

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΧΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:
«ΠΑΡΟΔΙΚΟΣ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ
ΣΥΝΘΑΣΗ ΤΗΣ β-ΑΜΥΡΙΝΗΣ ΣΤΟ ΦΥΤΟ *Medicago*
***truncatula*»**



ΝΤΑΛΛΑΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:
ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΚΑΛΛΙΟΠΗ
ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2013

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Παπαδοπούλου Καλλιόπη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών

Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος

Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας

Τσίκου Δανιέλα

**Διδάσκουσα ΠΔ 407 Βιοτεχνολογίας Φυτών, Μοριακής και Αναπτυξιακής
Φυτών**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω εκ βαθέων την επιβλέπουσα της παρούσας εργασίας, την αναπληρώτρια καθηγήτρια κ. Παπαδοπούλου Καλλιόπη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε για την ανάθεση του θέματος, τη βοήθεια και τις πολύτιμες συμβουλές ώστε να ολοκληρωθεί επιτυχώς η παρούσα πτυχιακή.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Τσίκου Δανιέλα και τον κ. Ματθιόπουλο Κωνσταντίνο που συγκροτούν μαζί με την κ. Παπαδοπούλου την τριμελή επιτροπή.

Ευχαριστώ επίσης την υποψήφια διδάκτορα Κροκιδά Αφροδίτη για τη βοήθεια της κατά την εκπόνηση της πτυχιακής εργασίας, καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα, τη συνεργασία και για τις ευχάριστες αναμνήσεις που μου προσέφεραν.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς και τους φίλους μου για την αμέριστη συμπαράσταση και στήριξή τους όλο αυτό το διάστημα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	6
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1. Δευτερογενείς μεταβολίτες	7
2. Βιοσύνθεση τριτερπενοειδών	9
3. Συνθάση της β-αμυρίνης και παραγωγής σαπωνινών	12
4. Γονιδιακές συστοιχίες	17
5. Το ψυχανθές <i>Medicago truncatula</i> ως φυτικό μοντέλο	20
6. <i>Agrobacterium rhizogenes</i> και μετασχηματισμός <i>Hairy Root</i>	21
7. Γονιδιακή σίγηση μέσω του μηχανισμού RNAi	23
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	26
2. Ανάλυση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αγαρόζης	27
3. Προετοιμασία σπόρων	29
4. Μετασχηματισμός «ικανών» κυττάρων <i>Escherichia coli</i>	30
4.1 Προετοιμασία «ικανών» κυττάρων προς μετασχηματισμό	30
4.2 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων <i>Escherichia coli</i>	31
5. Μετασχηματισμός «ικανών» κυττάρων <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	32
5.1 Προετοιμασία «ικανών» κυττάρων προς μετασχηματισμό	32
5.2 Μετασχηματισμός κυττάρων αγροβακτηρίου	33
5.3 Πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδιακού φορέα από κύτταρα αγροβακτηρίου	33
6. Μόλυνση φυτών με το <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	34
7. Ανάπτυξη φυτών	35
8. Επιλογή φυτών και μόλυνση με το βακτήριο <i>Sinorhizobium meliloti</i>	36
9. Απομόνωση ολικού RNA από φυτικούς ιστούς- Μέθοδος με LiCl	38
10. Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊκών οξέων	39
11. Χειρισμός ολικού RNA με DNάση	40
12. Σύνθεση cDNA από RNA μέσω αντίστροφης μεταγραφάσης	40
13. Αλυσιδωτή αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR)	41

13.1 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qRT-PCR)	41
13.2 Επιλογή εκκινητών	45
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
1. Σκοπός	46
2. Ανάπτυξη και μόλυνση φυτών με το <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	46
3. Έλεγχος της έκφρασης του γονιδίου β -AS στις μετασχηματισμένες ρίζες <i>Medicago truncatula</i>	51
4. Έλεγχος της έκφρασης του γονιδίου β -AS ορισμένων βασικών γονιδίων στα φυμάτια	59
Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	65
Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	69

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τριτερπένια αποτελούν την κύρια ομάδα της υπεροικογένειας των τερπενίων, που ανήκουν στους δευτερογενείς μεταβολίτες. Σε αρκετά φυτικά είδη έχει παρατηρηθεί η οργάνωση των γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών σε γονιδιακές συστοιχίες. Έτσι, είναι δυνατό να παράγεται μία ευρεία ποικιλία τερπενίων, έπειτα από τη σύνθεσή τους από γονίδια που κωδικοποιούν συνθάσες και από γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα που συμβάλλουν στη βιολογική ενεργοποίηση των τριτερπενίων. Ένα τέτοιο ένζυμο είναι η συνθάση της β-αμυρίνης, η οποία μετατρέπει το 2,3-οξειδοσκουαλένιο σε β-αμυρίνη, μέσω της οποίας παράγονται οι σαπωνίνες, που έχουν κυρίως αντιμυκητιακή δράση. Στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε σίγηση του γονιδίου *β-AS* που κωδικοποιεί τη συνθάση της β-αμυρίνης στο φυτό *Medicago truncatula*. Στη συγκεκριμένη μελέτη, χρησιμοποιήθηκε το *Agrobacterium rhizogenes* το οποίο μετασχηματίστηκε με τη βοήθεια μιας πλασμιδιακής κατασκευής (pUbi-βAS) που περιείχε αντίστροφες αλληλουχίες του ανοιχτού αναγνωστικού πλαισίου αυτού του γονιδίου της β-αμυρίνης προς παραγωγή φουρκέτας που οδηγεί σε σίγηση του γονιδίου μέσω του μηχανισμού RNAi. Τα μετασχηματισμένα φυτά ελέγχθηκαν για τα επίπεδα έκφρασης της συνθάσης της β-αμυρίνης στις ρίζες μέσω ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου και βρέθηκαν 5 φυτά με αυξημένο ποσοστό σίγησης. Τα αποτελέσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βάση για την εξασφάλιση περαιτέρω στοιχείων για τη βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών και την ύπαρξη κάποιας γονιδιακής συστοιχίας στο *Medicago truncatula*, καθώς και την επίδραση της β-αμυρίνης στην ανάπτυξη του φυτού και στο σχηματισμό συμβιωτικών σχέσεων με βακτήρια του εδάφους.

ABSTRACT

Plants synthesize a diverse range of secondary metabolites that have a wide range of functions from pigmentation to plant defense. Oxidosqualene cyclases (OSCs) catalyze the first committed step in triterpenoid secondary metabolite synthesis and cyclise 2,3-oxidosqualene to a number of cyclic products. β -amyrin is by far the most popular type of triterpenes found in plants and is formed from 2,3-oxidosqualene folded in pre-chair-chair-chair conformation. In the present work, the β -amyrin synthase gene was silenced in *Medicago truncatula* through the process of RNA interference (RNAi), using *Agrobacterium rhizogenes*. Five transformed plant lines with low expression of the β -amyrin synthase gene were identified by quantitative real-time PCR. These plants will contribute to understanding the influence of β -amyrin in the plant development and physiology, as well as for the nodulation caused by the bacterium *Sinorhizobium meliloti*, thus giving future prospects for the identification of new triterpenoid saponins or new biochemical pathways.

A.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΙΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ

Η μεταβολική δραστηριότητα για τη σύνθεση των απαραίτητων συστατικών, τα οποία συγκροτούν τη θεμελιώδη δομή και διαμορφώνουν τον τρόπο λειτουργίας των φυτικών κυττάρων, χαρακτηρίζεται συνολικά ως πρωτογενής μεταβολισμός. Οι βιοχημικοί μηχανισμοί που συμμετέχουν στον πρωτογενή μεταβολισμό δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ κυττάρων, ιστών ακόμα και οργανισμών. Προϊόντα του πρωτογενούς μεταβολισμού είναι οι ορμόνες (γιββερελίνες και βρασσινοστεροειδή), φωτοσυνθετικές χρωστικές (καροτενοειδή), συστατικά μεμβρανών (στερόλες) και μεταφορείς ηλεκτρονίων (χλωροφύλλη) (Liu et al, 2005). Ωστόσο, η πλειοψηφία των μεταβολικών προϊόντων (περισσότερα από 20.000 γνωστές δομές μέχρι σήμερα) παράγεται σε επιμέρους ιστούς και σε συγκεκριμένα στάδια ανάπτυξης (Connolly, 1991). Τα βιομόρια αυτά προέρχονται από ενδιάμεσες ενώσεις του πρωτογενούς μεταβολισμού και συντίθενται μέσω βιοχημικών οδών που στο σύνολό τους συνιστούν τον δευτερογενή μεταβολισμό (Καραμπουρνιώτης Γ., 2003).

Με βάση τα πρόδρομα βιομόρια, προϊόντα του πρωτογενούς μεταβολισμού από τα οποία συντίθενται οι πολυάριθμοι δευτερογενείς μεταβολίτες, οι τελευταίοι κατατάσσονται στις εξής κατηγορίες:

- α) Την ομάδα των φαινολικών ουσιών που περιλαμβάνει μεταβολίτες, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη ενός τουλάχιστον αρωματικού δακτυλίου στο μόριό τους και προέρχονται από τις βιοσυνθετικές οδούς του σικιμικού και του μηλονικού οξέος.
- β) Την ομάδα των τερπενίων που συντίθενται μέσω της βιοσυνθετικής οδού του μεβαλονικού με πρόδρομο μόριο το ακέτυλο-συνένζυμο Α.
- γ) Την ομάδα των αζωτούχων δευτερογενών μεταβολιτών, που περιλαμβάνει ενώσεις οι οποίες προέρχονται από αμινοξέα.

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι γνωστοί για τη δράση τους σε σημαντικές λειτουργίες της οικολογίας του φυτού, όπως είναι η προστασία από βιοτικούς (παράσιτα, παθογόνα, ακόμα και ζώα) και αβιοτικούς παράγοντες (ηλιοφάνεια, θερμοκρασία) καθώς και η επικοινωνία μέσω χρωστικών ή πτητικών ενώσεων.

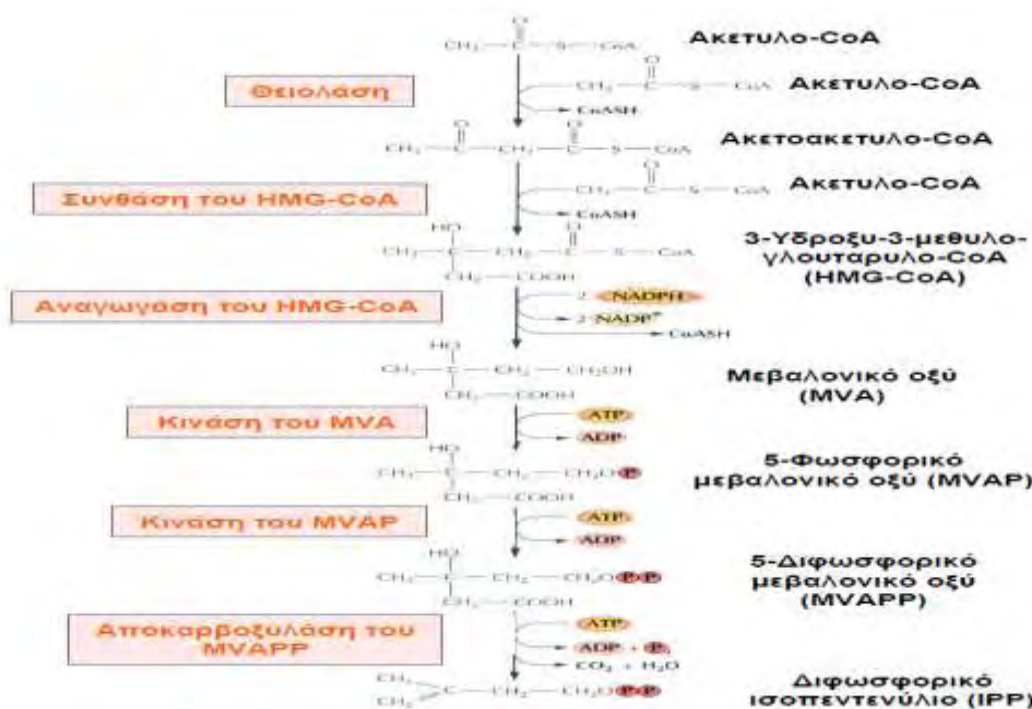
Επιπρόσθετα, επιδρούν στην ανάπτυξη άλλων φυτών (φαινόμενο αλληλοπάθειας) μέσω πτητικών ενώσεων ή μεταβολιτών που εντοπίζονται στο έδαφος, όπως επίσης και στην εγκαθίδρυση συμβιωτικών σχέσεων με βακτήρια, με την έκκριση φαινολικών ενώσεων (Καραμπουρνιώτης Γ., 2003; McGarvey and Croteau, 1995).

Τα τερπένια αποτελούν την πολυπληθέστερη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών, με κύριο ρόλο στη συμβολή της άμυνας του φυτού. Πρόκειται για μία ομάδα λιπιδίων των οποίων ο βασικός σκελετός είναι ένα μόριο υδρογονάνθρακα με 5 άτομα άνθρακα, το ισοπεντενύλιο (IPP). Το ισοπεντενύλιο είναι η ενεργοποιημένη μορφή του ισοπρενίου, το οποίο προέρχεται από τη συμπύκνωση τριών μορίων ακέτυλο-CoA. Με βάση τον αριθμό των μονάδων του ισοπρενίου, προκύπτουν οι εξής ομάδες:

- Τα μονοτερπένια ($C_{10}H_{16}$) από τα οποία παράγονται πτητικά παράγωγα των ανθέων (μενθόλη).
- Τα σεσκιτερπένια ($C_{15}H_{24}$) που υπάρχουν στα αιθέρια έλαια και λειτουργούν ως αντιμικροβιακές φυτοαλεξίνες και αποτρέπουν την προσβολή από έντομα.
- Τα διτερπένια ($C_{20}H_{32}$) με κύριο χαρακτηριστικό εκπρόσωπο τις γερανυλγερανιόλες, που απωθούν τα κουνούπια αλλά προσελκύουν τις μέλισσες για επικονίαση.
- Τα τριτερπένια ($C_{30}H_{48}$) που αποτελεί τη σημαντικότερη ομάδα αμυντικών μεταβολιτών ενάντια σε μύκητες και παθογόνα. Σε αυτά περιλαμβάνονται τα στεροειδή (φυτοεκδυσόνες), τα λεμονοειδή (αιθέραια έλαια λεμονιάς), τα καρδιακά γλυκοζίδια (ολεανδρίνη) και οι σαπωνίνες (που παράγονται από τις πρόδρομες ενώσεις α-αμυρίνη, β-αμυρίνη, λουπεόλη).
- Τα τετρατερπένια ($C_{40}H_{64}$) τα οποία συμβάλλουν στην ανάπτυξη και προστασία του φυτού (καροτενοειδή που παρίστανται στο κέντρο αντίδρασης και στα σύμπλοκα κεραιών του φωτοσυστήματος, ενώ ταυτόχρονα απορροφά την υπεριώδη ακτινοβολία του ήλιου) (Καραμπουρνιώτης Γ., 2003; McGarvey and Croteau, 1995; Barnard et al, 2004; Danka et al., 1990).

2. ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΡΙΤΕΡΠΕΝΟΕΙΔΩΝ

Τα τριτερπενοειδή συντίθενται από το μεβαλονικό οξύ, το οποίο προέρχεται από το ακετύλο-CoA, το μόριο εισόδου στον κύκλο του κιτρικού οξέος. Στο ενδοπλασματικό δίκτυο, σε ένα μόριο ακετύλο-CoA ακολουθεί προσθήκη δύο μορίων ακετύλο-CoA μετατρέπεται σε 3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρυλο-CoA με τη δράση μιας θειολάσης και μιας συνθάσης, το οποίο στη συνέχεια ανάγεται σε μεβαλονικό οξύ στο κυτταρόπλασμα. Το μεβαλονικό οξύ φωσφορυλιώνεται δύο φορές από δύο κινάσες: την κινάση του μεβαλονικού οξέος και την κινάση του 5-διφωσφορικού μεβαλονικού οξέος (Vranova et al, 2012; Philips et al, 2006). Έπειτα, απομακρύνεται ένα μόριο CO₂ μέσω της αποκαρβοξυλάσης του 5-διφωσφορικού μεβαλονικού οξέος με την κατανάλωση ενός μορίου ATP και έτσι προκύπτει το ισοπεντενύλιο (IPP) (εικόνα 1).

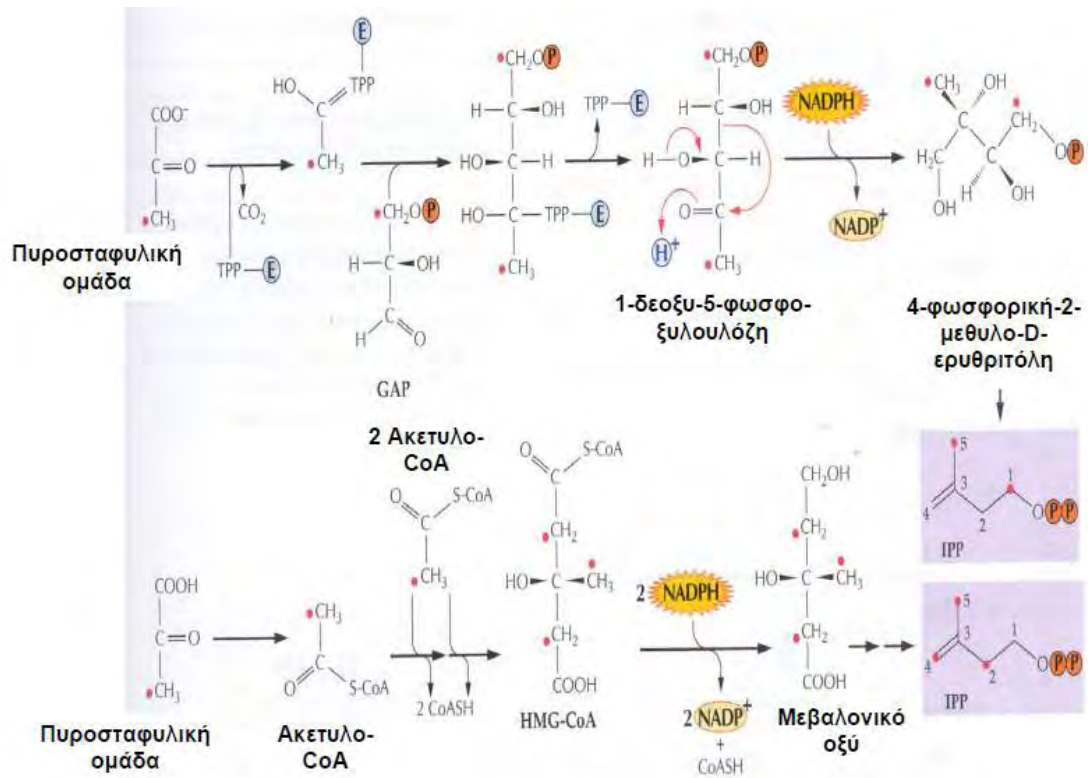


Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση της βιοσύνθεσης του διφωσφορικού ισοπεντενυλίου στο κυτταρόπλασμα (Istvan et al.2000)

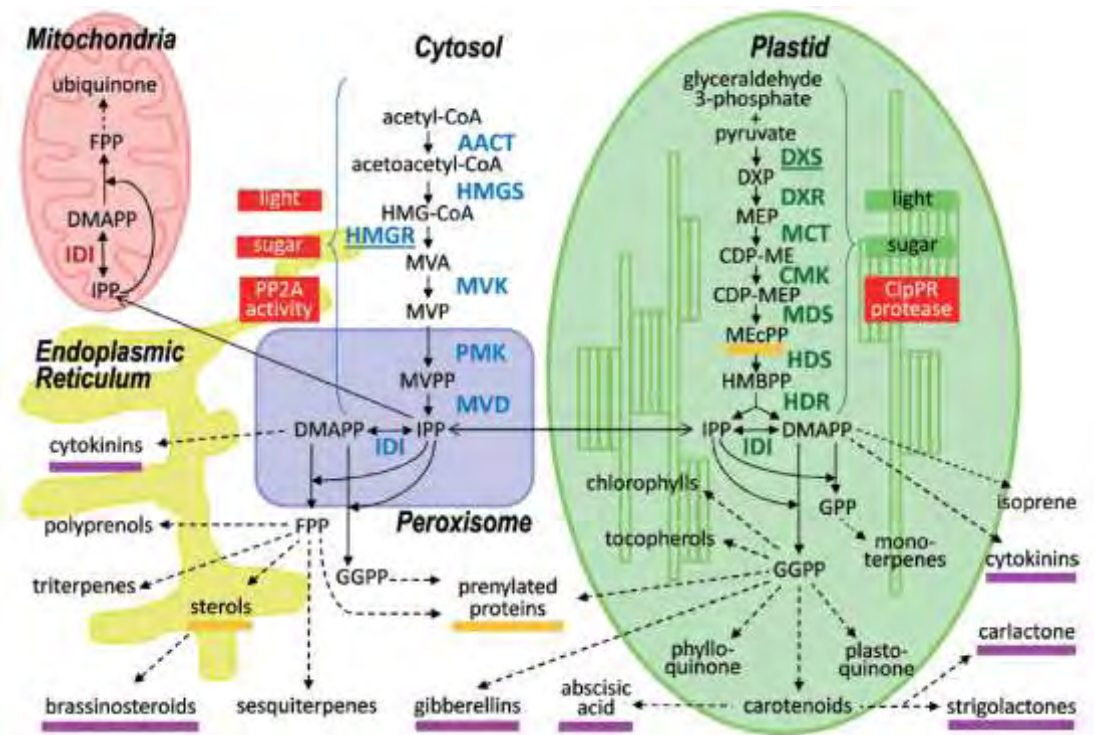
Ισομερής μορφή του IPP είναι το διφωσφορικό διμεθυλοαλλύλιο (DMAPP). Τα δύο ισομερή συμπυκνώνονται και σε αυτά προστίθενται ένα ακόμα μόριο IPP που οδηγεί στο σχηματισμό του διφωσφορικού γερανύλιου (GPP). Με προσθήκη ενός ακόμα IPP σχηματίζεται το διφωσφορικό φαρνεσύλιο (FPP), το οποίο αποτελείται

από 15 άτομα άνθρακα και είναι η πρόδρομη ένωση των σεσκιτερπενίων. Οι παραπάνω αντιδράσεις καταλύονται από ένζυμα που ανήκουν στην κατηγορία των πρενυλτρανσφερασών στο κυτταρόπλασμα.

Εκτός από την οδό του μεβαλονικού οξέος, τα φυτά εναλλακτικά βιοσυνθέτουν το ισοπρένιο μέσω του μονοπατιού της 4-φωσφορικής-2-μεθυλ-ερυθριτόλης (MEP) που λαμβάνει μέρος στους χλωροπλάστες (Eisenrich et al., 1998; Vranova et al., 2012). Το πλαστιδιακό μονοπάτι θεωρείται υπεύθυνο για τη βιοσύνθεση των μονοτερπενίων, των διτερπενίων και των τετρατερπενίων, καθώς και της φυτόλης, των καροτενοειδών και της πλευρικής αλυσίδας της χλωροφύλλης. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 2, η πρώτη αντίδραση αυτού του μονοπατιού είναι η σύμπτυξη του πυροσταφυλικού και της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεύδης, ένα ενδιάμεσο που προέρχεται από την γλυκόλυση και τον κύκλο του Calvin, προς παραγωγή 1-δεοξυ-5-φωσφο-ξυλουλόζης (DXP) (McGarvey and Croteau, 1995). Στη συνέχεια, μέσω της ρεδουκτάσης DXP και με κατανάλωση 1 μορίου NADPH, παραγείται η 4-φωσφορική-2-μεθυλο-D-ερυθριτόλη (CDP). Έπειτα, όπως απεικονίζεται συνοπτικά και στην εικόνα 3, μέσω μιας ρεδουκτάσης και δύο συνθασών, παράγεται το διφωσφορικό ισοπεντενύλιο. Σήμερα έχει αποδειχτεί ότι μεταξύ των δύο μονοπατιών που λειτουργούν παράλληλα υπάρχει ανταλλαγή πρόδρομων χημικών μορίων, ενώ κάποια τερπένια βιοσυντίθενται μέσω και των δυο μονοπατιών, ανάλογα με τις ανάγκες του φυτού. Έχει παρατηρηθεί μεταφορά ισοπρενίων από το κυτταρόπλασμα στα πλαστίδια και αντίστροφα. Τελικά, δύο μόρια διφωσφορικού φαρνεσουλίου σχηματίζουν το σκουαλένιο, μετά από μία αντίδραση συμπύκνωσης που καταλύεται από την σκουαλεϊνική συνθάση (SQS) σχηματίζουν το σκουαλένιο, το οποίο μετατρέπεται σε 2,3-οκείδοσκουαλένιο με τη δράση μιας μονοξυγενάσης, της εποξειδάσης του σκουαλενίου (SQE) (Vranova et al., 2012).



