


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



**Επίδραση αβιοτικών  
καταπονήσεων στην έκφραση  
γονιδίων βιοσύνθεσης  
τριτερπενοειδών στο *Lotus  
japonicus***

**Πετρογιαννάκης Γεώργιος**

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Παπαδοπούλου Καλλιόπη (επιβλέπουσα)**

**Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών**

**Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος**

**Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας**

**Τσίκου Δανιέλα**

**Διδάσκουσα ΠΔ 407 Βιοτεχνολογία Φυτών, Μοριακή και Αναπτυξιακή  
Βιολογία Φυτών, Φυσιολογία Φυτών**

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Αρχικά, θα ήθελα και θεωρώ χρέος μου να ευχαριστήσω την καθηγήτρια Παπαδοπούλου Καλλιόπη για την ανάθεση και την επίβλεψη της παρούσας εργασίας. Εν συνεχεία, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Κροκιδά Αφροδίτη για την εργαστηριακή της υποστήριξη, τις συμβουλές και την υπομονή της για την αποπεράτωση της παρούσας εργασίας. Τέλος, ευχαριστώ ιδιαιτέρως τη διδάσκουσα ΠΔ 407 Τσίκου Δανιέλα καθώς και τον καθηγητή Μαθιόπουλο Κωνσταντίνο, οι οποίοι και αυτοί συγκροτούν την τριμελή επιτροπή αξιολόγησής μου.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

---

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	7
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	8
1. Τα ψυχανθή και το <i>Lotus japonicus</i> ως φυτό-μοντέλο.....	8
2. Η συμβιωτική σχέση ριζοβίου – ψυχανθούς.....	10
3. Δευτερογενείς μεταβολίτες .....	11
3.1. Τερπενοειδή.....	13
3.2. Βιοσύνθεση τερπενοειδών και τριτερπενοειδών .....	14
4. OSCs.....	18
5. Ένζυμα του κυτοχρώματος P450 (P450s ή CYPs) .....	20
6. OSCs στο <i>Lotus japonicus</i> .....	22
7. Γονιδιακές συστοιχίες για τη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών .....	23
8. Αβιοτικές καταπονήσεις .....	24
8.1. Καταπόνηση αλατότητας .....	25
8.2. Καταπόνηση υψηλής και χαμηλής θερμοκρασίας.....	26
9. Σκοπός της παρούσας μελέτης.....	27
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	28
1. Προετοιμασία των σπόρων .....	28
2. Διαδικασία επίδρασης αβιοτικών καταπονήσεων.....	29
3. Απομόνωση ολικού RNA (RNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN).....	29

4. Χειρισμός του ολικού RNA με DNάση (Invitrogen) .....	30
5. Προσδιορισμός συγκέντρωσης νουκλεϊκών οξέων.....	31
6. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	31
6.1. Έλεγχος ύπαρξης γονιδιωματικού DNA με PCR.....	32
7. Ανάλυση νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτή αγαρόζης .....	33
8. Σύνθεση cDNA από RNA με το ένζυμο SuperscriptII RT, Invitrogen .....	34
9. PCR πραγματικού χρόνου (real time PCR) .....	36
9.1. Επιλογή των εκκινήτων.....	36
9.2. Αντίδραση της real time PCR.....	37
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	39
1. Εξαγωγή RNA από τις ρίζες των φυτών που αναπτύσσονται σε συνθήκες καταπόνησης. ....	39
2. Αντίδραση PCR για τον έλεγχο ύπαρξης γονιδιωματικού DNA .....	40
3. Έλεγχος της έκφρασης των γονιδίων LjAMY2, LjCYP71D353 και LjCYP88D541	
3.1. Έλεγχος της έκφρασης έπειτα από καταπόνησης αλατότητας (salt-stress).41	
3.2. Έλεγχος έκφρασης έπειτα από καταπόνηση υψηλής θερμοκρασίας (heat-stress) και ψύχους (cold-stress).....	43
Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	45
Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	48

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

---

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι ενώσεις των φυτών οι οποίες δεν απαιτούνται για την διεξαγωγή των βασικών φυσιολογικών λειτουργιών τους. Η σύνθεσή τους, όμως, έχει αποδειχθεί πως συνδέεται με την ύπαρξη αμυντικών μηχανισμών, αναγκαίων για την επιβίωση των φυτών. Τα τριτερπενοειδή αποτελούν υποκατηγορία των τερπενοειδών, που είναι η μεγαλύτερη κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών. Η βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών εμπλέκει πολυάριθμα γονίδια και ένζυμα. Σε κάποια φυτά, τα γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών, φάνηκε πως οργανώνονται σε γονιδιακές συστοιχίες όμοιες με οπερόνια. Οι γονιδιακές συστοιχίες αυτές, κωδικοποιούν πρωτεΐνες, όπως συνθάσες και ένζυμα του κυτοχρώματος P-450, για τη σύνθεση και τροποποίηση των τριτερπενοειδών. Στο ψυχανθές *Lotus japonicus*, το γονίδιο *LjAMY2* κωδικοποιεί μια συνθάση που παράγει δύο πρόδρομα μόρια του μονοπατιού βιοσύνθεσης τριτερπενοειδών, τη β-αμυρίνη και τη λουπεόλη. Στη γονιδιωματική περιοχή γύρω από το *LjAMY2* εντοπίστηκαν τα γονίδια *LjCYP71D353* και *LjCYP88D5* που κωδικοποιούν ένζυμα του κυτοχρώματος P450. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε έλεγχος της έκφρασης των τριών αυτών γονιδίων με Real-Time PCR, υπό την επήρεια τριών αβιοτικών καταπονήσεων. Οι αβιοτικές καταπονήσεις προκαλούνται από ένα πλεόνασμα ή μια έλλειψη στο φυσικό ή χημικό περιβάλλον του φυτού. Στόχος ήταν η παρατήρηση του μεταγραφικού προφίλ των τριών γονιδίων και πως αυτό διαμορφώνεται από τις καταπονήσεις, με απώτερο σκοπό τη διαπίστωση ύπαρξης ή μη, της γονιδιακής συστοιχίας. Γονίδια που οργανώνονται στην ίδια συστοιχία, συρρυθμίζονται και ακολουθούν κοινό προφίλ μεταγραφής.

# ABSTRACT

---

Secondary metabolites are plant compounds that are not required for their basic physiological functions. Although, their biosynthesis is approved to be related with defense mechanisms, necessary for plant survival. Triterpenoids consist a subclass of terpenoids, which is the largest secondary metabolites category. Triterpenoid biosynthesis involves numerous genes and enzymes. In some plants, genes involved in triterpenoid biosynthesis, seemed to be organized in operon-like gene clusters. These clusters encode proteins, such as synthases and cytochrome P-450 enzymes, that implicate in triterpenoid synthesis and modification. The gene *LjAMY2* of the legume *Lotus japonicus*, encodes a synthase that produces two precursors of the triterpenoid biosynthesis pathway :  $\beta$ -amyrin and lupeol. Nearby the genomic region of *LjAMY2*, were identified two genes: *LjCYP71D353* and *LjCYP88D5*. These genes encode enzymes of cytochrome P-450. In the present work, Real-Time PCR was used to carry out the expression profile of these three genes under three abiotic stress conditions. Abiotic stresses are caused by a surplus or a deficit in plant environment. Aim of this study was to observe the transcriptional profile of the three genes affected by the stresses and to determine if the gene cluster exists or not. Genes parts of the same cluster, are co-regulated and show similar transcriptional patterns.

# A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

## 1. Τα ψυχανθή και το *Lotus japonicus* ως φυτό-μοντέλο

Τα ψυχανθή (Papilionaceae ή Fabaceae) ανήκουν στην τάξη των χεδρωπών (Leguminosae ή Fabales) και αποτελούν μια εξαιρετικά σημαντική οικογένεια φυτών. Είναι βασική πηγή τροφής για τον άνθρωπο και τα ζώα και επίσης, χρησιμοποιούνται ως πρώτες ύλες για παραγωγή πολυάριθμων βιομηχανικών προϊόντων (Graham and Vance, 2003). Ακόμα, τα περισσότερα ψυχανθή παρουσιάζουν ένα βασικότατο χαρακτηριστικό: την ικανότητα συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης. Στο ριζικό τους σύστημα, αναπτύσσονται διάφορα είδη της οικογένειας *Rhizobiaceae*, που έχουν την ικανότητα δέσμευσης του ατμοσφαιρικού αζώτου. Η αλληλεπίδραση του βακτηρίου με τη ρίζα έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία χαρακτηριστικών διογκώσεων, τα φυμάτια, όπου πραγματοποιείται και η αζωτοδέσμευση.

Υπολογίζεται ότι περίπου 40-60 εκατομμύρια τόνοι αζώτου παρέχονται ετησίως από τα καλλιεργούμενα ψυχανθή, με αποτέλεσμα να εξοικονομούνται περίπου 10 δισεκατομμύρια σε λίπασμα (Smil, 1999). Τα ψυχανθή βρίσκονται στην τρίτη θέση των φυτών εντατικής καλλιέργειας, έχουν μεγάλη διαιτητική αξία και παρέχουν μεγάλες ποσότητες ελαίου. Επιπλέον, παράγουν ένα ευρύ φάσμα δευτερογενών ενώσεων, που χρησιμοποιούνται με θετικά αποτελέσματα ως συστατικά φαρμάκων (Dixon and Sumner, 2003). Κάποια από αυτά, παγκοσμίου σημασίας, είναι η σόγια (*Glycine max*), η φακή (*Lens esculenta*) και το μπιζέλι (*Pisum sativum*). Παρ' όλη, όμως, τη σημασία των ψυχανθών για τη γεωργία, μια πληθώρα βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων (όπως αλατότητα, ξηρασία, οξύτητα εδάφους, ζιζάνια, ασθένειες κ.ά.) δεν επιτρέπουν την



αύξηση της παραγωγής, με αποτέλεσμα η παραγωγή τους να υστερεί σημαντικά, σε σύγκριση με αυτή των σιτηρών (Graham and Vance, 2003). Η δημιουργία ανθεκτικών φυτών στις παραπάνω καταπονήσεις παραμένει κύριος στόχος των ερευνητών. Αν και οι έρευνες σε μη-ψυχανθή φυτά (π.χ. *Arabidopsis thaliana*), παρέχουν πολλές πληροφορίες για τη βιολογία των φυτών, δεν μπορούν να συμπεριληφθούν χαρακτηριστικά των ψυχανθών, όπως η αζωτοδέσμευση (Udvardi et al., 2005). Γι' αυτό το λόγο, επιλέχθηκαν δύο φυτά ως μοντέλα, για τη φυσιολογική και τη γενετική μελέτη των ψυχανθών : το *Lotus japonicus* και το *Medicago truncatula*.

Το γένος *Lotus* αποτελείται από περισσότερα των 200 είδη. Από αυτά, σύμφωνα με τις μέχρι τώρα έρευνες, μόνο τα είδη *L. corniculatus*, *L. uliginosus*, *L. tenuis* έχουν αγροοικονομική σημασία (Handberg and Stougaard, 1992). Για την επιλογή του διπλοειδούς *L. japonicus* (εικόνα 1) στη μελέτη των ψυχανθών, συνετέλεσαν τα εξής πλεονεκτήματά του:

- το μικρό του μέγεθος
- ο σχετικά μικρός κύκλος ζωής (2 – 3 μήνες)
- η ικανότητα αυτογονιμοποίησης του
- το μικρό μέγεθος του γονιδιώματος του (472.1 Mb) και
- η σχετικά εύκολη δημιουργία διαγονιδιακών φυτών.



**Εικόνα 1:** Το *Lotus japonicus* (αριστερά) και ο καρπός του (δεξιά)

## 2. Η συμβιωτική σχέση ριζοβίου – ψυχανθούς

Η συμβιωτική σχέση δέσμευσης του μοριακού αζώτου, είναι το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης μεταξύ των ψυχανθών φυτών και των βακτηρίων της οικογένειας *Rhizobiaceae* του εδάφους (γένη *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium* και *Bradyrhizobium*), τα οποία καλούνται, με τον γενικότερο όρο, ριζόβια. Όπως προαναφέρθηκε, η αλληλεπίδραση μεταξύ φυτών και ριζοβίων έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός νέου φυτικού οργάνου, το φυμάτιο. Για το σχηματισμό του, αρχικά, πραγματοποιείται αλληλοαναγνώριση των δύο συμβιωτών. Έπειτα, τα βακτήρια εισέρχονται στη ρίζα του φυτού, πολλαπλασιάζονται και εγκαθίστανται στα ριζικά κύτταρα (Ρουμπελάκη – Αγγελάκη, 2003).

Στο φυμάτιο τα βακτηριοειδή μετατρέπουν το ατμοσφαιρικό άζωτο σε αμμωνία, η οποία αφομοιώνεται από το φυτό ως γλουταμίνη και γλουταμινικό οξύ (Long, 1989). Ως αντάλλαγμα, το φυτό παρέχει στους μικροσυμβιώτες άνθρακα για την ανάπτυξή τους και την παραγωγή ενέργειας. Τα φυμάτια εξαρτώνται αρχικά από την παραγωγή και το μεταβολισμό της σουκρόζης για να διασφαλίσουν την απαιτούμενη ενέργεια, ώστε να αφομοιώσουν την αμμωνία και να εξάγουν αμινοξέα και άλλες ενώσεις του αζώτου (Vance et al., 1997). Επί προσθέτως, η σουκρόζη είναι η πρωταρχική πηγή ανθρακικών σκελετών για την παραγωγή κυτταρίνης και τη βιοσύνθεση του αμύλου κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του φυματίου.

Έχουν χαρακτηριστεί δύο διαφορετικοί τύποι φυματίων, τα καθορισμένα και τα μη καθορισμένα φυμάτια (Hadri and Bisseling, 1998). Τα καθορισμένα φυμάτια στερούνται τη συνεχή δραστηριότητα του μεριστώματος και είναι σφαιρικά. Έχουν μικρή διάρκεια ζωής και καθώς η ρίζα επιμηκύνεται, σχηματίζονται καινούρια. Στα μη καθορισμένα φυμάτια παρατηρείται συνεχής δραστηριότητα του μεριστώματος και οι συνεχείς κυτταροδιαίρεσεις συμβάλουν στη δημιουργία φυματίων κυλινδρικού σχήματος (εικόνα 2). Τα μη καθορισμένα φυμάτια, σε αντίθεση με τα καθορισμένα, διαθέτουν εκτεταμένο σύστημα ηθμαγγειωδών δεσμίδων. Επιπλέον, τις περισσότερες φορές, αποθηκεύουν το άμυλο και στα μολυσμένα και στα μη μολυσμένα κύτταρα, σε αντίθεση με τα καθορισμένα φυμάτια, στα οποία το άμυλο δεν εντοπίζεται στα μολυσμένα κύτταρα (Gordon et al., 1992).

Η εδραίωση της συμβίωσης πραγματοποιείται έπειτα από πολλές διεργασίες και αλληλεπιδράσεις και από τους δύο συμβιωτές (Long, 2001). Φυτικά σήματα (που είναι

φλαβονοειδή) εξέρχονται από τη ρίζα, ενεργοποιούν τα *nod* γονίδια των ριζοβίων και, σαν αποτέλεσμα, παράγονται σήματα λιποχιτοολιγосακχαριδιακής φύσης από τα ριζόβια, που καλούνται Nod παράγοντες. Οι παράγοντες αυτοί είναι βιομόρια που δρουν ως δευτερογενή σήματα για τη μορφογενετική τροποποίηση του φυτού στο σημείο προσβολής, δηλαδή για τη δημιουργία των φυματίων. Τέλος, η δέσμευση του ατμοσφαιρικού αζώτου σε αμμωνία στα φυμάτια, πραγματοποιείται με τη δράση ενός ενζύμου των βακτηρίων, τη νιτρογενάση.



*Εικόνα 2:* Φυμάτια στις ρίζες του *M. truncatula* και του *L. japonicus*. Το *M. truncatula* (αριστερά) σχηματίζει μη καθορισμένα φυμάτια ενώ το *L. japonicus* (δεξιά) σχηματίζει καθορισμένα.

