφανής. Το προϊόν τοποθετήθηκε στην 3<sup>η</sup> θέση στο πήκτωμα και όχι στην 2<sup>η</sup>, ακριβώς δίπλα από τον μάρτυρα για να είναι ευκολότερη η κοπή και η απομάκρυνση της ζώνης από το πήκτωμα αγαρόζης.



Εικόνα 15: Παρατήρηση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης του μάρτυρα (ladder)-1η θέση, του DNA προϊόντος με τον εκκινητή F<sub>3</sub> GST tobacco-3η θέση

Η ζώνη κόπηκε και καθαρίστηκε από το πήκτωμα με το Monarch DNA Gel Extraction kit. Στη συνέχεια, το erpendorf σωληνάριο που περιείχε 7  $\mu$ L DNA απεστάλη σε εταιρία για αλληλούχιση μαζί με 7  $\mu$ L του εκκινητή F<sub>3</sub> GST tobacco. Ο εκκινητής έπρεπε να αραιωθεί έτσι ώστε η συγκέντρωσή του από 10  $\mu$ M να μειωθεί στα 5  $\mu$ M, επομένως στο erpendorf σωληνάριο προστέθηκαν 3,5  $\mu$ L του εκκινητή F<sub>3</sub> GST tobacco και 3,5  $\mu$ L αποστειρωμένο και απιονισμένο νερό (για να παραχθούν τα απαιτούμενα 7  $\mu$ L)

Μετά την παραλαβή της αλληλούχισης αποφασίστηκε η αποστολή του προϊόντος της τελευταίας PCR μαζί με τον εκκινητή R-GST. Για αυτό το λόγο, επαναλήφθηκε η τελευταία PCR. Ο συνολικός όγκος του μείγματος της PCR ήταν 25  $\mu$ L αντί για 50  $\mu$ L, καθώς το υπήρχαν 2  $\mu$ L καθαρισμένου προϊόντος PCR με τους εκκινητές F GST tobacco και Race amp. Σε PCR σωληνάριο τοποθετήθηκαν 2  $\mu$ L καθαρισμένου DNA προϊόντος, 2,5  $\mu$ L ρυθμιστικό διάλυμα 1X, 0,75  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> (1.5 mM), 0,5  $\mu$ L dNTPs (0,2 mM), 1,25  $\mu$ L εκκινητή F<sub>3</sub> GST tobacco (0.5  $\mu$ M), 1,25  $\mu$ L εκκινητή R-GST (0.5  $\mu$ M), 0,5  $\mu$ L Taq απλή (5 μονάδες) και 16,25  $\mu$ L αποστειρωμένο και απιονισμένο νερό. Οι ρυθμίσεις του θερμοκυκλοποιητή ήταν οι ίδιες. Έγινε ηλεκτοφόρηση του προϊόντος της PCR.



Εικόνα 16: Παρατήρηση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης του μάρτυρα (ladder)-1η θέση, του DNA προϊόντος με τον εκκινητή F3 GST tobacco-2η θέση

Η ζώνη κόπηκε και απομακρύνθηκε από το πήκτωμα αгарόζης, αλλά δεν έγινε καθαρισμός από το αυτό και στάλθηκε μέσα σε ένα erppendorf σωληνάριο, μαζί με ένα erppendorf σωληνάριο με 7  $\mu\text{L}$  εκκινητή R-GST αραιωμένου (περιείχε 3,5  $\mu\text{L}$  εκκινητή R-GST και 3,5  $\mu\text{L}$  αποστειρωμένο και απιονισμένο νερό) για αλληλούχιση.

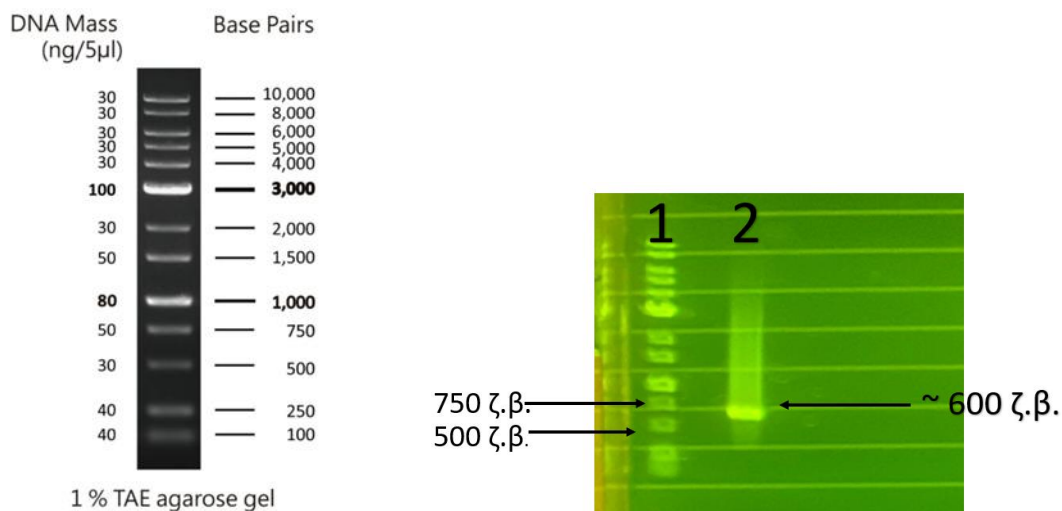
### 2.3.7 ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

Για τις περαιτέρω αναλύσεις των αλληλουχιών που προέκυψαν, χρησιμοποιήθηκαν κάποια βιοπληροφορικά προγράμματα και σελίδες στο διαδίκτυο.

- Για την οπτικοποίηση και την επεξεργασία των χρωματογραμμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Chromas 2.5.0. (*Chromas*, 1998)
- Για να καθοριστούν ομοιότητες της αλληλουχίας που απομονώθηκε με παρόμοιες αλληλουχίες, χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο Nucleotide BLAST του National Centre for Biotechnology Information (NCBI). Το πρόγραμμα συγκρίνει νουκλεοτιδικές ή πρωτεϊνικές αλληλουχίες με βάσεις δεδομένων και υπολογίζει τη στατιστική σημαντικότητα των στοιχίσεων. (National Center for Biotechnology Information (NCBI), 1988)
- Για την στοίχιση αλληλουχιών και εύρεση ομοιοτήτων και διαφορών στις βάσεις τους, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Bioedit. (Hall, T.A., 1999)
- Για την εύρεση περισσότερων πληροφοριών για τις παραγόμενες πρωτεΐνες, τη δομή τους και τις λειτουργίες τους έγινε χρήση της βάσης δεδομένων πρωτεϊνικών ακολουθιών UniProt (The UniProt Consortium, 2023).

- Για την κατασκευή μια αλυσίδας (contig) από τα 2 απομονωμένα κομμάτια του γονιδίου, χρησιμοποιώντας τις επικαλυπτόμενες περιοχές τους χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα CAP3 Sequence Assembly Program σε μορφή FASTA (X. Huang & Madan, 1999).

### 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 17: DNA μάρτυρας της εταιρίας NIPPON Genetics Europe (αριστερά) (FastGene 1 Kb DNA Marker Plus, 2018)

Εικόνα 18: Σύγκριση της ζώνης στην δεξιά εικόνα με τον μάρτυρα και καθορισμός του μεγέθους της.

Με μια αρχική παρατήρηση της ζώνης που εμφανίστηκε στο πήκτωμα αγαρόζης, διαπιστώθηκε πως τα ζεύγη βάσεων του απομονωμένου γονιδίου ήταν λιγότερα από 1000. Η αλληλούχιση του γονιδίου έγινε στην εταιρία Cemía και χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Sanger.

Για την αλληλούχιση του γονιδίου χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές F<sub>3</sub> GST tobacco και R-GST έτσι ώστε να γίνει η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδίου και να μην υπάρχουν περιοχές που δεν έχουν αναλυθεί. Έτσι προέκυψαν 2 αλληλουχίες του απομονωμένου γονιδίου μαζί με τα αντίστοιχα χρωματογράμματα.



Η αλληλουχία του γονιδίου με την χρήση του εκκινητή F3 GST tobacco.