Εικόνα 2: Σειρά αντιδράσεων για την παραγωγή διφωσφορικού ισοπεντενυλίου στο κυτταρόπλασμα και στους χλωροπλάστες



Εικόνα 3: Κυτταρική τοπολογία του μεταβολικού συστήματος των ισοπrenoειδών σε φυτικά κύτταρα όπως συμπεράθηκε από τη διαμερισματοποίηση των ενζύμων του

Arabidopsis thaliana. Συντομογραφίες: Mt: Μιτοχόνδρια, Chl: Χλωροπλάστες, ER: Ενδοπλασματικό δίκτυο, AACT: Θειολάση του ακετοακέτυλο-CoA, HMGS: Συνθάση του 3-υδροξυ-3-μεθυλγλουταρυλ-CoA, HMGR: Ρεδοκτάση του 3-υδροξυ-3-μεθυλγλουταρυλ-CoA MVA: Μεβαλονικό οξύ, MK: Κινάση του μεβαλονικού οξέος, MVP: 5-φωσφομεβαλονικό οξύ, PMK: Κινάση του φωσφομεβαλονικού οξέος, MVPP: 5-διφωσφορικό μεβαλονικό οξύ, MPDC: Απόκαρβοξυλάση του 5-διφωσφορικού μεβαλονικού οξέος, GA-3P: 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη, DXS: Συνθάση της 1-δεοξυ-5-φωσφοξυλουλόζης, DXR: Ρεδοκτάση της 1-δεοξυ-5-φωσφοξυλουλόζης, MEP: 4-φωσφορική-2-μεθυλ-D-ερυθριτόλη, MCT: Κυτιδύλτρανσφεράση της 4-φωσφορικής-2-μεθυλ-D-ερυθριτόλης, CDP-ME: 4-(κυτιδινη-5-διφωσφο)-2-C-μεθυλ-D-ερυθριτόλη, CMK: Κινάση της : 4-(κυτιδινη-5-διφωσφο)-2-C-μεθυλ-D-ερυθριτόλης, CDP-ME2P: 2-φωσφο-4-(κυτιδινη-5-διφωσφο)-2-C-μεθυλ-D-ερυθριτόλη, MCS: συνθάση της 2,4-δικυκλοφωσφορικής 2-C-μεθυλ-D-ερυθριτόλης, HDS: συνθάση του 1-υδροξυ-2-μεθυλ-4-διφωσφορικού βουτενυλίου, HDR: ρεδοκτάση του 1-υδροξυ-2-μεθυλ-4-διφωσφορικού βουτενυλίου, IPPI: Ισομεράση του διφωσφορικού ισοπεντενυλίου, DMAPP: διφωσφορικό διμεθυλαλλύλιο, GPS: υνθάση του διφωσφορικού γερανυλγερανυλίου, OPS: Συνθάση του διφωσφορικού ολιγοπρενυλίου, SPS: Συνθάση του διφωσφορικού σολανεσυλίου, PPS: Συνθάση του διφωσφορικού πολυπρενυλίου, SQS: Συνθάση του σκουαλένιου, PSY: Συνθάση του φυτοένιου, IPT: Τρανσφεράση του ισοπεντενυλίου, SS: Συνθάση των σεσκιτερπενοειδών, MS: Συνθάση των μονοτερπενοειδών, DS: Συνθάση των διτερπενοειδών, HPT: Τρανσφεράση του ομογεντισικού οξέος, HST: Τρανσφεράση του ομογεντισικού σολανεσυλίου, DHNAPT: Τρανσφεράση του 1,4-διυδροξυ-2 ναφτοϊκού φυτυλίου, HBPT: πολυπρενυλτρανσφεράση του 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος, GGR: Ρεδοκτάση του γερανυλ-γερανυλίου, CHS: Συνθάση της χλωροφύλλης. (Pulido et al., 2012)

3. ΣΥΝΘΑΣΗ ΤΗΣ β-ΑΜΥΡΙΝΗΣ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΣΑΠΩΝΙΝΩΝ

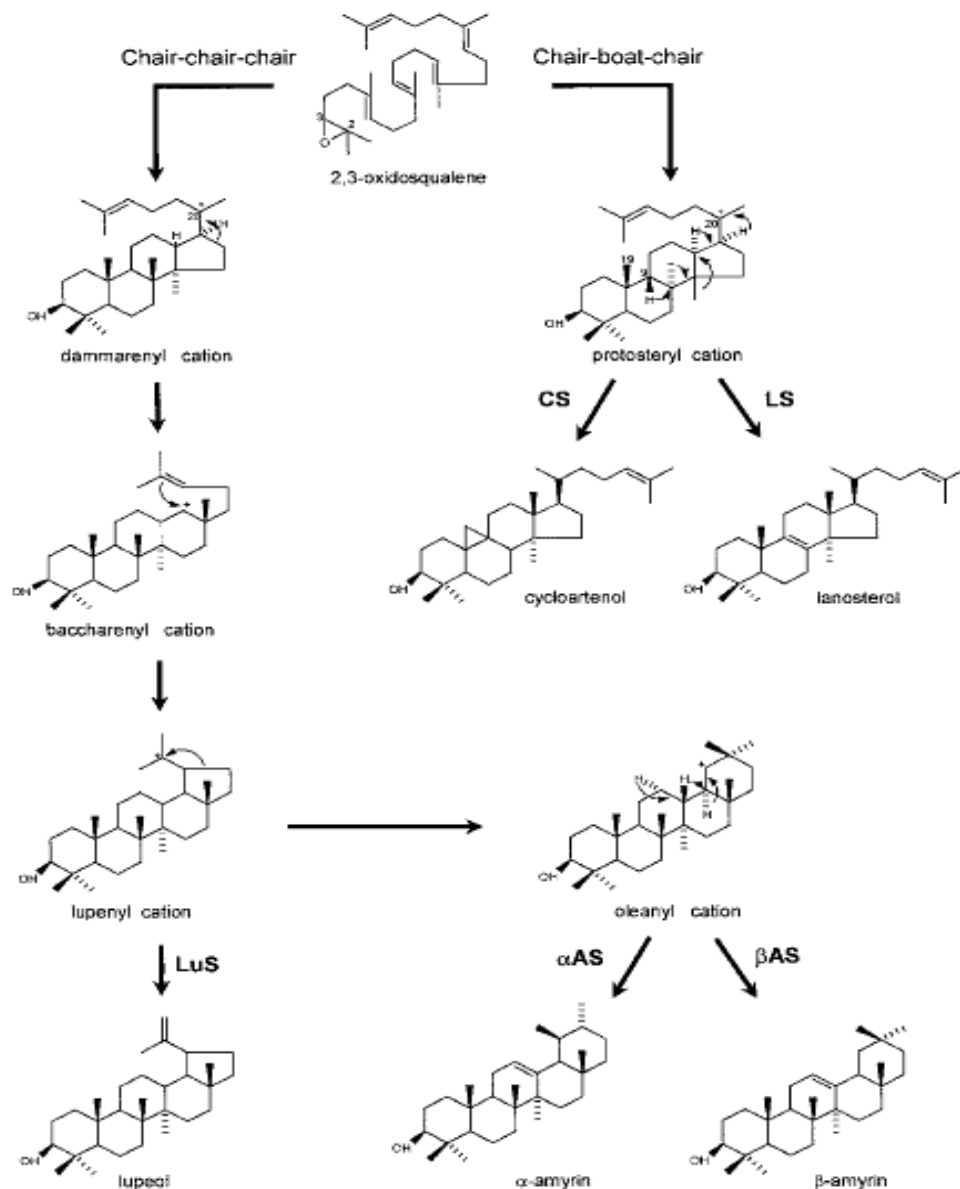
Το 2,3-οξειδοσκουαλένιο αποτελεί σημείο διακλάδωσης μεταξύ πρωτογενούς και δευτερογενούς μεταβολισμού καθώς μπορεί είτε να κυκλοποιηθεί και να παραχθούν στερόλες και στεροειδή (πρωτογενείς μεταβολίτες), τα οποία αποτελούν βασικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών, είτε να κυκλοποιηθεί προς σχηματισμό τριτερπενοειδών αλκοολών ή αλδεϊδών (δευτερογενείς μεταβολίτες). Τα ένζυμα που καταλύουν την κυκλοποίηση του 2,3-οξειδοσκουαλένιου (συνθάσες ή κυκλάσες του 2,3-οξειδοσκουαλένιου, OSCs) σταθεροποιούν ενδιάμεσες δομές καρβοκατιόντων για να σχηματιστεί μέχρι και εξακυκλικός ανθρακικός σκελετός (Phillips et al,2006).

Η συνθάση της κυκλοαρτενόλης (CAS) μετατρέπει το 2,3-οξειδοσκουαλένιο σε κυκλοαρτενόλη διαμέσου του ενδιάμεσου κατιόντος του προτοστερυλίου στη

“chair-boat-chair” διαμόρφωση προς παραγωγή στερολών και στεροειδών. Οι τριτερπενοειδείς αλκοόλες προκύπτουν από τη δράση των OSCs διαμέσου σχηματισμού του ενδιάμεσου κατιόντος του νταμαρενυλίου στη μορφή “chair-chair-chair”. Η διαφορά ανάμεσα σε αυτές τις δύο διαμορφώσεις είναι ότι στη διαμόρφωση “chair-chair-chair”, η μεθυλομάδα του άνθρακα 8 «δείχνει» προς τα πάνω και η μεθυλομάδα του άνθρακα 14 «δείχνει» προς τα κάτω, ενώ στη διαμόρφωση “chair-boat-chair”, εμφανίζεται η αντίθετη στερεοδιάταξη.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, ο ανθρακικός σκελετός στα τριτερπένια είναι πεντακυκλικός. Αυτός προέρχεται από το 2,3-οξειδοσκουαλένιο στην «pre-chair-chair» διαμόρφωση και η επαγόμενη από πρωτόνια κυκλοποίηση οδηγεί στην παραγωγή του κατιόντος του νταμαρενυλίου. Μία μετατόπιση δεσμού μεταξύ των ανθράκων 16-17 οδηγεί στο σχηματισμό του τετρακυκλικού καρβοκατιόντος του μπαχαρενυλίου και μετατρέπεται στο πεντακυκλικό καρβοκατιόν του λουπενυλίου, έπειτα από αντίδραση του δεσμού μεταξύ των ανθράκων 24 και 25. Το καρβοκατιόν του λουπενυλίου μπορεί να αναδιοργανωθεί περαιτέρω, πρώτα σε καρβοκατιόν του γερμανικενυλίου του άνθρακα 18 και έπειτα μέσω μιας σειράς μετατόπισης υδρογόνων προκύπτει το κατιόν του ολεανυλίου. (Vincken et al, 2007). Αυτό το κατιόν αποτελεί υπόστρωμα για τη συνθάση της α- και η β-αμυρίνης, οπότε και παράγονται τα αντίστοιχα προϊόντα.

Στις τριτερπενοειδείς αλκοόλες ανήκουν η λουπεόλη, η α-αμυρίνη και η β-αμυρίνη. Η συνθάση της λουπεόλης κυκλοποιεί το 2,3-οξειδοσκουαλένιο, με αποτέλεσμα το σχηματισμό του κατιόντος της λουπεόλης, προωθεί την επέκταση του δακτυλίου και τέλος, αποσπά ένα πρωτόνιο από τον άνθρακα 29 για να σχηματιστεί η λουπεόλη. Η συνθάση της β-αμυρίνης παράγει επίσης το κατιόν της λουπεόλης και επιτρέπει σε μεγαλύτερο βαθμό την επέκταση του δακτυλίου και ορισμένες αναδιαμορφώσεις, πριν την αποπρωτονίωση προς σχηματισμό β-αμυρίνης (Phillips et al.,2006). Όλα τα παραπάνω ένζυμα δρουν μέσω ηλεκτρονιόφιλων μηχανισμών και χαρακτηριστική τους ιδιότητα είναι η παραγωγή πολλαπλών προϊόντων, η οποία ενδέχεται να είναι απόρροια του μηχανισμού των ηλεκτρονιόφιλων αντιδράσεων που καταλύουν, αποσπώντας πρωτόνια από τους άνθρακες των σκελετών των μορίων (Vincken et al.,2007).



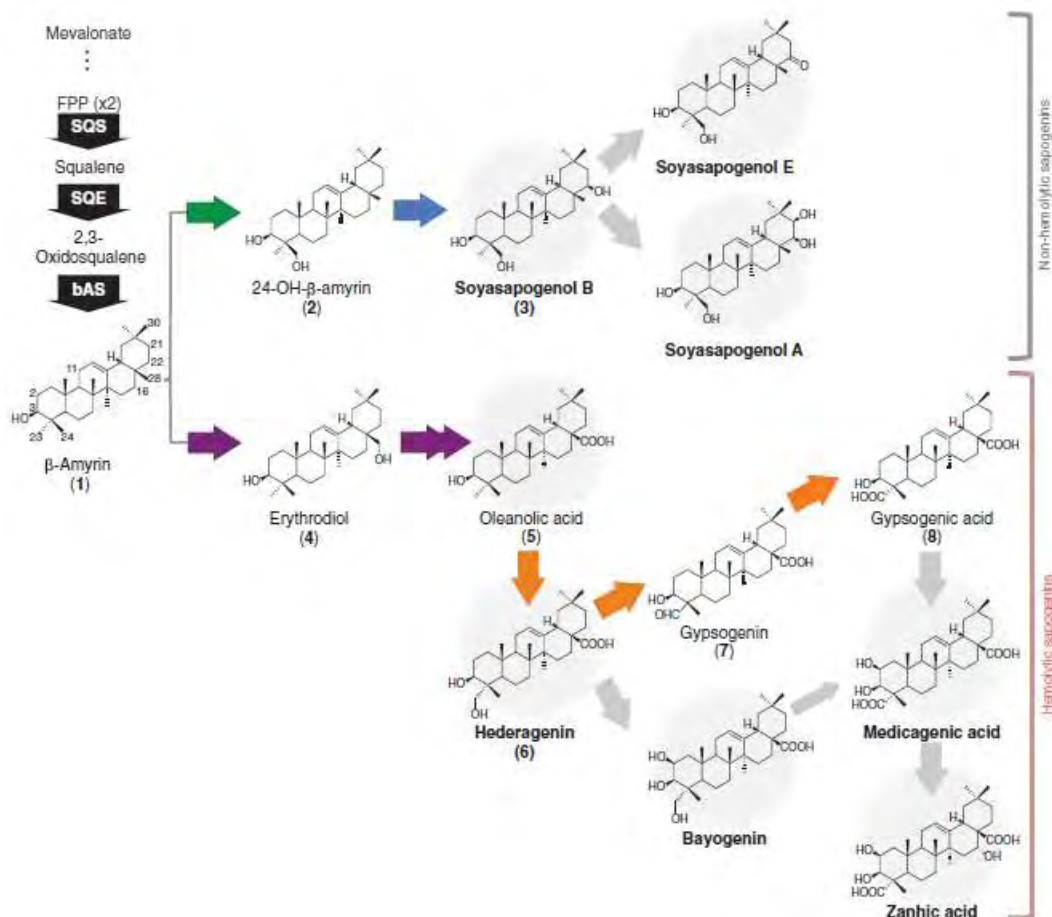
Εικόνα 4:Κυκλοποίηση του 2,3-οξειδοσκουαλενίου προς παραγωγή τριτερπενίων (α -αμυρίνη, β -αμυρίνη και λουπεόλη) και στερολών (κυκλοαρτενόλη και λανοστερόλη). Τα ένζυμα που καταλύουν τις υπαφαινόμενες αντιδράσεις είναι η συνθάση της α -αμυρίνης (α AS), η συνθάση της β -αμυρίνης (β AS), η συνθάση της λουπεόλης (LuS), η συνθάση της κυκλοαρτενόλης (CS) και η συνθάση της λανοστερόλης (LS) (Kushiro et al,1999).

Στο *Lotus japonicus*, έχουν εντοπιστεί δύο γονίδια που κωδικοποιούν για συνθάσες της β -αμυρίνης: Το γονίδιο *LjAMY1* που κωδικοποιεί για μία συνθάση της β -αμυρίνης και το γονίδιο *LjAMY2* που κωδικοποιεί μία συνθάση μικτής δράσης. Αμφότερα τα γονίδια εκφράζονται στα φύλλα, στη ρίζα και στα φυμάτια. Στο *Medicago truncatula*, η συνθάση της β -αμυρίνης παράγεται από το γονίδιο *MtAMY1* (ή β -AS) που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 4. Το ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο αποτελείται από 2286 νουκλεοτίδια προς παραγωγή της αντίστοιχης πρωτεΐνης που

αποτελείται από 762 αμινοξέα 87 kDa, όπως ισχύει και για το γονίδιο *LjAMY2*. Η έκφραση του MtAMY1 εντοπίζεται σε όλους τους ιστούς, αλλά μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης εντοπίζονται στο μεριστωματικό ιστό και στο βλαστό (Iturbe-Ormaeche et al, 2003). Όπως παρατηρήθηκε και στο ροδάκινο (*Pisum sativum*), η μέγιστη παραγωγή της β-αμυρίνης παρατηρείται δύο ημέρες μετά την εκβλάστηση ενώ η βιοσύνθεση των στερολών πραγματοποιείται ορισμένες ημέρες αργότερα.

Από την β-αμυρίνη, παράγονται κυρίως γλυκοζυλιωμένες μορφές που ονομάζονται σαπωνίνες, που έχουν αντιμυκητιακή δράση, ενώ σε ορισμένα φυτά έχουν προταθεί επιπρόσθετες δράσεις όπως στην περίπτωση του *Pisum sativum* όπου οι σαπωνίνες συμβάλλουν στον βαρυτροπισμό και στην παραγωγή κυτταρίνης (Rahman et al, 2011). Μετά το σχηματισμό του καρβοκατιόντος από το 2,3-οξειδοσκουαλένιο, ο βασικός σκελετός μπορεί να δεχθεί διάφορους υποκαταστάτες όπως υδροξυλομάδες, καρβονυλομάδες και κατάλοιπα σακχάρων σε διαφορετικές θέσεις στο σκελετό από ένζυμα του κυτοχρώματος P450, με αποτέλεσμα να σχηματίζεται μία πλειάδα προϊόντων.

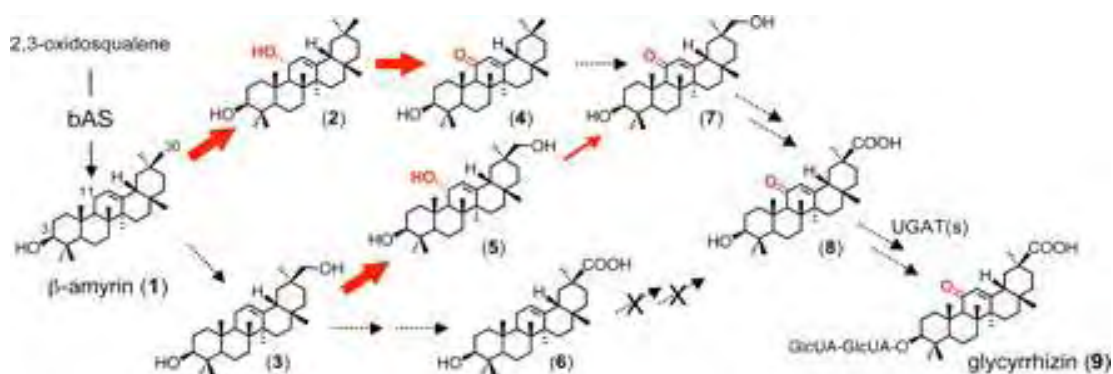
Στο φυτό *Medicago truncatula*, έχουν βρεθεί σαπωνίνες από τουλάχιστον πέντε διαφορετικές αγλυκόνες: *soyasapogenol B*, *soyasapogenol E*, *medicagenic acid*, *hederagenin* και *bayogenin* (εικόνα 5). Οι αγλυκόνες αυτές προέρχονται έπειτα από διάφορα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 και μπορούν να τροποποιηθούν περαιτέρω μέσω οξείδωσης, ακετυλίωσης ή γλυκοσυλίωσης προς παραγωγή σαπωνινών. Το είδος των σαπωνινών που θα παραχθούν εξαρτάται από το γενετικό υπόβαθρο, την ηλικία του φυτού, τον τύπο του ιστού και από το περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσεται το φυτό (Hostetmann et al, 1995).



Εικόνα 5: Μονοπάτι βιοσύνθεσης αγλυκόνων στο φυτό *Medicago truncatula* (Fukushima et al, 2013). Το πράσινο βέλος υποδεικνύει την οξειδάση CYP9E2 προσθέτοντας μία υδροξυλομάδα στη θέση 24 στην β-αμυρίνη. Το μπλε βέλος αντιπροσωπεύει την οξειδάση CYP72A61v2 που οξειδώνει την οξειδωμένη β-αμυρίνη στην αγλυκόνη *Soyasapogenol B*, η οποία με τη σειρά της μετατρέπεται στις μη αιμολυτικές αγλυκόνες *Soyasapogenol A* και *Soyasapogenol E* μέσω άγνωστων ενζυμικών μηχανισμών. Το μωβ βέλος αντιπροσωπεύει την οξειδάση CYP716A12 που μέσω δύο διαδοχικών οξειδώσεων στη θέση 28 μετατρέπει τη β-αμυρίνη σε ολεανολικό οξύ, το οποίο με τη σειρά του οξειδώνεται διαδοχικά στην θέση 23 από την οξειδάση CYP72A68v2 προς παραγωγή του *gypsogenic acid* μέσω της αγλυκόνης *hederagenin*. Από την τελευταία, παράγονται οι αιμολυτικές αγλυκόνες *medicagenic acid* και *zanhic acid*, χωρίς να είναι ακόμα γνωστοί οι μηχανισμοί παραγωγής τους (γκρι βέλη και γκρι σκίαση των μορίων) (Fukushima et al, 2013)

Ένα παράδειγμα τροποποιήσεων της β-αμυρίνης περιλαμβάνει το σχηματισμό γλυκυριζίνης, μιας σαπωνίνης που χρησιμοποιείται ως γλυκαντική και αντιφλεγμονώδης ουσία, στη γλυκόριζα (*Glycyrrhiza glabra*). Αυτές περιλαμβάνουν διαδοχικές υδροξυλιώσεις στον άνθρακα 11 και 30 της β-αμυρίνης αντίστοιχα από την μονοξυγενάση CYP88D6, που εντοπίζεται αποκλειστικά στην οικογένεια

Fabaceae, και από μία γλυκοσυλίωση στη θέση 3 του υδροξυλίου (εικόνα 6) (Seki et al., 2008).



Εικόνα 6: Προτεινόμενο μονοπάτι βιοσύνθεσης γλυκυριζίνης στο *Glycyrrhiza glabra* (Seki et al., 2008)

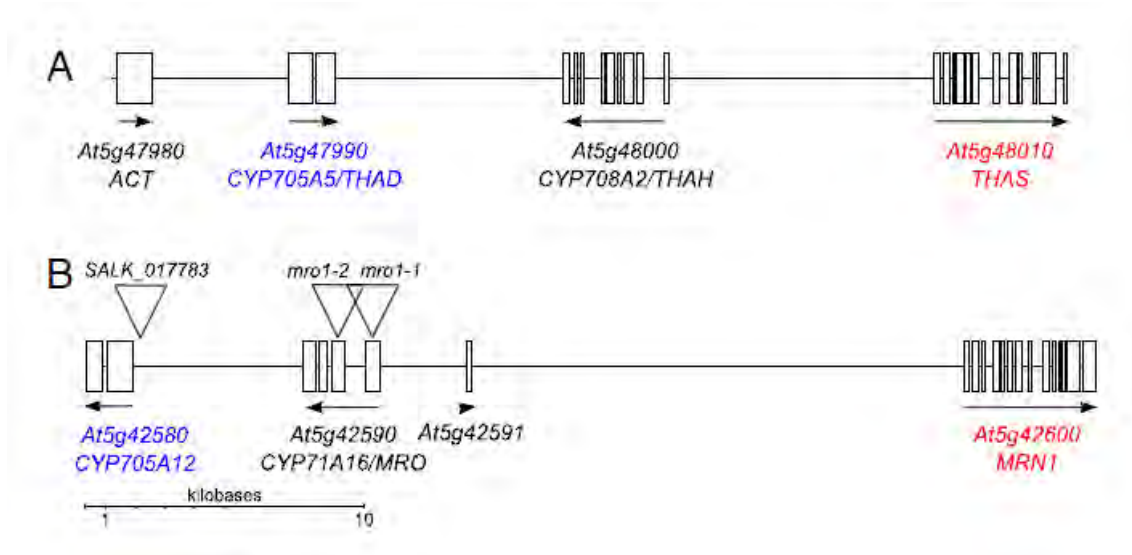
4. ΓΟΝΙΔΙΑΚΕΣ ΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ

Η πρώτη γονιδιακή συστοιχία που εμπλέκεται στη σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών στα φυτά βρέθηκε στον αραβοσίτο (*Zea mays*) για τη σύνθεση των κυκλικών υδροξαμικών οξέων 2,4-διυδροξυ-1,4-βενζοξαζιν-3-όνη (DIBOA) και 2,4-διυδροξυ-7-μεθοξυ-1,4-βενζοξαζιν-3-όνη (Osbourne, 2012). Σε αντίθεση με τους προκαρυώτες, των οποίων τα γονίδια είναι οργανωμένα σε οπερόνια, στα φυτά δεν είναι συνηθισμένη αυτή η οργάνωση. Οι μηχανισμοί που οδηγούν σε αυτούς τους σχηματισμούς δεν είναι πλήρως κατανοητοί αλλά το πιθανότερον είναι ότι η συγκρότηση τους γίνεται *de novo* έπειτα από γονιδιακό διπλασιασμό, αναπρογραμματισμό της λειτουργικότητας των αρχικών γονιδίων και αναπροσαρμογή του γονιδιώματος του φυτού (Osbourne, 2009). Αυτό το γεγονός έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή ενζύμων, κυρίως συνθάσων, που λειτουργούν ως ικρίωμα για το δευτερογενή μεταβολίτη και τη στρατολόγηση γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα CYP450 και άλλα ένζυμα (μεθυλοτρανσφεράσες, γλυκοσυλτρανσφεράσες, οξειδοορεδοουκτάσες) που εμπλέκονται στην τροποποίηση του βασικού σκελετού των τριτερπενοειδών (Chu et al., 2011). Οι διαφορετικές γονιδιακές συστοιχίες στα φυτά φαίνεται ότι εξελίχθηκαν ανεξάρτητα (Osbourne, 2009).