### 3. Δευτερογενείς μεταβολίτες

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι ενώσεις των φυτών οι οποίες δε φαίνεται να απαιτούνται για την ομαλή διεξαγωγή των βασικών φυσιολογικών λειτουργιών που είναι κοινές σε όλα τα φυτά και αναγκαίες για την ομαλή αύξηση και ανάπτυξη τους. Σε

αντίθεση προς τους πρωτογενείς μεταβολίτες (π.χ. χλωροφύλλη, αμινοξέα, νουκλεοτίδια, κ.α.), οι δευτερογενείς δεν έχουν γενικά αναγνωρισμένους ρόλους στις διαδικασίες φωτοσύνθεσης, αναπνοής, μεταφοράς διαλυμένων ουσιών, αφομοίωσης θρεπτικών ουσιών και διαφοροποίησης. Παλαιότερα, είχε θεωρηθεί ότι οι συγκεκριμένοι μεταβολίτες αντιπροσώπευαν απόβλητα ή παραπροϊόντα του πρωτογενούς μεταβολισμού. Σήμερα όμως, είναι πλέον αποδεκτό ότι η σύνθεση των δευτερογενών μεταβολιτών συνδέεται με την ύπαρξη και λειτουργία θεμελιωδών αμυντικών μηχανισμών, αναγκαίων για την επιβίωση των φυτών (Καραμπουρνιώτης, 2003; Τσέκος, 2004). Τα ζώα, προκειμένου να αποκριθούν σε διάφορους κινδύνους, διαθέτουν αναπτυγμένο νευρικό και ανοσοποιητικό σύστημα, ακόμα και ικανότητα διαφυγής. Αντιθέτως, τα φυτά δεν μπορούν να διαφύγουν και δεν διαθέτουν τέτοια συστήματα προστασίας. Η παραγωγή, λοιπόν, χημικών ουσιών που απωθούν ή σκοτώνουν παράσιτα και παθογόνα, είναι μια σημαντική ικανότητα αυτοπροστασίας. (Wink, 1999). Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι επίσης γνωστοί σαν παράγοντες οι οποίοι μεσολαβούν στην επικοινωνία του φυτού.

Εξ' ορισμού, η παραγωγή των δευτερογενών μεταβολιτών αποτελεί μια συντονισμένη και ολοκληρωμένη δραστηριότητα των φυτικών οργανισμών, η οποία συνδέεται στενά με την ικανότητα διαφοροποίησης των κυττάρων. Η ικανότητα, επομένως, κάθε φυτού να παράγει τους μεταβολίτες αυτούς ακολουθεί ένα ιδιαίτερο πρότυπο στο χώρο και στον χρόνο. Έτσι εξηγείται το γεγονός ότι, σε αντίθεση με τους πρωτογενείς οι οποίοι δεν παρουσιάζουν ουσιαστικές διαφοροποιήσεις στα ανώτερα φυτά, οι δευτερογενείς μεταβολίτες κάθε διαφορετικού φυτικού είδους, εμφανίζουν ένα συγκεκριμένο φυτοχημικό φαινότυπο (Καραμπουρνιώτης, 2003).

Οι φυτικοί δευτερογενείς μεταβολίτες μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις μεγάλες κατηγορίες, με κριτήριο τις χημικά διακριτές ομάδες τους. Αυτές είναι :

- α) η ομάδα των φαινολικών ενώσεων
- β) η ομάδα των αζωτούχων ενώσεων και
- γ) η ομάδα των τερπενίων (ή τερπενοειδών).

Η ομάδα των φαινολικών ενώσεων περιλαμβάνει οργανικές ενώσεις με τουλάχιστον έναν αρωματικό δακτύλιο με ένα ή περισσότερα υδροξύλια. Οι περισσότερες από αυτές προέρχονται από το μονοπάτι του σικιμικού οξέος και έχουν ως πρόδρομο μόριο τη φαινυλαλανίνη ή/και από το μονοπάτι του μηλονικού οξέος. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες αυτής της ομάδας, διαχωρίζονται ευρύτερα σε φαινυλπροανοειδή (phenylpropanoids), βενζενοειδή (benzenoids) και φλαβονοειδή (flavonoids). Στο *Arabidopsis thaliana* έχουν ταυτοποιηθεί διάφορες ενώσεις για κάθε κατηγορία

φαινολικών ενώσεων. Οι κουμαρίνες και οι εστέρες σιναπικού οξέος, αποτελούν κάποια από τα φαινυλπροπανοειδή του *A. thaliana*. Χαρακτηριστικά βενζοειδή είναι το βανιλλικό οξύ και το μεθυλβενζοϊκό. Τα κύρια φλαβονοειδή του *A. thaliana* είναι οι φλαβονόλες, οι γλυκοσίδες φλαβονολών και οι ανθοκυανίνες. Πολλές από τις παραπάνω ενώσεις, έχουν αποδεδειγμένο ρόλο στην προστασία του φυτού από την υπεριώδη ακτινοβολία (D'Auria and Gershenzon, 2005).

Οι αζωτούχοι δευτερογενείς μεταβολίτες συντίθενται κυρίως από κοινά αμινοξέα. Βασικότερη κατηγορία των αζωτούχων αυτών ενώσεων, είναι τα αλκαλοειδή. Το άζωτο που περιέχουν είναι, συνήθως, μέρος ενός ετεροκυκλικού δακτυλίου και σχεδόν πάντα είναι αλκαλικά. Τα αλκαλοειδή εμφανίζουν μεγάλο ενδιαφέρον λόγω των εντυπωσιακών φαρμακευτικών και τοξικών δράσεων τους στα ζώα και στον άνθρωπο (π.χ. μορφίνη, εφεδρίνη, καφεΐνη κ.α.) (Καραμπουρνιώτης, 2003). Το *A. thaliana* διαθέτει πληθώρα αζωτούχων ενώσεων οι οποίες συσσωρεύονται στα φυτά κυρίως σε περιπτώσεις μόλυνσης από παθογόνα. Πολλές από αυτές είναι ινδολικές και ινδολοθειικές ενώσεις. Η πιο χαρακτηριστική, όμως, κατηγορία αζωτούχων ενώσεων του *A. thaliana* είναι τα γλυκοσυνολικά (D'Auria and Gershenzon, 2005).

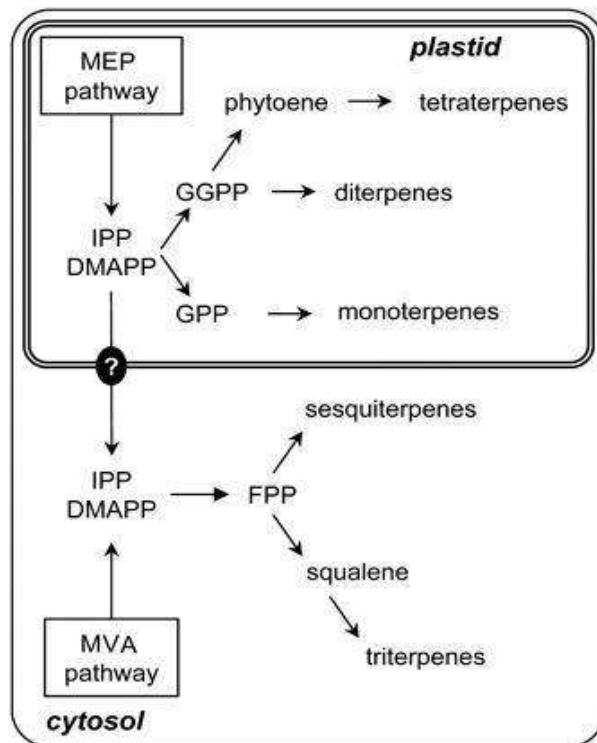
### 3.1. Τερπενοειδή

Τα τερπενοειδή είναι ίσως η μεγαλύτερη κατηγορία μεταβολιτών στους φυτικούς οργανισμούς και η μεγαλύτερη οικογένεια φυσικών προϊόντων από την οποία έχουν καταγραφεί περισσότερες από 22.000 δομές (Connolly and Hill, 1991). Είναι πολυμερή του ισοπρενίου (2- μέθυλο- 1,3- βουταδιένιο) και προκύπτουν από τη σύντηξη μονάδων διφωσφορικού ισοπεντενυλίου (IPP) το οποίο αποτελεί την ενεργοποιημένη μορφή του ισοπρενίου. Ανάλογα με τον αριθμό των μονάδων ισοπρενίου από τις οποίες αποτελούνται, κατατάσσονται σε μονοτερπένια, σεσκιτερπένια, τριτερπένια με 10, 15 και 30 άτομα άνθρακα αντίστοιχα, και ούτω καθεξής. Ορισμένα τερπένια έχουν χαρακτηρισμένη λειτουργία στην αύξηση ή ανάπτυξη των φυτών και, έτσι, μπορούν να θεωρηθούν ως πρωτογενείς μεταβολίτες. Ένα παράδειγμα αποτελεί η ορμονική ομάδα των γιββερελινών, οι οποίες είναι διτερπένια. Χαρακτηριστικοί αντιπρόσωποι των μονοτερπενίων και των σεσκιτερπενίων είναι τα αιθέρια έλαια (π.χ. λιμονένιο στη λεμονιά και μενθόλη στη μέντα) τα οποία έχουν εντομοαπωθητικές ικανότητες. Τα τριτερπένια έχουν κι αυτά

αντιμικροβιακές δράσεις οι οποίες εκδηλώνονται κυρίως από τις γλυκοζυλιωμένες τους μορφές, τις σαπωνίνες (Τσέκος, 2004; Osbourn, 1996). Οι σαπωνίνες είναι μια μεγάλη οικογένεια δευτερογενών μεταβολιτών που συναντώνται σε ένα ευρύ φάσμα φυτικών ειδών (Hostettmann and Marston, 1995). Ονομάστηκαν έτσι επειδή σχηματίζουν αφρό σε υδατικά διαλύματα λόγω των επιφανειοδραστικών ιδιοτήτων τους. Διάφορα μέλη της οικογένειας των σαπωνίνων έχουν αξιοποιηθεί εμπορικά για πολλούς σκοπούς π.χ. ως φάρμακα, ως πρόδρομες ενώσεις για σύνθεση ορμονών, ως αφρώδεις παράγοντες, ως γλυκαντικά, ως καλλυντικά κ.α. Δεδομένου ότι πολλές σαπωνίνες έχουν πιθανή αντιμικροβιακή δραστηριότητα, ο φυσικός ρόλος τους στα φυτά φαίνεται να είναι η προστασία αυτών από πιθανά παθογόνα (Morrissey and Osbourn, 1999).

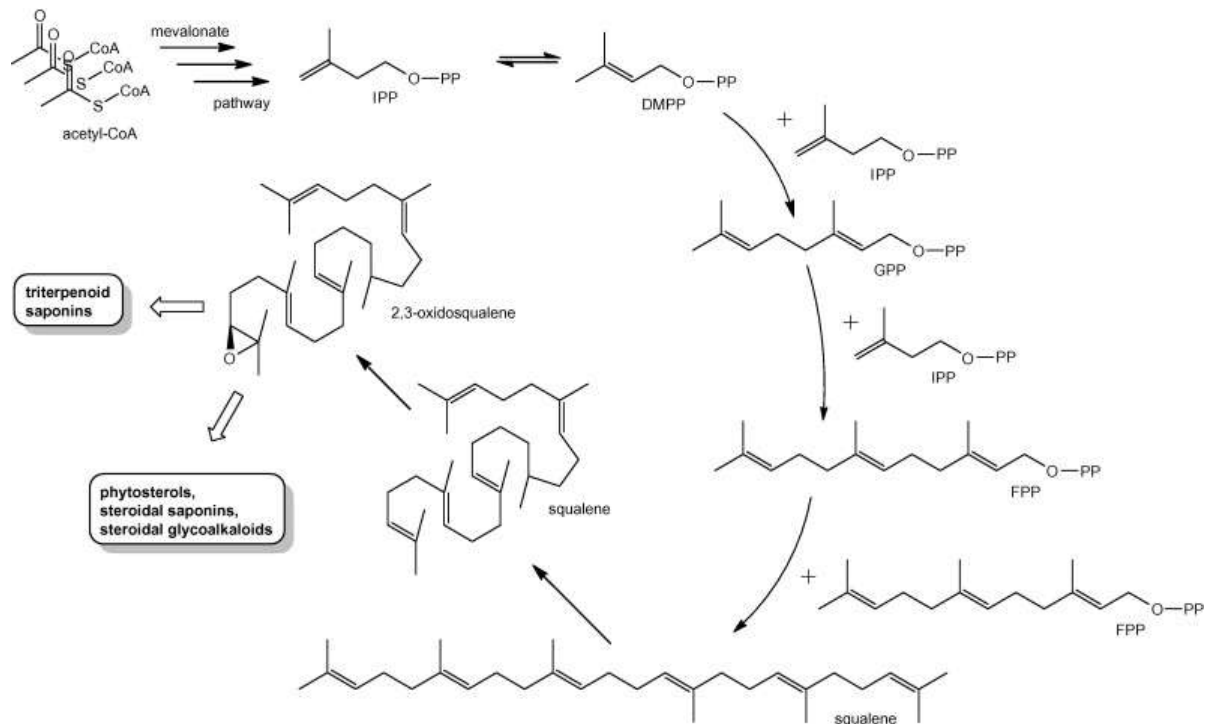
### **3.2. Βιοσύνθεση τερπενοειδών και τριτερπενοειδών**

Όλα τα τερπενοειδή, όπως προαναφέρθηκε, προέρχονται από το διφωσφορικό ισοπεντενύλιο με 5 άτομα άνθρακα και από το ισομερές του, το διφωσφορικό διμεθυλαλλύλιο (DMAPP) (Sacchettini and Poulter, 1997). Η πορεία του IPP, για τη βιοσύνθεση των τερπενίων, διακρίνεται χωρικά σε δύο μονοπάτια. Στο κυτταρόπλασμα ακολουθεί το μονοπάτι του μεβαλονικού οξέος όπου συντίθενται τα σесκιτερπενοειδή και τα τριτερπενοειδή, ενώ στα πλαστίδια ακολουθεί το μονοπάτι της φωσφορικής μεθυλερυθριτόλης, όπου συντίθενται τα μονοτερπενοειδή, τα διτερπενοειδή και τα τετρατερπενοειδή (εικόνα 3).



**Εικόνα 3:** το μονοπάτι του μεβαλονικού οξέος (MVA) και το μονοπάτι της μεθυλερυθριτόλης (MEP) για τη βιοσύνθεση των τερπενοειδών

Για τη βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών, λαμβάνουν χώρα τα παρακάτω στάδια, προκειμένου να επιτευχθούν τα 30 άτομα άνθρακα. Το IPP και το ισομερές του DMAPP, αντιδρούν και σχηματίζουν το διφωσφορικό γερανύλιο (GPP), το οποίο αποτελεί την πρόδρομο μορφή σχεδόν όλων των μονοτερπενίων, με 10 άτομα άνθρακα. Έπειτα, το GPP συμπυκνώνεται με IPP και προκύπτει το διφωσφορικό φαρνεζύλιο (FPP) με 15 άτομα άνθρακα. Το FPP αποτελεί την πρόδρομο ένωση των σεσκιτερπενίων. Τέλος, με τη συμπύκνωση δύο FPPs προκύπτει το σκουαλένιο, με τριάντα άτομα άνθρακα, με τη βοήθεια της συνθάσης του σκουαλενίου (SQS). Το σκουαλένιο μετατρέπεται σε 2,3-οξειδοσκουαλένιο από μια μονοξυγενάση, την εποξειδάση του σκουαλενίου (εικόνα 4) (Phillips et al., 2006). Το 2,3-οξειδοσκουαλένιο, ανάλογα με το μονοπάτι που θα ακολουθήσει, μπορεί να μετατραπεί σε στερόλες ή σε τριτερπενοειδείς αλκοόλες.