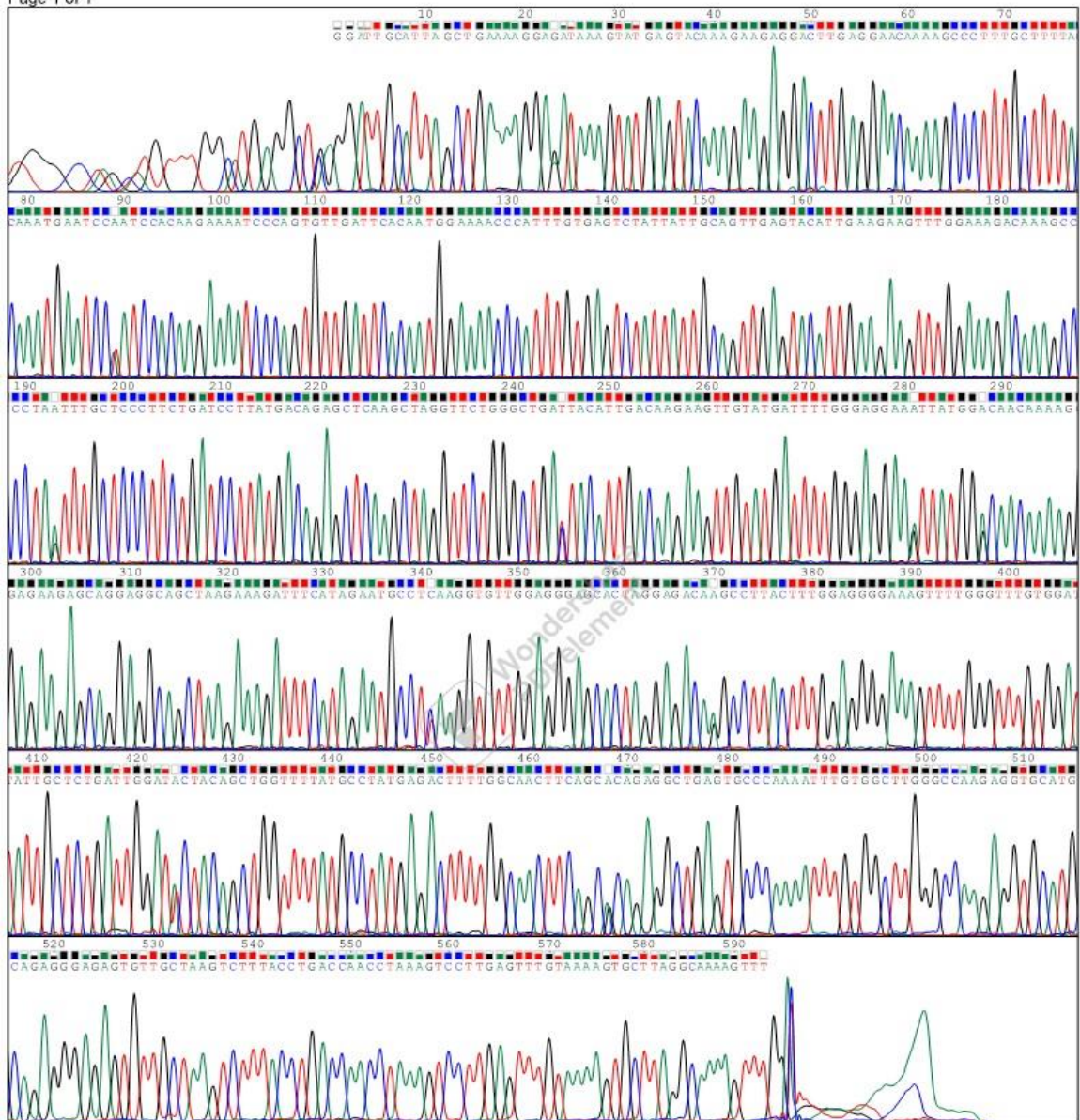
>20221104BS1P1\_H11\_2022-11-09.ab1

GTGGTCCTAGCATGTTTGGCATGAGGCTSAGGATTGCATTAGCTGAAAAG  
GARATAAAGTATGAGTACAAAGAAGAGGACTTGAGGAACAAAAGCCCTT  
TGCTTTTACAAATGAATCCWATCCACAAGAAAATCCCAGTGTTGATTCAC  
AATGGAAAACCCATTTGTGAGTCTATTATTGCAGTTGAGTACATTGAAGA  
AGTTTGGAAAGACAAAGCCCCTARTTTGCTCCCTTCTGATCCTTATGACAG  
AGCTCAAGCTAGGTTCTGGGCTGAYTACATTGACAAGAAGTTGTATGATT  
TTGGGAGGAARTTATGGRCAACAAAAGGAGAAGAGCAGGAGGCAGCTAA  
GAAAGATTTTCATAGAATGCCTYAAGGTGTTGGAGGGAGCACTAGGAGAC  
ARGCCTTACTTTGGAGGGGAAAGTTTTGGGTTTGTGGATATTGCTCTGATT  
GGATWCTACAGCTGGTTTTATGCCTATGAGACTTTTGGCAACTTCAGCRC  
AGAGGCTGAGTGCCCAAAATTTGTGGCTTGGGCCAAGAGGTGCATGCAGA  
GGGAGAGTGTTGCTAAGTCTTTACCTGACCAACCTAAAGTCCTTGAGTTTG  
TAAAAGTGCTTAGGCAAAAGTTTTGGTKGKRRRKAKWAMMACAAAAAA

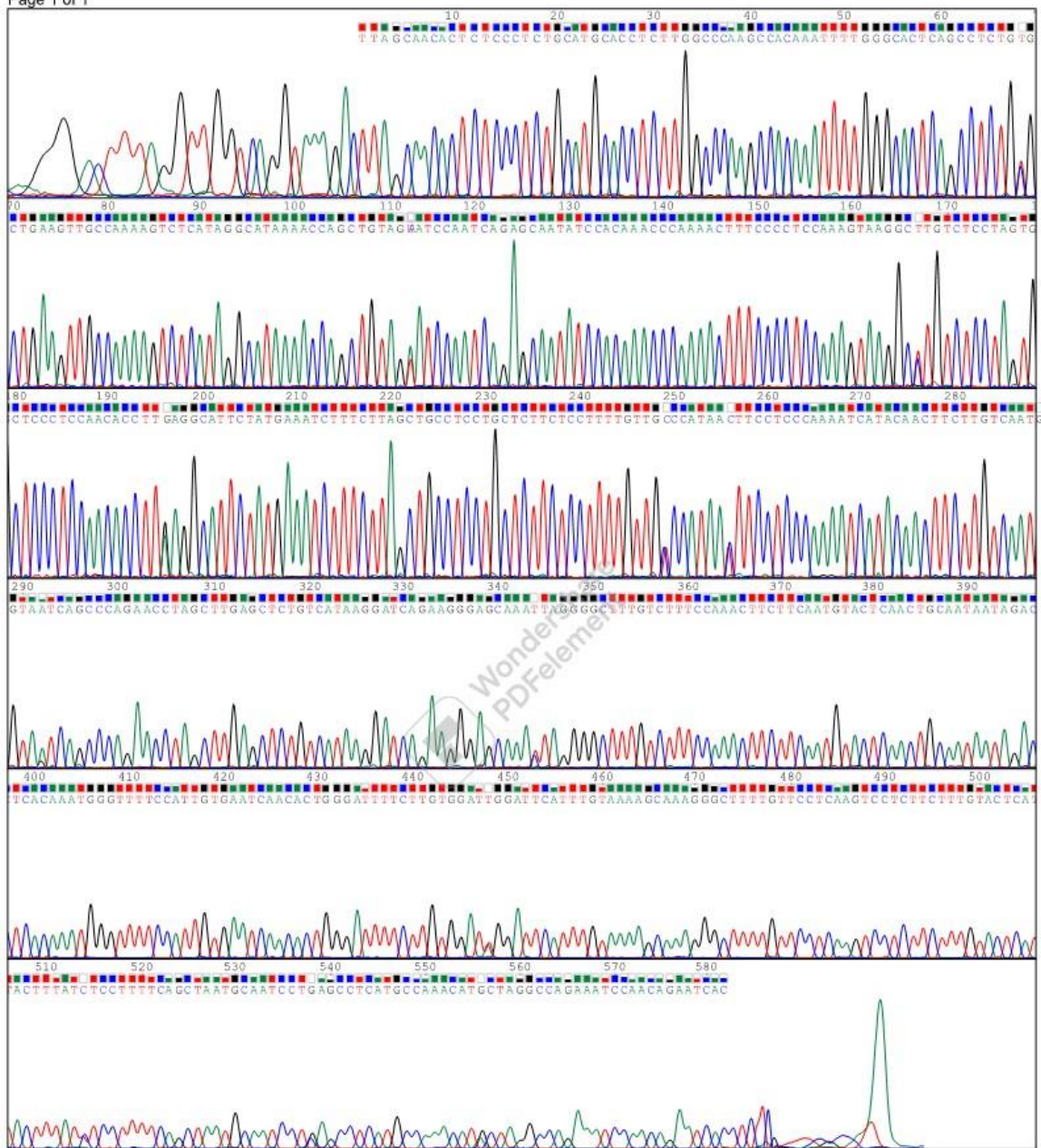
Η αλληλουχία του γονιδίου με χρήση του εκκινητή R-GST.

>20221209HS1P1\_D05\_2022-12-13.ab1

CAGGTACTTTAGGTTGGTCAGGTAAGACTTAGCAACACTCTCCCTCTGCA  
TGCACCTCTTGCCCAAGCCACAAATTTTGGGCACTCAGCCTCTGYGCTGA  
AGTTGCCAAAAGTCTCATAGGCATAAAACCAGCTGTAGWATCCAATCAG  
AGCAATATCCACAAACCCAAAACCTTTCCCCTCCAAAGTAAGGCYTGTCTC  
CTAGTGCTCCCTCCAACACCTTRAGGCATTCTATGAAATCTTTCTTAGCTG  
CCTCCTGCTCTTCTCCTTTTGTGTYCCATAAYTTCCTCCCAAAATCATAAA  
CTTCTTGTC AATGTAATCAGCCCAGAACCTAGCTTGAGCTCTGTCATAAGG  
ATCAGAAGGGAGCAAAYTAGGGGCTTTGTCTTTCCAAACTTCTTCAATGT  
ACTCAACTGCAATAATAGACTCACAAATGGGTTTTCCATTGTGAATCAAC  
ACTGGGATTTTCTTGTGGATWGGATTCATTTGTAAAAGCAAAGGGCTTTT  
GTTCCCTCAAGTCCTCTTCTTTGTA CTACTTTATYTCCTTTTCAGCTAAT  
GCAATCCTSAGCCTCATGCCAAACATRCTAGGCCAGAAATCCAACAGAAT  
CACCTCTGTTTTYSSCMWT



Εικόνα 19: Χρωματόγραμμα του γονιδίου με τον εκκινητή F3 GST tobacco



Εικόνα 20: Χρωματογράμμα του γονιδίου με τον εκκινητή R-GST.

Με την ανάλυση των χρωματογραμμάτων, εντοπίστηκαν οι μη αναγνώσιμες περιοχές που βρίσκονται στα σημεία σύνδεσης των εκκινητών. Αυτές οι περιοχές αποτελούνται από περίπου 25-30 ζεύγη βάσεων., οι οποία κόπηκαν από τον εμπρόσθιο

και τον ανάστροφο κλώνο για να παραμείνει μόνο η υψηλής ποιότητας αλληλουχία. Επίσης, οι βάσεις που είχαν επισημανθεί με γράμματα εκτός από τα A,T,G,C και παρουσίαζαν αλληλεπικαλυπτόμενες κορυφές, ερμηνεύτηκαν ως ένα από αυτά τα 4 δεσοξυριβονουκλεοτίδια ανάλογα με την αντιστοιχία στην υψηλότερη κορυφή. Έτσι, οι αλληλουχίες μετά από αυτές τις αλλαγές διαμορφώθηκαν ως εξής:

Η αλληλουχία με του γονιδίου με τον εκκινητή F3 GST tobacco

>20221104BS1P1\_H11\_2022-11-09.ab1

```
GGATTGCATTAGCTGAAAAGGAGATAAAGTATGAGTACAAAGAAGAGGA
CTTGAGGAACAAAAGCCCTTTGCTTTTACAAATGAATCCAATCCACAAGA
AAATCCCAGTGTTGATTCACAATGGAAAACCCATTTGTGAGTCTATTATTG
CAGTTGAGTACATTGAAGAAGTTTGGAAAGACAAAGCCCCTAATTTGCTC
CCTTCTGATCCTTATGACAGAGCTCAAGCTAGGTTCTGGGCTGATTACATT
GACAAGAAGTTGTATGATTTTGGGAGGAAATTATGGACAACAAAAGGAG
AAGAGCAGGAGGCAGCTAAGAAAGATTTTCATAGAATGCCTCAAGGTGTT
GGAGGGAGCACTAGGAGACAAGCCTTACTTTGGAGGGGAAAGTTTTGGGT
TTGTGGATATTGCTCTGATTGGATACTACAGCTGGTTTTATGCCTATGAGA
CTTTTGGCAACTTCAGCACAGAGGCTGAGTGCCCAAATTTGTGGCTTGG
GCCAAGAGGTGCATGCAGAGGGAGAGTGTTGCTAAGTCTTTACCTGACCA
ACCTAAAGTCCTTGAGTTTGTAAAAGTGCTTAGGCCAAAAGTTT
```

Η αλληλουχία του γονιδίου με τον εκκινητή R-GST.