Μέσω της οργάνωσης των γονιδίων σε γονιδιακές συστοιχίες, παρέχονται μηχανισμοί για τη ρύθμιση της έκφρασης τους σε επίπεδο οργάνωσης πυρήνα ή/και

χρωματίνης με τέτοιο τρόπο ώστε τα τελικά προϊόντα του μονοπατιού να παράγονται στο σωστό μέρος την κατάλληλη στιγμή. Να σημειωθεί ότι αντίθετα με τα οπερόνια, τα γονίδια μεταγράφονται ανεξάρτητα το ένα από το άλλο στις γονιδιακές συστοιχίες. Παράλληλα αποτρέπεται η συγκέντρωση επιβλαβών ενδιάμεσων του μεταβολισμού, που μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά την ανάπτυξη ή την επιβίωση του φυτού (Chu et al., 2011).

Μέχρι σήμερα, έχουν χαρακτηριστεί τέσσερις και πέντε γονιδιακές συστοιχίες στα μονοκότυλα και στα δικότυλα αντίστοιχα. Στο *Arabidopsis thaliana*, έχουν βρεθεί 13 γονίδια που κωδικοποιούν κυκλάσες του οξειδοσκουαλενίου (OSCs). Τα έξι κωδικοποιούν για εξειδικευμένες συνθάσες (μαρνερόλη, θαλιανόλη, β-αμυρίνη, κυκλοστερόλη, αραβιδιόλη, λανοστερόλη), τα άλλα έξι για κυκλάσες μεικτής δράσης, ενώ δεν έχει ανακαλυφθεί το προϊόν έκφρασης τους (Wang et al, 2011). Στο χρωμόσωμα 5, ταυτοποιήθηκε η πρώτη γονιδιακή συστοιχία των δικότυλων που περιλαμβάνει τα τέσσερα γειτονικά συνεκφραζόμενα γονίδια που εμπλέκονται στη σύνθεση και τροποποίηση του τριτερπενίου θαλιανόλη (εικόνα 7). Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν για μία κυκλάση του 2,3-οξειδοσκουαλενίου και συγκεκριμένα τη συνθάση της θαλιανόλης (At5g48010), δύο ένζυμα του κυτοχρώματος P450: ένα που κωδικοποιεί την υδροξυλαση της θαλιανόλης και μετατρέπει την θαλιανόλη σε θαλιαν-διόλη (At5g48000) και ένα που κωδικοποιεί για μία αποκορεσμάση που προκαλεί περαιτέρω τον μεταβολισμό της θαλιανόλης (At5g47990) και τέλος, μία ακετυλοτρανσφεράση της οικογένειας BAHD (At5g47980) (Field et al., 2011). Επίσης, ταυτοποιήθηκε μία ακόμα γονιδιακή συστοιχία μέσω της οποίας παράγεται η τριτερπενοειδής αλδεΐδη μαρνεράλη (marneral). Μάλιστα, αυτή η συστοιχία μαζί με τη συστοιχία της θαλιανόλης προήλθαν από το διπλασιασμό ενός προγονικού ζεύγους. Η συστοιχία περιλαμβάνει τρία γονίδια: Το γονίδιο MRN1 (At5g42600) που κωδικοποιεί τη συνθάση της μαρνεράλης, το γονίδιο CYP71A16 (At5g42590) που κωδικοποιεί για μία οξειδάση που δημιουργεί ισομερή αυτού του μεταβολίτη και το γονίδιο CYP705A12 (At5g42580) που εμπλέκεται και αυτό στον καταβολισμό της θαλιανόλης (εικόνα 7) (Field et al, 2011).



Εικόνα 7. Α: Γονιδιακή συστοιχία της θαλιανόλης Β: Γονιδιακή συστοιχία της μαρνεράλης (Field et al, 2011)

Στη βρώμη βρέθηκαν εννέα γενετικοί τόποι που σχετίζονται με την παραγωγή αβενασίνης που είναι μία σαπωνίνη που έχει ισχυρή αντιμυκητική δράση. Αυτοί οι τόποι παρατηρήθηκαν έπειτα από την δημιουργία μεταλλαγμένων φυτικών σειρών που παρουσίαζαν απώλεια σαπωνίνης (Sad= **S**aponin **d**eficient). Το γονίδιο *AsbAS1* που αντιστοιχεί στο γενετικό τόπο *Sad1* κωδικοποιεί τη συνθάση της β-αμυρίνης. Ο γενετικός τόπος *Sad2* κωδικοποιεί μία μονοξυγενάση του κυτοχρώματος P450. Τα *Sad3*, όπως και το *Sad4* κωδικοποιούν γλυκοσυλιοτρανσφεράσες και το *Sad7* ακετυλοτρανσφεράσες. Η σωστή γλυκοσυλίωση είναι καθοριστικής σημασίας για να προκύψει η αντιμικροβιακή και αντιμυκητιακή δράση των σαπωνινών (Qi et al, 2004). Να σημειωθεί ότι σε αυτή τη γονιδιακή συστοιχία, ο γονιδιακός τόπος *Sad1* έχει προέλθει από τον γονιδιακό διπλασιασμό και αναπρογραμματισμό ενός γονιδίου παρόμοιου με τη συνθάση της κυκλοαρτενόλης (Qi et al, 2004).

Οι υπόλοιπες γονιδιακές συστοιχίες που έχουν βρεθεί είναι η γονιδιακή συστοιχία των υδροξαμικών οξέων στον αραβοσίτο, και οι γονιδιακές συστοιχίες της μομιλακτόνης και της φυτοκασσάνης, που είναι διτερπένια, στο ρύζι (*Oryza sativa*), της νοσκαπίνης, ενός αντικαρκινικού αλκαλοειδούς, στην παπαρούνα (*Papaver somniferum*), κυανογόνων γλυκοζιτών σε *Lotus*, *Cassava* και στεροειδών γλυκοαλκαλοειδών στη ντομάτα (*Solanum lycopersici*) και στην πατάτα (*Solanum tuberosum*).

5. ΤΟ ΨΥΧΑΝΘΕΣ *Medicago truncatula* ΩΣ ΦΥΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ

Τα ψυχανθή (*Leguminosae* ή *Fabales*) αποτελούν φυτά της οικογένειας των δικοτυλήδων και είναι από τα πιο χρήσιμα στον άνθρωπο φυτά. Αποτελούν τις πιο θρεπτικές τροφές για τον ίδιο και τα ζώα και συμφέρουν από οικονομικής απόψεως, δεδομένου ότι η καλλιέργεια τους και η συντήρησή τους είναι φτηνή. Η πλειοψηφία τους διαθέτει ισχυρό ριζικό σύστημα στο οποίο αναπτύσσονται χαρακτηριστικές δομές που ονομάζονται φυμάτια. Οι δομές αυτές προκύπτουν από τη συμβίωση ριζόβιων βακτηρίων (*Rhizobiaceae*) με τις ρίζες του φυτού, σχηματίζοντας μία μάζα φυτικών κυττάρων που εποικίζονται στο εσωτερικό από βακτήρια και έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν το ατμοσφαιρικό άζωτο και να το ενσωματώνουν σε οργανικές ενώσεις οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τα φυτά, σε αντάλλαγμα με άνθρακα που χρησιμοποιείται από τα βακτήρια για την ανάπτυξή τους (Long, 1989). Η ικανότητά δέσμευσης του ατμοσφαιρικού αζώτου έχει σαν αποτέλεσμα να δεσμεύονται 40-60 εκατομμύρια τόνοι αζώτου, συμβάλλοντας στον βιολογικό εμπλουτισμό του εδάφους και γι' αυτό χρησιμοποιούνται ως "λιπαντικά" του εδάφους (Smil, 1999).

Το είδος *Medicago truncatula* (Kingdom: Plants, Subkingdom: Tracheobionta, Superdivision: Spermatophyta, Division: Magnoliophyta, Class: Magnoliopsida, Subclass: Rosidae, Order: Fabales, Family: Fabaceae, Genus: *Medicago*) είναι ετήσιο. Ο βλαστός είναι κατακείμενος έως ανορθούμενος, χνουδωτός, τα φυλλάρια είναι σφηνοειδή και ελαφρώς ρομβοειδή, οδοντωτά επάνω και χνουδωτά στις δύο επιφάνειες του. Τα παράφυλλα είναι πλατιά και βαθιά σχισμένα, τα άνθη κίτρινα, μήκος στεφάνης 5,5-7 χιλιοστά, μονήρη ή σε βότρυ μέχρι και 5, ο ποδίσκος του οποίου είναι μικρότερος από το μίσχο του φύλλου. Οι χέδρωπες έχουν μεγάλη παραλλακτικότητα με 4-6 σπείρες, είναι κυλινδρικοί, επίπεδοι στα δυο τους άκρα με έντονα αγκάθια (Σκάγια, 2005). Γενικά, το είδος *Medicago truncatula* αυτοφυές συναντάται σε όλες τις περιοχές της Μεσογείου, κυρίως σε παράκτιες περιοχές και σε έως 800 μέτρα υψόμετρο (Thanopoulos, 2007). Το 1990, προτάθηκε το είδος αυτό ως φυτό-μοντέλο για τη μοριακή γενετική μελέτη της συμβιωτικής σχέσης που αναπτύσσει το γένος *Medicago* με τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια. Το είδος *Medicago truncatula* είναι διπλοειδές ($2n=16$) με σχετικά μικρό γονιδίωμα (περίπου 500 Mbp). Είναι ικανό να αυτογονιμοποιείται και κάθε γενιά διαρκεί περίπου 3 μήνες, υπό συνθήκες μεγάλης ημέρας (Barker et al., 1990). Αυτά τα

χαρακτηριστικά τα κατέστησαν πιο κατάλληλο μοντέλο για έρευνα από το σταυρογονιμοποιούμενο και αυτοτετραπλοειδές *Medicago sativa*, με το οποίο δεν ήταν δυνατή η απόκτηση ομόζυγων διαγονιδιακών σειρών (Chabaud et al., 1995).

Επιπλέον, το φυτό αυτό εκτός από μοντέλο της συμβιωτικής σχέσης που αναπτύσσει με το *Sinorhizobium meliloti*, έχει αποδειχθεί χρήσιμο μοντέλο και για μελέτες μυκορριζικών αλληλεπιδράσεων, επιτρέποντας έτσι την άμεση σύγκριση των δύο αυτών τύπων συμβιωτικής σχέσης, ενώ έχει χρησιμοποιηθεί για την έρευνα της αλληλεπίδρασης του με νηματώδεις και αφίδες και την μελέτη μηχανισμών αντοχής σε παθογόνα (Rose, 2008).

6. *Agrobacterium rhizogenes* ΚΑΙ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ *HAIRY ROOT*

Το *Agrobacterium rhizogenes* είναι ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο το οποίο επάγει την ασθένεια hairy root σε πολλά δικοτυλήδονα φυτά, δηλαδή την παραγωγή περισσότερων διακλαδισμένων και μικρότερων σε μήκος ριζών. Η ικανότητα του αυτή οφείλεται στο πλασμίδιο Ri (**R**oot **i**nducing), που είναι παρόμοιο με του *Agrobacterium tumefaciens*, που προκαλεί τους κορωνοτούς κάλλους στα φυτά (Chilton. *et al.*,1982; Moore *et al.*,1979; White and Nester, 1980). Όταν το αγροβακτήριο μολύνει το φυτό, τότε το πλασμίδιο εισέρχεται στον πυρήνα και εκεί μπορεί να ενσωματωθεί στο φυτικό γονιδίωμα προς παραγωγή πολυαδενυλιωμένων mRNAs.

Τα πλασμίδια του *Agrobacterium rhizogenes* χωρίζονται σε δύο τάξεις με βάση τις οπίνες που παράγουν: Τα στελέχη που παράγουν την ομάδα των αγροπίνων (αγροπίνη, μαννοπίνη, αγροπινικό οξύ, μαννοπινικό οξύ) και τα στελέχη που παράγουν την ομάδα των μαννοπινών, που παράγουν τις ίδια οπίνες εκτός της αγροπίνης. Τα πιο καλά μελετημένα στέλεχη είναι η ομάδα των αγροπίνων που περιέχει δύο περιοχές T-DNA. Το T-DNA καθορίζεται από αλληλουχίες μήκους 25 ζευγών βάσεων με *cis* δράση και ονομάζονται συνοριακά άκρα LB (**L**eft **B**order=αριστερό όριο) και RB (**R**ight **B**order=δεξί όριο) (Yadav et al., 1982).

Στο Ri T_L-DNA, έχουν εντοπιστεί 18 ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια μήκους τουλάχιστον 255 νουκλεοτιδίων, από τα οποία τα τέσσερα έχει ανακαλυφθεί ο ρόλος τους στο φαινόμενο hairy root (Vilaine et al., 1987). Συγκεκριμένα, το γονίδιο RoI A

είναι υπεύθυνο για το σχηματισμό αυτού του φαινότυπου, το γονίδιο Rol B επάγει τη ριζογένεση και το σχηματισμό των κάλλων, το γονίδιο Rol C προωθεί την ανάπτυξη της ρίζας και το Rol D καταστέλλει την ανάπτυξη του κάλλου (Spena et al. 1987). Γενικά, έχει βρεθεί ότι συμβάλλει στην παραγωγή κυτοκινίνης ή/και στην αλλαγή του μεταβολισμού της. Το Ri T_R-DNA φέρει τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση των οπινών και τα γονίδια που αντιπροσωπεύουν δύο στάδια της βιοσύνθεσης αυξίνης, που αναφέρονται tms1 και tms2 και συμβάλλουν στην παθογένεια του βακτηρίου. Επίσης, το Ri T_R-DNA περιέχει ένα ομόλογο γονίδιο Rol B, αλλά η λειτουργία της παραγόμενης πρωτεΐνης είναι άγνωστη.

Η αποκοπή, η μεταφορά και ενσωμάτωση των Ri T-DNAs στο γονιδίωμα των φυτών γίνεται ανεξάρτητα το ένα από το άλλο και μεσολαβείται από ένα άλλο τμήμα επί του πλασμιδίου που είναι γνωστό ως περιοχή τοξικότητας vir (Mano et al. 1986). Η περιοχή αυτή ενεργοποιείται σε αρκετά μεγάλες συγκεντρώσεις ακετοσυριγκόνης (10^{-5} - 10^{-4} M), μιας φαινόλης η οποία παράγεται σε περίπτωση τραυματισμού του φυτού και προσελκύει χημειοτακτικά το αγροβακτήριο. Γενικά, οι συνθήκες που ενισχύουν την επαγωγή των γονιδίων vir είναι ανεπαρκείς για βακτηριακή αύξηση, ενώ συνθήκες που ενισχύουν την βακτηριακή αύξηση είναι ανεπαρκείς για την επαγωγή των γονιδίων vir. Το Ri T-DNA που εισέρχεται, προσδίδει στα φυτικά κύτταρα την ικανότητα να αναπτύσσονται απουσία εξωγενών ορμονών, ενώ επίσης παρέχει την ικανότητα να παραχθούν οι οπίνες στα μετασχηματισμένα κύτταρα, οι οποίες με τη σειρά τους, χρησιμοποιούνται μόνο από τα βακτήρια για πηγή άνθρακα, αζώτου και ενέργειας σε μεγάλες συγκεντρώσεις, ενώ σε μικρότερες το *Agrobacterium* παραμένει σε μια άριστη κατάσταση επαγωγής γονιδίων vir και μεταφοράς T-DNA (Χατζόπουλος, 2004). Τα γονίδια vir έχουν trans δράση και αυτό το γεγονός μας δίνει τη δυνατότητα να χρησιμοποιήσουμε δυαδικό σύστημα φορέων, όπου το ένα πλασμίδιο περιέχει τα γονίδια vir που κωδικοποιούν πρωτεΐνες για τη μεταφορά του T-DNA, ενώ το άλλο περιέχει ένα γονίδιο της επιλογής μας στη θέση του T-DNA, με μήκος μικρότερο των 15 kbp (Stougaard et al., 1987).

Η αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού και οι φαινοτυπικές αποκλίσεις οφείλονται στις διαφορές των γονιδίων των T-DNAs που ενσωματώνονται στο γονιδίωμα των φυτικών κυττάρων, καθώς και από την παρουσία συγκεκριμένων αλληλουχιών που δεν είναι απαραίτητες για τη μεταφορά και ενσωμάτωση (Jouanin et al., 1987). Είναι απαραίτητο να σημειωθεί ότι με αυτή τη μέθοδο, τα φυτά δεν είναι διαγονιδιακά, αλλά αποτελούνται από μετασχηματισμένες ρίζες και από υπέργειες

δομές αγρίου τύπου (Limpens et al., 2004). Η μέθοδος αυτή συνίσταται για τη μελέτη γονιδίων που εκφράζονται ή που επιδρούν σε γενετικό επίπεδο στο ριζικό σύστημα των φυτών (Martinari et al. 1999).

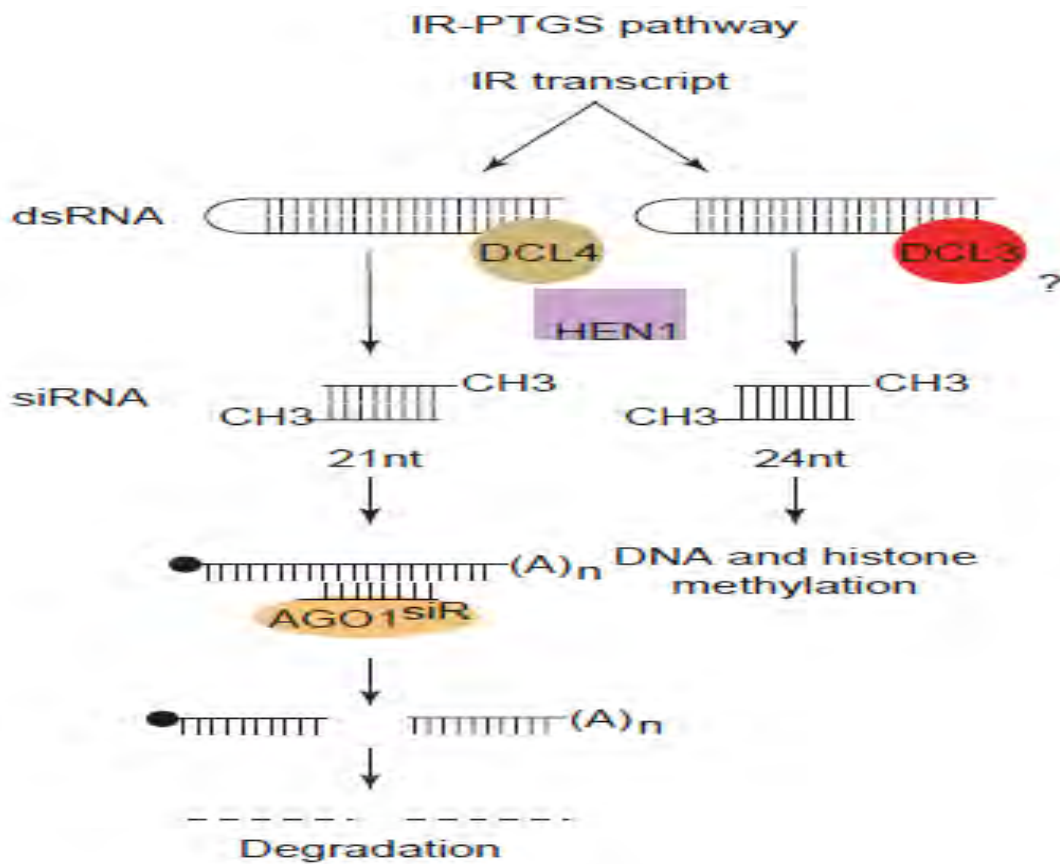
7. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΣΙΓΗΣΗ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ RNAi

Η μετα-μεταγραφική σίγηση μέσω του μηχανισμού RNAi είχε ανακαλυφθεί αρχικά το 1990, όταν είχαν γίνει προσπάθειες υπερέκφρασης του γονιδίου που κωδικοποιεί τη συνθάση της χαλκόνης, ένα ένζυμο-κλειδί για τη σύνθεση ανθοκυανινών στην πετούνια, οπότε και παρατήρησαν διαφορετικούς φαινότυπους από τους αναμενόμενους (Napoli et al. 1990, van der Krol et al. 1990). Παρόμοια αποτελέσματα εμφανίστηκαν και στα φυτά που μετασηματίστηκαν με διάφορα γονίδια από ιούς, στα οποία προσέδιδαν ανθεκτικότητα ενάντια σε ιούς και συνεπώς, αποτελούσαν ένα σύστημα άμυνας του φυτού (Baulcombe, 1996). Σήμερα, αυτή η τεχνική αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο στη γενετική και χρησιμοποιείται ευρέως στη μελέτη της λειτουργίας των γονιδίων.

Ο μηχανισμός αυτός που υφίσταται στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, ξεκινά με τη δημιουργία δίκλωνου RNA είτε ενδογενώς μέσω μεταγραφής μιας ακολουθίας DNA με αποτέλεσμα τη δημιουργίας mRNA με δομή φουρκέτας είτε λόγω υβριδοποίησης δύο συμπληρωματικών μορίων mRNA. Στο κυτταρόπλασμα, τα μεγάλα μόρια δίκλωνου RNA υδρολύονται στη συνέχεια σε όλο το μήκος τους, με αποτέλεσμα να προκύπτουν μικρά δίκλινα τμήματα RNA μεγέθους 22 νουκλεοτιδίων με δύο προεξέχοντα νουκλεοτίδια στο 3' άκρο και μία φωσφορική ομάδα στο 5' άκρο, τα οποία ονομάζονται μικρά RNA παρεμβολής (*siRNAs=small interfering RNAs*). Η υδρόλυση πραγματοποιείται από το ένζυμο Dicer, που δρα ως ριβονουκλεάση καταναλώνοντας μόρια ATP. Έπειτα, τα siRNAs ενσωματώνονται στο πρωτεϊνικό σύμπλοκο RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*), όπου ξεδιπλώνονται από μία ελικάση, με ταυτόχρονη απομάκρυνση του νοηματικού κλώνου, δηλαδή του κλώνου που έχει την ίδια αλληλουχία με το mRNA και αποτελεί το αρχικό μόριο DNA που περιέχει το γονίδιο. Το επόμενο βήμα περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του συμπλόκου RISC, το οποίο περιέχει τον αντινοηματικό (ή μη-κωδικό) κλώνο του siRNA που αλληλεπιδρά με ένα mRNA, που περιέχει μία συμπληρωματική αλληλουχία νουκλεοτιδίων ως προς τον αντινοηματικό κλώνο του siRNA. Αποτέλεσμα αυτής της αλληλεπίδρασης είναι η καταστροφή του mRNA

μέσω της πρωτεΐνης AGO1 στα φυτά που έχει έναν τομέα PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille) με δράση ενδονουκλεάσης και πρωτεολύει το RNA-στόχο στην περίπτωση πλήρους συμπληρωματικότητας των δύο μορίων RNA (Brodersen, 2006). Διαφορετικά, σε περιπτώσεις μερικής συμπληρωματικότητας, η μεταγραφή του mRNA απενεργοποιείται λόγω πρόσδεσης του συμπλόκου RISC στο mRNA χωρίς τη δράση της AGO1 ή λόγω πρόσδεσης του siRNA σε κάποιον υποκινητή με αποτέλεσμα τη μεθυλίωση του, ένα φαινόμενο που ονομάζεται RdDm (*RNA-dependent-DNA-methylation*, RNA-εξααρτώμενη-DNA-μεθυλίωση) (Matzke et al, 2009).