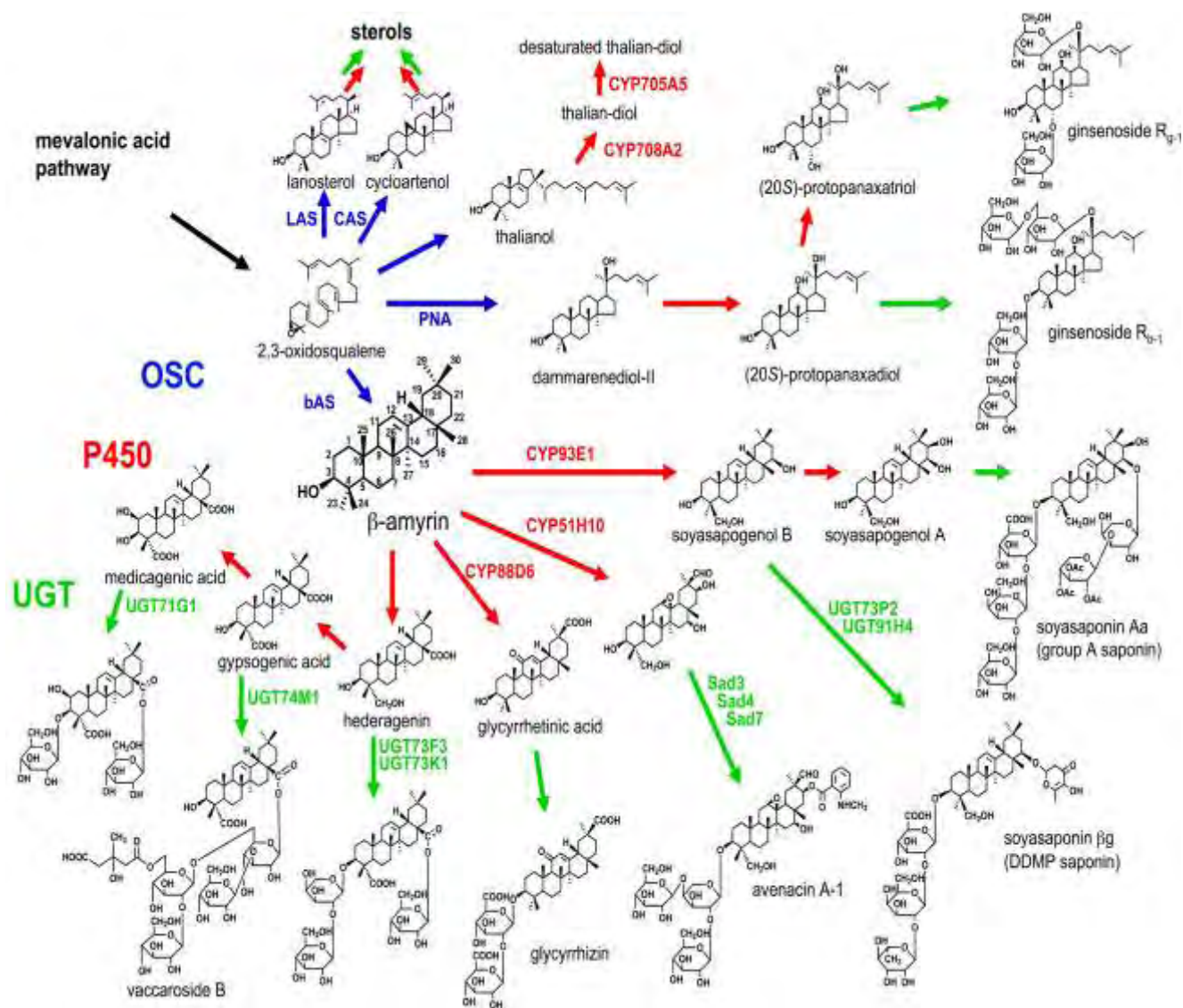
**Εικόνα 4 :** Το αρχικό στάδιο της πορείας βιοσύνθεσης των τριτερπενοειδών, έως το σχηματισμό του 2,3-οξειδοσκουαλένιου (Augustin et al., 2011).

Το πρώτο βήμα διαφοροποίησης στη διαδικασία της βιοσύνθεσης των τριτερπενοειδών, είναι η κυκλοποίηση του 2,3-οξειδοσκουαλένιου, η οποία καταλύεται από την κυκλάση του οξειδοσκουαλενίου (OSC) (Abe et al., 1993). Στα ζώα και στους μύκητες έχει αναγνωριστεί μόνο μία OSC, η συνθάση της λανοστερόλης (LAS). Από τη λανοστερόλη συντίθενται, αρχικά στερόλες και έπειτα στεροειδή και στεροειδείς ορμόνες. Τα φυτά όμως έχουν περισσότερες OSCs. Όχι μόνο για τη βιοσύνθεση στερολών, όπως είναι η συνθάση της λανοστερόλης και η συνθάση της κυκλοαρτενόλης (πρωτογενής μεταβολισμός) (Ohyama et al., 2009), αλλά και για τη βιοσύνθεση τριτερπενοειδών δευτερογενών μεταβολιτών. Είναι εμφανές, λοιπόν, πως το 2,3-οξειδοσκουαλένιο αποτελεί το κομβικό σημείο μεταξύ πρωτογενούς και δευτερογενούς μεταβολισμού.

Μετά τη δράση της OSC, ο τριτερπενοειδής σκελετός μετατρέπεται σε μία υδρόφοβη αγλυκόνη, που ονομάζεται σαπωγενίνη. Η κατάλυση αυτής της αντίδρασης πραγματοποιείται από μία μονοξυγενάση του κυτοχρώματος P450. Αυτό το βήμα επιτρέπει τις περαιτέρω τροποποιήσεις του μορίου, π.χ. τη γλυκοζυλίωση του (Kahn and Durst, 2000). Η γλυκοσυλίωση είναι απαραίτητη για τη βιοσύνθεση των σαπωνινών. Αυξάνει τη διαλυτότητα και αλλάζει τη βιολογική δραστηριότητα του τριτερπενοειδούς (Augustin,



2011). Οι αβενασίνες, σαπωνίνες της βρώμης, παρέχουν προστασία από μια σειρά παθογόνων του εδάφους (Papadopoulou et al., 1999) και η σωστή γλυκοσυλίωση τους είναι ιδιαίτερα κρίσιμη για την αντιμυκητιακή τους δραστηριότητα. Οι γλυκοσυλτρανσφεράσες εξαρτώμενες από διφωσφορική ουριδίνη (UGT) που καταλύουν τη γλυκοσυλίωση, αναγνωρίζουν ευρύ φάσμα φυσικών προϊόντων ως μόρια δέκτες. Η εικόνα 5 δείχνει τη συνολική πορεία βιοσύνθεσης των τριτερπενοειδών (Sawai and Saito, 2011).

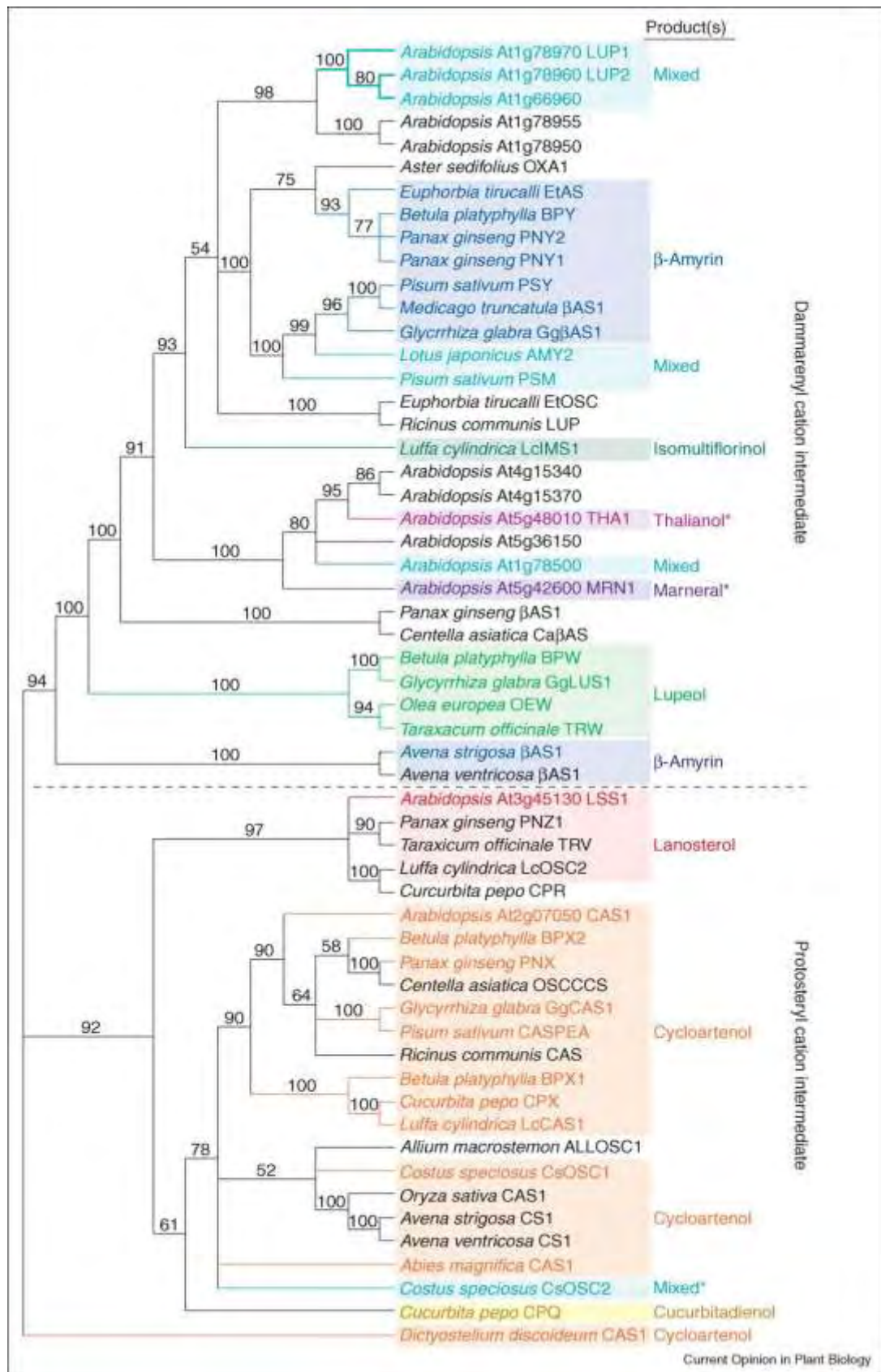


**Εικόνα 5:** Συνολική πορεία βιοσύνθεσης τριτερπενοειδών. Τα μπλε βέλη δείχνουν στάδια που καταλύονται από OSCs, τα κόκκινα από P450 και τα πράσινα από UGTs.

## 4. OSCs

Όπως προαναφέρθηκε, οι κυκλάσες του οξειδοσκουαλενίου (OSCs), μετατρέπουν το 2,3 οξειδοσκουαλένιο σε τριτερπενοειδείς αλκοόλες. Κατά τη σύνθεση των στερολών η OSC, που στην προκειμένη περίπτωση ονομάζεται συνθάση της κυκλοαρτενόλης, καταλύει τη μετατροπή του 2,3 οξειδοσκουαλενίου σε κυκλοαρτενόλη. Κατά τη σύνθεση, όμως, των τριτερπενοειδών σαπωνίων, το 2,3 οξειδοσκουαλένιο κυκλοποιείται προς παραγωγή πολλών πιθανών προϊόντων, με πιο κοινό τη β-αμυρίνη (Hostettmann and Marston, 1995). Το γονιδίωμα κάθε φυτού κωδικοποιεί διαφορετικό αριθμό OSCs. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι το γονιδίωμα του *A. thaliana* κωδικοποιεί 13 OSCs, του *Oryza sativa* 9 OSCs και του *L. japonicus* 8 OSCs (Phillips et al., 2006). Κατά τη σύνθεση των στερολών, οι OSCs κυκλοποιούν το 2,3 οξειδοσκουαλένιο, δημιουργώντας ως ενδιάμεσο προϊόν το κατιόν του προτεστερυλίου (με διαμόρφωση ανάκλιντρου-λουτήρα-ανάκλιντρου), ενώ κατά τη σύνθεση των τριτερπενοειδών, δημιουργείται ως ενδιάμεσο το κατιόν νταμμαρενυλίου (με διαμόρφωση ανάκλιντρου-ανάκλιντρου-ανάκλιντρου) (Sawai et al., 2006). Εκτός της συνθάσης της κυκλοαρτενόλης (CAS) που προαναφέρθηκε, άλλα βασικά παραδείγματα OSCs που σχηματίζουν το κατιόν προτεστερυλίου, είναι η συνθάση της λανοστερόλης (LAS), η συνθάση της κουκουρμπιταδιενόλης (CPQ) από το φυτό *Cucurbita pepo* που παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με τις CAS και LAS (Shibuya, 2004) κ.α. (Phillips et al., 2006).

Οι OSCs που σχηματίζουν το κατιόν του νταμμαρενυλίου απαντώνται αποκλειστικά στα φυτά και μάλιστα μόνο σε αυτά με αγγειακό αγωγό σύστημα (τραχεόφυτα). Από αυτές παράγονται οι τριτερπενοειδείς αλκοόλες. Βασικοί εκπρόσωποι αυτής της κατηγορίας είναι η συνθάση της β-αμυρίνης και η συνθάση της λουπεόλης. Εξελικτικά, φαίνεται ότι οι OSCs με ενδιάμεσο το κατιόν του νταμμαρενυλίου, παρουσιάζουν μικρότερη ομολογία μεταξύ τους, από εκείνες με το κατιόν του προτεστερυλίου. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 6, αρκετά μονοκοτυλήδονα και δικοτυλήδονα φυτά διαθέτουν OSCs που παράγουν αποκλειστικά β-αμυρίνη, μέσω κατιόντος νταμμαρενυλίου. Οι συνθάσες της β-αμυρίνης των φυτών αυτών παρουσιάζουν σχετικά μικρή ομολογία μεταξύ τους (48-50%) σε σύγκριση με τις συνθάσες της κυκλοαρτενόλης, στις οποίες παρουσιάζουν αρκετά υψηλότερη ομολογία (70-79%) (Haralampidis et al., 2001; Qi et al., 2004; Phillips et al., 2006).



**Εικόνα 6 :** Φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των OSCs, ομαδοποιημένες σύμφωνα με το ενδιάμεσο κατιόν που σχηματίζουν (Phillips et al., 2006).

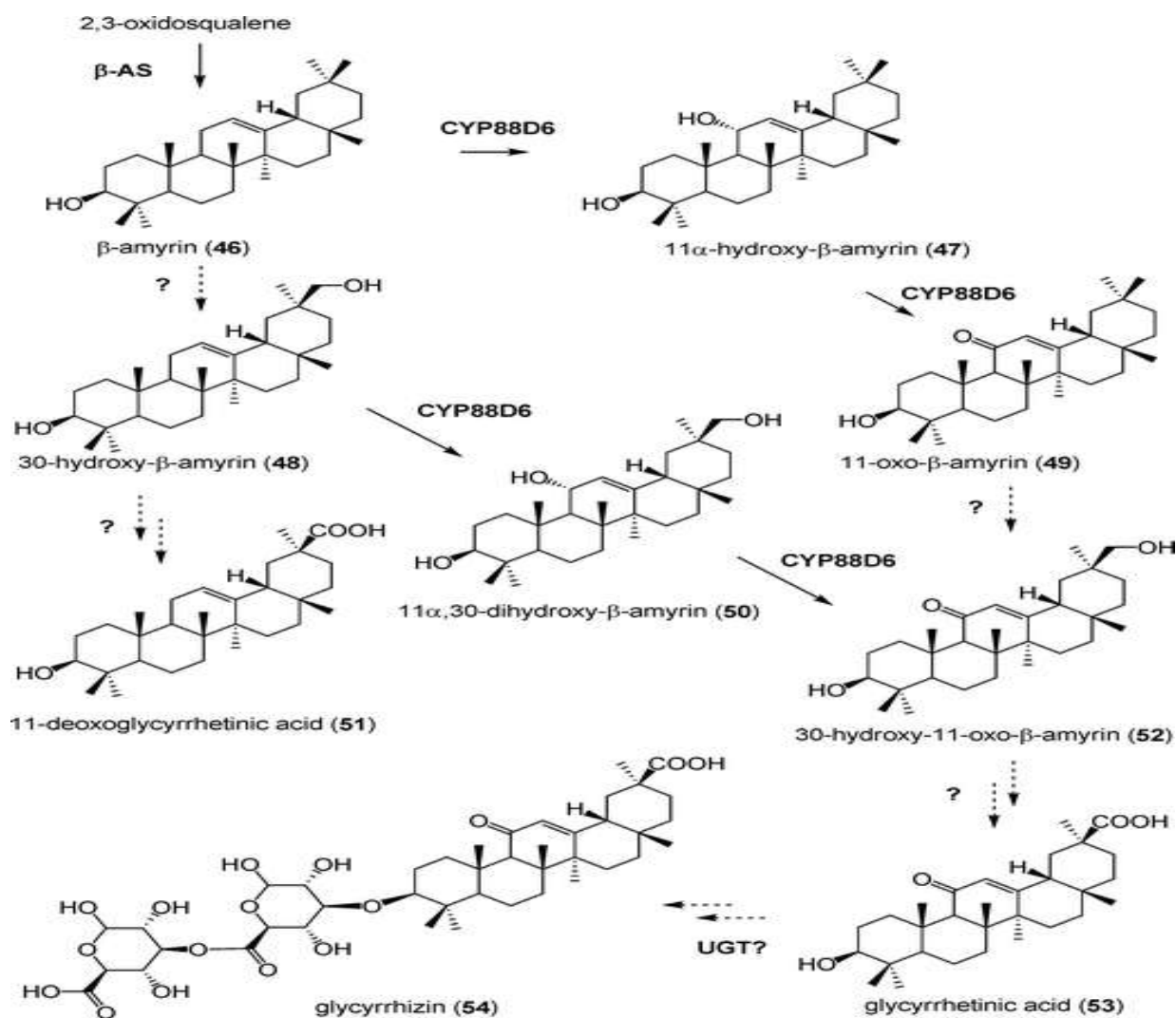
Η ποικιλομορφία των τριτερπενοειδών των φυτών προκύπτει όχι μόνο από την ποικιλία των OSCs αλλά και από την ικανότητα κάποιων από αυτές να παράγουν πολλαπλά προϊόντα. Και αυτές οι OSCs σχηματίζουν το κατιόν του νταμμαρενυλίου ως ενδιάμεσο. Συνθάσες της β-αμυρίνης που σχηματίζουν πολλαπλά προϊόντα έχουν χαρακτηριστεί στα ψυχανθή *Pisum sativum* (Morita et al., 2000) και *L. japonicus* (Iturbe-Ormaetxe et al., 2003). Οι πολυλειτουργικές κυκλάσες έχουν προκύψει μέσω της εξέλιξης των αγγειόσπερων. Πειράματα μεταλλαξιγένεσης και κατευθυνόμενης εξέλιξης έχουν δείξει ότι μικρές αλλαγές στις αλληλουχίες των OSCs μπορούν να επεκτείνουν την ποικιλία των προϊόντων τους (Segura et al., 2003).