>20221209HS1P1\_D05\_2022-12-13.ab1

```
TAGCAACACTCTCCCTCTGCATGCACCTCTTGGCCCAAGCCACAAATTTTG
GGCACTCAGCCTCTGTGCTGAAGTTGCCAAAAGTCTCATAGGCATAAAAC
CAGCTGTAGAATCCAATCAGAGCAATATCCACAAACCCAAAACCTTTCCCC
TCCAAAGTAAGGCYTGTCTCCTAGTGCTCCCTCCAACACCTTTAGGCATTC
TATGAAATCTTTCTTAGCTGCCTCCTGCTCTTCTCCTTTTGTGGCCATAAC
TTCTCCCAAATCATACAACCTTCTTGTCAATGTAATCAGCCCAGAACCTA
GCTTGAGCTCTGTCATAAGGATCAGAAGGGAGCAAATTAGGGGCTTTGTC
TTTCCAAACTTCTTCAATGTAACACTGCAATAATAGACTCACAAATGGG
TTTTCCATTGTGAATCAACACTGGGATTTTCTTGTGGATTGGATTCATTTGT
```

AAAAGCAAAGGGCTTTTGTTCCTCAAGTCCTCTTCTTTGTACTCATACTTT  
ATCTCCTTTTCAGCTAATGCAATCCTGAGCCTCATGCCAAACATGCTAGGC  
CAGAAATCCAACAGAATCACCTCTG

Η εμπρόσθια και ανάστροφη αλληλουχία εισήχθησαν στο εργαλείο αναζήτησης Nucleotide BLAST του National Centre for Biotechnology Information (NCBI), έτσι ώστε μέσα από την βάση δεδομένων να καθοριστούν ομοιότητες με παρόμοιες αλληλουχίες και να προσδιοριστεί η παραγόμενη πρωτεΐνη.

Όπως φαίνεται στους πίνακες παρακάτω, το γονίδιο που απομονώθηκε παρουσιάζει ομοιότητες με γονίδια GST κυρίως του γένους *Nicotiana* και δευτερευόντως με άλλα είδη του γένους *Solanum*. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχει ομοιότητα της εμπρόσθιας αλληλουχίας κατά 99,83% με ένα γονίδιο του είδους *Nicotiana tomentosiformis* και 98,15%-99,83% με γονίδια του είδους *Nicotiana tabacum* L. Με τα υπόλοιπα είδη του γένους *Nicotiana* υπάρχουν ομοιότητες σε ποσοστό 96,97%-98,15%, ενώ με τα γένη *Solanum* <90,27%. Για την αλληλουχία με τον ανάστροφο εκκινητή ισχύει παρομοίως ομοιότητα με το γονίδιο του είδους *Nicotiana tomentosiformis* σε ποσοστό 98,04% και με γονίδια του είδους *Nicotiana tabacum* L 97,72%-98,04%. Με τα υπόλοιπα είδη του γένους *Nicotiana* υπάρχουν ομοιότητες ύψους 95,60%-97,88% και με τα γένη *Solanum* <89,38%.

Πίνακας 10: Σύγκριση της εμπρόσθιας αλληλουχίας με γονίδια ίδιων ή γενετικά παρόμοιων φυτικών ειδών

| Description  | Scientific Name           | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. ident | Acc. Len |
|--|---------------------------|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------|
| PREDICTED: Nicotiana tomentosiformis probable glutathione S-transferase (LOC104108670), mRNA                 | Nicotiana tomentosiformis | 1094      | 1094        | 100%        | 0.0     | 99.83      | 945      |
| Nicotiana tabacum probable glutathione S-transferase (LOC107782951), mRNA                                    | Nicotiana tabacum         | 1094      | 1094        | 100%        | 0.0     | 99.83      | 941      |
| PREDICTED: Nicotiana sylvestris probable glutathione S-transferase parC (LOC104212320), mRNA                 | Nicotiana sylvestris      | 1038      | 1038        | 100%        | 0.0     | 98.15      | 985      |
| Nicotiana tabacum probable glutathione S-transferase parC (LOC107823949), mRNA                               | Nicotiana tabacum         | 1038      | 1038        | 100%        | 0.0     | 98.15      | 989      |
| PREDICTED: Nicotiana attenuata probable glutathione S-transferase (LOC109239663), mRNA                       | Nicotiana attenuata       | 1011      | 1011        | 100%        | 0.0     | 97.31      | 1001     |
| PREDICTED: Nicotiana attenuata probable glutathione S-transferase (LOC109222639), misc_RNA                   | Nicotiana attenuata       | 1003      | 1003        | 100%        | 0.0     | 97.14      | 811      |
| PREDICTED: Nicotiana attenuata probable glutathione S-transferase (LOC109219718), mRNA                       | Nicotiana attenuata       | 1000      | 1000        | 100%        | 0.0     | 96.97      | 995      |
| PREDICTED: Solanum verrucosum probable glutathione S-transferase (LOC125839326), transcript variant X2 mRNA  | Solanum verrucosum        | 774       | 774         | 100%        | 0.0     | 90.27      | 711      |
| PREDICTED: Solanum stenotomum probable glutathione S-transferase (LOC125877754), transcript variant X26 mRNA | Solanum stenotomum        | 730       | 730         | 100%        | 0.0     | 88.93      | 804      |
| PREDICTED: Solanum stenotomum probable glutathione S-transferase (LOC125877754), transcript variant X25 mRNA | Solanum stenotomum        | 730       | 730         | 100%        | 0.0     | 88.93      | 949      |

Πίνακας 11: Σύγκριση της ανάστροφης αλληλουχίας με γονίδια ίδιων ή γενετικά παρόμοιων φυτικών ειδών.

| Description  | Scientific Name                  | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. ident | Acc. Len |
|--|----------------------------------|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------|
| PREDICTED: <i>Nicotiana tomentosiformis</i> probable glutathione S-transferase (LOC104108670), mRNA                  | <i>Nicotiana tomentosiformis</i> | 1085      | 1085        | 98%         | 0.0     | 98.04      | 945      |
| <i>Nicotiana tabacum</i> probable glutathione S-transferase (LOC107782951), mRNA                                     | <i>Nicotiana tabacum</i>         | 1085      | 1085        | 98%         | 0.0     | 98.04      | 941      |
| PREDICTED: <i>Nicotiana sylvestris</i> probable glutathione S-transferase parC (LOC104212320), mRNA                  | <i>Nicotiana sylvestris</i>      | 1079      | 1079        | 98%         | 0.0     | 97.88      | 985      |
| <i>Nicotiana tabacum</i> probable glutathione S-transferase parC (LOC107823949), mRNA                                | <i>Nicotiana tabacum</i>         | 1074      | 1074        | 98%         | 0.0     | 97.72      | 989      |
| PREDICTED: <i>Nicotiana attenuata</i> probable glutathione S-transferase (LOC109222639), misc_RNA                    | <i>Nicotiana attenuata</i>       | 1013      | 1013        | 98%         | 0.0     | 95.92      | 811      |
| PREDICTED: <i>Nicotiana attenuata</i> probable glutathione S-transferase (LOC109239663), mRNA                        | <i>Nicotiana attenuata</i>       | 1013      | 1013        | 98%         | 0.0     | 95.92      | 1001     |
| PREDICTED: <i>Nicotiana attenuata</i> probable glutathione S-transferase (LOC109219718), mRNA                        | <i>Nicotiana attenuata</i>       | 1002      | 1002        | 98%         | 0.0     | 95.60      | 995      |
| PREDICTED: <i>Solanum verrucosum</i> probable glutathione S-transferase (LOC125839326), transcript variant X2, mRNA  | <i>Solanum verrucosum</i>        | 784       | 784         | 97%         | 0.0     | 89.38      | 711      |
| PREDICTED: <i>Solanum stenotomum</i> probable glutathione S-transferase (LOC125877754), transcript variant X26, mRNA | <i>Solanum stenotomum</i>        | 756       | 756         | 97%         | 0.0     | 88.56      | 804      |
| PREDICTED: <i>Solanum stenotomum</i> probable glutathione S-transferase (LOC125877754), transcript variant X25, mRNA | <i>Solanum stenotomum</i>        | 756       | 756         | 97%         | 0.0     | 88.56      | 949      |

Οι αλληλουχίες που απομονώθηκαν συγκρίθηκαν με το γονίδιο μεταφοράση της γλουταθειόνης LOC104108670 του είδους *Nicotiana tomentosiformis* και με το γονίδιο μεταφοράση της γλουταθειόνης LOC107782951 του είδους *Nicotiana tabacum* L, καθώς ήταν τα 2 που έμοιαζαν περισσότερο με το απομονωμένο γονίδιο, σε ποσοστό 99,83% με την εμπρόσθια αλληλουχία και 98,04% με την ανάστροφη αλληλουχία. Επίσης, τα score, δηλαδή η ένδειξη της ποιότητας της στοίχισης των αλληλουχιών με τα γονίδια αυτά, είναι υψηλά (score 1094 της εμπρόσθιας αλυσίδας με τα 2 γονίδια και

1085 της ανάστροφης). Τέλος, η ένδειξη της στατιστικής σημαντικότητας της στοίχισης (Expected value) είναι μηδενική και για τις 2 αλληλουχίες, το οποίο υποδεικνύει πως το αποτέλεσμα δεν προέκυψε λόγω τυχαιότητας.

Το γονίδιο μεταφοράση της γλουταθειόνης LOC104108670 του είδους *Nicotiana tomentosiformis* αποτελείται από 945 ζεύγη βάσεων, περιλαμβάνει 2 εξώνια, παράγεται σε ιστούς φύλλων και η παραγωγή του επάγεται από την αυξίνη. Υπάγεται στην κλάση των φυτικών GSTs.