Να σημειωθεί ότι τα δίκλινα μόρια mRNA έχουν δομή φουρκέτας, η οποία συμβάλλει στην αναγνώριση των μορίων από τη Dicer για την έναρξη της διαδικασίας. Συνεπώς, όταν είναι επιθυμητή η εισαγωγή ενός γονιδίου προς σίγηση, είναι απαραίτητο το ένθεμα να αποτελείται από ένα ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο που να περιέχει την αλληλουχία του γονιδίου-στόχου με αντίστροφη επανάληψη, στο οποίο μεσολαβείται ένα ιντρόνιο, ώστε να δημιουργηθεί η δομή φουρκέτας. Η κατασκευή αυτή βρίσκεται υπό τον έλεγχο ενός ισχυρού υποκινητή, ώστε να εξασφαλιστεί η συνεχής έκφραση του ενθέματος, επομένως να υπάρχει μεγαλύτερη σίγηση και μία αλληλουχία τερματισμού της έκφρασης (Helliwell and Waterhouse, 2003).



Εικόνα 8: Το μετα-μεταγραφικό μονοπάτι σίγησης που προκαλείται από κατασκευή που περιέχει αντιστραμμένη επανάληψη προς παραγωγή μεταγράφων διπλής έλικας με τέλεια συμπληρωματικά άκρα. Δύο ένζυμα παρόμοια με την Dicer (Dicer-like ή DCL) τροποποιούν τα μετάγραφα αυτά: Το ένζυμο DCL3 πιθανώς παράγει siRNAs μήκους 24 νουκλεοτιδίων, που μπορούν να κατευθύνουν την τροποποίηση των ιστονών ή του DNA σε ομόλογους γονιδιακούς τόπους και φαίνεται να είναι απαραίτητο για την πρωτεόλυση του RNA. Το ένζυμο DCL4 παράγει siRNAs μήκους 21 νουκλεοτιδίων από τα RNAs διπλής έλικας. Μία αλυσίδα siRNA ενσωματώνεται στο σύμπλοκο RISC που περιέχει την AGO1, η οποία καθοδηγεί την πρωτεόλυση του ομόλογου RNA. Αμφότερα τα siRNAs υφίστανται μεθυλίωση στο 3'-άκρο από την πρωτεΐνη HEN1 (Brodersen, Voinnet, 2006).

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (*PCR=Polymerase Chain Reaction*) είναι ο *in vitro* πολλαπλασιασμός αλληλουχιών DNA με ταυτόχρονη επέκταση των δύο συμπληρωματικών αλυσίδων και στηρίζεται στην κινητική επανασύνδεσης των αποδιαταγμένων συμπληρωματικών αλυσίδων δίκλωνου νουκλεϊκού οξέος, που ανέπτυξαν οι Britten και Kohne στα τέλη της δεκαετίας του '60.

Η διαδικασία περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους κύκλους σε διαφορετικές θερμοκρασίες, με γρήγορη μετάβαση από τη μία θερμοκρασία στην άλλη, η οποία πραγματοποιείται σε θερμικό κυκλοποιητή. Τα απαραίτητα αντιδραστήρια για την PCR, εκτός του DNA-εκμαγείου, είναι οι εκκινητές, τα τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs), η DNA πολυμεράση, τα ιόντα μαγνησίου και το ισοτονικό διάλυμα της αντίδρασης. Αρχικά, προστίθεται το DNA και στη συνέχεια τα υπόλοιπα αντιδραστήρια που έχουν αναμειχθεί όλα μαζί (master mix). Είναι απαραίτητο κάθε αντιδραστήριο να βρίσκεται σε συγκεκριμένες ποσότητες, επειδή υπάρχει ο κίνδυνος αποτυχίας του πειράματος. Για μια τυπική αντίδραση ενίσχυσης τελικού όγκου 20 μl χρειάζονται:

PCR	
Αντιδραστήρια	Όγκος (μl)
DNA-εκμαγείο	2
Ορθόδρομος εκκινητής (5μM)	1,6
Οποσθόδρομος εκκινητής (5μM)	1,6
dNTPs (10 mM)	0,4
Taq DNA πολυμεράση (5 unit/μl)	0,08
10X ρυθμιστικό διάλυμα	2
dH ₂ O	12,32
Τελικός όγκος	20

Πίνακας 1: Αντιδραστήρια και οι ποσότητες τους που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε περίπτωση στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο Kapa Taq DNA της εταιρείας Polymerase Kapa Biosystems. Αυτή η πολυμεράση λειτουργεί βέλτιστα στους 72 °C, ωστόσο είναι σταθερή ακόμα και στους 95 °C. Η Taq πολυμεράση προστίθεται μόνο μία φορά στην αρχή της αντίδρασης και παραμένει ενεργός σε όλη τη διάρκεια των κύκλων, καθιστώντας δυνατή την αυτοματοποίηση της PCR με τη

χρήση των θερμικών κυκλοποιητών. Επιπρόσθετα, συμβάλλει στην αύξηση της εξειδίκευσης και ευαισθησίας της αντίδρασης, δεδομένου ότι στις υψηλές θερμοκρασίες που επικρατούν στο στάδιο της αποδιάταξης, ελαχιστοποιείται η πιθανότητα υβριδισμού των εκκινητών σε περιοχές όπου η αλληλουχία διαφέρει ελάχιστα από την περιοχή-στόχο.

Κάθε κύκλος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης περιλαμβάνει:

- Θέρμανση σε υψηλή θερμοκρασία (93-95 °C), ώστε να αποδιαταχθεί το δίκλωνο DNA (*denaturation step*).
- Θερμοκρασία υβριδισμού (*annealing step*), προκειμένου οι εκκινητές να υβριδίσουν με το DNA. Η θερμοκρασία υβριδισμού εξαρτάται από το μήκος του εκκινητή και την περιεκτικότητα του σε G και C. Ο απλούστερος τρόπος υπολογισμού της θερμοκρασίας του εκκινητή 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 30-35 κύκλους συνήθως. Κατά τη διάρκεια των κύκλων η παραγωγή των προϊόντων της αντίδρασης γίνεται με εκθετικό ρυθμό, εφ' όσον βέβαια δεν παρουσιαστούν περιοριστικοί παράγοντες, όπως για παράδειγμα η 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. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε για απλές διαδικασίες, κυρίως για ταυτοποίηση πλασμιδίων βάσει μεγέθους ή για την ανίχνευση DNA κατά τον χειρισμό RNA με DNάσες, όπως θα αναλυθεί και στη συνέχεια.

2.ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Η ηλεκτροφόρηση είναι η ηλεκτροχημική μέθοδος διαχωρισμού ηλεκτρικά φορτισμένων σωματιδίων, πρωτεϊνικής ή νουκλεϊνικής φύσεως, από ένα μίγμα τους. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ικανότητα των νουκλεϊκών οξέων να μετακινούνται

από τον αρνητικό πόλο στον θετικό, λόγω της ύπαρξης φωσφορικών ομάδων που εντοπίζονται στο φωσφοδιεστερικό σκελετό.

Ο διαχωρισμός των δεοξυριβονουκλεϊνικών οξέων γίνεται βάσει μεγέθους και διαμόρφωσης σε πηκτή αγαρόζη. Το εύρος των μεγεθών που μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτή αγαρόζη εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζη στην πηκτή. Γενικά, σε πηκτή με 0,8% αγαρόζη, διαχωρίζονται τμήματα DNA μήκους 1-12 kb. Όσον αφορά τη διαμόρφωση, τα υπερελικωμένα μόρια κινούνται πιο γρήγορα από τα μόρια με «χαλαρή» διαμόρφωση και τα κυκλικά πιο γρήγορα από τα γραμμικά.

Με τη μέθοδο αυτή, τα τμήματα DNA διαχωρίζονται με βάση την απόσταση που έχουν διανύσει από την άνοδο και η σύγκριση της απόστασης που διένυσαν με την απόσταση που διανύουν στάνταρ θραύσματα γνωστού μεγέθους, πληροφορεί για το μέγεθος των πρώτων. Για να γίνουν διακριτά τα μόρια του DNA/RNA, προστίθεται το φθορίζον μόριο βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA/RNA και να φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός.

Η προετοιμασία της πηκτής των δειγμάτων γίνεται ως εξής:

- Κατάλληλη ποσότητα αγαρόζη προστίθεται σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X TAE και θερμαίνεται σε φούρνο μέχρι να λιώσει.
- Στη λιωμένη αγαρόζη, προστίθεται 0,001 % v/v διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου και αφήνεται να κρυώσει.
- Σε κατάλληλο εκμαγείο της συσκευής οριζόντιας ηλεκτροφόρησης, προστίθενται οι «χτένες», οι οποίες θα δημιουργήσουν τις υποδοχές των δειγμάτων. Προστίθεται το διάλυμα της αγαρόζη και αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μόλις στερεοποιηθεί η πηκτή, απομακρύνονται οι «χτένες» και η πηκτή τοποθετείται στην οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία συμπληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X TAE, μέχρι την πλήρη κάλυψη της πηκτής.
- Πραγματοποιείται η φόρτωση του μάρτυρα (marker) και των δειγμάτων στις υποδοχές της πηκτής. Στα δείγματα προς ανάλυση, προστίθεται 1/10 όγκου διαλύματος χρωστικής 10X DLB για την οπτικοποίηση των δειγμάτων στην

πηκτή, καθώς και στην ικανότητα τους να διατηρούν τα δείγματα στις υποδοχές και να μην έξω από αυτές.

- Τα δείγματα αναλύονται σε ηλεκτρικό πεδίο εντάσεως που δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 5 V/cm.
- Τα δείγματα γίνονται ορατά με τη χρήση του υπεριώδους φωτός και μιας κάμερας που επιτρέπει τη λήψη φωτογραφιών της πηκτής.

Υλικά για ηλεκτροφόρηση	
Υλικά	Συστατικά
ΤΑΕ (50X)	24,2% w/v Tris (BDH), 57,1 ml/l CH ₃ COOH (BDH), 100 ml/l EDTA συγκέντρωσης 0,5 M (Serva).
Βρωμιούχο αιθίδιο	Παρασκευάζεται ως πυκνό διάλυμα 0,5 mg/ml σε απιονισμένο νερό και διατηρείται στους 4°C.
DLB (10X)	0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανό του ξυλενίου, 30% γλυκερόλη.

Πίνακας 2: Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στις ηλεκτροφορήσεις.

3.ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΣΠΟΡΩΝ

Για την ομοιόμορφη και γρήγορη βλάστηση των σπερμάτων του *M. truncatula*, καθώς και για την απολύμανση των σπόρων, ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

- Σε ένα σωλήνα erpendorf με 100 σπόρους, προστέθηκε 1 ml πυκνού θειικού οξέος (H₂SO₄) για 5 λεπτά με πιπέτα Pasteur.
- Ακολουθεί έκπλυση 5 φορές με κρύο νερό, δεδομένου ότι η προσθήκη νερού στο θειικό οξύ είναι εξώθερμη αντίδραση και επομένως, να είναι δυνατή η διατήρηση μιας μέσης θερμοκρασίας.
- Έπειτα για την απολύμανση, προστίθεται 1 ml 100% υποχλωριώδους νατρίου (εμπορικής χλωρίνης) για 20 λεπτά.
- Ακολουθεί έκπλυση 6-7 φορές με αποστειρωμένο νερό στο θάλαμο νηματικής ροής. Προαιρετικά, είναι δυνατό να παραμείνουν για μία ώρα σε 1 ml νερού για την καλύτερη έκπλυση του υποχλωριώδους νατρίου.
- Μεταφορά των σπόρων σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα MS/2, το οποίο περιέχει τα εξής:

Θρεπτικό υλικό MS/2	
Συστατικά	Ποσότητα
MS/2 άλατα	0,22 gr
MS/2 βιταμίνες (1000X)	50 μl
Σουκρόζη	0,5 gr
Άγαρ	1 gr
ddH ₂ O	100 ml
Το pH πρέπει να είναι αυστηρά ρυθμισμένο στο 5,7-5,8, πριν την τελική ογκομέτρηση και αποστείρωση του δείγματος. Η μεταφορά του σε τρυβλία πραγματοποιείται σε θάλαμο νηματικής ροής για την αποφυγή επιμολύνσεων.	

Πίνακας 3: Αντιδραστήρια και τρόπος παραγωγής θρεπτικού υλικού MS/2

- Κάλυψη των τρυβλίων με αλουμινόχαρτο και διατήρηση τους στους 4 °C για μία ημέρα για την εκβλάστησή των εκφύτων.
- Την τρίτη μέρα, τα τρυβλία μεταφέρονται σε θάλαμο ανάπτυξης σε φωτοπερίοδο 16 ώρες φως/8 ώρες σκοτάδι για 3 ημέρες, τοποθετημένα κάθετα.
- Μετά το πέρας των τριών ημερών, αφαιρείται το αλουμινόχαρτο και προαιρετικά, γίνεται η προσαρμογή των ριζών στο θρεπτικό υλικό για την βέλτιστη ανάπτυξη των φυτών. Η προσαρμογή αυτή πρέπει να πραγματοποιηθεί σε αποστειρωμένες συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής.

4.ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ «ΙΚΑΝΩΝ» ΚΥΤΤΑΡΩΝ *Escherichia coli*

4.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΙΚΑΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΡΟΣ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ

Το βακτήριο *E. coli* χρησιμοποιείται ως ξενιστής για τον πολλαπλασιασμό των πλασμιδίων που χρησιμοποιούνται στα διάφορα στάδια υποκλωνοποίησης (βακτηριακό στέλεχος, DH5a).

- 200 ml θρεπτικού διαλύματος LB εμβολιάζονται με 2 ml υγρής καλλιέργειας του στελέχους που επιλέχθηκε.
- Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 37 °C με συνεχή ανακίνηση μέχρι η οπτική πυκνότητα του εναιωρήματος να έχει οπτική πυκνότητα στα 600 nm $O.D._{600}=0,2-0,3$.

- Τα βακτηριακά κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 6.000 στροφές για 10 λεπτά στους 4 °C.
- Το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 50 ml διαλύματος 0,1 M παγωμένου MgCl₂ και επωάζεται στον πάγο για 30 λεπτά.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 6.000 στροφές για 10 λεπτά στους 4 °C.
- Τα κύτταρα επαναδιασπείρονται σε 25 ml 0,1 M διαλύματος MgCl₂ και αφήνονται στον πάγο για 20 λεπτά.
- Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 6.000 στροφές για 10 λεπτά στους 4 °C και επαναδιασπείρονται σε 10 ml διαλύματος 0,1 M CaCl₂, το οποίο βρίσκεται στον πάγο.
- Η αποθήκευση των δεκτικών κυττάρων γίνεται στους -80°C με την προσθήκη 20% γλυκερόλης.

4.2 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Escherichia coli

- Σωλήνας erpendorf που περιέχει 100 μl δεκτικών κυττάρων του στελέχους DH5a ξεπαγώνουν στον πάγο.
- Στα δεκτικά κύτταρα μεταφέρονται 10-100 ng πλασμιδίου ή της πλασμιδιακής κατασκευής.
- Το δείγμα παραμένει στον πάγο για 30 λεπτά.
- Υποβάλλουμε τα κύτταρα σε θερμική καταπόνηση (stress) για 1 λεπτό στους 42 °C, προκειμένου να διευκολυνθεί η εισαγωγή του πλασμιδίου μέσα στα βακτήρια.
- Προστίθενται 200 μl υγρού θρεπτικού υποστρώματος LB και τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 37 °C για 60 λεπτά. Το LB περιέχει τα εξής συστατικά:

Θρεπτικό υπόστρωμα LB	
Συστατικά	Ποσότητες
Bactotryptone	10 gr
Yeast extract	5 gr
NaCl	10 gr
H ₂ O	1 l
Άγαρ (για στερεό θρεπτικό υπόστρωμα)	1,5%

Πίνακας 4: Αντιδραστήρια στερεού ή υγρού θρεπτικού υποστρώματος LB

- Τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό που περιέχουν το κατάλληλο αντιβιοτικό για την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων και έχουν προθερμανθεί στους 37 °C, ώστε να διατηρηθεί αυτή η θερμοκρασία για τη βέλτιστη ανάπτυξη των βακτηρίων. Στη συγκεκριμένη εργασία, προστέθηκε 50 µg/ml του αντιβιοτικού καναμυκίνη.
- Η επώαση των τρυβλίων πραγματοποιείται για 16 ώρες στους 37 °C, ενώ η μετέπειτα φύλαξη τους στους 4 °C.

5. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ «ΙΚΑΝΩΝ» ΚΥΤΤΑΡΩΝ *Agrobacterium rhizogenes*

5.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ «ΙΚΑΝΩΝ» ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΡΟΣ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *Agrobacterium rhizogenes* Arqua, η μόλυνση του οποίου στα φυτά έχει σαν αποτέλεσμα το φαινότυπο “hairy root”. Για την υγρή καλλιέργεια των βακτηρίων, χρησιμοποιείται το θρεπτικό υπόστρωμα *Luria-Bertani Broth* (LB), ενώ για την καλλιέργεια τους σε τρυβλία Petri χρησιμοποιήθηκε το ίδιο θρεπτικό υλικό, το οποίο στερεοποιείται με τη χρήση 1,5% άγαρ. Ακολουθεί πάντα υγρή αποστείρωση των θρεπτικών υλικών. Στην περίπτωση του στερεού θρεπτικού υλικού προσθέτουμε το κατάλληλο αντιβιοτικό στους 45°C-55 °C, πριν το υλικό κρυώσει και πολυμεριστεί. Το υγρό θρεπτικό υλικό καθώς και τα τρυβλία μπορούν να διατηρηθούν στους 4 °C μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την παραγωγή τους ήταν η εξής:

- Εμβολιασμός 2 ml αρχικής καλλιέργειας αγροβακτηρίου σε 50 ml θρεπτικού υλικού LB. Η καλλιέργεια αφήνεται για ανάπτυξη στους 28 °C με ανάδευση στις 250 στροφές έως ότου η οπτική πυκνότητα να φτάσει τη τιμή $OD_{600}=1-1,5$, με ιδανική τιμή τη τιμή 0,6.
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων για 5 λεπτά στις 3.000 στροφές στους 4 °C και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 1 ml διαλύματος $CaCl_2$ 20 mM.

- Τα κύτταρα μοιράζονται ανά 100 μl σε σωλήνες erpendorf, οι οποίοι έχουν προψυχθεί.
- Τα κύτταρα αποθηκεύονται στους -80 °C.

5.2 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΓΡΟΒΑΚΤΗΡΙΟΥ

Στην παρούσα μελέτη, τα κύτταρα του αγροβακτηρίου μετασχηματίστηκαν με το δυαδικό φορέα pUbi-BAS, ο οποίος φέρει στην περιοχή του T-DNA την κατασκευή για τη σίγηση του γονιδίου β-AS που κωδικοποιεί τη συνθάση της β-αμυρίνης και το γονίδιο αναφοράς GFP για την επιλογή των μετασχηματισμένων φυτών. Επίσης, ορισμένα κύτταρα μετασχηματίστηκαν με τον φορέα pUbi χωρίς το ένθεμα, από τα οποία θα προκύψουν μετασχηματισμένα φυτά-μάρτυρες (control) για να πραγματοποιηθούν οι απαραίτητες φαινοτυπικές συγκρίσεις με τα μετασχηματισμένα φυτά στα οποία έχει γίνει η σίγηση του ενζύμου της συνθάσης της β-αμυρίνης.

- Ο σωλήνας που περιέχει 100 μl δεκτικά κύτταρα αγροβακτηρίου τοποθετείται στον πάγο και τα κύτταρα ξεπαγώνουν εκεί.
- Ακολουθεί προθήκη 1 μg πλασμιδίου στα δεκτικά κύτταρα και πραγματοποιείται επώαση για 5 λεπτά στους 37 °C.
- Προσθήκη 1 ml θρεπτικού μέσου LB και ακολουθεί επώαση στους 28 °C για 4 ώρες με ήπια ανάδευση.
- Φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα στις 4.000 στροφές και απόρριψη του υπερκείμενου.
- Επαναδιάλυση του ιζήματος με 100 μl LB και στρώσιμο των κυττάρων σε τρυβλία με 50 μg/ml καναμυκίνη και 100 μg/ml στρεπτομυκίνη.
- Τα τρυβλία επωάζονται στους 28 °C για 2-3 ημέρες.

5.3. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ ΦΟΡΕΑ ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ ΑΓΡΟΒΑΚΤΗΡΙΟΥ

- Φυγοκέντρηση 1,5 ml βακτηριακής καλλιέργειας για 45 δευτερόλεπτα στη μέγιστη ταχύτητα και απόρριψη του υπερκείμενου. Αυτό το βήμα πραγματοποιείται εις διπλούν.

- Μηχανική ανάδευση του ιζήματος σε μηχανικό αναδευτήρα (vortex), προσθήκη 100 μl διαλύματος MPS1 (50mM γλυκόζη, 10 mM EDTA, 25mM Tris-HCl pH 8.0), μηχανική ανάδευση ξανά και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθήκη 8 μl λυσοζύμης συγκέντρωσης 50 mg/ml και μηχανική ανάδευση του σωλήνα φυγοκέντρωσης. Ακολουθεί σύντομη φυγοκέντρωση και επώαση για 15 λεπτά στους 37 °C.
- Προσθήκη 200 μl MPS2 (0,2 N NaOH, 1% SDS, H₂O), ανάδευση του erpendorf με το χέρι για 3-4 φορές και επώαση για 5 λεπτά στον πάγο.
- Προσθήκη 150 μl διαλύματος MPS3 (5 M οξικού καλίου, άνυδρο οξικό οξύ, νερό), μηχανική ανάδευση τουλάχιστον για 10 δευτερόλεπτα και επώαση για 5 λεπτά στον πάγο.
- Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στις 13.000 στροφές και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα erpendorf.
- Προσθήκη 400 μl φαινόλη/χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογία 25:24:1, μηχανική ανάδευση για 30 δευτερόλεπτα, φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στις 13.000 στροφές και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα erpendorf. Αυτό το βήμα πραγματοποιείται δύο φορές.
- Προσθήκη 300 μl ισοπροπανόλης και επώαση για 10 λεπτά στον πάγο.
- Φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στις 13.000 στροφές και έπειτα, το υπερκείμενο απομακρύνεται.
- Προσθήκη 70% αιθανόλης, φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στις 13.000 στροφές και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- Ακολουθεί επαναδιάλυση του ιζήματος με προσθήκη 25 μl διαλύματος TE και RNάση ή ddH₂O, αφού το ίζημα έχει απαλλαχθεί πλήρως από την αιθανόλη.
- Χρήση 2 μl από τον απομονωμένο πλασμιδιακό φορέα σε αντίδραση PCR για την επαλήθευση απομόνωσης του πλασμιδίου.

6. ΜΟΛΥΝΣΗ ΦΥΤΩΝ ΜΕ ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ *Agrobacterium rhizogenes*

- Το *Agrobacterium rhizogenes* που φέρει την πλασμιδιακή κατασκευή αλλά και τον άδειο φορέα αναπτύσσονται σε υγρές καλλιέργειες LB παρουσία των

κατάλληλων αντιβιοτικών για 2 ημέρες στους 28 °C και έπειτα μεταφέρονται 1 ml έκαστης καλλιέργειας σε τρυβλία LB με τα ίδια αντιβιοτικά για 2 ημέρες στους 28 °C για 2 ημέρες.