## 5. Ένζυμα του κυτοχρώματος P450 (P450s ή CYPs)

Το κυτόχρωμα P450 περιλαμβάνει μία υπεροικογένεια ενζύμων, κυρίως μονοξυγενάσες, που χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να καταλύουν της οξειδωση μη ενεργοποιημένων υδρογονανθράκων (Werck-Reichhart and Feyereisen, 2000). Εκτός από υδροξυλιώσεις και εποξειδώσεις, οι αντιδράσεις που καταλύονται από το κυτόχρωμα P450 μπορεί να είναι και πιο πολύπλοκες, όπως για παράδειγμα απαλκυλιώσεις, ισομερισμοί, αποκαρβοξυλιώσεις, κ.α. Στα φυτά, τα ένζυμα του P450 εμπλέκονται σε πολυάριθμες μεταβολικές διεργασίες του πρωτογενούς και του δευτερογενούς μεταβολισμού όπως αναβολισμός και καταβολισμός φυτοορμονών, λιπαρών οξέων και βιοσύνθεση ευρέος φάσματος των δευτερογενών μεταβολιτών. Η οικογένεια των γονιδίων του κυτοχρώματος P450 είναι μία από τις μεγαλύτερες και πιο ποικίλες στα φυτά. Για παράδειγμα, το γονιδίωμα του *A. thaliana* περιλαμβάνει 272 γονίδια P450 (συμπεριλαμβανόμενων 26 ψευδογονιδίων) ενώ του *Oryza sativa* περιλαμβάνει το λιγότερο 455 (συμπεριλαμβανόμενων 99 ψευδογονιδίων) (Augustin et al., 2011).

Τα ένζυμα του P450, όπως προαναφέρθηκε, παίζουν σημαντικό ρόλο στις οξειδωτικές αντιδράσεις της βιοσύνθεσης των τριτερπενοειδών. Η γλυκυριζίνη είναι μία τριτερπενοειδής γλυκοσυλιωμένη σαπωνίνη του φυτού γλυκόριζα (*Glycyrrhiza glabra* και *Glycyrrhiza uralensis*), για την οποία έχουν αναφερθεί διάφορες φαρμακευτικές ιδιότητες. Η βιοσύνθεσή της ξεκινά από τη β-αμυρίνη και έπειτα φαίνεται να ακολουθούν δύο στάδια οξειδωσης και μια γλυκοσυλίωση. Οι οξειδώσεις πραγματοποιούνται από μια μονοξυγενάση του κυτοχρώματος P450, το γονίδιο της οποίας ονομάζεται *CYP88D6*

(εικόνα 7). Καταλύει αρχικά τη μετατροπή της β-αμυρίνης σε 11-οξο-β-αμυρίνη μέσω ενός ενδιάμεσου προϊόντος, της 11-υδροξυ-β-αμυρίνης, με τελικό προϊόν τη γλυκιριζίνη μέσω γλυκοσυλίσωσης. Το CYP88D6 αποτελεί υποοικογένεια των ενζύμων CYP88 τα οποία φαίνεται να βρίσκονται μόνο στα φυτά της οικογένειας Fabaceae (Seki et al., 2008).

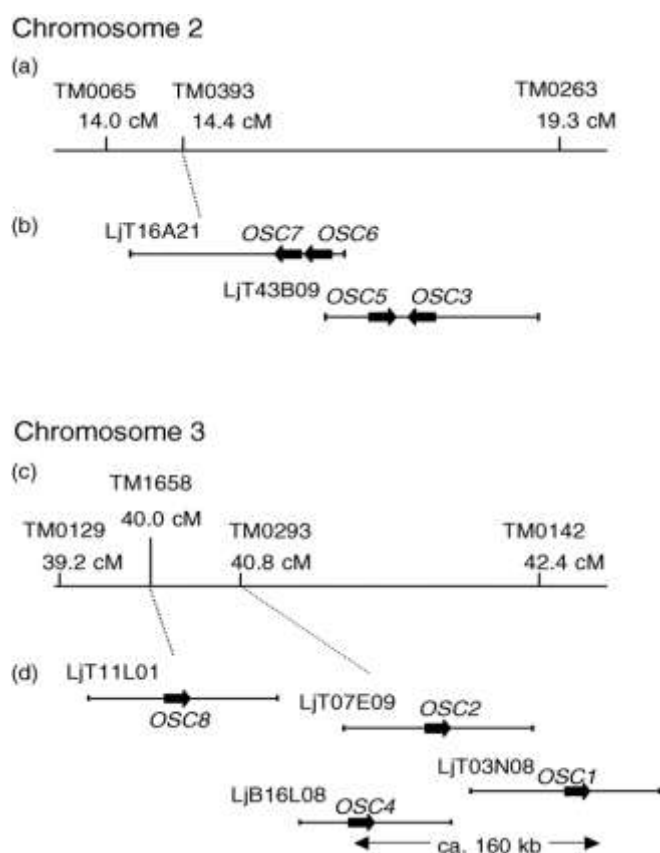


**Εικόνα 7** : Μονοπάτι βιοσύνθεσης της γλυκιριζίνης. Φαίνονται οι οξειδώσεις που πραγματοποιούνται από το τη μονοξυγενάση CYP88D6 (Yonekura-Sakakibara and Saito, 2009).

## 6. OSCs στο *Lotus japonicus*

Στο *L. japonicus* έχουν αναγνωρισθεί 8 OSCs.. Τα γονίδια των OSCs αυτών, σχηματίζουν δύο συστοιχίες γονιδίων στα χρωμοσώματα 2 και 3 του *L. japonicus* (εικόνα 8) (Sawai et al., 2006). Οι OSC1/ LjAMY1, OSC3 και OSC5 έχουν ταυτοποιηθεί ως συνθάση της β-αμυρίνης, συνθάση της λουπεόλης και συνθάση της κυκλοαρτενόλης αντιστοίχως, με τη διαδικασία της ετερόλογης έκφρασης των cDNA σε μεταλλάγματα ζύμης (Sawai et al., 2006). Παρομοίως, η OSC8/ LjAMY2 έχει αναφερθεί ως μια πολυλειτουργική OSC με δυνατότητα παραγωγής β-αμυρίνης και λουπεόλης (Iturbe-Ormaetxe et al., 2003)

Τα γονίδια των OSCs στο *L. japonicus*, όπως και σε άλλα φυτά, έχει αποδειχθεί ότι οργανώνονται σε συστοιχίες (clusters), κάτι που σημαίνει ότι έχουν δημιουργηθεί από επαναλαμβανόμενο τοπικό γονιδιακό διπλασιασμό (repeated local gene duplication) με περαιτέρω αλλαγές στη νουκλεοτιδική αλληλουχία τους.



**Εικόνα 8** : Οργάνωση των γονιδίων των OSCs στα χρωμοσώματα 2 και 3 του *L. japonicus*

## 7. Γονιδιακές συστοιχίες για τη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών

Σχετικά πρόσφατα, οι γονιδιακές συστοιχίες στη βιοσύνθεση των δευτερογενών μεταβολιτών, αναδείχθηκαν ως ένα νέο αναπτυσσόμενο θέμα για τη βιολογία των φυτών. Οι συστοιχίες αυτές είναι από τα πλέον ποικίλα και ταχέως εξελισσόμενα χαρακτηριστικά των φυτών και παρέχουν σημαντική γνώση για τη διερεύνηση του γονιδιώματος τους και της εξέλιξής του (Chu et al., 2011). Οι μηχανισμοί και οι δυνάμεις που οδηγούν σε τέτοιους σχηματισμούς δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Το πρώτο βήμα για το σχηματισμό των γονιδιακών συστοιχιών είναι ο γονιδιακός διπλασιασμός και ο λειτουργικός αναπρογραμματισμός ενός αρχικού γονιδίου. Αυτό το γεγονός πυροδοτεί τη στρατολόγηση γονιδίων που κωδικοποιούν CYP450s και άλλα ένζυμα που εμπλέκονται στην τροποποίηση του βασικού σκελετού των τριτερπενοειδών. Υπάρχουν βασικά πλεονεκτήματα της ύπαρξης τέτοιων συστοιχιών στους οργανισμούς. Το πρώτο πλεονέκτημα είναι η συγκληρονόμηση τέτοιων ευνοϊκών συνδυασμών γονιδίων, στον ίδιο γενετικό τόπο. Το δεύτερο πλεονέκτημα είναι η συρρύθμιση των γονιδίων της συστοιχίας, η οποία πραγματοποιείται καλύτερα και ευκολότερα (Chu et al, 2011).

Η ύπαρξη γονιδιακών συστοιχιών με μη-ομόλογα αλλά λειτουργικώς σχετικά γονίδια, είναι συχνή στα βακτήρια. Τα γονίδια αυτά οργανώνονται σε οπερόνια και εκφράζονται σε ένα απλό πολυκιστρονικό mRNA, γεγονός που επιτρέπει τη στενή σύνδεση μεταγραφής και μετάφρασης (Zheng et al., 2002; Rocha, 2008; Koonin, 2009). Στους ευκαρυώτες η ύπαρξη πραγματικών οπερονίων είναι σπάνια αφού η μεταγραφή δεν συνδέεται με τη μετάφραση και τα mRNAs είναι μονοκιστρονικά. Όσα γονίδια βρίσκονται υπό κοινή ρύθμιση είναι συνήθως διασκορπισμένα στο γονιδίωμα και αλληλεπιδρούν εξ αποστάσεως (Osbourn, 2010).

Παρ'όλα αυτά, έχουν ταυτοποιηθεί και στους ευκαρυώτες κάποιες γονιδιακές συστοιχίες «όμοιες με οπερόνια». Το πιο γνωστό παράδειγμα τέτοιας γονιδιακής συστοιχίας ίσως είναι το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας στα θηλαστικά (Horton et al., 2004). Στα φυτά, τέτοιες συστοιχίες όμοιες με οπερόνια έχουν ταυτοποιηθεί για τα μονοπάτια του δευτερογενούς μεταβολισμού. Πιο συγκεκριμένα, στο *A. thaliana* έχουν ταυτοποιηθεί οι γονιδιακές συστοιχίες για τη σύνθεση των τριτερπενοειδών θαλιανόλη (thalianol) (Field and Osbourn, 2008) και μαρνεράλη (marneral) (Field et al, 2011) ενώ στη βρώμη (*Avena sativa*) ταυτοποιήθηκε η συστοιχία για την παραγωγή αβενασινών (Qi et al,

2004). Στο καλαμπόκι (*Zea mays*) βρέθηκε η πρώτη, χρονικά, γονιδιακή συστοιχία για την βιοσύνθεση του μορίου 2,4 δινδροξυ-7-μέθοξυ-1,4 βενζοξοξασιν-3-όνη (DIMBOA) (Frey et al., 1997). Στο ρύζι (*O. sativa*) έχουν βρεθεί δύο συστοιχίες για τη βιοσύνθεση των διτερπενοειδών momilactone και phytocassane (Sakamoto et al., 2004; Wilderman et al., 2004; Shimura et al., 2007; Swaminathan et al., 2009). Πρόσφατα βρέθηκε πως τα γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση του αντικαρκινικού αλκαλοειδούς νοσκαπίνη στην παπαρούνα (*Papaver somniferum*), οργανώνονται σε γονιδιακή συστοιχία. Το εύρημα αυτό, επεκτείνει την εμπλοκή των γονιδιακών συστοιχιών στην τάξη των αλκαλοειδών που ανήκουν στους δευτερογενείς μεταβολίτες των ανώτερων φυτών (Winzer et al, 2012).

## 8. Αβιοτικές καταπονήσεις

Η μεγάλη ποικιλότητα των περιβαλλοντικών συνθηκών εκθέτει τα φυτά σε μια πληθώρα, ως προς τον αριθμό και το είδος, περιβαλλοντικών καταπονήσεων, οι οποίες διακρίνονται σε βιοτικές και αβιοτικές. Οι βιοτικές προκαλούνται από άλλους οργανισμούς, ενώ οι αβιοτικές προκαλούνται από ένα πλεόνασμα ή μια έλλειψη στο φυσικό ή χημικό περιβάλλον. Οι περιβαλλοντικές καταπονήσεις δημιούργησαν συνθήκες ισχυρής επιλεκτικής πίεσης, προκαλώντας μοριακές, βιοχημικές, φυσιολογικές και μορφολογικές αντιδράσεις, που συνετέλεσαν στην προσαρμογή και την επιβίωση των φυτών στις δυσμενείς συνθήκες. Οι σημαντικότερες αβιοτικές καταπονήσεις είναι :

- η οξειδωτική καταπόνηση (oxidative stress)
- η έλλειψη νερού, που μπορεί να προκληθεί από ξηρασία (drought), αλατότητα (salinity), υψηλή θερμοκρασία (heat stress) και παγετό (frost)
- η περίσσεια νερού, που μπορεί να προκαλέσει ανοξία (anoxia) ή υποξία (hypoxia)
- η παρουσία βαρέων μετάλλων.

Η προσαρμογή των φυτών σε διάφορες καταπονήσεις υποδηλώνει ότι οι φυτικοί οργανισμοί είναι ικανοί να προσλαμβάνουν και να μεταφέρουν τα περιβαλλοντικά σήματα και, στη συνέχεια, να μεταβάλλονται οι ίδιοι, προκειμένου να μπορέσουν να προσαρμοστούν. Αυτές οι μεταβολές ενδέχεται να είναι παροδικές ή μόνιμες και να κληρονομούνται από τις επόμενες γενεές. Αυτό σημαίνει ότι οι περιβαλλοντικές



καταπονήσεις, με ρόλο αγγελιαφόρου ευαισθητοποιούν διακόπτες που ήδη υπάρχουν στην αναπτυξιακή διαδικασία και που τροποποιούν αντιστρεπτά τον φαινότυπο ή προκαλούν μόνιμες κληρονομικές μεταβολές του DNA.

Τα φυτά αντιδρούν στις καταπονήσεις αναπτύσσοντας μηχανισμούς είτε αποφυγής είτε ανοχής. Η ρύθμιση των αντιδράσεων των φυτών στις καταπονήσεις, ελέγχεται ως ένα βαθμό από ορμόνες. Ο ρόλος των ορμονών στις καταπονήσεις εμφανίζεται σε τρία επίπεδα: στη μεταγωγή του σήματος, στο συντονισμό των αντιδράσεων μέσω ορμονικών μεταβολών και στη ρύθμιση μεμονωμένων φυσιολογικών αντιδράσεων που επηρεάζονται από καταπονήσεις (Κωνσταντινίδου, 2003). Παράγοντες αβιοτικής καταπόνησης όπως υψηλή θερμοκρασία, ψύχος, ξηρασία, αλατότητα, κ.α., έχουν ισχυρό αντίκτυπο στην παγκόσμια γεωργία. Μάλιστα, έχει προταθεί πως οι καταπονήσεις αυτές μειώνουν τη μέση απόδοση των βασικότερων καλλιεργούμενων φυτών, σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50% (Wang et al., 2003).