Η αλληλουχία του γονιδίου LOC104108670:

```
TAAGTATTATCAATTCTGAAATTTCTTATTCTTCTTCTCGCTTGCTTTTCAT
AACAATGGCGAACGAAGAGGTGATTCTGTTGGATTTCTGGCCTAGCATGT
TTGGCATGAGGCTCAGGATTGCATTAGCTGAAAAGGAGATAAAGTATGAG
TACAAAGAAGAGGACTTGAGGAACAAAAGCCCTTTGCTTTTACAAATGAA
TCCAATCCACAAGAAAATCCCAGTGTTGATTCACAATGGAAAACCCATTT
GTGAGTCTATTATTGCAGTTGAGTACATTGAAGAAGTTTGGAAAGACAAA
GCCCCTAATTTGCTCCCTTCTGATCCTTATGACAGAGCTCAAGCTAGGTTT
TGGGCTGATTACATTGACAAGAAGTTGTATGATTTTGGGAGGAAGTTATG
GACAACAAAAGGAGAAGAGCAGGAGGCAGCTAAGAAAGATTTCATAGAA
TGCCCTCAAGGTGTTGGAGGGAGCACTAGGAGACAAGCCTTACTTTGGAGG
GGAAAGTTTGGGTTTGTGGATATTGCTCTGATTGGATACTACAGCTGGTT
TTATGCCTATGAGACTTTTGGCAACTTCAGCACAGAGGCTGAGTGCCCAA
AATTTGTGGCTTGGGCCAAGAGGTGCATGCAGAGGGAGAGTGTTGCTAAG
TCTTTACCTGACCAACCTAAAGTCCTTGAGTTTGTAAAAGTGCTTAGGCAA
AAGTTTGGACTTGAGTAAACATATGAAATTATGCACCATAATGTATTA
AGAAGGCATTTTCGTTGTGCCTTCTTGATTGATGTTTCAGATATGAAGTTT
TTTGGTGGTAATGTCAGTCAGTTTACTTTTATGAGTAATAAAAGACTCTTA
GTTGTGTCATGTTAAGTGTTGGCCTTTTGTAGTCTGTATGTAAATTCTGGA
GGTTGTCAACTTTGTAGCGAGGAGTAATCATTATCA
```

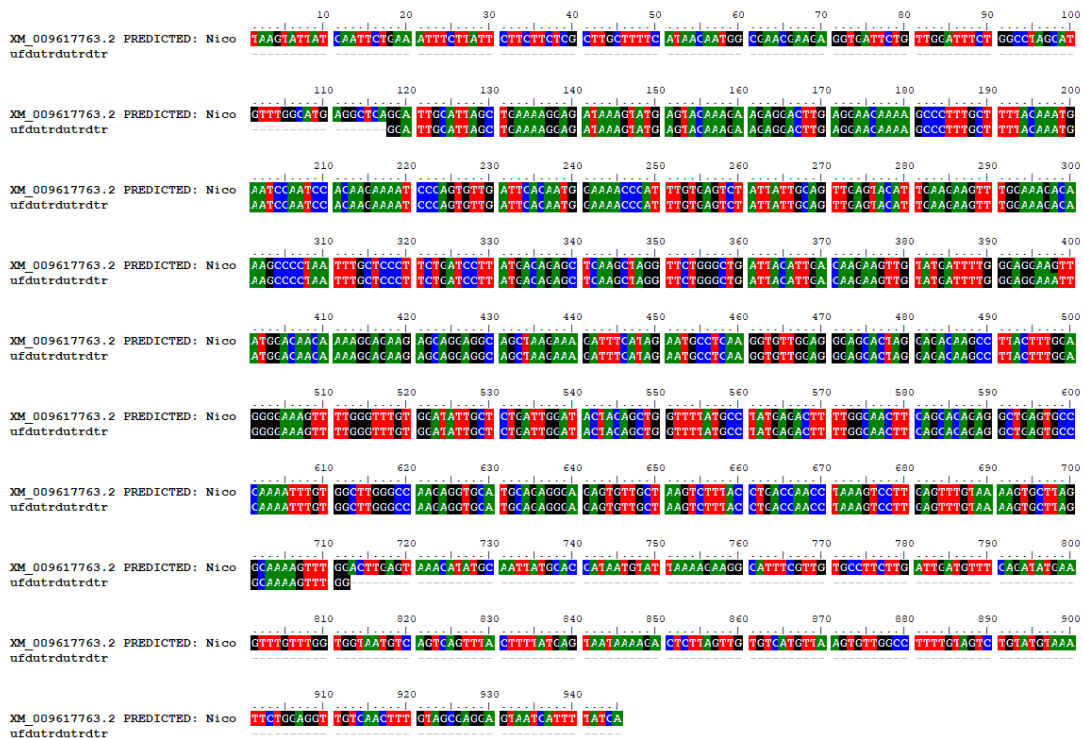
Η μετάφραση του γονιδίου δίνει την εξής αλληλουχία αμινοξέων:

```
"MANEEVILLDFWPSMFGMRLRIALAEKEIKYEYKEEDLRNKSPLLLQMNPIH
KKIPVLIHNGKPICESIIAVEYIEEVWKDKAPNLLPSDPYDRAQARFWADYIDK
KLYDFGRKLWTTKGEEQEAAKKDFIECLKVLEGALGDKPYFGGESFGFVDIA
```



LIGYYSWFYAYETFGNFS TEAECPKFVAWAKRCMQRESVAKSLPDQPKVLEF  
VKVLRQKFGLE"

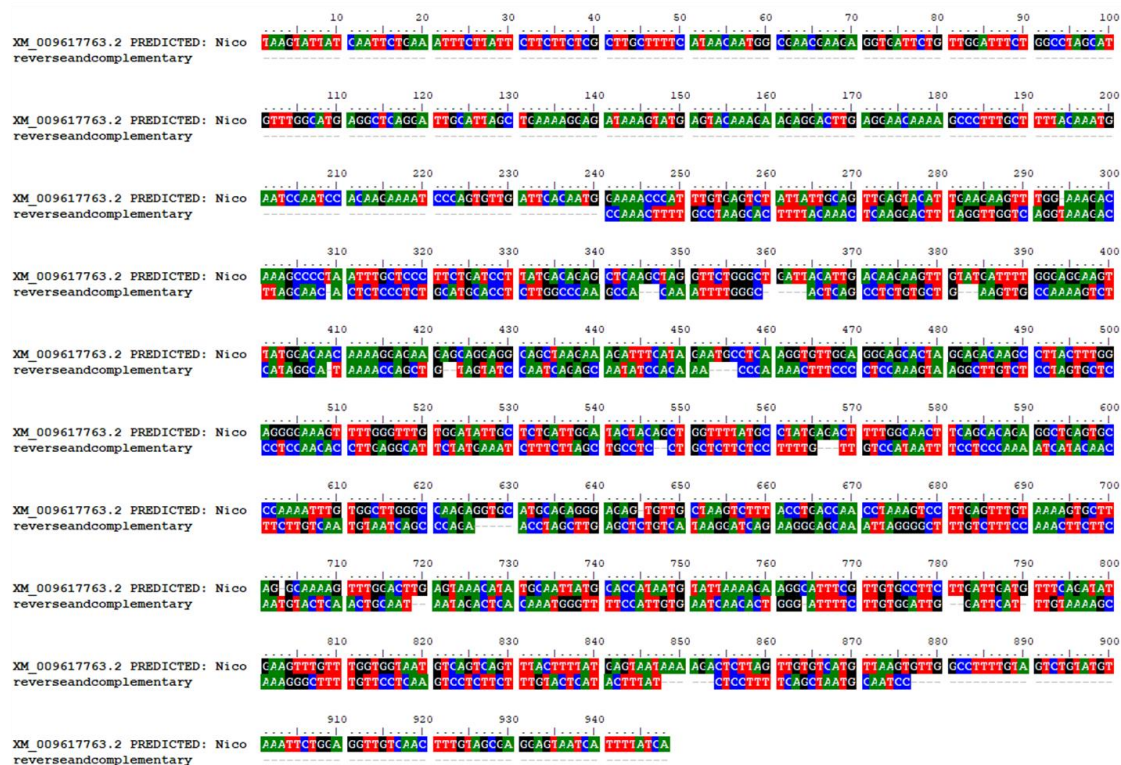
Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε στοίχιση της αλληλουχίας ολόκληρου του γονιδίου με την πρόσθια και την ανάστροφη αλληλουχία με την βοήθεια του προγράμματος Bioedit (Hall, T.A. 1999.) ώστε να καθοριστούν με ακρίβεια οι ομοιότητες και οι διαφορές που υπάρχουν ανάμεσα στις αλληλουχίες των 2 γονιδίων.



Εικόνα 21: Στοίχιση της αλληλουχίας του γονιδίου LOC104108670 με την αλληλουχία με τον εμπρόσθιο εκκινητή F3 GST tobacco.

Όπως φαίνεται, οι δύο αλληλουχίες αντιστοιχίζονται σχεδόν πλήρως, με την μόνη διαφορά στη θέση 398, που αντί για G που υπάρχει στην αλυσίδα του ολόκληρου γονιδίου, υπάρχει A στο απομονωμένο γονίδιο.

Στη συνέχεια έγινε αντιστοίχιση του ολόκληρου γονιδίου με την συμπληρωματική αλυσίδα του ανάστροφου εκκινητή.



Εικόνα 22: Στοιχισή του γονιδίου *LOC104108670* με την συμπληρωματική αλυσίδα του ανάστροφου εκκινητή *R-GST*.

Γενικά, η στοιχισή δεν είναι τόσο καλή, αφού υπάρχουν αρκετές αναντιστοιχίες βάσεων και κενά. Παρόλα αυτά, όταν η αλληλουχία εισήχθη στη βάση NCBI στο εργαλείο «nucleotide BLAST» προέκυψαν τα ίδια αποτελέσματα με την εμπρόσθια αλληλουχία, οπότε πρόκειται για το ίδιο γονίδιο.

Το 2<sup>ο</sup> γονίδιο με το οποίο συγκρίθηκαν οι 2 αλληλουχίες ήταν η μεταφοράση της γλουταθειόνης *LOC107782951* του είδους *Nicotiana tabacum L*, το οποίο είναι και το πιο πιθανό, καθώς χρησιμοποιήθηκαν πιστοποιημένοι σπόροι *Nicotiana tabacum L*.

Το γονίδιο αυτό αποτελείται από 941 ζεύγη βάσεων, έχει 2 εξώνια, παράγεται στα φύλλα και η παραγωγή του επάγεται από την αυξίνη. Υπάγεται και αυτό στην κλάση των των φυτικών GSTs.