- Στο τρυβλίο με τη βακτηριακή καλλιέργεια προστίθενται 2-2,5 ml αποστειρωμένου νερού και δημιουργείται εναιώρημα αυτής.
- Το βακτηριακό εναιώρημα μεταφέρεται σε αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί και τα φυτάρια τοποθετούνται πάνω σε αυτό.
- Οι ρίζες των φυταρίων κόβονται με νυστέρι και απομακρύνονται. Στα φυτάρια γίνεται συμπίεση της άκρης της ρίζας, ώστε να προκληθεί τραυματισμός και να γίνει ευκολότερη η μόλυνση με το αγροβακτήριο.
- Στη συνέχεια, τα φυτάρια μεταφέρονται σε τρυβλίο με θρεπτικό υλικό B5 και καλύπτονται με αλουμινόχαρτο για 2 μέρες. Το θρεπτικό υλικό B5 παρασκευάζεται από τα εξής συστατικά:

Θρεπτικό υλικό B5	
Συστατικά	Ποσότητες
Θρεπτικό υπόστρωμα B5	0,3 gr
Βιταμίνες	1X
Σουκρόζη	2 gr
Άγαρ	1 gr
ddH ₂ O	100 ml
Το pH πρέπει να είναι αυστηρά ρυθμισμένο στο 5,7-5,8, πριν την τελική ογκομέτρηση και αποστείρωση του δείγματος. Η μεταφορά του σε τρυβλία πραγματοποιείται σε θάλαμο νηματικής ροής για την αποφυγή επιμολύνσεων.	

Πίνακας 5: Αντιδραστήρια και τρόπος παραγωγής θρεπτικού υλικού B5

7. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΥΤΩΝ

- Μετά το πέρας των δύο ημερών, αφαιρείται το αλουμινόχαρτο και τα φυτάρια αναπτύσσονται σε θάλαμο ανάπτυξης σε φωτοπερίοδο 16 ώρες φως/8 ώρες σκοτάδι για 3 ημέρες.
- Τα φυτά μεταφέρονται σε τρυβλία B5 με το αντιβιοτικό σεφοταξίμη, το οποίο σκοτώνει τα αγροβακτήρια και τα φυτάρια αναπτύσσονται σε θάλαμο

ανάπτυξης σε φωτοπερίοδο 16 ώρες φως/8 ώρες σκοτάδι για 5 ημέρες σε κάθετη θέση.

- Τα φυτά μεταφέρονται σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα Jensen και αναπτύσσονται κάθετα σε θάλαμο ανάπτυξης σε φωτοπερίοδο 16 ώρες φως/8 ώρες σκοτάδι για 10 ημέρες μέχρι την πλήρη ανάπτυξη του ριζικού συστήματος. Σε αυτό το θρεπτικό υλικό, κανένα συστατικό του δεν περιέχει άζωτο, οπότε ευνοείται η μετ' έπειτα μόλυνση του με το βακτήριο *Sinorhizobium meliloti* και την εγκαθίδρυση της συμβιωτικής σχέσης μεταξύ ρίζας και βακτηρίου. Το θρεπτικό υλικό Jensen περιέχει τα εξής:

Θρεπτικό υλικό Jensen	
Συστατικά	Ποσότητα
CaHPO ₄	0,01 gr
K ₂ HPO ₄ (20 g/l)	100 μl
MgSO ₄ ·7H ₂ O (1M)	8,1 μl
NaCl (20 g/l)	100 μl
Na ₂ MoO ₄ ·4H ₂ O (40 g/l)	250 μl
H ₃ BO ₃ (12,7 g/l)	250 μl
FeEDTA (0,1 M)	100 μl
Mixed stock (3,5 g/l CuSO ₄ ·5H ₂ O, MnSO ₄ ·4H ₂ O, 9,7 g/l ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	250 μl
Άγαρ	1 gr
ddH ₂ O	100 ml
Το pH πρέπει να είναι αυστηρά ρυθμισμένο στο 5,7-5,8, πριν την τελική ογκομέτρηση και αποστείρωση του δείγματος. Η μεταφορά του σε τρυβλία πραγματοποιείται σε θάλαμο νηματικής ροής για την αποφυγή επιμολύνσεων.	

Πίνακας 6: Αντιδραστήρια και τρόπος παραγωγής θρεπτικού υλικού Jensen

8. ΕΠΙΛΟΓΗ ΦΥΤΩΝ ΚΑΙ ΜΟΛΥΝΣΗ ΜΕ ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ *Sinorhizobium meliloti*

Μετά το πέρας των 7 ημερών, είναι δυνατό να παρατηρηθούν φυτά στα οποία έχει ενσωματωθεί η πλασμιδιακή κατασκευή, λόγω της ύπαρξης του γονιδίου

αναφοράς GFP, οπότε και η ρίζα φθορίζει κατά την έκθεση του σε υπεριώδη ακτινοβολία. Αυτή η μελέτη έγινε με την βοήθεια του οπτικού μικροσκοπίου, όπως θα αναλυθεί και στη συνέχεια.

Τα φυτά με αναγεννημένες ρίζες τοποθετούνται σε πλαστικές θήκες με υπόστρωμα περλίτη-βερμικουλίτη σε αναλογία 1:1. Αμφότερα τα υποστρώματα συμβάλλουν στην κατακράτηση του νερού, στον επαρκή αερισμό του ριζικού συστήματος, καθώς και στο να μην υπάρχουν έντονες θερμοκρασιακές διακυμάνσεις.

Λίγο πριν την τοποθέτηση των φυτών στις πλαστικές θήκες, πραγματοποιείται η μόλυνση τους στις ρίζες με το βακτήριο *Sinorhizomium meliloti*, διαβρέχοντας τις ρίζες με 1 ml καλλιέργειας του βακτηρίου. Η ανάπτυξη των βακτηρίων έχει γίνει στο υγρό θρεπτικό υλικό TY για 2 μέρες, το οποίο παρασκευάζεται ως εξής:

Θρεπτικό υλικό TY	
Συστατικά	Ποσότητα
Tryptone peptone	1 gr
Yeast extract	0,6 gr
CaCl ₂ (1 M)	2 ml
Άγαρ	1,5 gr
ddH ₂ O	100 ml
Προσθέτουμε όλα τα συστατικά εκτός του CaCl ₂ , το οποίο προστίθεται μετά την αποστείρωση του διαλύματος σε θάλαμο νηματικής ροής.	

Πίνακας 7: Αντιδραστήρια και τρόπος παραγωγής θρεπτικού υλικού TY

Για τη μόλυνση των φυτών με την καλλιέργεια, αφαιρούμε αρχικά το θρεπτικό υλικό με απόχυση, έπειτα από φυγοκέντρηση 8 λεπτών στις 5.000 στροφές, οπότε και τα κύτταρα καθιζάνουν. Στη συνέχεια, προσθέτουμε όσο αποσταγμένο νερό χρειάζεται ώστε η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας να είναι κοντά στο 0,2.

Μετά τη μόλυνση, τα φυτά ποτίζονται εναλλάξ με νερό και αυξανόμενη συγκέντρωση του θρεπτικού υλικού Hoagland χωρίς άζωτο (25%,50%,75%,100%), το οποίο παρέχει τα απαραίτητα συστατικά για την ανάπτυξη των φυτών –πλην του αζώτου- και αποτελείται από τα παρακάτω συστατικά:

Πλήρες (100%) θρεπτικό υλικό Hoagland		
Συστατικά	Συγκέντρωση	Ποσότητα (ml/lit H₂O)
MgSO ₄	1 M	2
KH ₂ PO ₄	1 M	1
FeEDTA	0,1 M	1
Microelements*		1
CaCl ₂	0,5 M	10
KCl	1 M	5
*Microelements: 2,8 g/l H ₃ BO ₃ , 1,8 g/l MnCl ₂ ·4H ₂ O, 0,2 g/l ZnSO ₄ ·7H ₂ O, 0,1 g/l CuSO ₄ ·5H ₂ O, 0,025 g/l NaMoO ₄		

Πίνακας 8: Αντιδραστήρια και ποσότητες του θρεπτικού υλικού Hoagland

9. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΑΠΟ ΦΥΤΙΚΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ- ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕ LiCl

- Ομογενοποίηση του φυτικού ιστού με λειοτριβήση με υγρό άζωτο.
- Προσθήκη 800 µl διαλύματος REB (25 mM Tris-HCl, pH=8, 25 mM EDTA, pH=8, 75mM NaCl, 1% SDS) και 600 µl φαινόλη/χλωροφόρμιο σε αναλογία 2:1. Ακολουθεί μηχανική ανάδευση και φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα.
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα erpendorf και προσθήκη 600 µl φαινόλη/χλωροφόρμιο σε αναλογία 1:1. Ακολουθεί μηχανική ανάδευση και φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα.
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα erpendorf και προσθήκη 500 µl διαλύματος χλωροφόρμιο και ισοαμυλικής αλκοόλης σε αναλογία 49:1. Ακολουθεί μηχανική ανάδευση και φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα.
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα erpendorf και προσθήκη 250 µl LiCl. Ακολουθεί καθίζηση του RNA για 16 ώρες στους 4°C.
- Φυγοκέντρωση για 30 λεπτά στις 13.000 στροφές στους 4 °C, προκειμένου να γίνει η συλλογή του RNA ως ίζημα.
- Επαναδιάλυση του RNA με 200µl H₂O-DEPC.

- Προσθήκη 100% αιθανόλης σε όγκο ίσο με 2,5 όγκους της υδατικής φάσης (500 μ l) και διαλύματος οξικού νατρίου pH 5,3 σε όγκο ίσο με το 1/10 του όγκου της υδατικής φάσης (20 μ l).
- Επώαση του RNA για κατακρήμνιση, είτε για 60 λεπτά στους -80°C είτε για 16 ώρες τους -20°C .
- Φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στις 13.000 στροφές στους 4°C και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- Πλύση του RNA ιζήματος με 70% αιθανόλη.
- Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13.000 στροφές στους 4°C και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- Επαναδιάλυση του RNA ιζήματος με $\text{H}_2\text{O-DEPC}$.

Να σημειωθεί ότι στη συγκεκριμένη μελέτη, είχε δοκιμαστεί αυτή η μέθοδος, ωστόσο δεν υπήρξαν ικανοποιητικά αποτελέσματα, ίσως λόγω του μικρού ιστού που υπήρχε διαθέσιμο κατά την πραγματοποίηση της δοκιμής, οπότε η απομόνωση του RNA έγινε με το *RNeasy Plant Minikit* της εταιρείας *QIAGEN*.

10. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΝΟΥΚΛΕΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση και η καθαρότητα του RNA που απομονώθηκε, χρησιμοποιήθηκε η ποσοτική φωτομετρική ανάλυση. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στο νόμο των Beer-Lambert, κατά την οποία η απορρόφηση του φωτός από ένα δείγμα είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της ουσίας που υφίσταται στο διάλυμα, καθώς και του μήκους της διαδρομής του φωτός μέσα από το διάλυμα. Για τον υπολογισμό των παραπάνω παραγόντων, τοποθετήθηκαν 3 μ l από κάθε δείγμα σε 600 μ l dd H_2O σε ειδική κυβέττα χαλαζία και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση κάθε δείγματος. Η συγκέντρωση δίνεται από τον τύπο:

$C = \text{OD}_{260} * D * \text{συντελεστής αραίωσης}$, όπου:

OD_{260} : Η οπτική πυκνότητα του δείγματος στα 260 nm. Χρησιμοποιείται αυτό το μήκος κύματος, επειδή οι αζωτούχες βάσεις των νουκλεϊκών οξέων εμφανίζουν το μέγιστο απορρόφησης σε αυτό το σημείο.

D: Σταθερά, η οποία εξαρτάται από το είδος του νουκλεϊκού οξέος. Σε καθαρά διαλύματα DNA, η σταθερά D ισούται με 50 µg/ml, ενώ σε καθαρά διαλύματα RNA και ολιγονουκλεοτιδίων ισούται με 40 και 30 µg/ml, αντίστοιχα.

Συντελεστής αραίωσης: Στην περίπτωση μας είναι 1:201, βάσει των ήδη αναφερόμενων ποσοτήτων που προστέθηκαν.

Για τον υπολογισμό της καθαρότητας ενός δείγματος νουκλεϊκών οξέων, υπολογίζεται ο λόγος OD₂₆₀/OD₂₈₀. Στα 280 nm, οι πρωτεΐνες εμφανίζουν το μέγιστο απορρόφησης, λόγω απορρόφησης του φωτός από τα αρωματικά αμινοξέα (φαινυλαλανίνη, τρυπτοφάνη, ιστιδίνη, τυροσίνη), συνεπώς η ύπαρξη πρωτεϊνών αυξάνει τον παραπάνω λόγο. Όταν η τιμή του λόγου είναι ανάμεσα στις τιμές 1,8 και 2, τότε το δείγμα θεωρείται ικανοποιητικής καθαρότητας.

11. ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΜΕ DNAΣΗ

Με αυτή τη μέθοδο, απομακρύνεται το γονιδιωματικό DNA, το οποίο μπορεί να απομονώθηκε ταυτόχρονα με το RNA από τον ιστό. Στη διαδικασία αυτή, χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο της εταιρείας *Invitrogen*. Το πρωτόκολλο περιλαμβάνει τις εξής διαδικασίες:

- Σε δείγμα RNA ποσότητας μέχρι ενός µg, προστίθενται:
 - 1 µl U/µg RNA DNάσης, ελεύθερης από RNάσες
 - 1 µl 10X ρυθμιστικό διάλυμα DNάσηςI
 - dd H₂O μέχρι τελικού όγκου 10 µl.
- Ακολουθεί επώαση στους 37 °C για 45 λεπτά. Εναλλακτικά, η επώαση μπορεί να πραγματοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθήκη 1 µl EDTA 25 mM pH 8.0 για να τερματιστεί η αντίδραση, επειδή το EDTA δεσμεύει τα ιόντα που υπάρχουν, στερώντας τα από την DNάση που τα χρησιμοποιεί για τη λειτουργία της.
- Επώαση στους 65 °C για 10 λεπτά.

12. ΣΥΝΘΕΣΗ cDNA ΑΠΟ RNA ΜΕΣΩ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΑΣΗΣ

Σε συνολικό όγκο 20 μ l μπορούν να χρησιμοποιηθούν 1ng-5 μ g ολικού RNA ή 1-500ng mRNA. Τα βήματα που ακολουθούνται είναι τα εξής:

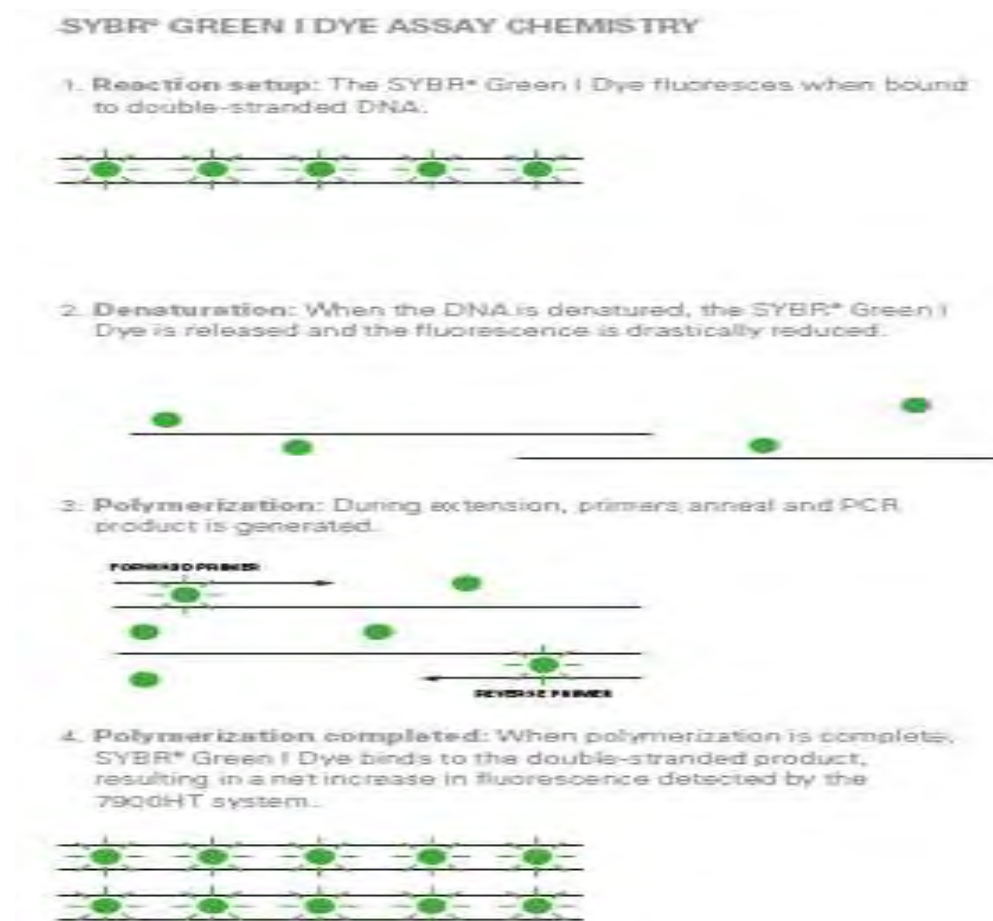
- Σε σωλήνα erpendorf τοποθετούνται τα παρακάτω συστατικά:
 - 1 μ l oligo(dT)₁₂₋₁₈ συγκέντρωσης 500 μ g/ml ή 50-250 ng τυχαίων εκκινητών
 - 1 ng-5 μ g ολικού RNA ή 1-500 ng mRNA
 - 1 μ l μείγματος dNTPs (10 mm dATPs, dGTPs, dTTPs σε ουδέτερο pH)
 - Αποστειρωμένο ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 12 μ l
- Το παραπάνω διάλυμα θερμαίνεται στους 65 °C για 5 λεπτά και αμέσως μετά, τοποθετείται στον πάγο.
- Ακολουθεί μία γρήγορη φυγοκέντρωση και έπειτα προστίθενται:
 - 4 μ l 5X διάλυμα σύνθεσης πρώτης αλυσίδας
 - 2 μ l 0,1 M DTT
 - 0,5 μ l *RNaseOUT*, που είναι ένας ανασυνδυασμένος παρεμποδιστής ριβονουκλεασών (40 units/ μ l)
- Τα παραπάνω συστατικά αναμειγνύονται με την πιπέτα και επωάζονται στους 42 °C για 2 λεπτά.
- Στη συνέχεια, προστίθεται 1 μ l (200 units) του ενζύμου *SuperScript II RT* της εταιρείας *Invitrogen* και ακολουθεί ανάμιξη με πιπέτα.
- Ο σωλήνας erpendorf αφήνεται για επώαση στους 42 °C για 50 λεπτά.
- Η αντίδραση διακόπτεται με θέρμανση στους 70 °C για 15 λεπτά, οπότε και απενεργοποιείται το ένζυμο.

13. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (REAL-TIME PCR)

13.1 REAL-TIME PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (*Real-Time PCR*) ή αλλιώς και ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (*qPCR= quantitative PCR*) είναι μία 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 διάφορων 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, χρησιμοποιήθηκε η χρωστική SYBR green, η οποία έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται ανάμεσα στους δύο κλώνους του DNA και να εκπέμπει φθορισμό στα 520 nm. Έτσι, κατά την φάση της αποδιάταξης των δύο αλυσίδων παρατηρείται ελάχιστος η μηδαμινός φθορισμός, ενώ αυξάνεται σταδιακά κατά τον υβριδισμό των εκκινητών και μεγιστοποιείται στη φάση της πλήρους επιμήκυνσης του γονιδίου-στόχου (εικόνα 8).



Εικόνα 8: Εκπομπή φθορισμού της χρωστικής SYBR green σε κάθε φάση της Real-Time PCR. Η χρωστική SYBR φθορίζει όταν προσδένεται σε διπλής έλικας DNA. Κατά την αποδιάταξη του DNA, η χρωστική απελευθερώνεται και ο φθορισμός μειώνεται δραματικά. Κατά την επιμήκυνση των αλυσίδων του DNA, η χρωστική «παγιδεύεται» ανάμεσα στις αλυσίδες και ο φθορισμός που εκπέμπεται υπολογίζεται από το μηχάνημα, υπολογίζοντας με αυτόν τον τρόπο τη σχετική ποσότητα του τελικού προϊόντος.

Ο φθορισμός μετريέται σε κάθε κύκλο, με αποτέλεσμα να προκύπτει μία καμπύλη ενίσχυσης (*amplification plot*), γεγονός που επιτρέπει στον ερευνητή να παρακολουθεί όλη τη διαδικασία της αντίδρασης. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος. Επιπλέον, προκύπτει μια καμπύλη αποδιάταξης (*dissociation curve*) όπου σε μία συγκεκριμένη θερμοκρασία πρέπει να υπάρχει μία και μόνο κορυφή, πράγμα που υποδηλώνει την ύπαρξη και ενίσχυση ενός μόνο προϊόντος. Περισσότερες κορυφές σημαίνει ότι υπάρχουν επιμολύνσεις στο δείγμα και συνεπώς, το πείραμα πρέπει να επαναληφθεί. Επιπροσθέτως, υπολογίζεται το όριο του κύκλου που ονομάζεται Ct (*Cycle threshold*). Το Ct είναι ο κύκλος της PCR κατά την οποία ο φθορισμός της χρωστικής είναι μεγαλύτερος από το όριο που θέτει το μηχάνημα της *real-time PCR*. Γενικά, όσο μικρότερη τιμή έχει το Ct, τόσο μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε DNA έχει το διάλυμα. Μέσω της τιμής Ct, πραγματοποιείται αρχικά η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων, οπότε και φροντίζεται όλα τα δείγμα να έχουν τιμές Ct από 20-22, συνεπώς να υπάρχει παρόμοια συγκέντρωση DNA σε κάθε δείγμα, έπειτα από την επεξεργασία τους με τις DNάσες και την παραγωγή cDNA. Να σημειωθεί ότι υποδιπλασιασμός της συγκέντρωσης του δείγματος, οδηγεί σε αύξηση της τιμής Ct κατά μία μονάδα.

Στην παρούσα εργασία, η ενίσχυση των cDNA πραγματοποιήθηκε με το qRT-PCR kit της εταιρείας Kapa Biosystems χρησιμοποιώντας εξειδικευμένους εκκινητές. Στις αντιδράσεις Real-Time PCR χρησιμοποιήθηκαν optical tubes στα οποία προστέθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια μέχρι τελικού όγκου 10 μ l.

<i>Real-Time PCR</i>	
Αντιδραστήρια	Όγκος (μl)
cDNA	1
Διάλυμα SYBR green	5
Ορθόδρομος εκκινητής (5 μ M)	0,4
Οπισθόδρομος εκκινητής (5 μ M)	0,4
Χρωστική αναφοράς ROX	0,2
ddH ₂ O	3
Συνολικός όγκος	10

Πίνακας 9: Αντιδραστήρια και οι ποσότητές τους που χρησιμοποιήθηκαν στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου.

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε συσκευή Mx3005P (Stratagene). Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με το ίδιο θερμοκρασιακό πρόγραμμα και καταγράφονταν για 45 κύκλους. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις στη συγκεκριμένη μελέτη, ήταν το εξής:

Πρόγραμμα αντιδράσεων Real-Time PCR	
Χρόνος (min:sec)	Βαθμοί °C
3:00	95
0:15	95
0:20	56
0:11	72
1:00	95
0:30	55
0:30	95

Πίνακας 10: Χρόνος και θερμοκρασία που χρησιμοποιήθηκαν στο πρόγραμμα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου.

Στο τέλος κάθε αντίδρασης, ακολουθούσε η παρακολούθηση της καμπύλης αποδιάταξης βάσει της οποίας επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη ενός μόνο προϊόντος σε κάθε αντίδραση. Τα δεδομένα φθορισμού εισήχθησαν στο πρόγραμμα LinRegPCR και υπολογίστηκε η αποτελεσματικότητα της PCR (PCR efficiency) επιλέγοντας το σύνολο των σημείων κάθε αντίδρασης στην αρχή της εκθετικής φάσης του φθορισμού της αντίδρασης. Υψώνοντας την αποτελεσματικότητα της PCR στον αριθμό Ct κάθε αντίδρασης, προκύπτει η σχετική ποσότητα αντιγράφων του γονιδίου ενδιαφερόντος και του γονιδίου αναφοράς Mt27c. Διαιρώντας τη σχετική ποσότητα του γονιδίου ενδιαφερόντος με το μέσο όρο της σχετικής ποσότητας του γονιδίου αναφοράς Mt27c, προκύπτει η σχετική έκφραση του γονιδίου ενδιαφερόντος σε κάθε δείγμα, ενώ αφαιρώντας το ποσοστό έκφρασης από τη μονάδα, προκύπτει η σχετική σίγηση. Για κάθε δείγμα, η αντίδραση πραγματοποιούταν τουλάχιστον δύο φορές και την παρουσίαση των αποτελεσμάτων, παρουσιάζονται ο μέσος όρος της σχετικής έκφρασης των επαναλήψεων καθώς και το σφάλμα.