### **8.1. Καταπόνηση αλατότητας**

Η καταπόνηση αλατότητας έχει τόσο οσμωτική (κυτταρική αφυδάτωση) όσο και τοξική (συσσώρευση ιόντων) επίδραση στα φυτά, αλλοιώνοντας την ανάπτυξη, την ομοιόσταση των ιόντων, τη φωτοσύνθεση, την αζωτοδέσμευση και άλλες σημαντικές φυσιολογικές διαδικασίες των φυτών. Η οσμωτική και η τοξική επιρροή στη μείωση της συνολικής απόδοσης του φυτού, είναι σχετική ανάλογα με την ένταση και τη διάρκεια της καταπόνησης και ανάλογα με το είδος του φυτού (π.χ διαφορές ανάμεσα σε αλόφυτα και γλυκόφυτα) και του ιστού που καταπονείται (Rubio et al, 2009).

Κατά την καταπόνηση αλατότητας, ενδιαφέρον παρουσιάζει η διαδικασία της οσμωτικής προσαρμογής, κατά την οποία πραγματοποιείται συσσώρευση οργανικών οσμωλυτών οι οποίοι δεν εμπλέκονται στον κυτταρικό μεταβολισμό. Οι οσμωλύτες που συντίθενται, διαμερισματοποιούνται στο κυτταρόπλασμα, στο στρώμα και στις κοιλότητες των οργανιδίων, προσφέροντας ζωτική οσμωτική εξισορρόπηση μεταξύ αυτών και του χυμοτοπίου (Κωνσταντινίδου, 2003).

Η καταπόνηση αλατότητας φαίνεται να επηρεάζει ιδιαίτερα και τη γονιδιακή έκφραση. Στο *L. japonicus* παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις στην έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των αμινοξέων και στη μεταφορά νιτρικών και οργανικών

ενώσεων. Γενικότερες μεταβολικές αλλαγές παρατηρήθηκαν και σε διάφορες μεγάλες ενζυμικές οικογένειες που συνδέονται με πολλές κυτταρικές διαδικασίες, όπως για παράδειγμα, περοξειδάσες, λιπάσες, γλυκοσιδάσες, γλυκοσυλο-S-τρανσφεράσες, S-τρανσφεράσες γλουταθειόνης, οξειδάσες και κυτόχρωμα P-450. Περαιτέρω παρατηρήσεις λόγω απόκρισης στην καταπόνηση, παρουσιάστηκαν στη μεταγραφή και επεξεργασία του RNA, στη σηματοδότηση και στο μεταβολισμό των ορμονών (Sanchez et al., 2008).

## **8.2. Καταπόνηση υψηλής και χαμηλής θερμοκρασίας**

Οι μηχανισμοί αντοχής του φυτού σε ακραίες θερμοκρασίες, από το μοριακό επίπεδο έως το επίπεδο του οργανισμού, είναι πολύπλοκοι. Εκτός από τις διάφορες αντιδράσεις που προξενούν οι ακραίες θερμοκρασίες στο φυτό, υπάρχει πάντα ο κοινός παρανομαστής της αφυδάτωσης. Στις υψηλές θερμοκρασίες επέρχεται αφυδάτωση λόγω αύξησης της διαπνοής ενώ στις χαμηλές λόγω εξόδου του ενδοκυτταρικού νερού ή/και του ενδοκυτταρικού παγώματος.

Κατά την καταπόνηση υψηλής θερμοκρασίας, επέρχεται αλλαγή στη γονιδιακή έκφραση των φυτών, με συνέπεια την καταστολή της σύνθεσης των περισσότερων φυσιολογικών και επαγωγή σύνθεσης θερμοπληξιακών πρωτεϊνών (heat shock proteins, HSP). Το φαινόμενο αυτό είναι πολλά χρόνια γνωστό και παρατηρείται ακόμη και σε αποκλίσεις της τάξης των 5 βαθμών, από τη βέλτιστη θερμοκρασία του φυτού. Ακόμη, η υπερβολική θερμότητα προκαλεί ανάσχεση της φωτοσύνθεσης, τροποποίηση της δομής και της σύνθεσης των μεμβρανών, αλλοδόμηση πρωτεϊνών, καθυστέρηση στην ανάπτυξη, βλάβη των οργάνων και νέκρωση του φυτού (Κωνσταντινίδου, 2003).

Η καταπόνηση χαμηλής θερμοκρασίας, η οποία περιλαμβάνει δύο περιπτώσεις, την ψύξη (<20 °C) και το πάγωμα (<0 °C), επηρεάζει αρνητικά την αύξηση και την ανάπτυξη των φυτών και περιορίζει σημαντικά την αγροτική παραγωγικότητα. Ακόμη, εμποδίζει την έκφραση του πλήρους γενετικού δυναμικού του φυτού αμέσως, λόγω της αναστολής διαφόρων μεταβολικών αντιδράσεων και, εμμέσως, λόγω οσμωτικών, οξειδωτικών και άλλων καταπονήσεων που επάγονται από το ψύχος. Να σημειωθεί πως η ψύξη επάγει την αναστολή πρόσληψης νερού, ενώ το πάγωμα επάγει την κυτταρική αφυδάτωση (Chinnusamy et al., 2007).

Όσον αφορά την αντοχή των φυτών στις χαμηλές θερμοκρασίες, εμπλέκονται πολλαπλοί μοριακοί μηχανισμοί οι οποίοι δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Οι τρεις καλύτερα τεκμηριωμένοι μηχανισμοί είναι:

- η σταθεροποίηση των μεμβρανών (αφού είναι γνωστό πως η κύρια βλάβη από παγετό, αφορά τη δομή και τη λειτουργικότητα της μεμβράνης)
- η συσσώρευση σακχάρων και άλλων μορίων που επηρεάζουν την όσμωση (οσμωλύτες)
- και η συσσώρευση αντιψυκτικών πρωτεϊνών (Κωνσταντινίδου, 2003).

## 9. Σκοπός της παρούσας μελέτης

Στο χρωμόσωμα 3 του *L. japonicus* εντοπίζεται το γονίδιο *LjAMY2*, το οποίο κωδικοποιεί μία OSC μικτής δράσης. Η OSC αυτή μπορεί να παράγει λουπεόλη και β-αμυρίνη. Στη γονιδιωματική περιοχή γύρω από το *LjAMY2* εντοπίστηκαν δύο γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα του κυτοχρώματος P450, το *LjCYP71D353* και το *LjCYP88D5*, τα οποία πιθανώς να εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών (Krokida et al., μη δημοσιευμένα αποτελέσματα). Εφόσον τα τρία αυτά γονίδια ανήκουν στον ίδιο γενετικό τόπο, γεννάται η υπόθεση του αν συγκροτούν μια γονιδιακή συστοιχία ή όχι. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο έλεγχος των μεταγραφημάτων των γονιδίων *LjAMY2*, *LjCYP71D353* και *LjCYP88D5* στις ρίζες φυτών *L. japonicus* στα οποία είχε προκληθεί αβιοτική καταπόνηση. Η μελέτη των αποτελεσμάτων θα αποκαλύψει εάν τα τρία αυτά γονίδια ακολουθούν κοινό πρότυπο έκφρασης και, κατ' επέκταση, εάν στηρίζεται η υπόθεση της ύπαρξης της γονιδιακής συστοιχίας.

## **B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

---

Ως φυτικό υλικό για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε το ψυχανθές *Lotus japonicus* (οικότυπος Gifu B-129). Για την απομόνωση ολικού RNA χρησιμοποιήθηκαν ρίζες ηλικίας 14 ημερών.

### **1. Προετοιμασία των σπόρων**

Για την ομοιόμορφη και γρήγορη βλάστηση των σπερμάτων του *L. japonicus* είναι απαραίτητη η τοποθέτησή τους σε πυκνό θειικό (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) οξύ για 5 λεπτά. Ακολουθούν δύο εκπλύσεις με απιονισμένο νερό. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αποστείρωση των σπερμάτων, εμβαπτίζονται σε διάλυμα 2% υποχλωριώδους νατρίου και 0.02% Tween 20 (BDH) για 20 λεπτά. Ακολούθως, τα σπέρματα ξεπλένονται 6 φορές με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό. Τέλος, τα σπέρματα απλώνονται σε τρυβλία που περιέχουν 1% άγαρ. Τα τρυβλία αφήνονται στο σκοτάδι, στους 22°C για 72 ώρες, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η προβλάστηση των σπερμάτων.

## **2. Διαδικασία επίδρασης αβιοτικών καταπονήσεων**

Η προβλάστηση των σπόρων πραγματοποιείται όπως περιγράφηκε παραπάνω. Για τη μελέτη επίδρασης αλατότητας και οξειδωτικής καταπόνησης τα νεαρά έκφυτα μεταφέρονται σε τρυβλία MS που περιέχουν 1% σουκρόζη για 7 ημέρες και αναπτύσσονται σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία 22°C, φωτοπερίοδος 16 ώρες φως / 8 ώρες σκοτάδι). Στη συνέχεια, τα νεαρά έκφυτα μεταφέρονται σε τρυβλία MS που περιέχουν 1% σουκρόζη και 25 mM, 50 mM ή 75 mM NaCl για 7 ημέρες. Για τη μελέτη επίδρασης υψηλής θερμοκρασίας και ψύχους, τα νεαρά έκφυτα αναπτύσσονται σε τρυβλία MS που περιέχουν 1% σουκρόζη για 11 ημέρες σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών. Έπειτα τα νεαρά έκφυτα εκτίθενται σε 37°C ή 4°C για 24 ώρες.

## **3. Απομόνωση ολικού RNA (RNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN)**

Οι ρίζες των φυτών συλλέχθηκαν και μοιράστηκαν σε σωλήνες eppendorf, διαφορετικούς για κάθε χειρισμό. Οι σωλήνες τοποθετήθηκαν άμεσα σε υγρό άζωτο και, τελικά, ομογενοποιήθηκαν με ελαιοτριβίση.

Για την απομόνωση του RNA (RNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN), πραγματοποιήθηκαν τα εξής:

- Ομογενοποίηση 100 mg φυτικού ιστού με λειοτριβίση με υγρό άζωτο και μεταφορά σε σωλήνα eppendorf 1.5 ml.
- Προσθήκη 450 µl διαλύματος RLT [σε 1 ml buffer RLT προστίθενται 10 µl β-μερκαπτεθανόλη (β-ME)].
- Ανάδευση σε μηχανικό αναδευτήρα και προαιρετική επώαση στους 56 οC για 1 – 3 λεπτά.
- Μεταφορά του δείγματος σε στήλη φυγοκέντρησης QIAshredder η οποία τοποθετείται σε σωλήνα eppendorf 2 ml και φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα.
- Μεταφορά του υπερκείμενου με πιπέτα σε νέο σωλήνα eppendorf 1.5 ml χωρίς διατάραξη του ιζήματος.

- Προσθήκη 0.5 όγκου αιθανόλη (96-100 %) και ανάμιξη με πιπέτα.
- Μεταφορά του διαλύματος σε στήλη φυγοκέντρησης RNeasy η οποία τοποθετείται σε σωλήνα erpendorf 2 ml. Φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 15 sec και απόρριψη του flow-through.
- Προσθήκη 700μl διαλύματος RW1, φυγοκέντρηση στα 10.000 rpm για 15 sec και απόρριψη του flow-through.
- Προσθήκη 500μl buffer RPE, φυγοκέντρηση στα 10.000 rpm για 15 sec και απόρριψη του υπερκείμενου.
- Προσθήκη 500μl buffer RPE, φυγοκέντρηση στα 10.000 rpm για 2 λεπτά και απόρριψη του υπερκείμενου.  
(Εναλλακτικά: μεταφορά της στήλης σε καινούριο σωλήνα erpendorf 2 ml και φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα για 1 min προκειμένου να στεγνώσει η μεμβράνη).
- Μεταφορά της στήλης φυγοκέντρησης σε νέο σωλήνα erpendorf 1.5 ml. Προσθήκη 30 – 50 μl νερού στο κέντρο της στήλης και φυγοκέντρηση στα 10.000 rpm για 1 λεπτό για έκπλυση του RNA.

#### **4. Χειρισμός του ολικού RNA με DNάση (Invitrogen)**

Με τη μέθοδο απομακρύνεται το γονιδιωματικό DNA που, πιθανώς, συνυπάρχει με το ολικό RNA που απομονώθηκε από τον ιστό. Χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο της εταιρίας Invitrogen.

- Σε δείγμα RNA ποσότητας έως 1μg προστέθηκαν
  - ο 1μl 10X ρυθμιστικό διάλυμα DNάσηςI.
  - ο 1μl 1 U / μg RNA DNάσης ελεύθερης από RNάσες.
  - ο ddH<sub>2</sub>O μέχρις όγκου 10 μl.
- Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min.
- Προσθήκη 1 μl EDTA 25 mM pH 8.0 για να τερματιστεί η αντίδραση.
- Επώαση στους 65°C για 10 min.

## 5. Προσδιορισμός συγκέντρωσης νουκλεϊκών οξέων

Προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων, χρησιμοποιήθηκε η ποσοτική φωτομετρική ανάλυση. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στο νόμο των Beer και Lambert. Με το νόμο αυτό η απορρόφηση του φωτός από ένα διάλυμα συσχετίζεται με τη συγκέντρωση της ουσίας και το μήκος της διαδρομής του φωτός μέσα από το διάλυμα.

Σε ειδική κυβέττα χαλαζία, τα δείγματα προς φωτομέτρηση αραιώθηκαν κατά 1:50 με dH<sub>2</sub>O, και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του διαλύματος σε μήκος κύματος 260nm. Η συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων, χωρίς την παρουσία άλλων προσμίξεων, όπως πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες, δίνεται από τον τύπο :

$$C = O.D.260 * D * \text{συντελεστής αραιώσης},$$

όπου: O.D. είναι η απορρόφηση του δείγματος στα 260nm και D είναι η σταθερά που εξαρτάται από το είδος του νουκλεϊκού οξέος. Σε καθαρά διαλύματα DNA, η σταθερά D ισούται με 50 mg/ml, σε διαλύματα RNA ισούται με 40 mg/ml, ενώ στην περίπτωση ολιγονουκλεοτιδίων ισούται με 30 mg/ml.

Προκειμένου να υπολογιστεί η καθαρότητα ενός δείγματος νουκλεϊκών οξέων, υπολογίζονται οι λόγοι O.D.260/O.D.280 και O.D.240/O.D.260. Όταν η τιμή του πρώτου λόγου κυμαίνεται μεταξύ 1,8 – 2,0 και του δεύτερου στο 0,5 ,τότε το δείγμα θεωρείται ικανοποιητικής καθαρότητας.

## 6. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) είναι ο in vitro πολλαπλασιασμός αλληλουχιών DNA με ταυτόχρονη επέκταση των δύο συμπληρωματικών αλυσίδων. Η διαδικασία περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους κύκλους σε διαφορετικές θερμοκρασίες, με γρήγορη μετάβαση από τη μια θερμοκρασία στην άλλη, η οποία πραγματοποιείται σε θερμικό κυκλοποιητή. Τα απαραίτητα αντιδραστήρια για την PCR – εκτός του στόχου DNA – είναι οι εκκινητές, τα τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs), η DNA πολυμεράση, τα ιόντα μαγνησίου και το ισοτονικό διάλυμα της αντίδρασης. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει :

- Θέρμανση σε υψηλή θερμοκρασία (93 – 95 °C) ώστε να αποδιαταχθεί το DNA (denaturation step).
- Θερμοκρασία υβριδισμού (annealing step), προκειμένου οι εκκινητές να υβριδιστούν με το DNA. Η θερμοκρασία υβριδισμού εξαρτάται από το μήκος του εκκινητή και την περιεκτικότητά του σε G και C. Ο απλούστερος τρόπος υπολογισμού της θερμοκρασίας του εκκινητή είναι μέσω του τύπου  $T_m = 2(A+T) + 4(C+G)$ . Η θερμοκρασία του υβριδισμού είναι τελικά 5°C κάτω από τον μέσο όρο των τιμών  $T_m$  των δύο εκκινητών της αντίδρασης.
- Θερμοκρασία επιμήκυνσης ή πολυμερισμού (extension step) στους 72 °C. Κατά τη διάρκεια αυτού του βήματος λαμβάνει χώρα η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA, με τη δράση της πολυμεράσης.