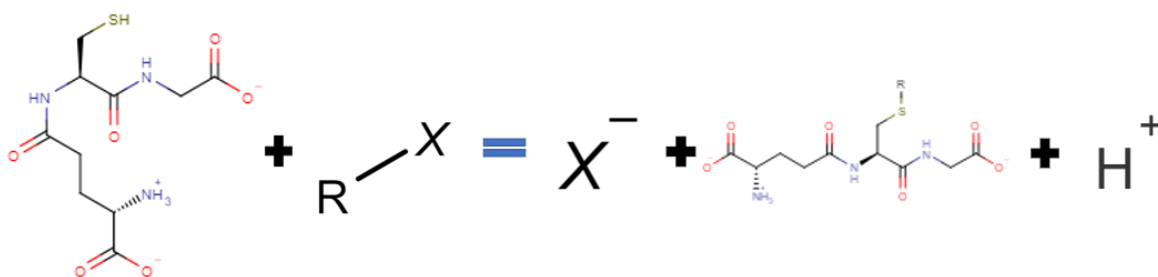
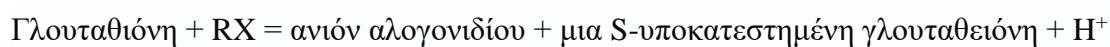
Η αλληλουχία του γονιδίου μεταφοράση της γλουταθειόνης LOC107782951:

TTTCATAACAATGGCGAACGAAGAGGTGATTCTGTTGGATTTCTGGCCTAG  
CATGTTTGCATGAGGCTCAGGATTGCATTAGCTGAAAAGGAGATAAAGTA  
TGAGTACAAAGAAGAGGACTTGAGGAACAAAAGCCCTTTGCTTTTACAAA  
TGAATCCAATCCACAAGAAAATCCCAGTGTGATTACAATGGAAAACCC  
ATTTGTGAGTCTATTATTGCAGTTGAGTACATTGAAGAAGTTTGGAAAGAC  
AAAGCCCCTAATTTGCTCCCTTCTGATCCTTATGACAGAGCTCAAGCTAGG  
TTCTGGGCTGATTACATTGACAAGAAGTTGTATGATTTTGGGAGGAAGTTA  
TGGACAACAAAAGGAGAAGAGCAGGAGGCAGCTAAGAAAGATTTTCATAG  
AATGCCTCAAGGTGTTGGAGGGAGCACTAGGAGACAAGCCTTACTTTGGA  
GGGAAAGTTTTGGGTTTGTGGATATTGCTCTGATTGGATACTACAGCTGG  
TTTTATGCCTATGAGACTTTTGGCAACTTCAGCACAGAGGCTGAGTGCCCA  
AAATTTGTGGCTTGGGCCAAGAGGTGCATGCAGAGGGAGAGTGTTGCTAA  
GTCTTTACCTGACCAACCTAAAGTCCTTGAGTTTGTAAAAGTGCTTAGGCA  
AAAGTTTGGACTTGAGTAAACATATGCAATTATGCACCATAATGTATTAA  
AAGAAGGCATTTTCGTTGTGCCTCTTGATTGATGTTTCAGATAAATGAAGTT  
TGTTTGGTGGTAATGTCAGTCAGTTTACTTTTATGAGTAATAAAAAGTCTCT  
TAGTTGTGTCATGTTAAGTGTTGGCCTTTTGTAGTCTGTATGTAAATTCTGG  
AGGTTGTCAACTTTGTAGCGAGGAGTAATCATTTTATCATTTGGCATTATC  
TATAATACAAAAGATGATTCTACTCTA

Η αλληλουχία του γονιδίου μεταφοράση της γλουταθειόνης LOC107782951, του είδους *Nicotiana tabacum L* εισήχθη στην βάση αναζήτησης πρωτεϊνών UniProt. Η πρωτεΐνη που προέκυψε αποτελείται από 221 αμινοξέα με την εξής αλληλουχία:

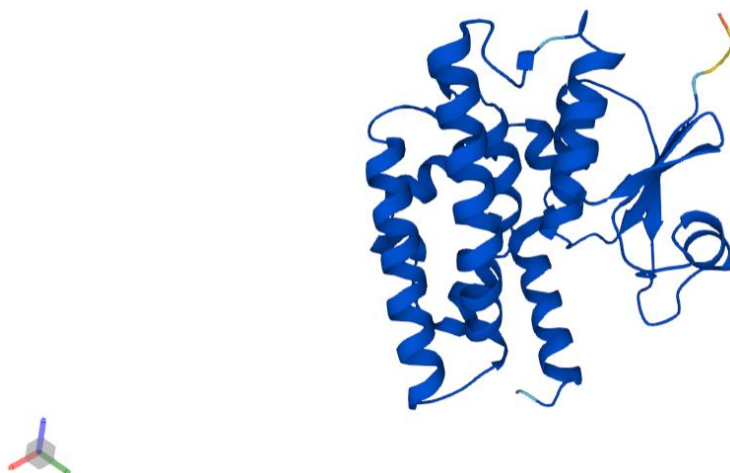
"MANEEVILLDFWPSMFGMRLRIALAEKEIKYEYKEEDLRNKSPLLLQMNPIH  
KKIPVLIHNGKPICESIIAVEYIEEVWKDKAPNLLPSDPYDRAQARFWADYIDK  
KLYDFGRKLWTTKGEEQEAAKKDFIECLKVLEGALGDKPYFGGESFGFVDIA  
LIGYYSWFYAYETFGNFSTEAECPKFVAWAKRCMQRESVAKSLPDQPKVLEF  
VKVLRQKFGLE"

Τα αμινοξέα 4-83 βρίσκονται στην GST N-τερματική περιοχή και τα αμινοξέα 90-214 στην GST C-τερματική περιοχή. Αυτή η πρωτεΐνη εντοπίζεται στο κυτόπλασμα και έχει καταλυτική δραστηριότητα:



Εικόνα 23: Αντίδραση υποκατάστασης της γλουταθειόνης

Η τρισιδιάστατη δομή της παραγόμενης πρωτεΐνης είναι η εξής:

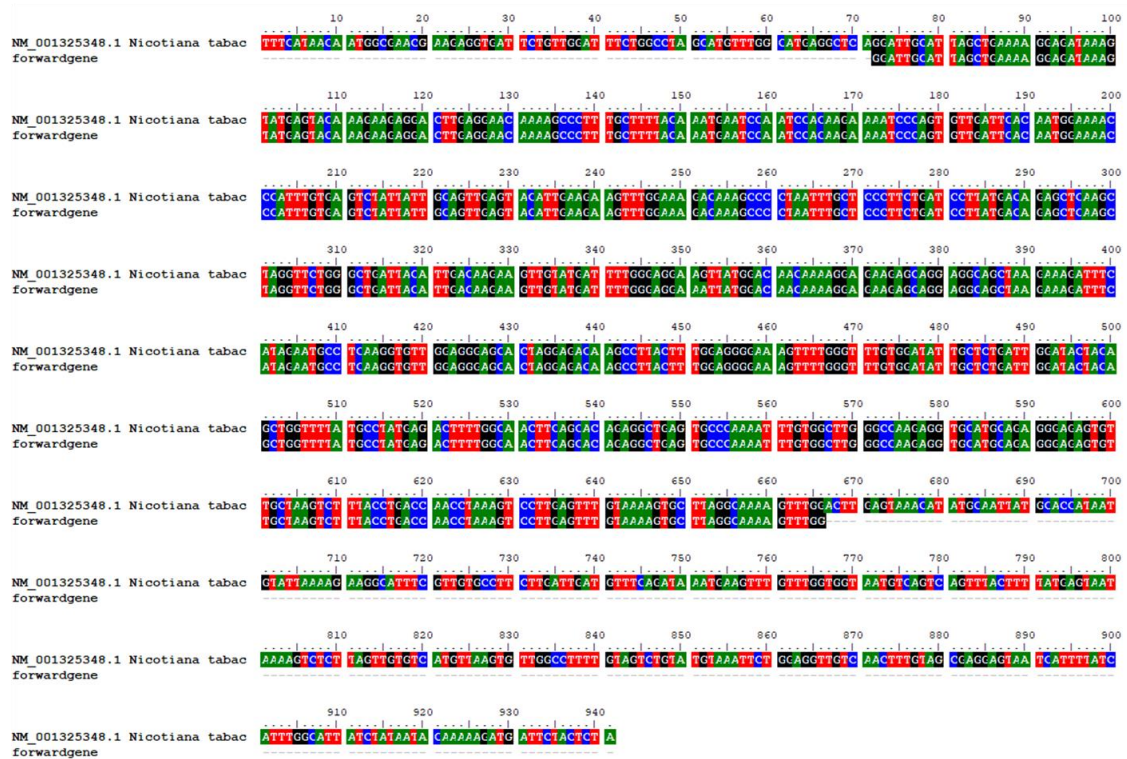


Εικόνα 24: Δομή της μεταφοράσης της γλουταθειόνης του είδους *Nicotiana tabacum* L. Η βαθμολογία εμπιστοσύνης ανά υπόλειμμα-*per-residue confidence score* (pLDDT), είναι πολύ υψηλό, >90. Για αυτό το χρώμα της πρωτεΐνης είναι κυρίως μπλε. Οι περιοχές με διαφορετικό χρώμα έχουν μικρότερη βαθμολογία και μπορεί να μην είναι καλά δομημένες κατά μια πιθανή απομόνωση.

Πρέπει επίσης να σημειωθεί πως η βαθμολογία σχολιασμού (annotation score) της πρωτεΐνης είναι 2/5 καθώς δεν είναι αναθεωρημένη. Ανήκει στο υποσύνολο

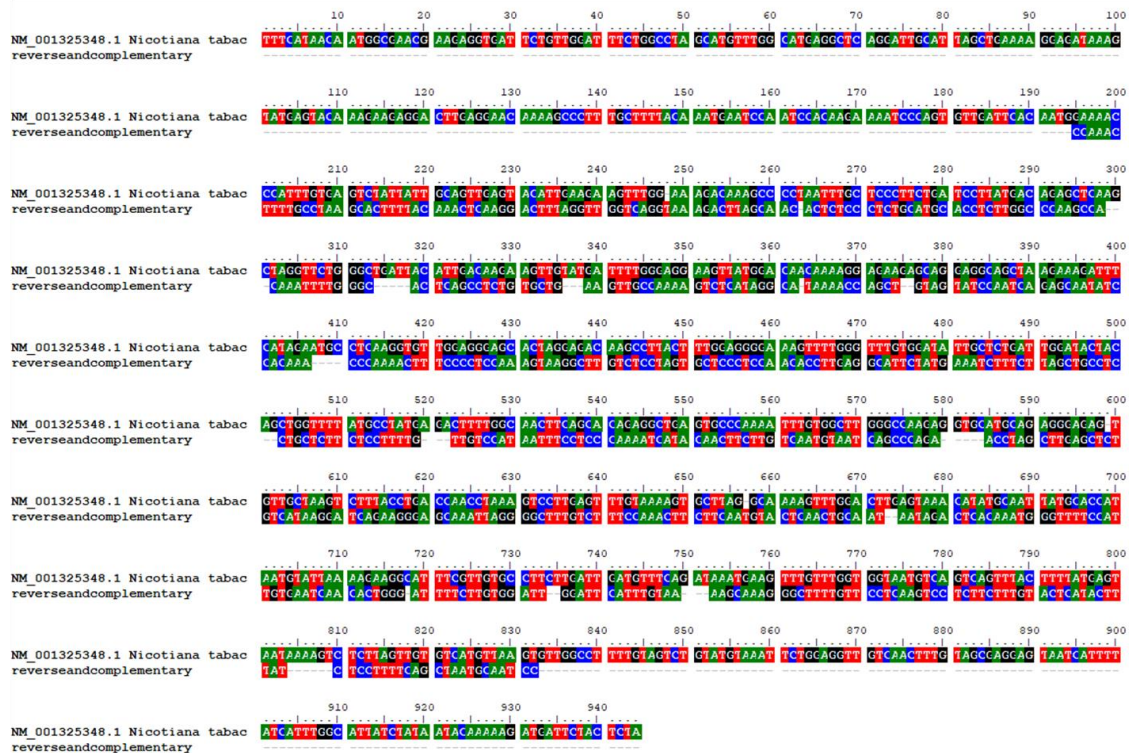
TreMBL της βάσης UniProt, δηλαδή αποτελεί μια πρωτεϊνική αλληλουχία που έχει προκύψει από αυτόματη μετάφραση της γονιδιωματικής αλληλουχίας.