13.2 ΕΠΙΛΟΓΗ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ

Στην παρούσα εργασία, οι εκκινητές επιλέχθηκαν σε μη συντηρημένες περιοχές των γονιδίων, όπως προέκυψε με ομοιοπαράθεση βασισμένη στον αλγόριθμο ClustalW, ώστε να αποφευχθεί ο υβριδισμός των εκκινητών με μη επιθυμητές αλληλουχίες. Σε περιπτώσεις μη επικαλυπτόμενων αλληλουχιών που κωδικοποιούν για το ίδιο γονίδιο, οι εκκινητές ελέγχθηκαν με τον αλγόριθμο BLAST σε όλες τις γονιδιακές βάσεις δεδομένων. Τελικά, επιλέχθηκαν εκκινητές που υβριδίζουν αποκλειστικά την αλληλουχία ενδιαφέροντος στο φυτό *Medicago truncatula*. Το μέγεθος των ενισχυόμενων τμημάτων για την real-time PCR ήταν περίπου 100-150 ζεύγη βάσεων. Οι εκκινητές επιλέχθηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός ομοδιμερών ή ετεροδιμερών, των οποίων η δημιουργία έχει ως αποτέλεσμα την εκπομπή μη εξειδικευμένου φθορισμού κατά την αντίδραση της PCR πραγματικού χρόνου.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΣΚΟΠΟΣ

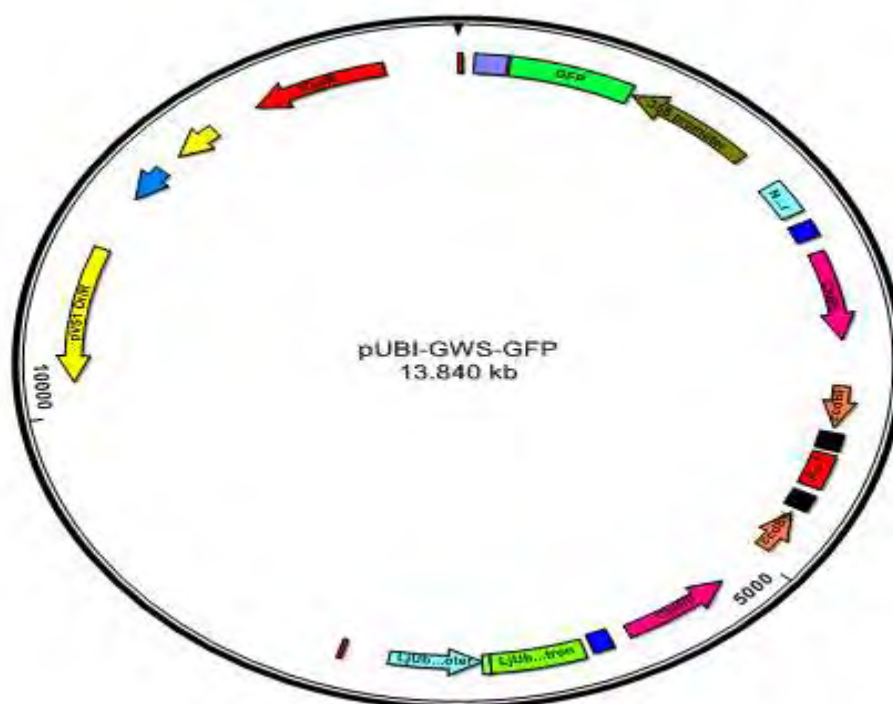
Σε αυτή την εργασία, στόχος είναι η δημιουργία διαγονιδιακών φυτών *Medicago truncatula* που έχουν μετασχηματισμένες ρίζες στις οποίες έχει σιγηθεί το γονίδιο που κωδικοποιεί για τη συνθάση της β-αμυρίνης. Η δημιουργία των παροδικά μετασχηματισμένων ριζών έγινε με τη βοήθεια του *Agrobacterium rhizogenes*. Η β-αμυρίνη είναι ένα πρόδρομο μόριο παραγωγής σαπωνινών και με αυτή τη μεθοδολογία, είναι δυνατό να παρατηρήσουμε την ενδεχόμενη επίδραση των μορίων αυτών στη φυσιολογία των φυτών. Επιπλέον, μελετάται η επιρροή που προκύπτει από την ελαττωμένη έκφραση των προϊόντων λόγω της μειωμένης έκφρασης του γονιδίου β-AS στη συμβιωτική σχέση μεταξύ ρίζας και αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων. Γενικά, λίγα πράγματα είναι γνωστά για την επίδραση των δευτερογενών μεταβολιτών στις συμβιωτικές σχέσεις, ωστόσο αυτή η πτυχιακή εργασία αποτελεί μία βάση για τη διερεύνηση του ρόλου των μορίων αυτών.

2. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΜΟΛΥΝΣΗ ΦΥΤΩΝ ΜΕ ΤΟ *Agrobacterium rhizogenes*

Για τη δημιουργία παροδικά μετασχηματισμένων ριζών *Medicago truncatula* χρησιμοποιήθηκαν σπόροι του οικότυπου A17 και χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο που έχει περιγραφεί αναλυτικά στο κεφάλαιο Υλικά & Μέθοδοι. Η διάρκειά του ήταν 58 ημέρες από την έναρξη του πειράματος μέχρι τη δειγματοληψία, οπότε και λήφθηκαν οι ρίζες.

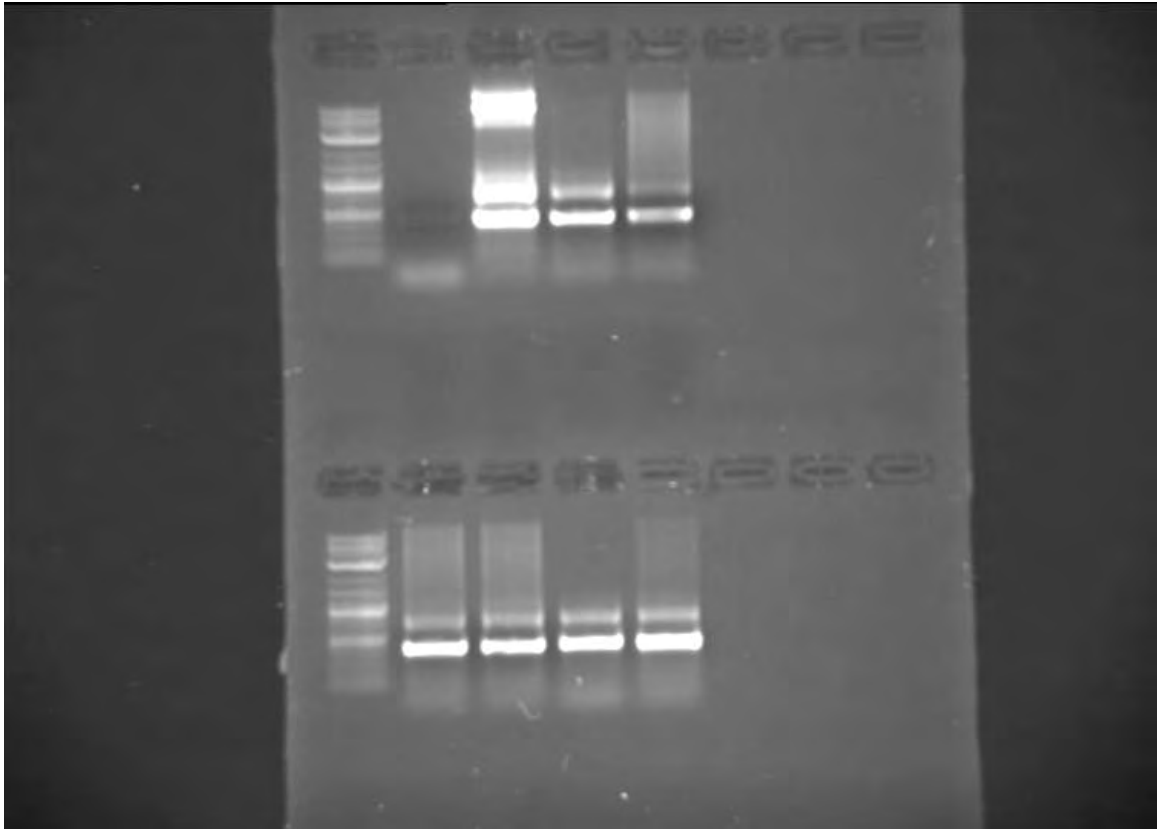
Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός σε ικανά για μετασχηματισμό *Agrobacterium rhizogenes* (στέλεχος ARQUA) εισάγοντας την πλασμιδιακή κατασκευή, καθώς και τον φορέα χωρίς το ένθεμα σε διαφορετικά κύτταρα ARQUA. Ο πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στην εικόνα 9. Η κατασκευή που δημιουργήθηκε με τη τεχνολογία Gateway φέρει το ένθεμα β-AS ενσωματωμένο εκατέρωθεν του ιντρονίου με προσανατολισμό 3' – 5' (αντικωδική φορά) και με προσανατολισμό 5' – 3' (κωδική φορά). Η περιοχή T-DNA που μεταφέρεται στο φυτικό γονιδίωμα περιέχει με τη σειρά το αριστερό συνοριακό άκρο, την CaMV35S

αλληλουχία τερματισμού, το γονίδιο πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP), τον υποκινητή CaMV35S, την αλληλουχία τερματισμού Nos, το γονίδιο β-AS στις δύο διαφορετικές κατευθύνσεις εκατέρωθεν του ιντρονίου AtWRKY33, τον υποκινητή LjUbiquitin μαζί με το πρώτο εξόνιο και ιντρόνιο του ίδιου γονιδίου και τέλος, το δεξί συνοριακό άκρο.

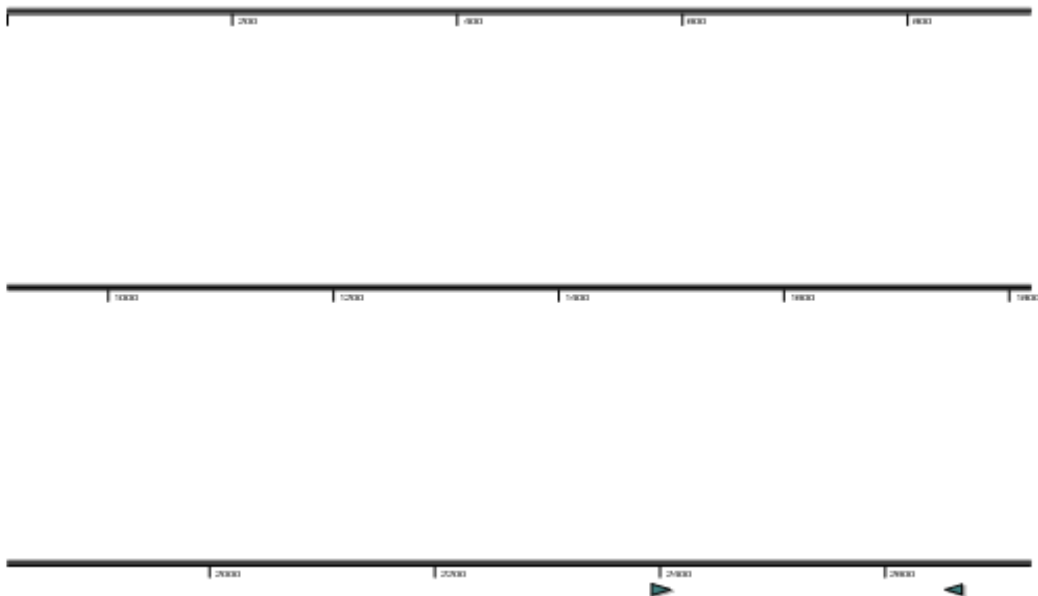


Εικόνα 9: Πλασμιδιακός φορέας pUBi.

Η απομόνωση του πλασμιδίου έγινε όπως περιγράφηκε και στην ενότητα 7.3 στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι, ενώ η ταυτοποίηση έγινε με την χρήση των ίδιων τεχνικών (PCR και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης), χρησιμοποιώντας τον ορθόδρομο εκκινητή 5'-ACGCCATGGTAAGCTATAAGCTATGAG -3' και τον οπισθόδρομο εκκινητή 5'- GCATAGGTAGAATATTTACTCGAGCGCT -3' (εικόνα 10). Με αυτό το ζευγάρι εκκινητών, ενισχύεται το τμήμα του γονιδίου β-AS, όπως φαίνεται στην εικόνα 11.



Εικόνα 10: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των πλασμιδίων για την ταυτοποίηση έπειτα από τον μετασχηματισμό. Στην εικόνα παρατηρείται το ενισχυόμενο τμήμα του γονιδίου της συνθάσης της β-αμυρίνης. Από πάνω αριστερά προς τα κάτω δεξιά: Αρνητικό control, θετικό control, control 1, control 2, pUBi-BAS 1, pUBI-BAS 2, pUBI-BAS 3, pUBI-BAS 4.



Εικόνα 11: Απεικόνιση του ενισχυόμενου τμήματος του γονιδίου β-AS για την ταυτοποίηση των πλασμιδίων. Τα βέλη υποδεικνύουν τους εκκινητές.

Απολυμασμένοι σπόροι *Medicago truncatula* του οικότυπου A17 προβλάστησαν και αναπτύχθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης για συνολικά 9 ημέρες. Ταυτόχρονα, πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη των αγροβακτηρίων που έφεραν τόσο την πλασμιδιακή κατασκευή pUBi-BAS, όσο και τον «άδειο» φορέα pUBi που χρησιμοποιείται ως αρνητικός έλεγχος. Η ανάπτυξη των αγροβακτηρίων γινόταν σε θρεπτικό υλικό LB με τη συνεχή παρουσία 50 µg/ml καναμυκίνη και 100 µg/ml στρεπτομυκίνη. Την 9^η ημέρα από την απολύμανση των σπόρων, πραγματοποιήθηκε η μόλυνση των ριζών με τα αγροβακτήρια βάσει πρωτοκόλλου. Τα φυτά μεταφέρθηκαν σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα B5 και τα τρυβλία καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο για την επαγωγή της ριζογένεσης και μεταφέρθηκαν στον θάλαμο ανάπτυξης. Δύο ημέρες αργότερα, το αλουμινόχαρτο αφαιρείται ενώ έξι ημέρες μετά τη μόλυνση, τα φυτάρια μεταφέρονται σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό B5 στο οποίο έχει προστεθεί το αντιβιοτικό σεφοταξίμη, το οποίο σκοτώνει τα αγροβακτήρια που είχαν αναπτυχθεί κατά τη διάρκεια της παραμονής στο θάλαμο ανάπτυξης. Μετά από μία εβδομάδα (21^η ημέρα με βάση το πρωτόκολλο), πραγματοποιήθηκε μεταφορά των φυταριών σε στερεό θρεπτικό υλικό Jensen που δεν περιέχει άζωτο και ευνοεί τη μετέπειτα μόλυνση με τον μικροσυμβιώτη τους.

Ο έλεγχος των μετασχηματισμένων φυτών έγινε με την βοήθεια του μικροσκοπίου Leica Dm2000 σε μεγέθυνση 10X με διεγείρουσα υπεριώδη ακτινοβολία. Οι ρίζες που ήταν μετασχηματισμένες εμφάνισαν έντονο φθορισμό λόγω της έκφρασης του γονιδίου GFP που έχει ενσωματωθεί στο γονιδίωμα του ριζικού συστήματος των φυτών. Η ένταση του φθορισμού μπορεί να μεταβάλλεται λόγω της θέσης ενσωμάτωσης της κατασκευής ή λόγω μη ενσωμάτωσης της σε ορισμένα μεριστωματικά κύτταρα κατά τη μόλυνση. Οι μη μετασχηματισμένες ρίζες φθορίζουν σε μικρότερο βαθμό λόγω της ύπαρξης πρωτεϊνών με αρωματικούς δακτύλιους κατά μήκος της ρίζας. Παρατηρήθηκαν συνολικά 120 φυτά και βρέθηκαν 9 φυτά-μάρτυρες και 14 φυτά με την πλασμιδιακή κατασκευή, τα οποία βρέθηκαν να είναι μετασχηματισμένα λόγω φθορισμού.



Εικόνα 12: Μετασχηματισμένα φυτά *Medicago truncatula* 28 ημερών. Αριστερά: Φυτά που έχουν μετασχηματιστεί με τον απλό φορέα pUbi (control). Δεξιά: Μετασχηματισμένα φυτά που έχουν μετασχηματιστεί με την πλασμιδιακή κατασκευή pUbi-BAS.

Σε στερεό θρεπτικό υλικό TY επιστρώθηκε το βακτήριο *Sinorhizobium meliloti*, το οποίο ήταν διαθέσιμο σε stock γλυκερόλης. Η επώαση του βακτηρίου διήρκησε 2 μέρες στους 30 °C και ύστερα, μία μικρή ποσότητα αποικιών μεταφέρθηκε σε υγρό θρεπτικού υλικό TY και επώαστηκαν στους 30 °C με ανακίνηση.

Στη συνέχεια, τα φυτά μολύνθηκαν στις ρίζες με μικρή ποσότητα καλλιέργειας του βακτηρίου *Sinorhizobium meliloti*, όπως έχει περιγραφεί και στην ενότητα 9 και μεταφέρθηκαν σε πλαστικές θήκες με αποστειρωμένο και καλά ποτισμένο με νερό υπόστρωμα που περιείχαν περλίτη και βερμικουλίτη σε αναλογία 1:1. Έπειτα, τα φυτά ποτίζονταν κάθε δύο ημέρες εναλλάξ με απιονισμένο νερό και θρεπτικό διάλυμα *Hoagland* αυξανόμενης συγκέντρωσης για 28 μέρες συνολικά. Μέχρι το τέλος των ποτισμάτων, είχαν παραμείνει 4 φυτά-μάρτυρες (control) και 8 φυτά με την πλασμιδιακή κατασκευή pUbi-BAS.



Εικόνα 13: Μετασχηματισμένα φυτά 58 ημερών. Από αριστερά προς τα δεξιά, τα τέσσερα πρώτα είναι τα φυτά control και τα υπόλοιπα είναι τα φυτά που έχουν μετασχηματιστεί με την πλασμιδιακή κατασκευή.

3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ β -AS ΣΤΙΣ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΕΣ ΡΙΖΕΣ *Medicago truncatula*.

Μετά την ανάπτυξη των φυτών για 28 ημέρες, ο ριζικός ιστός των μετασχηματισμένων φυτών ξεπλύθηκε από το υπόστρωμα με νερό, πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση του αριθμού των φυματίων και του μήκους της ρίζας (Πίνακας 11) καθώς και λήψη φωτογραφιών των παροδικά μετασχηματισμένων φυτών (Εικόνες 13 & 14). Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν ήταν τα εξής:

Αριθμός φυματίων και μήκος ρίζας των μετασχηματισμένων φυτών		
Φυτό	Αριθμός φυματίων	Μήκος ρίζας (cm)
Control 1	0	14
Control 2	1	12
Control 3	1	16,5
Control 4	0	6
β -AS 1	7	16
β -AS 2	3	13,5
β -AS 3	2	17
β -AS 4	0	12
β -AS 5	5	31,4
β -AS 6	1	12
β -AS 7	3	13
β -AS 8	1	22,5

Πίνακας 11: Αριθμός φυματίων και μήκος ρίζας σε εκατοστά κάθε φυτικής σειράς που βρέθηκε μετασχηματισμένη έπειτα από την επιλογή μέσω μικροσκοπίου.

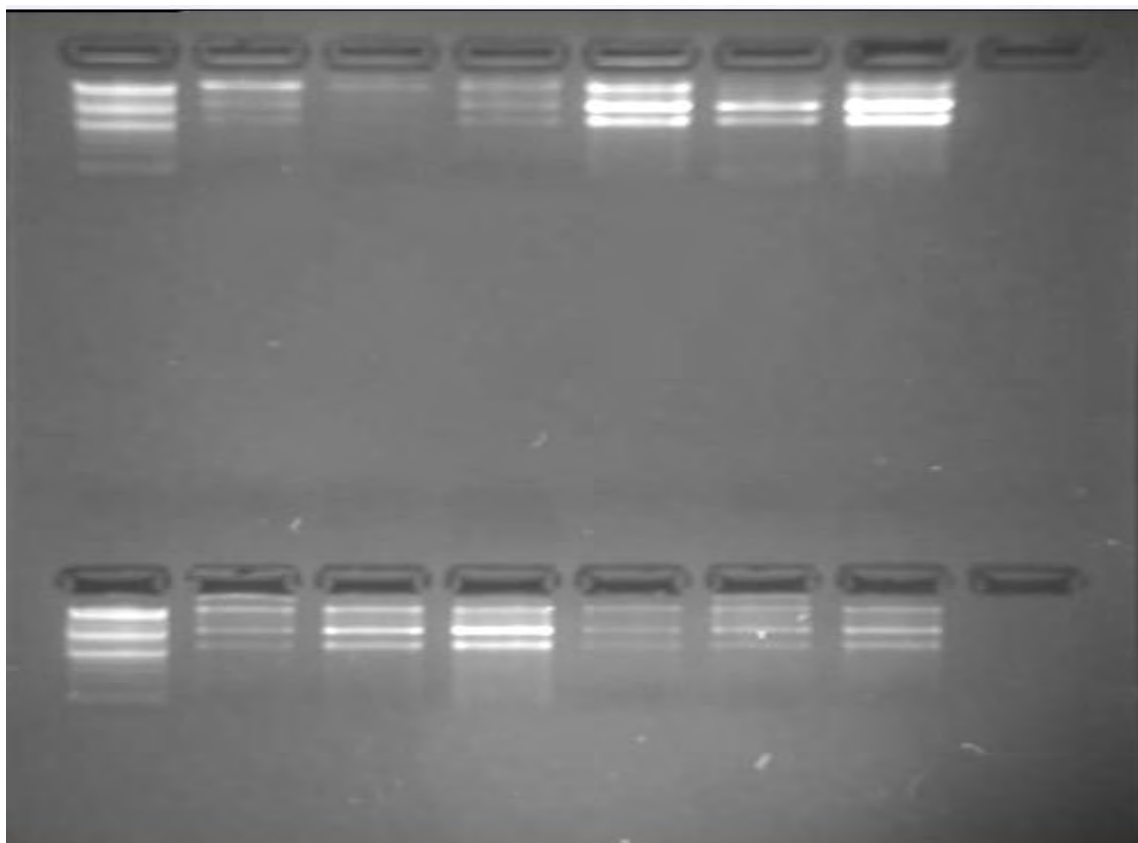


Εικόνα 14: Control φυτά πριν την δειγματοληψία. Από αριστερά προς τα δεξιά: control 1- control 4.



Εικόνα 15: Φυτά μετασχηματισμένα με την πλασμιδιακή κατασκευή πριν τη δειγματοληψία. Από αριστερά προς τα δεξιά: BAS1- BAS8.

Στη συνέχεια, λήφθηκαν οι ρίζες και τα φυμάτια των φυτών και αποθηκεύτηκαν σε eppendorfs στους -80°C . Έπειτα, έγινε απομόνωση του RNA των ριζών με το *RNeasy Plant Minikit* της εταιρείας *QIAGEN* και πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης 2% για την ταυτοποίηση ύπαρξης RNA. Στην εικόνα 16 φαίνεται η ανάλυση του RNA σε πηκτή αγαρόζης από όπου παρατηρούμε πως η ποιότητα του RNA είναι πολύ καλή.



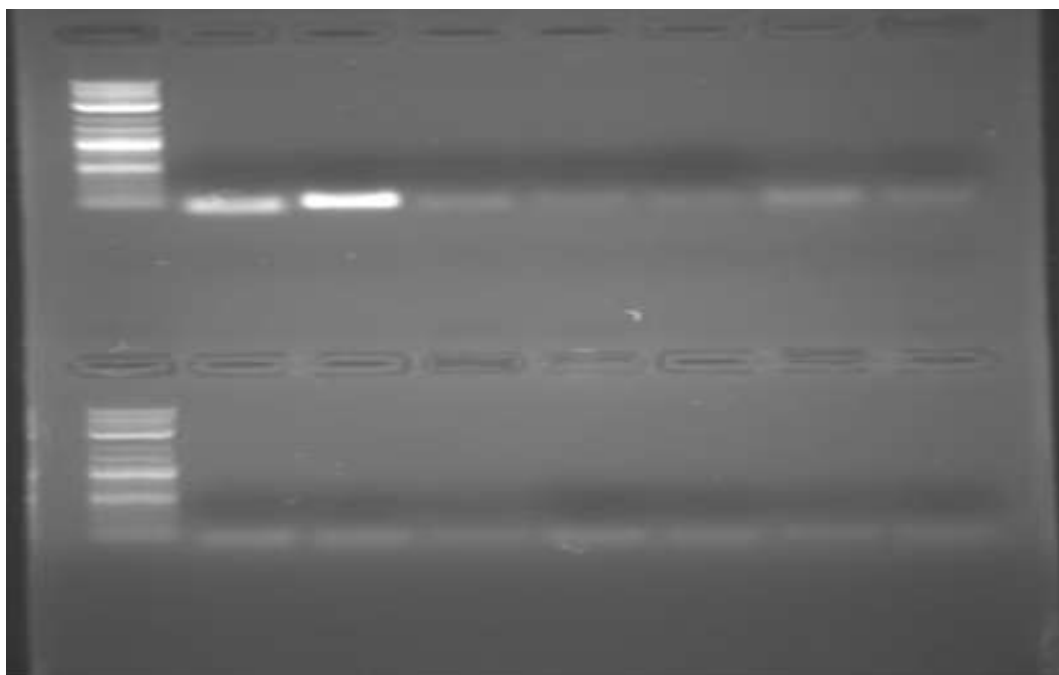
Εικόνα 16: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% για τον έλεγχο απομόνωσης RNA από τις ρίζες. Αριστερά κάθε στήλης, διακρίνεται ο μάρτυρας. Από πάνω αριστερά: control 1-control 4 και β-AS1- β-AS8. Σε κάθε δείγμα εμφανίζονται τρεις μπάντες εκ των οποίων η πάνω αφορά το γενωμικό DNA, ενώ οι κάτω αφορούν το DNA της μεγάλης (80S) και της μικρής (40S) ριβοσωμικής υπομονάδας αντίστοιχα.