Η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω επαναλαμβάνεται για 25 – 35 κύκλους συνήθως. Κατά τη διάρκεια των κύκλων η παραγωγή των προϊόντων της αντίδρασης γίνεται με εκθετικό ρυθμό, εφόσον βέβαια δεν παρουσιαστούν περιοριστικοί παράγοντες, όπως για παράδειγμα έλλειψη νουκλεοτιδίων. Μετά το πέρας της αντίδρασης το προϊόν ενίσχυσης αναλύεται ή χρησιμοποιείται για περαιτέρω πειραματικές διαδικασίες. Η PCR βρίσκει εφαρμογή σε πολλούς τομείς και, τελευταία, έχουν αναπτυχθεί πολλές παραλλαγές της παραπάνω βασικής αντίδρασης. Μία ευρέως χρησιμοποιούμενη παραλλαγή είναι η RT-PCR, κατά την οποία χρησιμοποιείται - ως μήτρα για ενίσχυση - RNA, το οποίο πρώτα μεταγράφεται σε cDNA με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφή (Reverse transcriptase).

### **6.1. Έλεγχος ύπαρξης γονιδιωματικού DNA με PCR**

Για να διαπιστωθεί αν στα δείγματα υπάρχει εναπομείναν DNA, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), με την οποία ενισχύθηκε το γονίδιο της ουβικουΐτινης.

Σε σωλήνα eppendorf προστέθηκαν τα παρακάτω σε τελικό όγκο 20μl:

- 14,92 μl ddH<sub>2</sub>O
- 2 μl 10X ρυθμιστικό διάλυμα Kara Taq
- 0,4 μl μίγμα dNTPs
- 1 μl ολικό RNA



- 0,8 μl εμπρόσθιος εκκινητής
- 0,8 μl ανάστροφος εκκινητής
- 0,08 μl kapa Taq DNA πολυμεράση (1 Unit/μl)

Το μίγμα αναμιγνύεται με γρήγορη φυγοκέντρηση και τοποθετείται στο θερμοκυκλοποιητή, προκειμένου να εκτελεστεί το παρακάτω πρόγραμμα:

	Θερμοκρασία	Χρόνος	Αρ. κύκλων
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	3 λεπτά	1
Αποδιάταξη αλυσίδων DNA	95 °C	30 δευτερόλεπτα	35
Υβριδισμός εκκινητών		1 λεπτό	35
Σύνθεση νέων αλυσίδων DNA	72 °C	2 λεπτό	35
Τελική επιμήκυνση	72 °C	10 λεπτά	1

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για να ενισχύσουν το γονίδιο της ουβικουϊτίνης είναι:

Εμπρόσθιος εκκινητής Lj UbiF: 5'-TTC ACC TTG TGC TCC GTC TTC-3'

Ανάστροφος εκκινητής Lj UbiR: 5'-AAC AAC AGC ACA CAC AGC CAA TCC-3'

- Μετά το τέλος της διαδικασίας το προϊόν της PCR ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης.

## 7. Ανάλυση νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτή αγαρόζης

Ο διαχωρισμός των δεοξυριβονουκλεϊνικών οξέων γίνεται, με βάση το μέγεθος και τη διαμόρφωσή τους, με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Αν πρέπει να διαχωριστούν γραμμικά δίκλινα μόρια, η σχέση που συνδέει την κινητικότητα των μορίων με το μέγεθός τους είναι ημιλογαριθμική. Η κινητικότητα μη γραμμικών μορίων εντός του ηλεκτρικού πεδίου της πηκτής δεν είναι άμεση συνάρτηση του μεγέθους τους, αλλά εξαρτάται και από τη διαμόρφωσή τους στο χώρο. Το εύρος των μεγεθών που μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτή αγαρόζης εξαρτάται από τη συγκέντρωση της πηκτής σε αγαρόζη, για παράδειγμα σε 0,8% συγκέντρωση αγαρόζης μπορούν να διαχωριστούν, ανάλογα με το μοριακό τους

βάρος, τμήματα του DNA που κυμαίνονται από 1 έως 12 kb (Χατζόπουλος, 2001). Τα μόρια του DNA γίνονται ορατά με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και να φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός. Η προετοιμασία της πηκτής των δειγμάτων γίνεται ως εξής :

- Κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης (συνήθως 1%) προστίθεται σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1XTAE και θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να λιώσει.
- Στην λιωμένη αγαρόζη προστίθεται 0,001% v/v διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου και αφήνεται να κρυώσει.
- Η πηκτή τοποθετείται σε κατάλληλο εκμαγείο της συσκευής οριζόντιας ηλεκτροφόρησης και αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου. Εδώ πρέπει να σημειωθεί πως στην πηκτή βυθίζεται ειδική "χτένα" που δημιουργεί τις υποδοχές των δειγμάτων. Στα δείγματα του DNA που πρόκειται να αναλυθούν προστίθεται 1/10 όγκου διαλύματος χρωστικής 10X DLB.
- Μόλις στερεοποιηθεί η πηκτή απομακρύνεται η "χτένα" και τοποθετείται στο δοχείο ηλεκτροφόρησης, το οποίο συμπληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X TAE.
- Τα δείγματα αναλύονται σε ηλεκτρικό πεδίο εντάσεως που δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 5 V/ cm.

>> TAE : 50XTAE : 24.2% (w/v) Tris (BDH), 57.1 ml/l CH<sub>3</sub>COOH (BDH), 100 ml/l 0.5 M EDTA (Serva)

>>Βρωμιούχο αιθίδιο : παρασκευάζεται ως πυκνό διάλυμα 0,5 mg/ml σε απιονισμένο νερό και διατηρείται στους 4oC. Η συγκέντρωσή του στην πηκτή της αγαρόζης είναι 0,5 mg/ml.

>> 10X DLB : 0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανό του ξυλενίου, 30% γλυκερόλη

## **8. Σύνθεση cDNA από RNA με το ένζυμο SuperscriptII RT, Invitrogen**

Στην PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR) ως αρχικό δείγμα χρησιμοποιείται το ολικό RNA το οποίο μετατρέπεται σε cDNA παρουσία του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης (reverse transcriptase). Για τη μεταγραφή αυτή χρησιμοποιούνται τυχαία

εξαμερή ή εννεαμερή oligo(dT)s και το cDNA που θα παραχθεί θα χρησιμοποιηθεί ως εκμαγείο για την DNA πολυμεράση στη συνήθη τεχνική της PCR. Εξελίξεις στην RT-PCR περιλαμβάνουν την ανάπτυξη απλών πρωτοκόλλων στα οποία η σύνθεση cDNA και η αντίδραση PCR εκτελούνται σε ένα στάδιο (one step RT-PCR). Τα πρωτόκολλα αυτά βασίζονται στην αξιοποίηση της διπλής ιδιότητας ορισμένων θερμοσταθερών DNA πολυμερασών όπως η *T. Thermophilus* (Tth) DNA πολυμεράση να μεταγράφουν αντίστροφα RNA παρουσία  $Mn^{2+}$ , ενώ ταυτόχρονα δρουν και ως DNA πολυμεράσες.

Στην προκειμένη περίπτωση, ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

- Σε σωλήνα erppendorf τοποθετήθηκαν τα παρακάτω συστατικά :
  - 1 μl oligo(dT)12-18 (500 μg/ml),
  - 1 ng – 5 μg ολικού RNA ή 1 – 500 ng mRNA
  - 1 μl 10mM μίγμα dNTPs (10mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP σε ουδέτερο pH)
  - αποστειρωμένο, ddH<sub>2</sub>O μέχρις όγκου 12 μl.
- Το παραπάνω μίγμα θερμάνθηκε στους 65°C για 5 λεπτά και αμέσως μετά τοποθετήθηκε στον πάγο.
- Ακολούθησε γρήγορη φυγοκέντρηση και κατόπιν προστέθηκαν:
  - 4 μl 5X διάλυμα σύνθεσης πρώτης αλυσίδας
  - 2 μl 0,1M DTT
  - 0.5 μl RnaseOUT, που είναι ανασυνδυασμένος παρεμποδιστής ριβονουκλεασών (40 units/μl).
- Τα παραπάνω συστατικά αναμίχθηκαν και επώαστηκαν στους 42°C για 2 λεπτά.
- Στη συνέχεια, προστέθηκε 1 μl (200 units) αντίστροφης μεταγραφάσης SuperScript II RT και ακολούθησε ανάμιξη με πιπέτα.
- Έπειτα, ο σωλήνας erppendorf αφέθηκε για επώαση στους 42°C για 50 λεπτά.
- Η αντίδραση διακόπηκε με θέρμανση στους 72°C για 15 λεπτά.

## 9. PCR πραγματικού χρόνου (real time PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time PCR) ή αλλιώς ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) είναι μια μέθοδος που βασίζεται στην PCR και χρησιμοποιείται για να ενισχύσει τμήματα DNA. Επιτρέπει την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση πολλαπλών τμημάτων DNA - στόχων σε απόλυτο αριθμό με τη χρήση προτύπων διαφόρων συγκεντρώσεων DNA. Η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος πραγματοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας. . Στη συγκεκριμένη περίπτωση ο φθορισμός μετρήθηκε σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύψει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), γεγονός που επιτρέπει την παρακολούθηση όλης τη διαδικασία της αντίδρασης. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος. Στη βασική έρευνα, η real-time PCR χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση και παρακολούθηση της διαφορικής έκφρασης γονιδίων-στόχων μετά από μεταχειρίσεις ή για την αναπτυξιακή μελέτη των επιπέδων έκφρασης γονιδίων-στόχων.

### 9.1. Επιλογή των εκκινητών

Οι αλληλουχίες των γονιδίων που κωδικοποιούσαν για τα ίδια ένζυμα του βιοχημικού μονοπατιού, ομοπαρατέθηκαν με τον αλγόριθμο ClustalW. Οι εκκινητές επιλέχθηκαν σε μη συντηρημένες περιοχές των γονιδίων, ώστε να αποφευχθεί ο μη εξειδικευμένος υβριδισμός των εκκινητών. Σε περιπτώσεις μη επικαλυπτόμενων αλληλουχιών που κωδικοποιούσαν για το ίδιο γονίδιο, οι εκκινητές ελέγχθηκαν με τον αλγόριθμο BLAST σε όλες τις γονιδιακές βάσεις δεδομένων. Τελικά, επιλέχθηκαν εκκινητές που υβριδίστηκαν πλήρως μόνο με την επιθυμητή αλληλουχία στο φυτό *L. japonicus*.

Η επιλογή των εκκινητών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του εξειδικευμένου προγράμματος επιλογής εκκινητών Beacon designer v7.0. Το μέγεθος των ενισχυόμενων τμημάτων ήταν περίπου 100 ζεύγη βάσεων. Οι εκκινητές επιλέχθηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός ομοδιμερών ή ετεροδιμερών. Η δημιουργία ομο- και

ετερο-διμερών από τους εκκινητές έχει ως αποτέλεσμα την εκπομπή μη εξειδικευμένου φθορισμού κατά την αντίδραση της PCR πραγματικού χρόνου.

Οι εκκινητές οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

Σύμβολο εκκινητή	Νουκλεοτιδική αλληλουχία εκκινητή
RtUbi, forward	5'-TTC ACC TTG TGC TCC GTC TTC-3'
RtUbi, reverse	5'AAC AAC AGC ACA CAC AGC CAA TCC-3'
RtAMY2, forward	5'-GCA GTT TAA CTT GTA AAG ATA GC-3'
RtAMY2, reverse	5'-GGC AAC AAA CCG ACA CTA AAT AC-3'
RtP450-88, forward	5'-TAG TGT TCT GGA AGT CAA TGA TG-3'
RtP450-88, reverse	5'-AGA TGT GTG GGT GTT GTG TAA G-3'
RtP450-71, forward	5'-ACA TTA AAG CCG TTC TTC AGG AC-3'
RtP450-71, reverse	5'-CCT CAA CAT ACC CTC TGC TAC C-3'

## 9.2. Αντίδραση της real time PCR

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε συσκευή Mx3005P (Stratagene) με το ίδιο θερμοκρασιακό πρόγραμμα και καταγράφονταν για 40 κύκλους. Στο τέλος κάθε αντίδρασης ακολουθούσε η παρακολούθηση της καμπύλης αποδιάταξης βάση της οποίας επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη ενός μόνο προϊόντος στην κάθε αντίδραση. Σε όλες τις περιπτώσεις, το μίγμα της αντίδρασης προετοιμάστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας (Stratagene). Τα δεδομένα φθορισμού εισήχθησαν στο πρόγραμμα LinRegPCR και υπολογίστηκε η απόδοση (E) από την κλίση της εφαπτομένης της καμπύλης φθορισμού της αντίδρασης.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η PCR πραγματικού χρόνου για το γονίδιο της ουβικουϊτίνης ώστε να γίνει κανονικοποίηση – ποσοτικοποίηση στα αρχικά δείγματα cDNA. Για το σκοπό αυτό σε optical tubes προστέθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια μέχρι τελικό όγκο 20  $\mu$ l:

- 10  $\mu$ l 2X buffer
- 0,8 $\mu$ l εμπρόσθιος εκκινητής
- 0,8 $\mu$ l ανάστροφος εκκινητής

- 1 μl cDNA (αραιωμένο κατά 1:10)
- 0,4 μl χρωστική αναφοράς ROX
- 7μl ddH<sub>2</sub>O

Παρακολουθώντας την έκφραση του γονιδίου της ουβικουΐτινης σε κάθε δείγμα, φαίνεται η πυκνότητα του cDNA του κάθε δείγματος και κάνοντας τις κατάλληλες αραιώσεις, οι συγκεντρώσεις cDNA από κάθε δείγμα μπορούν να ισοσκελιστούν.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου στα τρία προς-μελέτη γονίδια (AMY2, P450-88, P450-71), με τα κανονικοποιημένα, πλέον, δείγματα. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε εν συγκρίσει με την έκφραση του γονιδίου της ουβικουΐτινης, σε όλες τις περιπτώσεις. Όλα τα τελικά αποτελέσματα, επεξεργαστήκαν στατιστικά.

## **Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

---

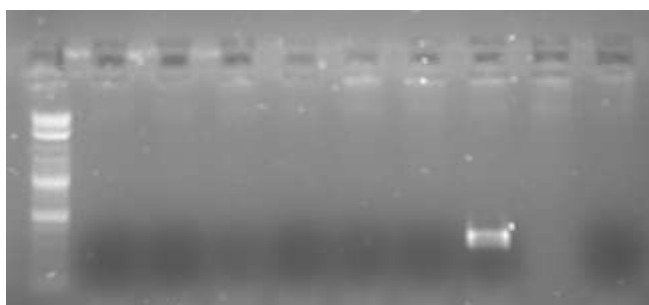
### **1. Εξαγωγή RNA από τις ρίζες των φυτών που αναπτύσσονται σε συνθήκες καταπόνησης.**

Στην καταπόνηση αλατότητας (salt-stress), τα φυτά παρέμειναν στο θάλαμο ανάπτυξης, αρχικά για 4 ημέρες σε τρυβλία με θρεπτικό MS και, έπειτα, για 7 ημέρες στα τρυβλία με τις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος NaCl. Στην καταπόνηση υψηλής θερμοκρασίας (heat-stress) και στην καταπόνηση ψύχους (cold-stress), τα φυτά παρέμειναν για 11 ημέρες στο θάλαμο ανάπτυξης και έπειτα στα μεν προκλήθηκε heat-stress (επώαση στους 37°C) και στα δε προκλήθηκε cold-stress (επώαση στους 4°C) για 24h.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε σε όλους τους χειρισμούς εξαγωγή ολικού RNA των ριζών και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του με ποσοτική φωτομετρική ανάλυση.