Ακολούθησε η στοίχιση της αλληλουχίας ολόκληρου του γονιδίου με την πρόσθια και την ανάστροφη αλληλουχία στο πρόγραμμα Bioedit για να καθοριστούν και εδώ οι ομοιότητες και οι διαφορές που υπάρχουν ανάμεσα στις αλληλουχίες των 2 γονιδίων.



Εικόνα 25: Στοίχιση της αλληλουχίας του γονιδίου LOC107782951 με την αλληλουχία με τον πρόσθιο εκκινητή F3 GST tobacco

Ανάμεσα στις 2 αυτές αλληλουχίες υπάρχει πλήρης στοίχιση.



Εικόνα 26: Στοίχιση του γονιδίου LOC107782951 με την συμπληρωματική αλυσίδα του ανάστροφου εκκινητή R-GST.

Εδώ, όπως και στην προηγούμενη ανάλυση με τον ανάστροφο εκκινητή, δεν υπάρχει πλήρης στοίχιση και παρουσιάζονται αρκετά κενά.

Τέλος, δημιουργήθηκε μια αλυσίδα (contig) από τα 2 απομονωμένα κομμάτια του γονιδίου, χρησιμοποιώντας τις επικαλυπτόμενες περιοχές τους. Η αλληλουχία που προέκυψε με την χρήση του πρόσθιου εκκινητή και η συμπληρωματική αλυσίδα της αλληλουχίας που προέκυψε με την χρήση του ανάστροφου εκκινητή εισήχθησαν στο CAP3 Sequence Assembly Program σε μορφή FASTA (X. Huang & Madan, 1999). Η νουκλεοτιδική αλυσίδα που προέκυψε ήταν η εξής:

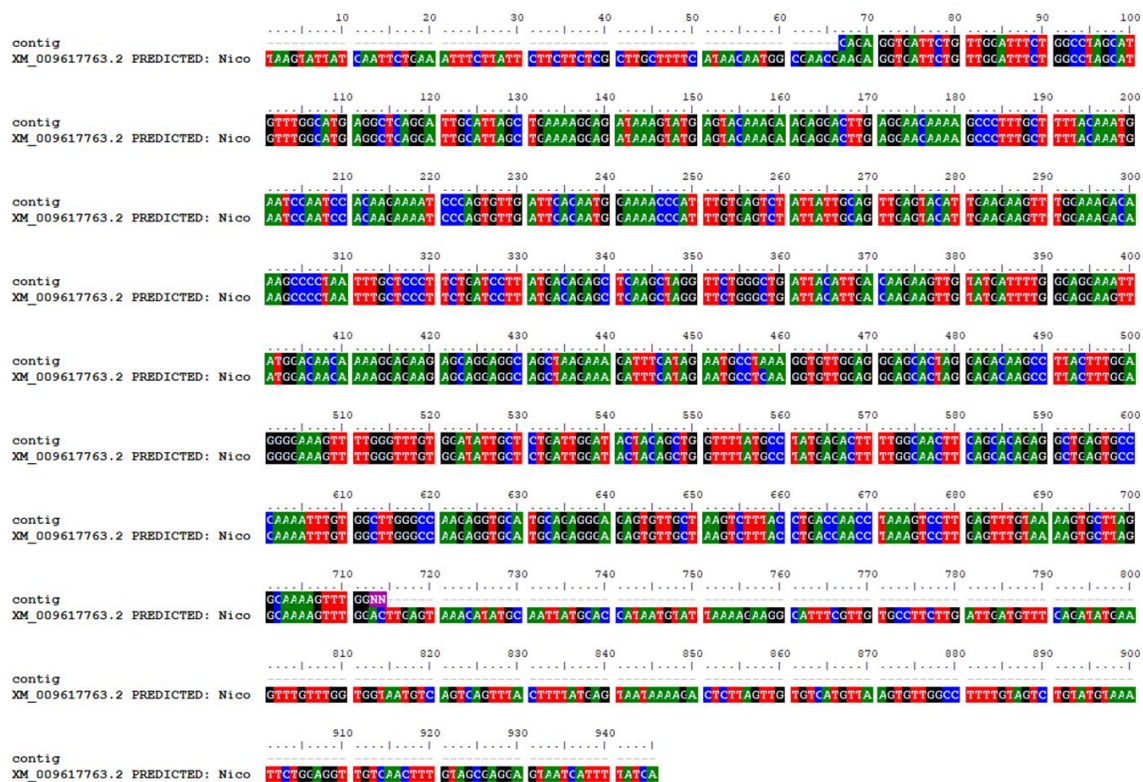
>contig

CAGAGGTGATTCTGTGGATTCTGGCCTAGCATGTTTGGCATGAGGCTCA  
GGATTGCATTAGCTGAAAAGGAGATAAAGTATGAGTACAAAGAAGAGGA  
CTTGAGGAACAAAAGCCCTTTGCTTTTACAAATGAATCCAATCCACAAGA  
AAATCCCAGTGTTGATTCACAATGGAAAACCCATTTGTGAGTCTATTATTG

CAGTTGAGTACATTGAAGAAGTTTGGAAAGACAAAGCCCCTAATTTGCTC  
CCTTCTGATCCTTATGACAGAGCTCAAGCTAGGTTCTGGGCTGATTACATT  
GACAAGAAGTTGTATGATTTTGGGAGGAAATTATGGACAACAAAAGGAG  
AAGAGCAGGAGGCAGCTAAGAAAGATTTTCATAGAATGCCTAAAGGTGTT  
GGAGGGAGCACTAGGAGACAAGCCTTACTTTGGAGGGGAAAGTTTTGGGT  
TTGTGGATATTGCTCTGATTGGATACTACAGCTGGTTTTATGCCTATGAGA  
CTTTTGGCAACTTCAGCACAGAGGCTGAGTGCCCAAATTTGTGGCTTGG  
GCCAAGAGGTGCATGCAGAGGGAGAGTGTTGCTAAGTCTTTACCTGACCA  
ACCTAAAGTCCTTGAGTTTGTAAAAGTGCTTAGGCAAAGTTTGGNN

Τα 2 N στο τέλος της αλυσίδας μπορεί να είναι να είναι οποιαδήποτε από τις 4 βάσεις (A,T,G,C)

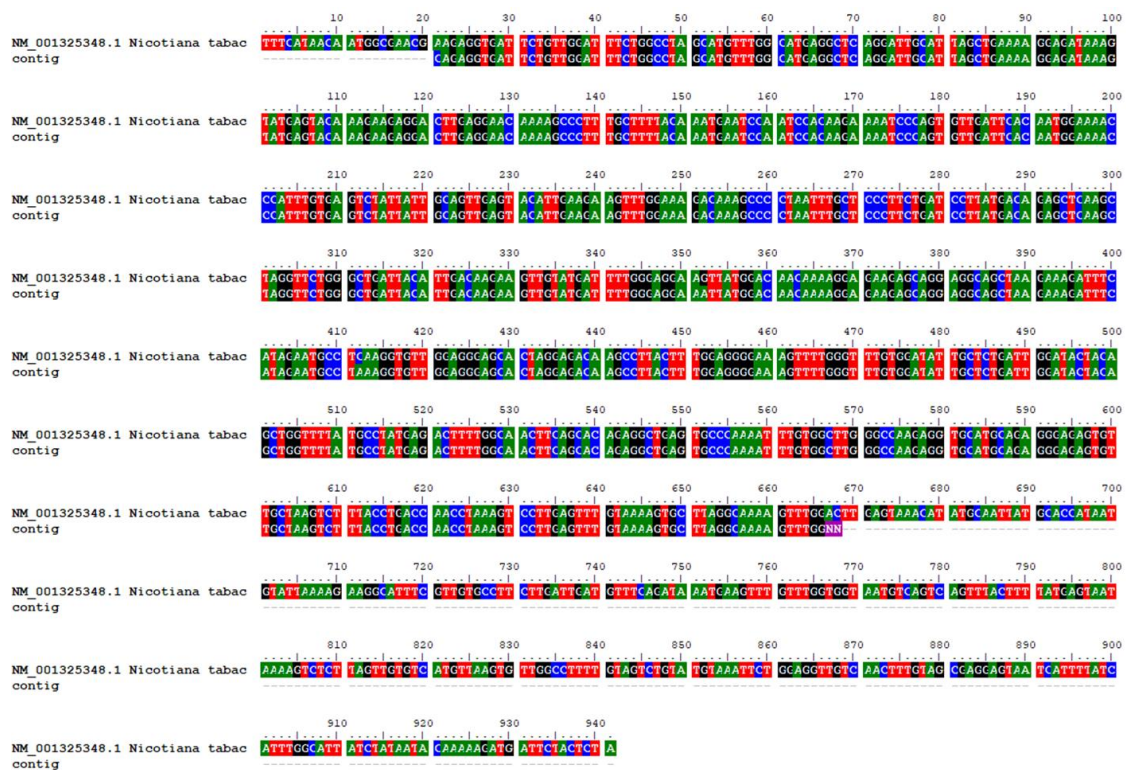
Ακόμη, έγινε στοίχιση των γονιδίων μεταφοράση της γλουταθειόνης LOC104108670 του είδους *Nicotiana tomentosiformis* και μεταφοράση της γλουταθειόνης LOC107782951 του είδους *Nicotiana tabacum L* με αυτή την αλληλουχία στο βιοπληροφορικό πρόγραμμα Bioedit.