Το επόμενο βήμα περιλάμβανε την μέτρηση της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των δειγμάτων του RNA με την χρήση φωτόμετρου στα 260 nm. Γενικά, τα δείγματα RNA είναι καθαρά από πρωτεΐνες όταν ο λόγος $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ κυμαίνεται από 1,8-2. Τα αποτελέσματα ήταν τα εξής:

Συγκέντρωση και λόγος OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀ των δειγμάτων		
Φυτό	Συγκέντρωση (ng/μl)	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀
Control 1	116,6	1,66
Control 2	73,2	1,96
Control 3	111,3	1,79
Control 4	175,6	1,81
β-AS 1	119,6	1,92
β-AS 2	149,1	1,72
β-AS 3	97,6	2,02
β-AS 4	169,4	1,89
β-AS 5	257,2	1,83
β-AS 6	123,3	1,79
β-AS 7	77,2	2
β-AS 8	109,9	1,9

Πίνακας 12: Συγκέντρωση του RNA σε ng/μl και ο λόγος των οπτικών απορροφήσεων στα 260 nm και στα 280 nm μετά την απομόνωση του RNA για τον προσδιορισμό της καθαρότητας κάθε δείγματος.

Παρατηρείται ότι σχεδόν όλα τα δείγματα είναι υψηλής καθαρότητας και αρκούντως μεγάλης συγκέντρωσης. Ακολούθησε ο χειρισμός των δειγμάτων με DNάση, ώστε σε κάθε δείγμα να περιέχεται μόνο το RNA και ο έλεγχος της απομάκρυνσης του γενωμικού DNA έγινε με τη χρήση της τεχνικής PCR με εκκινητές του συστατικού γονιδίου Mtc27 τον ορθόδρομο 5'-TGAGGGAGCAACCAAATACC-3' και τον οπισθόδρομο 5'-GCGAAAACCAAGCTACCATC-3', ακολουθούμενη από ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη 1% για την επιβεβαίωση της ολικής αποδόμησης του γενωμικού DNA. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 17, δεν εμφανίζονται μπάντες σε κανένα δείγμα πλην του θετικού control, που περιείχε DNA που ενισχύεται από τους συγκεκριμένους εκκινητές. Αυτό το γεγονός αποδεικνύει ότι ο χειρισμός με τις DNάσες λειτούργησε και ότι το DNA αποικοδομήθηκε εντελώς.



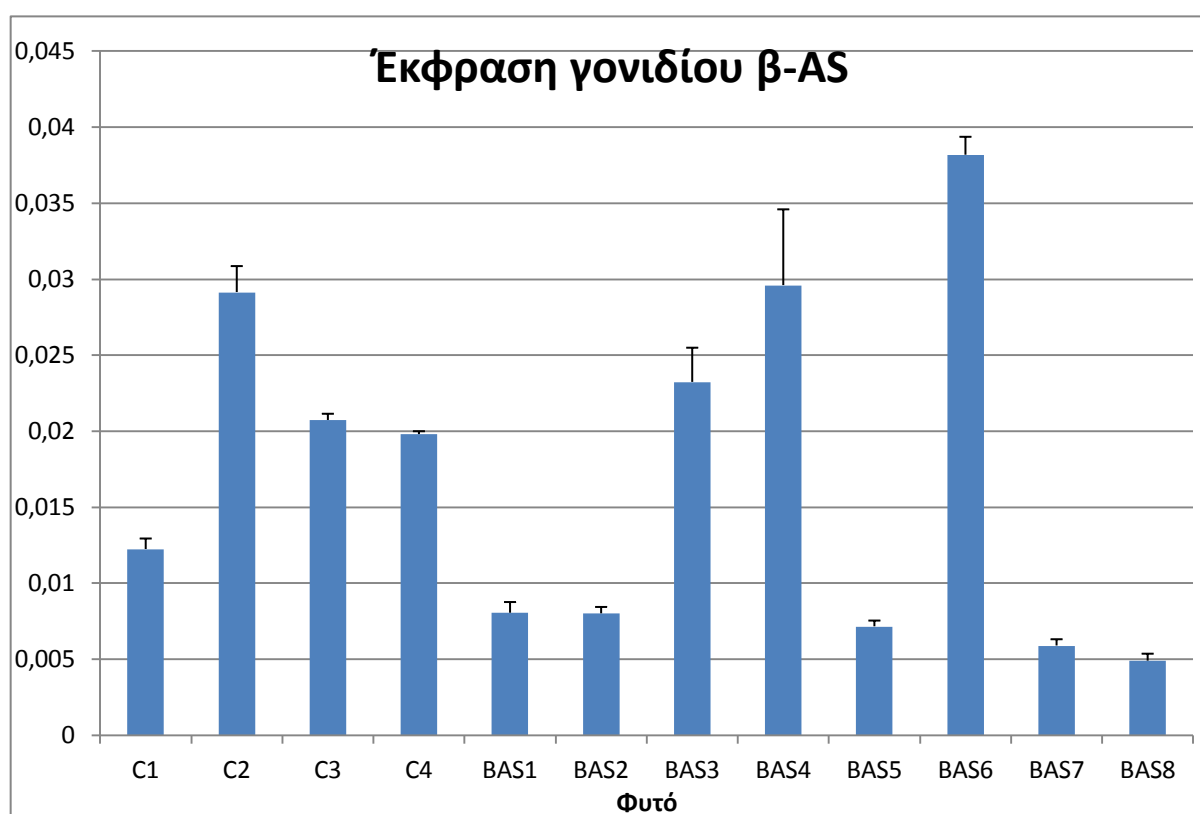
Εικόνα 17: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 0,8% για την επιβεβαίωση της πλήρους απομάκρυνσης του DNA. Αριστερά κάθε στήλης, διακρίνεται ο μάρτυρας. Από πάνω αριστερά: Αρνητικό control, θετικό control, control 1-control 4 και β-AS1- β-AS8.

Στη συνέχεια, κατασκευάστηκαν τα cDNA από τα αντίστοιχα RNA με βάση το πρωτόκολλο και στη συνέχεια κανονικοποιήθηκαν με το ενδογενές ιδιοσυστατικά εκφραζόμενο γονίδιο Mtc27. Έπειτα, πραγματοποιήθηκαν οι αραιώσεις με βάση το Ct κάθε δείγματος. (βλ. ενότητα 14 αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι). Οι αραιώσεις που έγιναν ήταν οι εξής

Κανονικοποίηση δειγμάτων RNA			
Φυτό	Αρχικό Ct	Αραίωση	Τελικό Ct
Control 1	19,5	1:2	20,5
Control 2	19,2	1:3	20,7
Control 3	17,7	1:8	20,7
Control 4	15,6	1:32	20,6
β-AS 1	17,2	1:8	20,2
β-AS 2	17,3	1:8	20,3
β-AS 3	17,4	1:8	20,4
β-AS 4	18,8	1:4	20,8
β-AS 5	18	1:8	21
β-AS 6	21	1:1	21
β-AS 7	18,6	1:4	20,6
β-AS 8	17,3	1:8	20,3

Πίνακας 13: Αρχικό Ct (Cycle threshold) όπως υπολογίστηκε από το μηχάνημα Mx3005P της Stratagene, καθώς και το τελικό Ct που προέκυψε έπειτα από την αραίωση των δειγμάτων.

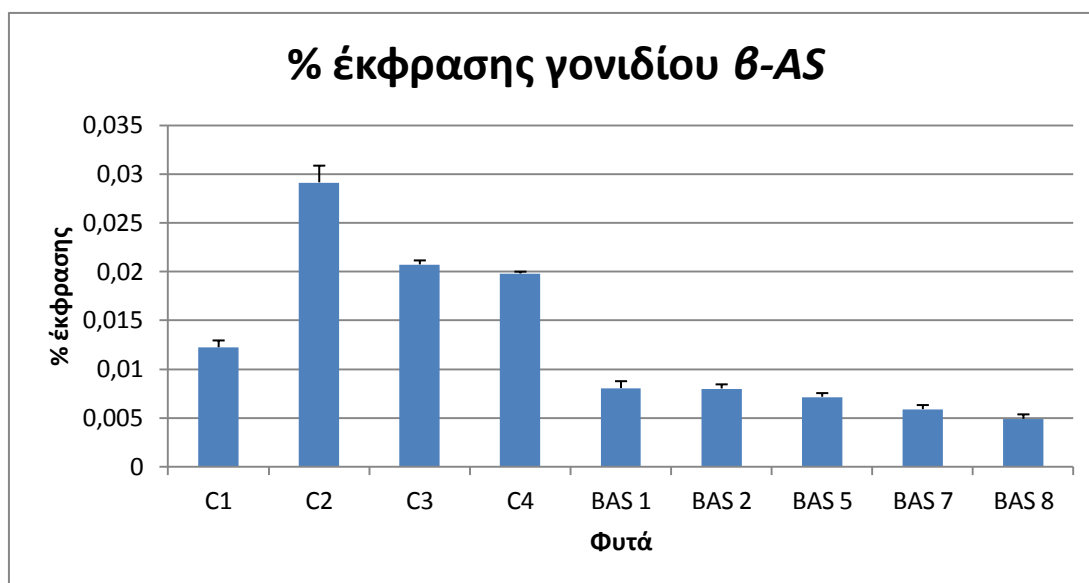
Μετά την κανονικοποίηση των δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε Real-time PCR στα δείγματα για να ανιχνευτεί το ποσοστό σίγησης του επιθυμητού γονιδίου και μάλιστα εις τριπλούν, ώστε τα αποτελέσματα να είναι αντιπροσωπευτικά. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου που κωδικοποιεί τη συνθάση της β-αμυρίνης ήταν ο ορθόδρομος εκκινητής 5'-ACGCCATGGTAAGCTATAAGCTATGAG -3' και ο οπισθόδρομος εκκινητής 5'-AGCGCTCGAGTAAATATTCTACCTATGC -3'. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν διακρίνονται στο γράφημα 1.



Γράφημα 1: Ποσοστό έκφρασης του γονιδίου της συνθάσης της β-αμυρίνης στις ρίζες όλων των δειγμάτων. Παρατηρείται ότι οι φυτικές σειρές BAS1, BAS2, BAS5, BAS7 και BAS8 έχουν μειωμένη έκφραση του γονιδίου συγκριτικά με τα φυτά control (C1-C4). Σε αυτές τις φυτικές σειρές εστιάζεται το ενδιαφέρον για την επίδραση της σίγησης του γονιδίου β-AS.

Παρατηρείται ότι από τα 8 μετασηματισμένα φυτά, προέκυψαν πέντε (β-AS 1, β-AS 2, β-AS 5, β-AS 7, β-AS 8) στα οποία η έκφραση του γονιδίου β-AS φαίνεται εμφανώς μειωμένη στις ρίζες συγκριτικά με τα φυτά μάρτυρες. Σε καμία

περίπτωση δεν παρατηρείται πλήρης σίγηση λόγω της λειτουργικότητας της πλασμιδιακής κατασκευής και της θέσης ενσωμάτωσης της στο φυτικό γονιδίωμα. Οι πέντε φυτικές σειρές που επιλέχθηκαν επειδή είναι μετασχηματισμένες και παρουσιάζουν σίγηση του επιθυμητού γονιδίου παρουσιάζονται στο παρακάτω γράφημα, ενώ στον πίνακα εμφανίζεται το ποσοστό σίγησης του γονιδίου.



Γράφημα 2: Ποσοστό σίγησης του γονιδίου β-AS στις φυτικές σειρές που παρατηρήθηκε σίγηση του γονιδίου σε σχέση με τα φυτά control.

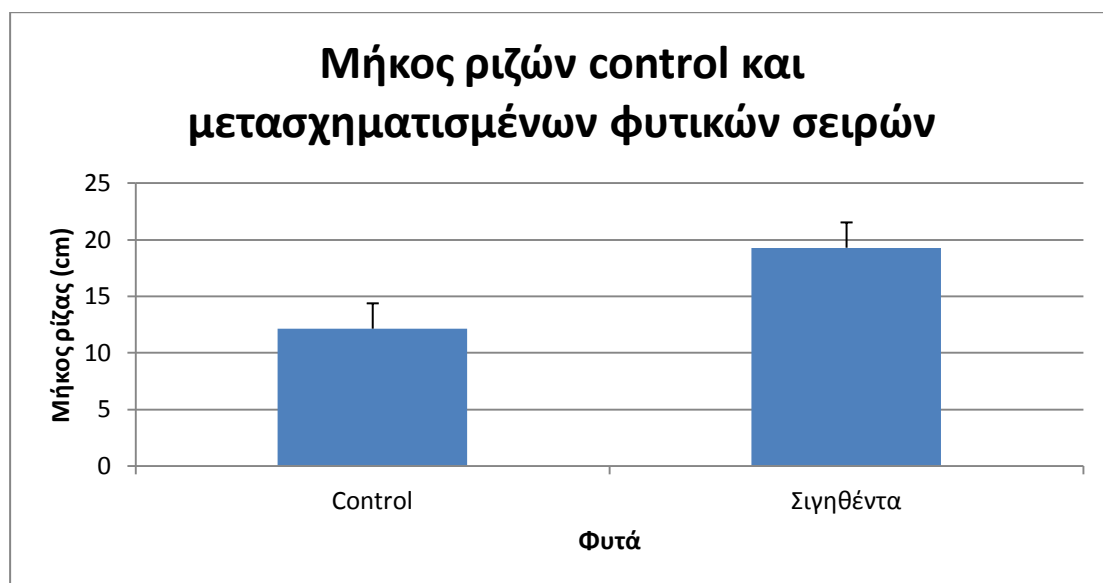
Ποσοστό σίγησης του γονιδίου β-AS στα μετασχηματισμένα φυτά	
Φυτό	% σίγησης
β-AS 1	60,71682
β-AS 2	60,90826
β-AS 5	65,07795
β-AS 7	71,25591
β-AS 8	76,10547

Πίνακας 14: Η επί τοις εκατό σίγηση του γονιδίου β-AS στα μετασχηματισμένα φυτά

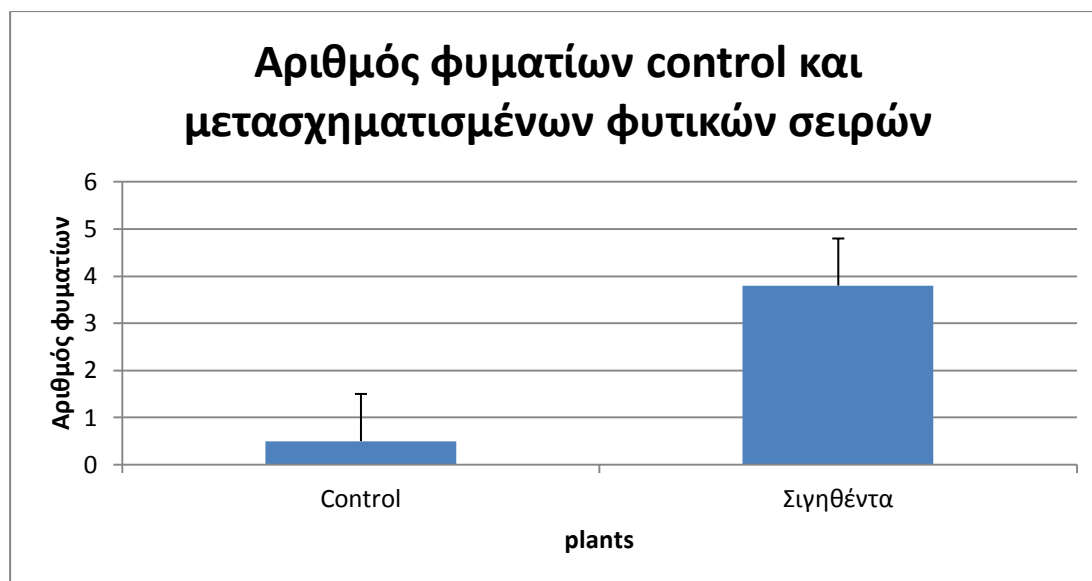
Επομένως, τα αποτελέσματα που περιλαμβάνουν μόνο τα παραπάνω φυτά τροποποιούνται ως εξής:

Φυτό	Αριθμός φυματίων	Μήκος ρίζας (cm)
C1	0	14
C2	1	12
C3	1	16,5
C4	0	6
β-AS1	7	16
β-AS2	3	13,5
β-AS5	5	31,4
β-AS7	3	13
β-AS8	1	22,5

Πίνακας 15: Αριθμός φυματίων και μήκος ρίζας σε εκατοστά κάθε φυτικής σειράς που είναι μετασχηματισμένη έπειτα από την real-time PCR.



Γράφημα 3: Μέσος όρος του μήκους της ρίζας στα φυτά control και στα σιγηθέντα φυτά που επιβεβαιώθηκε η σίγηση του γονιδίου β-AS.



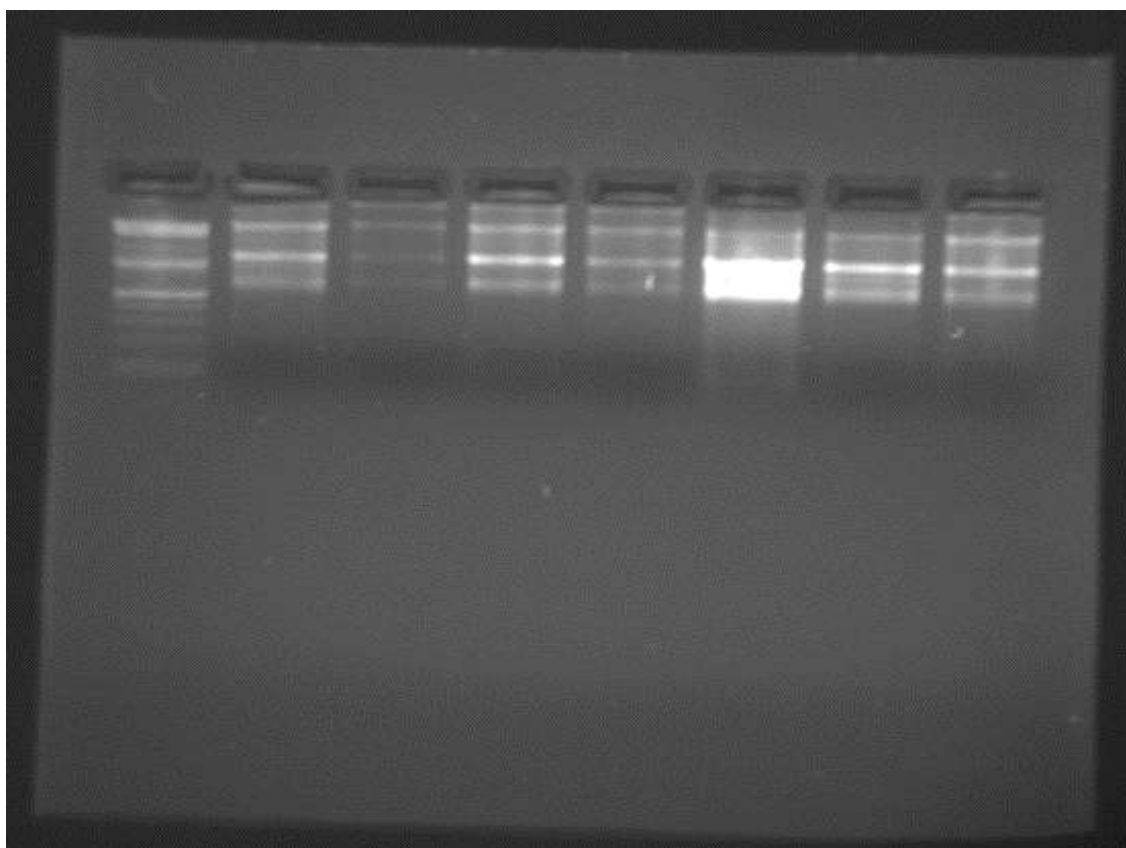
Γράφημα 4: Μέσος όρος του αριθμού των φυματίων στα φυτά control και στα σιγηθέντα φυτά που επιβεβαιώθηκε η σίγηση του γονιδίου β -AS.

Παρατηρούμε ότι ο αριθμός των φυματίων στα φυτά-control είναι 0 ή 1, πράγμα που σημαίνει ότι η μόλυνση των φυτών αυτών με το ριζόβιο δεν ήταν επιτυχής. Αυτό το γεγονός δεν μας επιτρέπει να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα για την επίδραση του γονιδίου β -AS στη διαδικασία σχηματισμού και ανάπτυξης των φυματίων. Όσο αφορά το μήκος της ρίζας, τα μετασηματισμένα με την κατασκευή pUbi-BAS φυτά φαίνεται να έχουν αυξημένο μήκος ρίζας σε σχέση με τα φυτά control, παρόλα αυτά η μεταξύ τους διαφορά δε βρέθηκε να είναι στατιστικώς σημαντική (Γράφημα 4).

4. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ β -AS ΚΑΙ ΟΡΙΣΜΕΝΩΝ ΒΑΣΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΑ ΦΥΜΑΤΙΑ

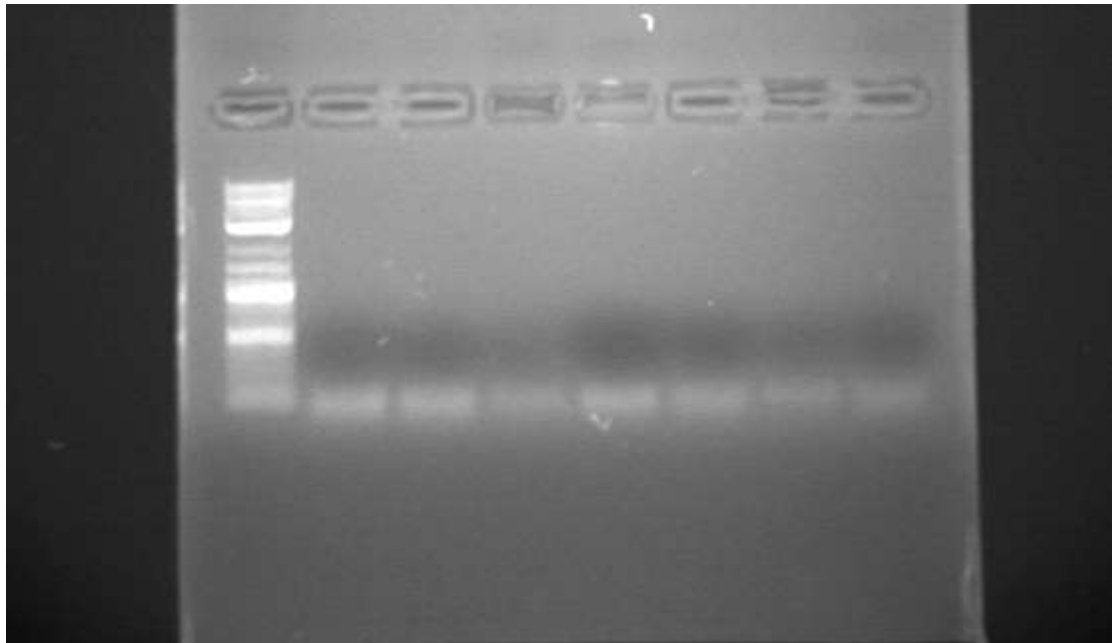
Απομόνωση RNA και έλεγχος της έκφρασης γονιδίων πραγματοποιήθηκε και στα δείγματα των φυματίων. Λόγω του μικρού αριθμού των φυματίων στα φυτά ελέγχου (Πίνακας 11) τα φυμάτια των φυτών control 2 και control 3 ενώθηκαν σε ένα δείγμα control, ενώ ένα δεύτερο control προέκυψε από την ένωση των δειγμάτων β -AS 3 και β -AS 6, τα οποία αφορούν μετασηματισμένα φυτά που όμως δεν παρουσίασαν σίγηση του β -AS. Φυσικά ελέγχθηκαν και τα φυμάτια των φυτών β -AS 1, β -AS 2, β -AS 5, β -AS 7, β -AS 8 τα οποία παρουσίασαν σίγηση του β -AS. Στην

εικόνα 18 παρουσιάζεται η ανάλυση του RNA που απομονώθηκε από τα δείγματα των φυματίων, ενώ στην εικόνα 19 παρουσιάζονται τα προϊόντα της αντίδρασης PCR που πραγματοποιήθηκε μετά από χειρισμό των δειγμάτων με DNAση για τον έλεγχο της απομάκρυνσης του γενωμικού DNA. Όλοι οι χειρισμοί στα δείγματα των φυματίων έγιναν όπως ακριβώς περιγράφηκαν στην προηγούμενη παράγραφο με τα δείγματα των ριζών.