## 2. Αντίδραση PCR για τον έλεγχο ύπαρξης γονιδιωματικού DNA.

Τα RNAs υπέστησαν χειρισμό με το ένζυμο DNase1 προκειμένου να απομακρυνθεί το γονιδιωματικό DNA που πιθανώς να έχει απομονωθεί μαζί με το RNA. Στη συνέχεια, για να επιβεβαιωθεί η απουσία DNA από τα δείγματα, πραγματοποιήθηκε PCR με εξειδικευμένους εκκινητές για το γονίδιο της ουβικουΐτινης, το οποίο εκφράζεται συστατικά. Όπως φαίνεται στην εικόνα 9, τα δείγματα δεν παρουσίασαν ζώνες στην πηκτή αγαρόζης, που σημαίνει πως δεν έχει απομείνει γονιδιωματικό DNA σε αυτά, μετά το χειρισμό με το ένζυμο DNAση.



**Εικόνα 9** : Πηκτή αγαρόζης της ενίσχυσης του γονιδίου της ουβικουΐτινης. Μόνο ο θετικός μάρτυρας εμφάνισε ζώνη.

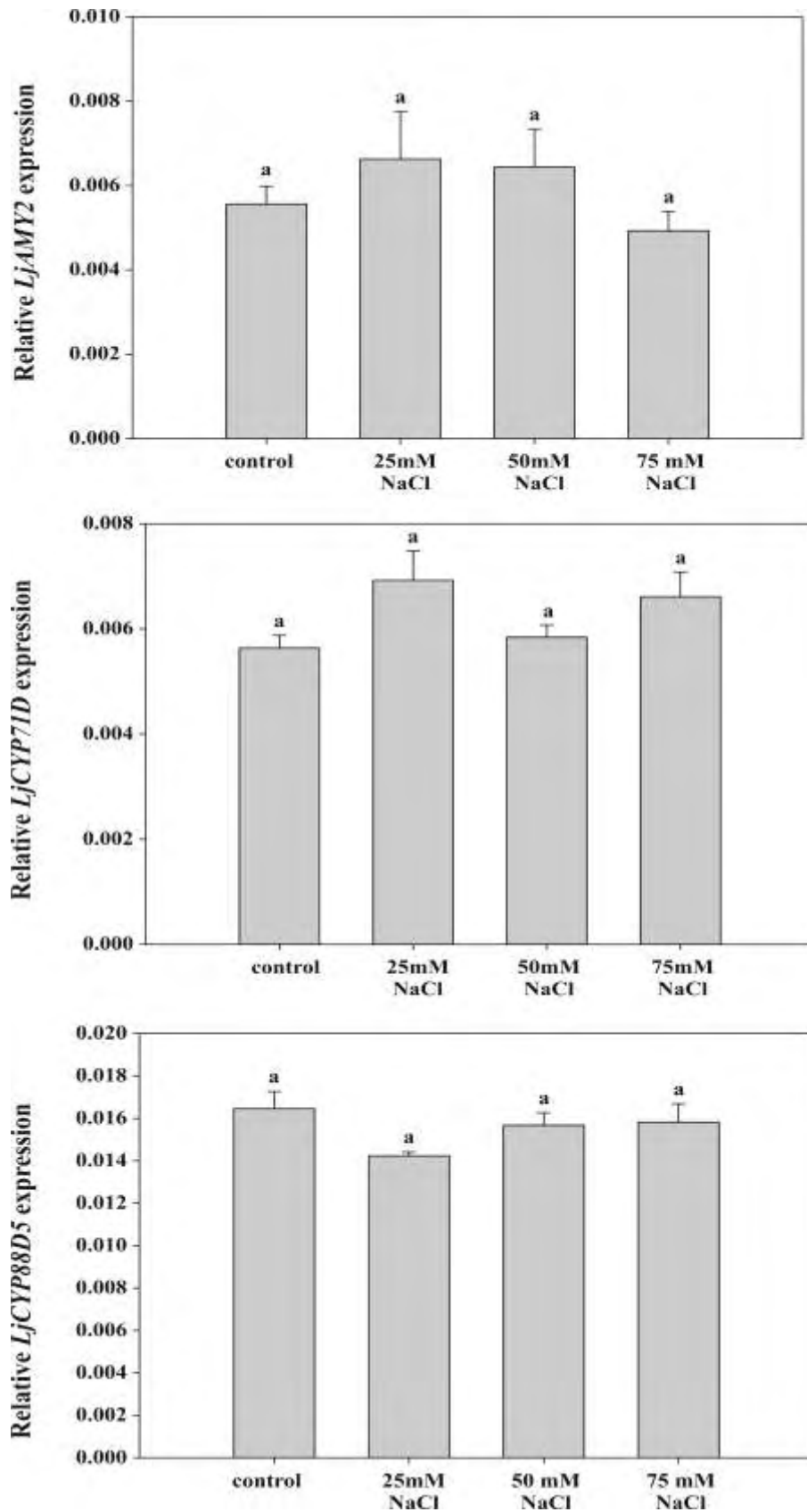


### **3. Έλεγχος της έκφρασης των γονιδίων *LjAMY2*, *LjCYP71D353* και *LjCYP88D5***

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η αντίδραση RT-PCR για τη εατροπή του ολικού RNA των δειγμάτων, σε cDNA. Τα τελικά, όμως, αποτελέσματα για τα επίπεδα έκφρασης των τριών γονιδίων, φάνηκαν με την τεχνική της real-time PCR.

#### **3.1. Έλεγχος της έκφρασης έπειτα από καταπόνησης αλατότητας (salt-stress).**

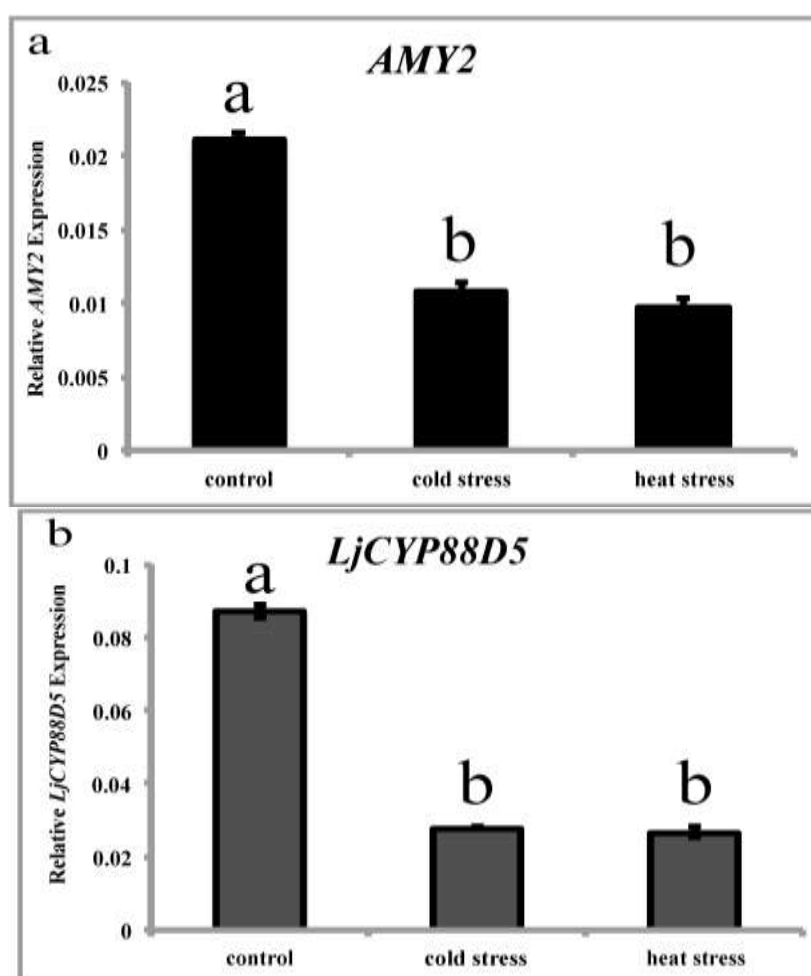
Όπως παρατηρείται από τα διαγράμματα (εικόνα 10), τα τρία γονίδια δεν παρουσίασαν ιδιαίτερη απόκλιση στα επίπεδα έκφρασης τους σε σύγκριση με τους μάρτυρες (controls) σε καμία από τις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος. Το βασικό όμως πόρισμα που αντλείται, είναι η επιβεβαίωση της συνέκφρασης των τριών γονιδίων υπό την καταπόνηση.

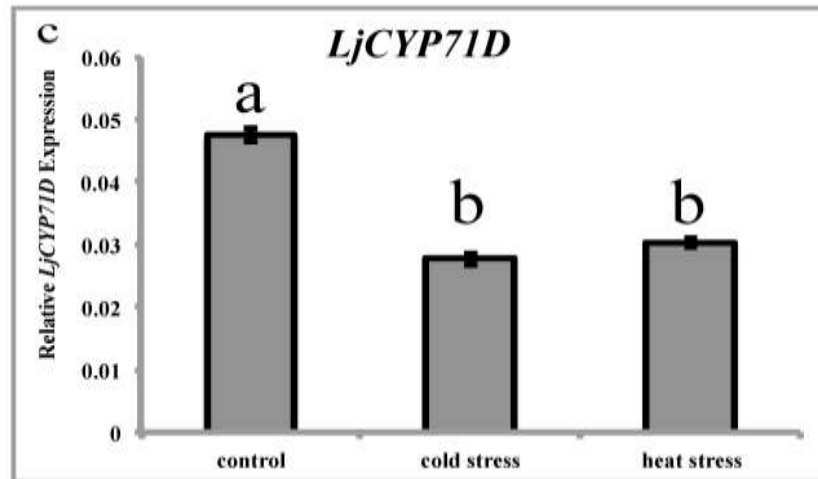


*Εικόνα 10* : Επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *LjAMY-2*, *LjCYP71D* και *LjCYP88D5* έπειτα από καταπόνηση αλατότητας σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις.

### 3.2. Έλεγχος έκφρασης έπειτα από καταπόνηση υψηλής θερμοκρασίας (heat-stress) και ψύχους (cold-stress)

Με τη real-time PCR, φάνηκαν και πάλι τα επίπεδα έκφρασης των τριών γονιδίων (εικόνα 11). Τα αποτελέσματα έδειξαν αξιοσημείωτες διαφοροποιήσεις σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Η διαφοροποίηση της έκφρασης που παρατηρήθηκε, σε σύγκριση με τους μάρτυρες, είναι στατιστικώς σημαντική. Τα επίπεδα έκφρασης που παρατηρήθηκαν ήταν όμοια και στις δυο καταπονήσεις (heat-stress και cold-stress). Πιο συγκεκριμένα, το γονίδιο της συνθάσης της β-αμυρίνης *LjAMY2*, παρουσίασε μείωση της έκφρασής του περίπου στο μισό σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Ακόμη μεγαλύτερη μείωση παρουσίασε το γονίδιο *LjCYP71D353* του P450-71. Τη μεγαλύτερη μείωση στην έκφρασή του, εμφάνισε το γονίδιο *LjCYP88D5* του P450-88.





**Εικόνα 11** : Επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *LjAMY2* (a), *LjCYP88D5* (b) και *LjCYP71D353* (c) έπειτα από καταπόνηση ψύχους (cold stress) και καταπόνηση υψηλής θερμοκρασίας (heat stress)

Τα προαναφερόμενα αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι τα τρία γονίδια ακολουθούν παρόμοιο πρότυπο γονιδιακής έκφρασης. Και στις δύο καταπονήσεις θερμοκρασίας, η έκφραση των γονιδίων παρουσίασε μόνο μείωση, σε διαφορετικό βαθμό για το καθένα. Η αύξηση της έκφρασης ενός από αυτά σε κάποια από τις δυο καταπονήσεις, θα κατέληγε σε αβέβαια και μη αξιόπιστα συμπεράσματα όσον αφορά το πρότυπο έκφρασης των τριών γονιδίων.

Στην περίπτωση των δύο αυτών αβιοτικών καταπονήσεων που ασκήθηκαν στα φυτά, ενισχύεται για ακόμη μια φορά (όπως και στην περίπτωση της αλατότητας) η πεποίθηση της οργάνωσης των τριών γονιδίων σε μία συστοιχία. Σε καθεμία από τις περιπτώσεις που εξετάστηκαν, τα τρία γονίδια παρουσίασαν κοινή συμπεριφορά έκφρασης. Γενικότερα, η σχετική λειτουργία και η συνρύθμιση χαρακτηρίζουν γονίδια που ανήκουν στην ίδια συστοιχία.

## Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

---

Τα τερπενοειδή αποτελούν μια μεγάλη κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών των φυτών, με μεγάλη ποικιλία δομών και δράσεων. Πολλά από τα τερπενοειδή έχουν κριθεί σημαντικά για τα φυτά και ειδικότερα για την άμυνά τους, υπάρχουν όμως και πολλά των οποίων η λειτουργία παραμένει άγνωστη. Άγνωστοι παραμένουν σε αρκετές περιπτώσεις και οι μηχανισμοί της βιοσύνθεσής τους σε μοριακό και βιοχημικό επίπεδο. Όσον αφορά τα τριτερπενοειδή, έχει ταυτοποιηθεί ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων και ενζύμων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεσή τους. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στη βρώμη και το *A. thaliana*, τα γονίδια που εμπλέκονται στα μονοπάτια βιοσύνθεσης τριτερπενοειδών οργανώνονται σε γονιδιακές συστοιχίες (clusters) (Chu et al, 2011).

Εκτός από τα φυτά που προαναφέρθηκαν, η ύπαρξη γονιδιακών συστοιχιών που να εμπλέκονται στο δευτερογενή μεταβολισμό έχει εξακριβωθεί και αλλού όπως στο *Oryza sativa*, το *Sorghum bicolor* και το *Manihot esculenta*. Δεν θεωρείται πως γενικότερα τα γονίδια του δευτερογενούς μεταβολισμού οργανώνονται σε συστοιχίες. Παρόλα αυτά, όσο περισσότερα γονιδιώματα φυτών αλληλουχούνται και αναλύονται, γίνεται ξεκάθαρο πως η οργάνωση των γονιδίων του δευτερογενούς μεταβολισμού σε συστοιχίες είναι πολύ πιο κοινή από ότι είχε αρχικά θεωρηθεί (Field and Osbourn, 2012). Η πρώτη τέτοια συστοιχία ανακαλύφθηκε στο *Zea mays* (Frey et al., 1997).

Τι προσφέρει όμως η ομαδοποίηση των γονιδίων ενός μεταβολικού μονοπατιού σε συστοιχίες; Ένα πλεονέκτημα είναι σίγουρα η συνρύθμιση. Είναι γεγονός πως διασκορπισμένα στο γονιδίωμα γονίδια μπορούν κι αυτά να συνρυθμιστούν μέσω ενός κοινού μεταγραφικού παράγοντα. Ωστόσο, η φυσική σύνδεση γονιδίων με σχετιζόμενη λειτουργία, μπορεί να παρέχει συντονισμένη ρύθμιση της έκφρασης τους ακόμη και σε επίπεδο πυρηνικής οργάνωσης, ίσως και σε επίπεδο ιστονών (Hurst et al., 2004; Sproul et al., 2005; Osbourn and Field, 2009). Ένα δεύτερο πλεονέκτημα είναι η συγκληρονόμηση. Αν ο συνδυασμός των γονιδίων είναι ευνοϊκός για τη σύνθεση ενός ενεργού τελικού προϊόντος του μονοπατιού, τότε η ομαδοποίησή τους συμβάλλει στην πιθανότερη κληρονόμηση του συνδυασμού αυτού ως έχει. Γενικότερα, με τη συνρύθμιση και τη συγκληρονόμηση δεν διαταράσσεται η γονιδιακή συστοιχία. Μια διαταραχή της, πιθανώς θα ήταν επιζήμια και θα είχε ως αποτέλεσμα είτε την απώλεια ενεργότητας των τελικών μεταβολιτών, είτε τη συσσώρευση τοξικών/βιοενεργών ενδιάμεσων του μεταβολισμού (Chu et al, 2011). Για παράδειγμα, η συσσώρευση υψηλών επιπέδων μεταβολικών ενδιάμεσων στα μονοπάτια των συστοιχιών σε βρώμη και *Arabidopsis*, έδειξε ότι συνοδεύεται με σοβαρές επιπλοκές στη φυτική αύξηση και ανάπτυξη (Field and Osbourn, 2008; Mylona et al, 2008; Field et al, 2011).