Εικόνα 27: Στοιχίαση της αλυσίδας contig με το γονίδιο μεταφοράση της γλουταθειόνης LOC104108670 του είδους *Nicotiana tomentosiformis*.

Υπάρχουν αναντιστοιχίες βάσεων σε 5 θέσεις, στην θέση 67, στη θέση 398,στη θέση 458 και στις θέσεις 713 και 714. Η ομολογία ανάμεσα στις 2 αλληλουχίες φτάνει το 99,47%





Εικόνα 28: Στοιχισή της αλυσίδας contig με το γονίδιο μεταφοράση της γλουταθειόνης LOC107782951 του είδους *Nicotiana tabacum L.*

Η στοιχισή παρουσιάζει διαφορές και εδώ σε 5 θέσεις, στις θέσεις 21, 352, 412, 667, 668. Η ομολογία ανάμεσα στις 2 αλληλουχίες φτάνει το 99,47%.

#### 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μετά από όλες τις αναλύσεις, εκτιμάται ότι το γονίδιο που απομονώθηκε είναι η μεταφοράση της γλουταθειόνης LOC107782951 του είδους *Nicotiana tabacum L.*, καθώς υπάρχει αντιστοιχία του είδους του φυτού που χρησιμοποιήθηκε με αυτό που προέκυψε ως αποτέλεσμα από την βάση δεδομένων NCBI. Το γονίδιο αυτό αποτελείται από 941 ζεύγη βάσεων και έχει 2 εξόνια. Η ομοιότητα της αλληλουχίας που προέκυψε με την χρήση του εμπρόσθιου εκκινητή F<sub>3</sub> GST tobacco ήταν 99,83% και 98,04% με την αλληλουχία του ανάστροφου εκκινητή R-GST. Τα score ήταν υψηλά (score 1094 της εμπρόσθιας αλυσίδας και 1085 της ανάστροφης) και τα E-value ήταν μηδενικά και για τις 2 αλληλουχίες. Αυτοί οι δύο παράμετροι υποδεικνύουν την καλή στοιχισή των αλληλουχιών. Επίσης, δεν υπήρχαν μεγάλες διαφορές στις

στοιχίσεις του απομονωμένου γονιδίου και των γονιδίων των 2 ειδών *Nicotiana* που σημαίνει ότι αυτό το GST γονίδιο υπάρχει και στο είδος *Nicotiana tabacum L* και στο είδος *Nicotiana tomentosiformis*, χωρίς σημαντικές διαφορές στην αλληλουχία του. Ακόμη, αφού η ομολογία της αλληλουχίας που απομονώθηκε και των 2 γονιδίων που προέκυψαν από την βάση δεδομένων ήταν υψηλή (99.47%), σημαίνει πως οι πρωτεΐνες τους πιθανώς έχουν κοινή λειτουργία.

Η πρωτεΐνη που παράγεται από την έκφραση του γονιδίου μεταφοράς της γλουταθειόνης LOC107782951, αποτελείται από 221 αμινοξέα, εντοπίζεται στο κυτόπλασμα και έχει καταλυτική δραστηριότητα. Υπάρχει η τρισδιάστατη δομή της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στην UniProt, παρόλα αυτά δεν είναι αναθεωρημένη και σχολιασμένη. Η βαθμολογία σχολιασμού της είναι 2/5 και ανήκει στην υπομονάδα TreMBL.

Η πρωτεΐνη που παράγεται από την έκφραση του γονιδίου μεταφοράς της γλουταθειόνης LOC107782951, εντάσσεται στην κλάση ταυ και εντοπίζεται στο μονοπάτι μεταφοράς και μεταγωγής σήματος που ενεργοποιείται με αυξίνη. Η κλάση ταυ είναι υπεύθυνη για την κατάλυση αντιδράσεων που εξαρτώνται από την γλουταθειόνη με διάφορες ξενοβιοτικές ουσίες. Κυρίως δημιουργούν συζεύξεις που οδηγούν στην αποτοξίνωση κυττάρων (Cummins κ.ά., 2011). Επίσης, η πρωτεΐνη αυτή επηρεάζει την αύξηση και την ανάπτυξη του φυτού με διάφορους τρόπους, καθώς παράγεται παρουσία της φυτοορμόνης αυξίνης. Η αυξίνη προάγει την διαίρεση και την επιμήκυνση των κυττάρων, την αύξηση της ρίζας, την καθυστέρηση της γήρανσης και την κυριαρχία κορυφής (van der Zaal κ.ά., 1991). Υπάρχουν 4 είδη φυσικών αυξινών, με την πιο σημαντική την ινδολο-3-οξικό οξύ (IAA) (Lavy & Estelle, 2016). Υπάρχουν επίσης συνθετικές αυξίνες όπως τα παράγωγα του χλωροφαινοξυοξικού οξέος, του ναφθαλινοξικού οξέος (NAA), των βενζοϊκών οξέων και των πικολινικών οξέων (Korasick κ.ά., 2013). Οι συνθετικές αυξίνες έχουν βρει χρήση ως ζιζανιοκτόνα. Για παράδειγμα, στα παράγωγα του χλωροφαινοξυοξικού οξέος υπάγονται τα ζιζανιοκτόνα 2,4-D, MCPA και mecoprop, στα παράγωγα βενζοϊκών οξέων βρίσκονται το dicamba, chloramben και dinoben, ενώ στα παράγωγα των πικολινικών οξέων τα clorpyralid, fluroxypyr και triclopyr (Ζιώγας, 2017). Η ύπαρξη των ζιζανιοκτόνων, μπορεί να προκαλέσει την παραγωγή της GST πρωτεΐνης, η οποία θα τα μεταβολίσει και θα επάγει την αποτοξίνωση του φυτού. Αυτή η δράση θα μπορούσε να αξιοποιηθεί βιοτεχνολογικά, καθώς με την αύξηση της αυξίνης, θα υπερεκφραστεί το γονίδιο και

θα παραχθούν μεγαλύτερες ποσότητες της πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα να ενισχυθεί η αντοχή στα ζιζανιοκτόνα (Cummins κ.ά., 2011). Σε πείραμα που εξέτασε την παραγωγή GST πρωτεϊνών σε φυτά πατάτας σε σχέση με την εφαρμογή των ζιζανιοκτόνων, βρέθηκε πως με την εφαρμογή 2,4-D σε συγκέντρωση 50  $\mu$ M, οι παραγόμενες GSTs αυξήθηκαν κατά 280%, ενώ με την εφαρμογή dicamba στην ίδια συγκέντρωση, αυξήθηκαν κατά 180% (Peixoto κ.ά., 2008).

Τέλος, τα δυο σετ εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή του πειράματος, δηλαδή ο εμπρόσθιος F GST tobacco με τον ανάστροφο Race-amp και ο εμπρόσθιος F<sub>3</sub> GST tobacco με τον ανάστροφο R-GST, αποδείχθηκαν ικανά να απομονώσουν το συγκεκριμένο GST γονίδιο στον καπνό.

## 5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Παρουσιάζονται επιγραμματικά τα κύρια αποτελέσματα του πειράματος και των αναλύσεων:

- Το GST γονίδιο που απομονώθηκε από το φυτό *Nicotiana tabacum L.*, της ποικιλίας ΜΠΑΣΜΑΣ ΞΑΝΘΗΣ 81 (BΞ81), είναι η μεταφοράση της γλουταθειόνης LOC107782951.
- Το GST γονίδιο μεταφοράση της γλουταθειόνης LOC104108670 του είδους *Nicotiana tomentosiformis* και το γονίδιο μεταφοράση της γλουταθειόνης LOC107782951 του είδους *Nicotiana tabacum L.* έχουν σχεδόν όμοιες αλληλουχίες (διαφορές εντοπίζονται σε μεμονωμένες βάσεις) και αποδείχθηκε με βιοπληροφορικές αναλύσεις πως έχουν πιθανώς κοινή εξέλιξη και λειτουργία.
- Η μεταφοράση της γλουταθειόνης LOC107782951 αποτελείται από 941 ζεύγη βάσεων και έχει 2 εξώνια,
- Η παραγόμενη πρωτεΐνη αποτελείται από 221 αμινοξέα, βρίσκεται στο κυτόπλασμα και κατατάσσεται στην κλάση των φυτικών GSTs, ενώ εντοπίζεται στο μονοπάτι μεταφοράς και μεταγωγής σήματος που ενεργοποιείται με αυξίνη.
- Η πρωτεΐνη αυτή βοηθά κυρίως στην κυτταρική αποτοξίνωση, στην αύξηση και στην ανάπτυξη του φυτού.

- Για την απομόνωση του γονιδίου χρησιμοποιήθηκαν 2 ζευγάρια εκκινητών. Αρχικά, ο εμπρόσθιος F GST tobacco και ο ανάστροφος Race-amp και στη συνέχεια, ο εμπρόσθιος F<sub>3</sub> GST tobacco και ο ανάστροφος R-GST. Αυτοί οι εκκινητές ήταν κατάλληλοι για την απομόνωση του GST γονιδίου στο είδος *Nicotiana tabacum L.*

## 6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

### 6.1 ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

B.N. Ζιώγας, A. N. M. (2017). *Γεωργική Φαρμακολογία* (3η). Greenbooks publications.

Δ. Παπακόστα - Τασοπούλου. (2013). *Βιομηχανικά Φυτά* (B). Σύγχρονη Παιδεία.

Θεοδοσία Χαρίτου. (2023). *EClass Πανεπιστημίου Θεσσαλίας | Βιοπληροφορική | Έγγραφα*. [https://eclass.uth.gr/modules/document/?course=AGR\\_U\\_116](https://eclass.uth.gr/modules/document/?course=AGR_U_116)

Μαδέσης Παναγιώτης. (2020). *PCR* [Pdf αρχείο].

Παναγιωτάρα Δήμητρα – Άννα. (2022). *Απομόνωση και Χαρακτηρισμός GST Πρωτεϊνών από το Phaseolus coccineous*. ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ & ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ.

Τζάμος Ελευθέριος Κ. (2017). *ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ* (B). Εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε.

### 6.2 ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Andris-Widhopf, J., Steinberger, P., Fuller, R., Rader, C., & Barbas, C. F. (2011). Generation of Human scFv Antibody Libraries: PCR Amplification and Assembly of Light- and Heavy-Chain Coding Sequences. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2011(9), pdb.prot065573. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot065573>

Arrigoni, O., & De Tullio, M. C. (2002). Ascorbic acid: Much more than just an antioxidant. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1569(1–3), 1–9. [https://doi.org/10.1016/s0304-4165\(01\)00235-5](https://doi.org/10.1016/s0304-4165(01)00235-5)

Barbas, C. F., Burton, D. R., Scott, J. K., & Silverman, G. J. (2007). Quantitation of DNA and RNA. *CSH Protocols*, 2007, pdb.ip47. <https://doi.org/10.1101/pdb.ip47>

Belyavsky, A., Vinogradova, T., & Rajewsky, K. (1989). PCR-based cDNA library construction: General cDNA libraries at the level of a few cells. *Nucleic Acids Research*, 17(8), 2919–2932. <https://doi.org/10.1093/nar/17.8.2919>

Budzianowski, J. (2009). [New role for tobacco—Production of biopharmaceuticals]. *Przegląd Lekarski*, 66(10), 894–897.

Chan, C., & Lam, H.-M. (2014). A putative lambda class glutathione S-transferase enhances plant survival under salinity stress. *Plant & Cell Physiology*, *55*(3), 570–579. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct201>

Chen, J.-H., Jiang, H.-W., Hsieh, E.-J., Chen, H.-Y., Chien, C.-T., Hsieh, H.-L., & Lin, T.-P. (2012). Drought and salt stress tolerance of an *Arabidopsis* glutathione S-transferase U17 knockout mutant are attributed to the combined effect of glutathione and abscisic acid. *Plant Physiology*, *158*(1), 340–351. <https://doi.org/10.1104/pp.111.181875>

*Chromas* (2.5.0). (1998). Technelysium Pty Ltd. <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>

Cornelis, G. R., & Van Gijsegem, F. (2000). Assembly and function of type III secretory systems. *Annual Review of Microbiology*, *54*, 735–774. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.735>

Crossley, B. M., Bai, J., Glaser, A., Maes, R., Porter, E., Killian, M. L., Clement, T., & Toohey-Kurth, K. (2020). Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *32*(6), 767–775. <https://doi.org/10.1177/1040638720905833>

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. <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.552910>

Dixon, D. P., Laphorn, A., & Edwards, R. (2002). Plant glutathione transferases. *Genome Biology*, *3*(3), REVIEWS3004. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-3-reviews3004>

Edwards, R., & Dixon, D. P. (2005). Plant glutathione transferases. *Methods in Enzymology*, *401*, 169–186. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)01011-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)01011-6)

Estevezj. (2012). Own work. <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sanger-sequencing.svg>

Excedr. (2022, Φεβρουάριος 7). *What is RNase? The Basics of Ribonuclease*. Excedr. <https://www.excedr.com/resources/what-is-rnase-the-basics-of-ribonuclease/>

*FastGene 1 kb DNA Marker Plus*. (2018, Ιούλιος 5). NIPPON Genetics EUROPE. <https://www.nippongenetics.eu/en/products/electrophoresis-dna-rna/dna-ladder/1-kb-dna-ladder/>

Fatica, A., Di Lucia, F., Marino, S., Alvino, A., Zuin, M., De Feijter, H., Brandt, B., Tommasini, S., Fantuz, F., & Salimei, E. (2019). Study on analytical characteristics of *Nicotiana tabacum* L L., cv. Solaris biomass for potential uses in nutrition and biomethane production. *Scientific Reports*, 9(1), 16828. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53237-8>

Gavilano, L. B., Coleman, N. P., Burnley, L.-E., Bowman, M. L., Kalengamaliro, N. E., Hayes, A., Bush, L., & Siminszky, B. (2006). Genetic engineering of *Nicotiana tabacum* L for reduced normicotine content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(24), 9071–9078. <https://doi.org/10.1021/jf0610458>

Gonneau, M., Mornet, R., & Laloue, M. (1998). A *Nicotiana plumbaginifolia* protein labeled with an azido cytokinin agonist is a glutathione S-transferase. *Physiologia Plantarum*, 103(1), 114–124. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1998.1030114.x>

Hall, T.A. (1999). *BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT*. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.

Huang, G.-T., Ma, S.-L., Bai, L.-P., Zhang, L., Ma, H., Jia, P., Liu, J., Zhong, M., & Guo, Z.-F. (2012). Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. *Molecular Biology Reports*, 39(2), 969–987. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-0823-1>

Huang, X., & Madan, A. (1999). CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research*, 9(9), 868–877. <https://doi.org/10.1101/gr.9.9.868>

Irini Nianiou-Obeidat<sup>1\*</sup>, Panagiotis Madesis<sup>2</sup>, Nikolaos E. Labrou<sup>3</sup>, Athanasios Tsaftaris<sup>1,2</sup>. (2010). *Glutathione transferases mediated plant tolerance to biotic and abiotic stresses*.

Jube, S., & Borthakur, D. (2007). Expression of bacterial genes in transgenic tobacco: Methods, applications and future prospects. *Electronic Journal of Biotechnology: EJB*, 10(3), 452–467. <https://doi.org/10.2225/vol10-issue3-fulltext-4>

Kishore, K. (2014). *MONOGRAPH OF TOBACCO (NICOTIANA TABACUM L)*.

- Kooiker, M., & Xue, G.-P. (2014). CDNA library preparation. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1099, 29–40. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-715-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-715-0_5)
- Korasick, D. A., Enders, T. A., & Strader, L. C. (2013). Auxin biosynthesis and storage forms. *Journal of Experimental Botany*, 64(9), 2541–2555. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert080>
- Lavy, M., & Estelle, M. (2016). Mechanisms of auxin signaling. *Development (Cambridge, England)*, 143(18), 3226–3229. <https://doi.org/10.1242/dev.131870>
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 62, 3923. <https://doi.org/10.3791/3923>
- Marrs, K. A. (1996). THE FUNCTIONS AND REGULATION OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASES IN PLANTS. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47, 127–158. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.127>
- Mertens, D., Boege, K., Kessler, A., Koricheva, J., Thaler, J. S., Whiteman, N. K., & Poelman, E. H. (2021). Predictability of Biotic Stress Structures Plant Defence Evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 36(5), 444–456. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2020.12.009>
- Moons, A. (2005). Regulatory and functional interactions of plant growth regulators and plant glutathione S-transferases (GSTs). *Vitamins and Hormones*, 72, 155–202. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(05\)72005-7](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(05)72005-7)
- Morris, R. (2015). Spectrophotometry. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 11(1). <https://doi.org/10.1002/9780470089941.et0201s11>
- Muthamilarasan, M., & Prasad, M. (2013). Plant innate immunity: An updated insight into defense mechanism. *Journal of Biosciences*, 38(2), 433–449. <https://doi.org/10.1007/s12038-013-9302-2>
- Nejat, N., & Mantri, N. (2017). Plant Immune System: Crosstalk Between Responses to Biotic and Abiotic Stresses the Missing Link in Understanding Plant Defence. *Current Issues in Molecular Biology*, 23, 1–16. <https://doi.org/10.21775/cimb.023.001>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2139-7>

Pearson, W. R. (2013). An Introduction to Sequence Similarity (“Homology”) Searching. *Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D. Baxevanis ... [et al.]*, 0 3, 10.1002/0471250953.bi0301s42. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0301s42>

Peixoto, F. P., Gomes-Laranjo, J., Vicente, J. A., & Madeira, V. M. C. (2008). Comparative effects of the herbicides dicamba, 2,4-D and paraquat on non-green potato tuber calli. *Journal of Plant Physiology*, 165(11), 1125–1133. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.12.013>

Ren, N., & Timko, M. P. (2001). AFLP analysis of genetic polymorphism and evolutionary relationships among cultivated and wild *Nicotiana* species. *Genome*, 44(4), 559–571.

Roxas, V. P., Smith, R. K., Allen, E. R., & Allen, R. D. (1997). Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nature Biotechnology*, 15(10), 988–991. <https://doi.org/10.1038/nbt1097-988>

Saijo, Y., & Loo, E. P.-I. (2020). Plant immunity in signal integration between biotic and abiotic stress responses. *The New Phytologist*, 225(1), 87–104. <https://doi.org/10.1111/nph.15989>

Shendure, J., & Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*, 26(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/nbt1486>

Sonagra, A. D., & Dholariya, S. J. (2023). Electrophoresis. Στο *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK585057/>

Tan, S. C., & Yiap, B. C. (2009). DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *BioMed Research International*, 2009, e574398. <https://doi.org/10.1155/2009/574398>

The UniProt Consortium. (2023). UniProt: The Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D523–D531. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>

- Thom, R., Dixon, D. P., Edwards, R., Cole, D. J., & Laphorn, A. J. (2001). The structure of a zeta class glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana*: Characterisation of a GST with novel active-site architecture and a putative role in tyrosine catabolism<sup>11</sup>Edited by I. A. Wilson. *Journal of Molecular Biology*, *308*(5), 949–962. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4638>
- Tropp, B. E. (2013). *Principles of molecular biology* (1st ed). Jones & Bartlett Learning.
- Udomsinprasert, R., Pongjaroenkit, S., Wongsantichon, J., Oakley, A. J., Prapanthadara, L., Wilce, M. C. J., & Ketterman, A. J. (2005). Identification, characterization and structure of a new Delta class glutathione transferase isoenzyme. *The Biochemical Journal*, *388*(Pt 3), 763–771. <https://doi.org/10.1042/BJ20042015>
- Vaish, S., Parveen, R., Rajneesh, null, Singh, N., Gupta, D., & Basantani, M. K. (2022). Computational insights into diverse aspects of glutathione S-transferase gene family in *Papaver somniferum*. *Journal of Plant Research*, *135*(6), 823–852. <https://doi.org/10.1007/s10265-022-01408-6>
- van der Zaal, E. J., Droog, F. N., Boot, C. J., Hensgens, L. A., Hoge, J. H., Schilperoort, R. A., & Libbenga, K. R. (1991). Promoters of auxin-induced genes from tobacco can lead to auxin-inducible and root tip-specific expression. *Plant Molecular Biology*, *16*(6), 983–998. <https://doi.org/10.1007/BF00016071>
- Wang, Y., Bao, Z., Zhu, Y., & Hua, J. (2009). Analysis of temperature modulation of plant defense against biotrophic microbes. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, *22*(5), 498–506. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-5-0498>
- Wilce, M. C., & Parker, M. W. (1994). Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1205*(1), 1–18. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(94\)90086-8](https://doi.org/10.1016/0167-4838(94)90086-8)
- Zhao, J., & Dixon, R. A. (2010). The ‘ins’ and ‘outs’ of flavonoid transport. *Trends in Plant Science*, *15*(2), 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.11.006>
- Zhu, J.-K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*, *53*, 247–273. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.091401.143329>