Στο φυτό *L. japonicus* έχουν χαρακτηριστεί οκτώ γονίδια που κωδικοποιούν συνθάσες ή κυκλάσες του 2,3-οξειδοσκουαλενίου. Το γονίδιο *LjAMY2*, το οποίο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 3 του *L. japonicus*, κωδικοποιεί μία κυκλάση μικτής δράσης, η οποία μπορεί να παράγει λουπεόλη και β-αμυρίνη. Η γονιδιωματική περιοχή γύρω από το γονίδιο αυτό διερευνήθηκε για παρακείμενα γονίδια με τα οποία ίσως να σχηματίζεται μια συστοιχία (cluster) παρόμοια με αυτές που βρέθηκαν στη βρώμη και στο *Arabidopsis*. Στη γονιδιωματική αυτή περιοχή, εντοπίστηκαν τα γονίδια *LjCYP71D353* και *LjCYP88D5* τα οποία κωδικοποιούν ένζυμα του κυτοχρώματος P-450 που πιθανώς να εμπλέκονται στο μονοπάτι βιοσύνθεσης τριτερπενοειδών στο *L. japonicus* (Krokida et al, μη δημοσιευμένα αποτελέσματα).

Στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε έλεγχος των μεταγραφημάτων των γονιδίων *LjAMY2*, *LjCYP71D353* και *LjCYP88D5* σε ρίζες φυτών στα οποία είχε προκληθεί αβιοτική καταπόνηση. Κάθε αβιοτική καταπόνηση, ανάλογα με το είδος της και τη διάρκειά της, προκαλεί μια πληθώρα αντιδράσεων στα φυτά, οι οποίες υποδεικνύονται σε πολλές περιπτώσεις με το μεταγραφικό έλεγχο μιας πληθώρας γονιδίων. Αν τα τρία υπό μελέτη γονίδια όντως οργανώνονται σε γονιδιακή συστοιχία, θα ήταν αναμενόμενο το πρότυπο έκφρασης τους μετά από μια καταπόνηση, να είναι κοινό. Όπως προαναφέρθηκε,

τα γονίδια μιας γονιδιακής συστοιχίας, συνεκφράζονται και συρρυθμίζονται που σημαίνει πως υπό τις ίδιες συνθήκες αναμένεται κοινή συμπεριφορά.

Σπόροι *L. japonicus* αναπτύχθηκαν σε τρυβλία με κατάλληλο θρεπτικό μέσο. Έπειτα τα φυτά υπέστησαν αβιοτικές καταπονήσεις (αλατότητας, υψηλής θερμοκρασίας και ψύχους). Στη συνέχεια απομονώθηκε το ολικό RNA από τις ρίζες τους, μετατράπηκε σε cDNA και κανονικοποιήθηκε σε σύγκριση με το γονίδιο της ουβικουΐτινης. Εν τέλει, με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών για κάθε γονίδιο, εξετάστηκαν τα επίπεδα των μεταγραφημάτων τους με την τεχνική της Real-time PCR.

Στην καταπόνηση αλατότητας, τα αποτελέσματα έδειξαν τα τρία γονίδια να μην επηρεάζονται ιδιαίτερα σε σύγκριση με τους μάρτυρες (controls) σε καμία από τις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος. Στις καταπονήσεις υψηλής θερμοκρασίας και ψύχους, και τα τρία γονίδια παρουσίασαν στατιστικώς σημαντική μείωση στην έκφραση τους. Τα αποτελέσματα, λοιπόν, έδειξαν πως τα γονίδια ακολουθούν κοινό μεταγραφικό προφίλ για κάθε διαφορετική καταπόνηση που ασκήθηκε. Το βασικό συμπέρασμα που αντλείται, είναι η επιβεβαίωση της συνέκφρασης των τριών γονιδίων υπό την καταπόνηση. Άλλωστε, θα ήταν παράταιρο να φαινόταν μεγάλη αύξηση ή μείωση στην έκφραση ενός μόνο εκ των τριών γονιδίων σε κάποια συγκεκριμένη καταπόνηση. Το γεγονός αυτό θα φανέρωνε πιθανό χάσμα στο βιοσυνθετικό μονοπάτι των τριτερπενοειδών, αφού και τα τρία ένζυμα μάλλον απαιτούνται για τη δημιουργία ενός ενεργού μεταβολίτη.

Έτσι λοιπόν, όλα τα αποτελέσματα αποτελούν μια επιπλέον ένδειξη που ενισχύει την ύπαρξη της «συστοιχίας της β-αμυρίνης» στο χρωμόσωμα 3 του *Lotus japonicus*. Στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος έχουν πραγματοποιηθεί και άλλες πειραματικές διαδικασίες που ενισχύουν την ύπαρξη του. Η επιβεβαίωση της ύπαρξης του θα αποτελέσει το πρώτο παράδειγμα συστοιχίας γονιδίων για τη βιοσύνθεση τριτερπενοειδών στα ψυχανθή.

## E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

1. Graham P.H., Vance C.P. (2003): Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* 131, 872–877.
2. Smil V. (1999): Nitrogen in crop production: an account of global flows. *Global Biogeochem. Cycles* 13, 647-662.
3. Dixon R.A., Sumner L.W. (2003): Legume natural products: understanding and manipulating complex pathways for human and animal health. *Plant Physiol.* Vol. 131: 878–885.
4. Udvardi M., Tabata S., Parniske M., Stougaard J. (2005): *Lotus japonicus*: legume research in the fast lane. *TRENDS in Plant Science* Vol.10 No.5.
5. Handberg K., Stougaard J. (1992): *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *Plant J.* 2: 487-496.
6. Ρουμπελάκη – Αγγελάκη Κ., 2003, μεταβολισμός του αζώτου, φυσιολογία φυτών από το μύριο στο περιβάλλον, 259-308
7. Long S.R. (1989): Rhizobium – legume nodulation: life together in the underground. *Cell* 56:203-14.
8. Vance C.P., Miller S.S., Driscoll B.T., Robinson D.L., Trepp G., Gantt J.S., Samas D.A. (1997): Nodule carbon metabolism: organic acids for N<sub>2</sub> fixation. In:



- Elmerich CE, Kondorosi A, Newton WE (eds), Biological nitrogen fixation for the 21th century. *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands*, pp 443–448.
9. Long SR. 2001. Genes and signals in the Rizobium-legume symbiosis. *PlantPhysiology* 125: 69–72.
  10. Τσέκος Ι ,2004, Μηχανισμοί άμυνας του φυτού και δευτερογενείς μεταβολίτες, *Φυσιολογία Φυτών*, 541-568
  11. Wink M. 1999. Functions of plant secondary metabolites and their exploitation *in biotechnology*. Sheffield, UK: Sheffield Academic Press.
  12. Καραμπουρνιώτης Γ. , 2003, Δευτερογενής μεταβολισμός , *Φυσιολογία φυτών, από το μόριο στο περιβάλλον*, 333 - 354
  13. Connolly, J.D. and Hill, R.A. 1991. Dictionary of Terpenoids. 1st Edn., Chapman and Hall, London, New York, ISBN: 041225770X, pp: 80-182
  14. Osbourn A.E. (1996): Preformed Antimicrobial Compounds and Plant Defense against Fungal Attack. *Plant Cell* 8, 1821-1831.
  15. Sacchettini J.C. and Poulter, C.D. 1997. Creating isoprenoid diversity. *Science* 277: 1788–1789.
  16. Phillips D., Rasbery J., Bartel B., Matsuda S. (2006): Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. *Current Opinion in Plant Biology*, 9:305-314.
  17. Augustin, J.M., Kuzina, V., Andersen, S.B., and Bak, S. (2011). Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry* 72: 435-457.
  18. I. Abe, M. Rohmer, G.D. Prestwich, Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes, *Chem. Rev.* 93 (1993) 2189–2206.
  19. Ohyama K., Shinohara H., Ogawa-Ohnishi M., Matsubayashi Y. *A glycopeptide regulating stem cell fate in Arabidopsis thaliana. Nat. Chem. Biol.* 2009;5:578-580.
  20. Kahn, R. and Durst, F. (2000), Function and evolution of plant cytochrome P450. In *Recent Advances in Phytochemistry. Vol. 34: Evolution of Metabolic Pathways.* Edited by Romeo J.T., Ibrahim R., Varin L. and DeLuca V. pp. 151–189. Elsevier Science Ltd.
  21. Sawai S and Saito K (2011) Triterpenoid biosynthesis and engineer-ing in plants. *Front. Plant Sci.* 2:25. doi: 10.3389/fpls.2011.00025

22. Sawai S., Shindo T., Sato S., Kaneko T., Tabata S., Ayabe S., Aoki T. (2006): Functional and structural analysis of genes encoding oxidosqualene cyclases of *Lotus japonicus*. *Plant Science*, 170: 247-257.
23. Haralampidis K., Bryan G., Qi X., Papadopoulou K., Bakht S., Melton R., Osbourn A. (2001): A new class of oxidosqualene cyclases directs synthesis of antimicrobial phytoprotectants in monocots. *Proc Natl Acad Sci*, 13431-13436.
24. Qi X, Bakht S, Leggett M, Maxwell C, Melton R, Osbourn A. A gene cluster for secondary metabolism in oat: implications for the evolution of metabolic diversity in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 May 25;101(21):8233-8.
25. Morita M, Shibuya M, Kushiro T, Masuda K, Ebizuka Y. (2000): Molecular cloning and functional expression of triterpene synthases from pea (*Pisum sativum*) new alpha-amyrin-producing enzyme is a multifunctional triterpene synthase. *Eur J Biochem*, 267:3453-3460.
26. Iturbe-Ormaetxe I, Haralampidis K, Papadopoulou K, Osbourn AE (2003): Molecular cloning and characterization of triterpene synthases from *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant Mol. Biol.* 51:731-743
27. Segura MJR, Jackson BE, Matsuda SPT: Mutagenesis approaches to deduce structure–function relationships in terpene synthases. *Nat Prod Rep* 2003, 20:304-317.
28. Morrissey, J.P., and Osbourn, A.E. (1999). Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 708–724.
29. Hostettmann, K. & Marston, A. (1995) *Saponins* (Cambridge Univ. Press, Cambridge, U.K.).
30. Papadopoulou K., Melton RE, Leggett M, Daniels MJ, Osbourn AE. (1999): Compromized disease resistance in saponin-deficient plants. *Proc Natl Acad Sci*, 12923-12928.
31. Werck-Reichhart, D., Feyereisen, R., 2000. Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol.* 1 (REVIEWS3003).
32. Seki H, Ohyama K, Sawai S, Mizutani M, Ohnishi T, Sudo H, Akashi T, Aoki T, Saito K, Murunaka T (2008): Licorice b-amyrin 11-oxidase, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the triterpene sweetener glycyrrhizin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105:14204-14209.
33. Keiko Yonekura-Sakakibara and Kazuki Saito : Functional genomics for plant natural product biosynthesis *Nat. Prod. Rep.*, 2009,26, 1466-1487

34. Chu HY, Wegel E, Osbourn A. From hormones to secondary metabolism: the emergence of metabolic gene clusters in plants. *Plant J.* 2011 Apr;66(1):66-79.
35. Zheng Y, Szustakowski JD, Fortnow L, Roberts RJ, Kasif S (2002) Computational identification of operons in microbial genomes. *Genome Res* 12: 1221–1230
36. Rocha EPC (2008) The organization of the bacterial genome. *Annu Rev Genet* 42: 211–233
37. Koonin E (2009) Evolution of genome architecture. *Int J Biochem Cell Biol* 41: 298–306
38. Osbourn A. Gene clusters for secondary metabolic pathways: an emerging theme in plant biology. *Plant Physiol.* 2010 Oct;154(2):531-5.
39. Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering RC, Bruford EA, Khodiyar VK, Lush MJ, Povey S, Talbot CC Jr, Wright MW, et al (2004) Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet* 5: 889–899
40. Ben Field and Anne E. Osbourn (2008): Metabolic diversification – Independent assembly of operon-like gene clusters in different plants. *Science Vol.320*: 543-547
41. Ελένη-Ισις Κωνσταντινίδου, 2003: Φυσιολογία αβιοτικών καταπονήσεων, *Φυσιολογία Φυτών, από το μόριο στο περιβάλλον*, 555-620.
42. Maria C. Rubio, Pilar Bustos-Sanmamed, Maria R. Clemente and Manuel Becana, Effects of salt stress on the expression of antioxidant genes and proteins in the model legume *Lotus japonicus*, *New Phytologist* (2009) **181**: 851–859
43. Frey M, Chomet P, Glawischnig E, Stettner C, Grun S, Winklmaier A, Eisenreich W, Bacher A, Meeley RB, Briggs SP, et al (1997) Analysis of a chemical plant defense mechanism in grasses. *Science* 277: 696–699
44. Ben Field and Anne Osbourn, 2012 *Order in the playground, Formation of plant gene clusters in dynamic chromosomal regions*, *Mobile Genetic Elements* 2:1, 46–50
45. Osbourn AE, Field B (2009) Operons. *Cell Mol Life Sci* 66: 3755–3775
46. Sproul D, Gilbert N, Bickmore W (2005) The role of chromatin structure in regulating the expression of clustered genes. *Nat Rev Genet* 6: 775–781
47. Hurst LD, Pal C, Lercher MJ (2004) The evolutionary dynamics of eukaryotic gene order. *Nat Rev Genet* 5: 299–310
48. Field B, Fiston-Lavier AS, Kemen A, Geisler K, Quesneville H, Osbourn AE. Formation of plant metabolic gene clusters within dynamic chromosomal regions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Sep 20;108(38):16116-21.

49. Mylona, P., Owatworakit, A., Papadopoulou, K. et al. (2008) Sad3 and Sad4 are required for saponin biosynthesis and root development in oat. *Plant Cell*, 20, 201–212.
50. Hadri, A. E. and Bisseling, T.(1998). Responses of the plant to Nod factors. In *The Rhizobiaceae, molecular biology of model plant-associated bacteria*. (ed. H.P. Spaink, Kondorosi A. and Hooykaas P.J.J.), pp. 403-416.Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
51. Gordon A.J., Thomas B.J., Reynolds P.H.S. (1992): Localization of sucrose synthase in soybean root nodules. *New Phytol.* 122:35–44.
52. D’Auria J.C. and Gershenzon J. (2005): The secondary metabolism of *Arabidopsis thaliana*: growing like a weed. *Current Opinion in Plant Biology.* 8:308-316.
53. Frey M, Chomet P, Glawischnig E, Stettner C, Grün S, Winklmaier A, Eisenreich W, Bacher A, Meeley RB, Briggs SP, Simcox K, Gierl A. Analysis of a chemical plant defense mechanism in grasses. *Science.* 1997 Aug 1;277(5326):696-9.
54. Winzer T, Gazda V, He Z, Kaminski F, Kern M, Larson TR, Li Y, Meade F, Teodor R, Vaistij FE, Walker C, Bowser TA, Graham IA. A Papaver somniferum 10-gene cluster for synthesis of the anticancer alkaloid noscapine. *Science.* 2012 Jun 29;336(6089):1704-8.
55. Wilderman PR, Xu M, Jin Y, Coates RM, Peters RJ. Identification of syn-pimara-7,15-diene synthase reveals functional clustering of terpene synthases involved in rice phytoalexin/allelochemical biosynthesis. *Plant Physiol.* 2004 Aug;135(4):2098-105
56. Swaminathan S, Morrone D, Wang Q, Fulton B, Peters RJ (2009) CYP76M7 is an ent-cassadiene C11a-hydroxylase defining a second multifunctional diterpenoid biosynthetic gene cluster in rice. *Plant Cell* 21: 3315–3325
57. Shimura K, Okada A, Okada K, Jikumaru Y, Ko KW, Toyomasu T, Sassa T, Hasegawa M, Kodama O, Shibuya N, et al (2007) Identification of a biosynthetic gene cluster in rice for momilactones. *J Biol Chem* 282: 34013–34018
58. Sakamoto T, Miura K, Itoh H, Tatsumi T, Ueguchi-Tanaka M, Ishiyama K, Kobayashi M, Agrawal GK, Takeda S, Abe K, et al (2004) An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice. *Plant Physiol* 134: 1642–1653
59. Viswanathan Chinnusamy , Jianhua Zhu and Jian-Kang Zhu (2007) Cold stress regulation of gene expression in plants *TRENDS in Plant Science* Vol.12 No.10

60. Wang WX, Vinocur B, Altman A. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218, 1–14.
61. Diego H. Sanchez, Felix Lippold, Henning Redestig, Matthew A. Hannah, Alexander Erban, Ute Kramer, Joachim Kopka and Michael K. Udvardi, (2008), Integrative functional genomics of salt acclimatization in the model legume *Lotus japonicus*, *The Plant Journal* (2008) 53, 973–987