Εικόνα 18: Ανάλυση του απομονωμένου RNA από τα δείγματα των φυματίων σε πηκτή αγαρόζης 2%. Η πάνω μπάνα αντιπροσωπεύει το γενωμικό DNA των δειγμάτων, ενώ οι υπόλοιπες το DNA της μεγάλης (80S) και τη μικρής (40S) ριβοσωμική υπομονάδα. Από αριστερά προς τα δεξιά: Control 2+3, BAS 3+6, BAS1, BAS2, BAS5, BAS7, BAS8. Τα δείγματα BAS3 και BAS6 χησιμοποιήθηκαν σαν control, δεδομένου ότι δεν εμφάνισαν μειωμένη έκφραση του γονιδίου β-AS, ενώ τα control 2 και control 3 μετρήθηκαν ως ένα δείγμα λόγω του μικρού αριθμού φυματίων, ώστε να εξασφαλιστεί η απομόνωση επαρκούς ποσότητας RNA.

Η συγκέντρωση του RNA και η καθαρότητα των δειγμάτων στα φυμάτια κατατίθενται στον πίνακα 16.



Εικόνα 19: Τα δείγματα των φυματίων έπειτα από χειρισμό με DNάση σε πηκτή αγαρόζης 1%. Δεν παρατηρείται καμία μπάντα (πέρα από τους εκκινητές), πράγμα που υποδηλώνει την απουσία DNA. Από αριστερά προς τα δεξιά: Control 2+3, BAS 3+6, BAS1, BAS2, BAS5, BAS7, BAS8.

Συγκέντρωση και λόγος OD₂₆₀/OD₂₈₀ των δειγμάτων από τα φυμάτια		
Φυτό	Συγκέντρωση (ng/μl)	OD₂₆₀/OD₂₈₀
Control 2+3	7,7	1,86
β-AS 3+6	4,6	1,79
β-AS 1	10,3	1,89
β-AS 2	6,4	1,87
β-AS 5	31,8	1,88
β-AS 7	10,6	1,84
β-AS 8	12,9	1,83

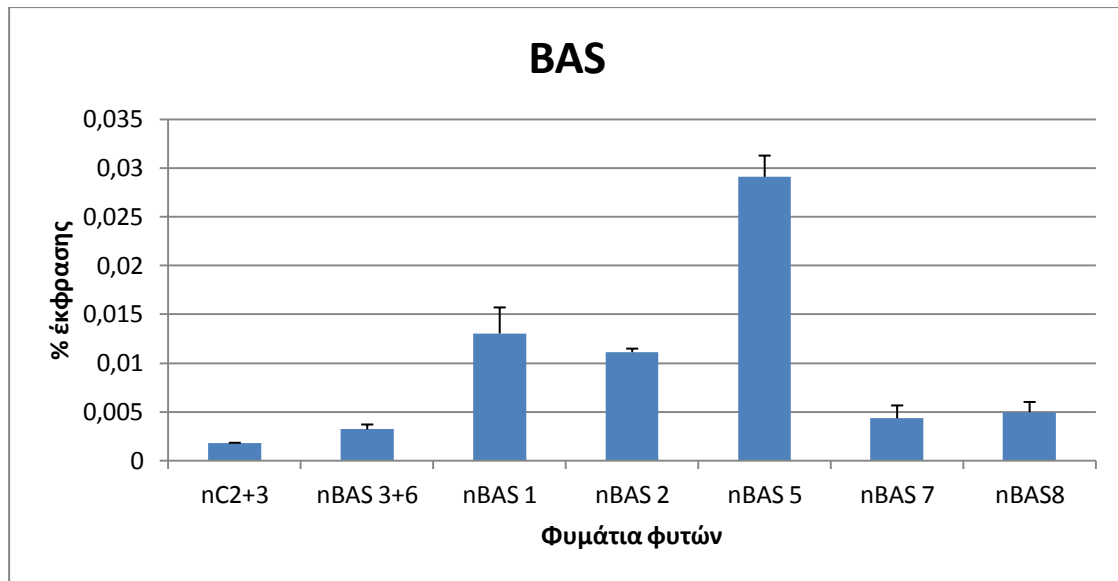
Πίνακας 16: Συγκέντρωση του RNA των φυματίων σε ng/μl και ο λόγος των οπτικών απορροφήσεων στα 260 nm και στα 280 nm μετά την απομόνωση του RNA για τον προσδιορισμό της καθαρότητας κάθε δείγματος.

Μετά τον χειρισμό των δειγμάτων από DNάσες και την παραγωγή cDNA, τα δείγματα κανονικοποιήθηκαν ώστε να έχουν παρόμοιες συγκεντρώσεις.

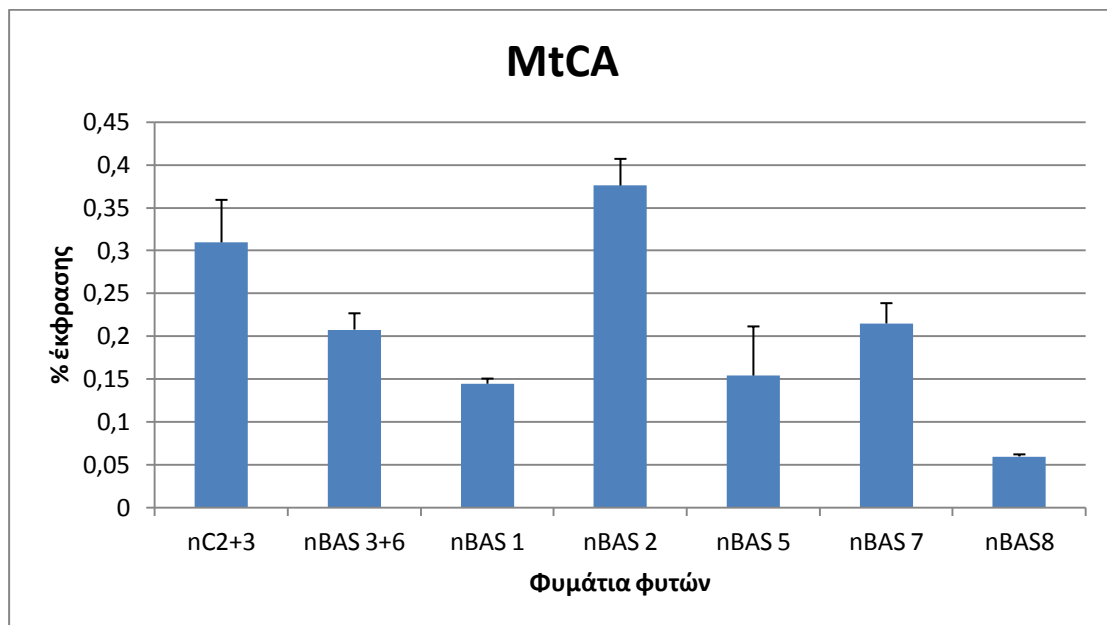
Κανονικοποίηση δειγμάτων RNA			
Φυτό	Αρχικό Ct	Αραίωση	Τελικό Ct
Control 2+3	16,78	1:16	20,78
β-AS 3+6	18,73	1:4	20,73
β-AS 1	16,46	1:16	20,46
β-AS 2	17,55	1:8	20,55
β-AS 5	15,53	1:32	20,53
β-AS 7	16,65	1:16	20,65
β-AS 8	16,55	1:16	20,55

Πίνακας 17: Αρχικό Ct (Cycle threshold) όπως υπολογίστηκε από το μηχάνημα Mx3005P της Stratagene, καθώς και το τελικό Ct που προέκυψε έπειτα από την αραίωση των δειγμάτων.

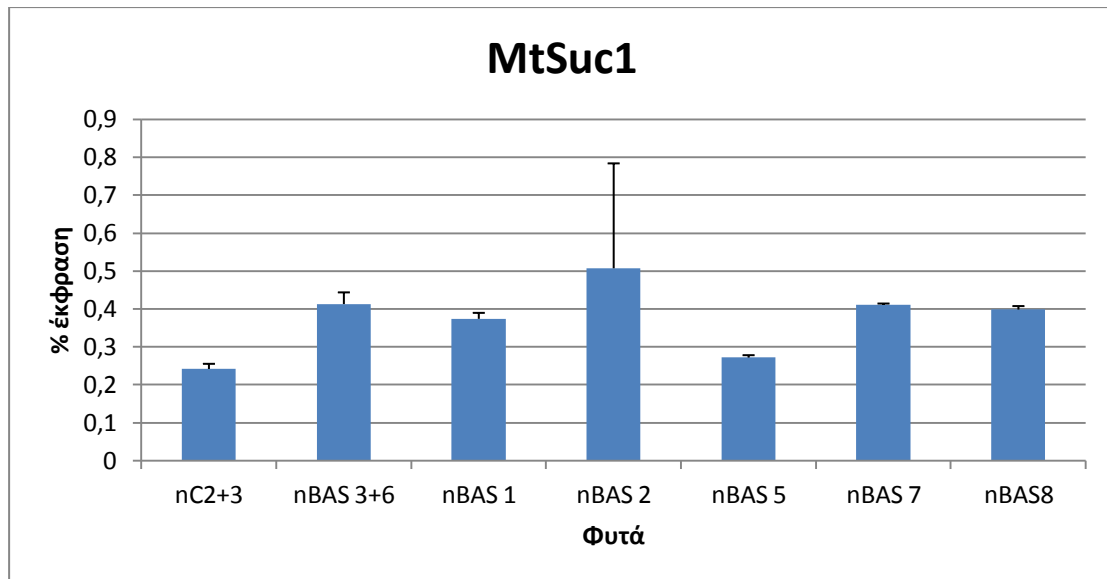
Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε real-time PCR, όπου μελετήθηκε η έκφραση της συνθάσης της β-αμυρίνης, καθώς και δύο καλά μελετημένων γονιδίων στα φυμάτια, της καρβονικής ανυδράσης (MtCA) και της συνθάσης της σουκρόζης (MtSuc1). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου που κωδικοποιεί για την καρβονική ανυδράση είναι ο ορθόδρομος 5'-TCTCCCAAGTTTATGGTATTT-3' και ο οπισθόδρομος 5'-GGAAGATAAACCAATTTTCAC-3', ενώ οι αντίστοιχοι για τη συνθάση της σουκρόζης είναι οι 5'-CTTTGGAATTTCTCAGACTT-3' και 5'-GACATCATTTCTGAGCAAAGTA-3'. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν ήταν τα εξής:



Γράφημα 5: Σχετική έκφραση του γονιδίου της συνθάσης της β-αμυρίνης (β-AS) στα φυμάτια



Γράφημα 6: Σχετική έκφραση του γονιδίου της καρβονικής ανυδράσης (MtCA) στα φυμάτια



Γράφημα 7: Σχετική έκφραση του γονιδίου της συνθάσης της σουκρόζης (MtSuc1) στα φυμάτια

Στο γράφημα 5, παρατηρούμε ότι στα φυμάτια η έκφραση του γονιδίου β -AS στα μετασηματισμένα φυτά είναι αυξημένη σε σχέση με τα control, μολονότι έχει επιτευχθεί σίγηση του γονιδίου β -AS στις ρίζες. Στα γραφήματα 6 και 7, παρατηρούμε ότι η έκφραση των δύο βασικών γονιδίων για την λειτουργικότητα των φυματίων δεν επηρεάζεται αισθητά, καθώς οι διαφορές που παρατηρήθηκαν μεταξύ των φυτών που παρουσίασαν σίγηση του β -AS και των φυτών control δεν είναι σημαντική.

Δ.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων και ενζύμων που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των τριτερπενίων έχουν χαρακτηριστεί στα φυτά, τα οποία συμβάλλουν στην άμυνα του φυτού. Οι σαπωνίνες είναι γλυκοσυλιωμένα τριτερπενοειδή, που έχουν μια πλειάδα δράσεων στο φυτό, κυρίως αντιμυκητιακής, αντιμικροβιακής και εντομοκτόνου, αλλά συμβάλλουν ταυτόχρονα στα φαινόμενα αλληλοπάθειας μεταξύ των φυτών και στη γλυκιά ή πικρή γεύση που προσδίδεται στο φυτό (Hostettmann et al, 1991). Συντίθεται από το μονοπάτι των ισοπρενοειδών μέσω κυκλοποίησης του 2,3-οξειδοσκουαλενίου οδηγώντας στην παραγωγή κυρίως ολαενικών ή νταμμαρενυλικών τριτερπενοειδών σκελετών (Haralampidis et al, 2002). Οι σκελετοί αυτοί υφίστανται περαιτέρω τροποποιήσεις, όπως οξείδωσεις, υποκαταστάσεις και γλυκοσυλίωσεις από ένζυμα του κυτοχρώματος P450, προς παραγωγή των σαπωνινών.

Η συνθάση της β-αμυρίνης εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 4 στο φυτό *Medicago truncatula* και ρόλος της είναι να μετατρέπει το κατιόν του ολεανυλίου σε β-αμυρίνη, μία πρόδρομη ένωση των σαπωνινών (Vranova, 2012). Το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο αυτό, ενδέχεται να ανήκει σε γονιδιακή συστοιχία, μιας και κοντά στο γενετικό τόπο του β-AS είχε βρεθεί ένα γονίδιο *CYP88* που κωδικοποιεί για μία οξειδάση όπως συμβαίνει στο φυτό *Lotus japonicus*. Συγκεκριμένα, στο *L. japonicus* ταυτοποιήθηκαν δύο γονιδιακές συστοιχίες όπου υπάρχει το γονίδιο *AMY2* που κωδικοποιεί μία συνθάση μικτής δράσης παράγοντας β-αμυρίνη και λουπεόλη έπειτα από την κυκλοποίηση του 2,3-οξειδοσκουαλενίου. Στη μία γονιδιακή συστοιχία, βρίσκονται γειτονικά του γονιδίου αυτού δύο γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα του κυτοχρώματος P450, το ένζυμο *LjCYP88D5* με άγνωστη ως τώρα λειτουργία και το ένζυμο *LjCYP71D353* που μετατρέπει την διυδρο-λουπεόλη σε 20-υδροξυλουπεόλη. Η δεύτερη γονιδιακή συστοιχία βρίσκεται 200 kb μακριά από την πρώτη και περιέχει το γονίδιο *LjCYP88D4*, πέραν του γονιδίου *AMY2* (Krokida et al, 2013). Στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών έγιναν πολλές προσπάθειες για την ενίσχυση του γονιδίου *CYP88* στο *Medicago truncatula*, αλλά χωρίς επιτυχία, επομένως η ύπαρξη μιας αντίστοιχης συστοιχίας γονιδίων στο *Medicago truncatula* δεν έχει αποδειχτεί. Με την οργάνωση των γονιδίων βιοσύνθεσης τερπενίων σε γονιδιακές συστοιχίες, εξασφαλίζεται η έκφραση του γονιδίου στο σωστό χρόνο και χώρο για την αποφυγή συσσωρεύσεων μεταβολιτών που μπορούν να έχουν δυσμενή επίδραση στην επιβίωση

και ανάπτυξη του φυτού (Field et al, 2011). Αυτό το φαινόμενο συνείσφερε στη φυσική επιλογή και διατήρηση των συστοιχιών (Chu et al, 2011).

Η εργασία αυτή είναι μία προσπάθεια αποσιώπησης του γονιδίου που κωδικοποιεί τη συνθάση της β-αμυρίνης, β-AS, στο φυτό *Medicago truncatula*. Επομένως, μπορεί να παρέχει πληροφορίες για την επίδραση στη βιοσύνθεση τριτερπενοειδών μορίων, όταν απουσιάζει ένα ένζυμο του βιοχημικού μονοπατιού.

Φυτά *Medicago truncatula* συγκαλλιέρθηκαν με βακτήρια του στελέχους *Agrobacterium rhizogenes*, το οποίο έφερε κατάλληλη πλασμιδιακή κατασκευή για την απενεργοποίηση του γονιδίου β-AS, μέσω RNAi σίγησης. Τα φυτά παρέμειναν σε τρυβλία μέχρι να εμφανίσουν ριζικό σύστημα και στη συνέχεια, τα μετασχηματισμένα φυτά επιλέχθηκαν στο μικροσκόπιο, δεδομένου ότι ο φορέας περιείχε την πρωτεΐνη πράσινου φθορισμού GFP, ως γονίδιο αναφοράς. Στη συνέχεια, οι ρίζες μολύνθηκαν με το βακτήριο *Sinorhizobium meliloti* και τα φυτά μεταφέρθηκαν σε πλαστικές θήκες με υπόστρωμα περλίτη/βερμικουλίτη για 28 ημέρες.

Μετά το πέρας των ημερών, έγινε καταμέτρηση του μήκους της ρίζας και των φυματίων σε κάθε φυτό. Στα περισσότερα μετασχηματισμένα φυτά, ο αριθμός των φυματίων ήταν μεγαλύτερος από αυτά των φυτών μαρτύρων, αλλά από το συγκεκριμένο πείραμα δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα γιατί κάποια φυτά ελέγχου δεν έφεραν κανένα φυμάτιο, που ίσως σημαίνει ότι η μόλυνση των φυτών από το μικροσυμβιώτη δεν ήταν εξ' ολοκλήρου επιτυχής. Όσον αφορά το μήκος της ρίζας, ο μέσος όρος του μήκους ρίζας μεταξύ των φυτών που παρουσίασαν σίγηση του β-AS και των φυτών ελέγχου δεν ήταν πολύ διαφορετικός. Αυτό δείχνει ότι η μειωμένη έκφραση του β-AS δεν επηρεάζει το μήκος της ρίζας.

Έπειτα, πραγματοποιήθηκε απομόνωση του RNA, χειρισμός των δειγμάτων με DNάση για την απομάκρυνση του DNA και παραγωγή cDNA στις ρίζες. Το επόμενο βήμα ήταν η χρήση της real-time PCR, χρησιμοποιώντας εξειδικευμένους εκκινητές του γονιδίου για τον εντοπισμό των φυτικών σειρών που παρουσίαζε σίγηση του γονιδίου β-AS. Από τις οκτώ φυτικές σειρές που βρέθηκαν μετασχηματισμένες, οι πέντε παρουσίασαν γονιδιακή σίγηση του επιθυμητού γονιδίου σε σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες (control). Όλα τα φυτά είχαν διαφορετικό ποσοστό σίγησης του γονιδίου, αλλά σε κανένα δεν εμφανίστηκε πλήρη σίγηση του γονιδίου. Πιθανώς, η κατασκευή δεν εκφράστηκε σε τόσο υψηλό βαθμό ώστε να προκαλέσει πλήρη σίγηση, λόγω της θέσης στην οποία ενσωματώθηκε στο DNA.

Εναλλακτικά, ενδέχεται οι ρίζες να είναι χμαιρικές, δηλαδή να απαρτίζονται από κύτταρα αγρίου τύπου και από κύτταρα στα οποία έχει ενσωματωθεί η κατασκευή σίγησης. Με αυτόν τον τρόπο, το μεταγράφημα του γονιδίου *β-AS* μπορεί να ανιχνεύεται στα κύτταρα του αγρίου τύπου αλλά όχι στα επίπεδα που εκφράζεται στα φυτά μάρτυρες.

Αργότερα, οι ίδιες διαδικασίες για την παραγωγή cDNA πραγματοποιήθηκαν και στα φυμάτια, οπότε και εν τέλει χρησιμοποιήθηκε η αντίδραση της real-time PCR για την μελέτη της έκφρασης των καλά μελετημένων γονιδίων *MtCA* και *MtSucSI* που κωδικοποιούν για μία καρβονική ανυδράση και μία συνθάση της σουκρόζης αντίστοιχα, αλλά και του γονιδίου *β-AS* στα φυμάτια. Για να είναι δυνατή η χρήση της σουκρόζης στο μεταβολισμό, απαιτείται η πρωτεόλυση του δεσμού O της σουκρόζης. Αυτό επιτυγχάνεται με τη συνθάση της σουκρόζης που καταλύει την UDP-εξαρτώμενη πρωτεόλυση της σουκρόζης σε UDP-γλυκόζη και φρουκτόζη. Στα φυμάτια, οι μικροσυμβιώτες μετατρέπουν το ατμοσφαιρικό άζωτο σε αμμωνία, χρησιμοποιώντας δικαρβοξυλικά οξέα ως πηγή άνθρακα. Τα οξέα αυτά προέρχονται από τη γλυκόλυση και κυρίως από την διάσπαση της σουκρόζης, παρέχοντας ταυτόχρονα ενέργεια για το σχηματισμό των φυματίων μέσω της παροχής εξοζών.

Βάσει προηγούμενων ερευνών, όταν σιγήθηκε το γονίδιο αυτό, ο αριθμός των φυματίων ελαττώθηκε σημαντικά ενώ ταυτόχρονα μειώθηκε και η μεταφορά ενέργειας μέσω αναπνοής μέσω της γλυκόλυσης και των τρικαρβοξυλικών οξέων, που αποτελούν απαραίτητα μονοπάτια για την παραγωγή σκελετών άνθρακα είτε για την αφομοίωση ιόντων NH_4^+ είτε δικαρβοξυλικών οξέων για την αναπνοή των βακτηροειδών. Εδώ εντοπίζεται και ο ρόλος της καρβονικής ανυδράσης, που είναι η μετατροπή του CO_2 σε HCO_3^- προς παραγωγή δικαρβοξυλικών οξέων, τα οποία με την αντίδραση με το φωσφοενολοπυροσταφυλικό οξύ παρουσία της καρβοκινάσης του φωσφοενολοπυροσταφυλικού προς παραγωγή οξαλοξικού. Με την μείωση της συνθάσης της σουκρόζης, βρέθηκε ότι η έκφραση της καρβονικής ανυδράσης, η οποία ρυθμίζεται ανοδικά σε σχέση με το γονίδιο *MtSucSI*, επάγεται σε μεγαλύτερο βαθμό εξασφαλίζοντας μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στη χρήση του περιορισμένου άνθρακα για την ανάπτυξη των φυτών, μέσω της ανακύκλωσης του CO_2 . Συμπεραίνεται, λοιπόν, ότι ο μεταβολισμός των φυματίων κατέχει μηχανισμούς για τη βέλτιστη παροχή θρεπτικών στοιχείων για τα βακτηροειδή και την ταχεία ενσωμάτωση του αζώτου στο φυτό (Baier et al, 2007)

Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, παρατηρήθηκε, ότι η έκφραση των γονιδίων αυτών δεν επηρεάστηκε σε μεγάλο βαθμό, πράγμα που υποδηλώνει ότι η έλλειψη της συνθάσης της β-αμυρίνης δεν επηρέασε τη σωστή λειτουργία του φυματίου ως προς το μεταβολισμό, τουλάχιστον σε επίπεδο μεταγραφής γονιδίων.

Ωστόσο, το παράδοξο αποτέλεσμα που παρατηρήθηκε είναι ότι η έκφραση του γονιδίου *β-AS* ήταν υψηλότερη σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες. Αυτό μας δημιούργησε την υποψία ότι μπορεί στα φυμάτια να ενισχύεται και κάποιο άλλο γονίδιο που να έχει υψηλή ομολογία με το *β-AS*. Κάνοντας BLAST έχοντας ως αλληλουχίες επερώτησης τους εκκινητές του γονιδίου *β-AS* και το γονιδίωμα του *Medicago truncatula* στις υποκείμενες αλληλουχίες στη βάση δεδομένων, δεν παρατηρείται καμία ομολογία με τους εκκινητές, μειώνοντας τις πιθανότητες ενίσχυσης διαφορετικού γονιδίου από το επιθυμητό. Επιπλέον, δεδομένου ότι σε πειράματα που πραγματοποιείται σίγηση γονιδίων, αυτή είναι συστημική και περιλαμβάνει και τα φυμάτια (Tsikou et al, μη δημοσιευμένα αποτελέσματα). Άρα, το αποτέλεσμα είναι κάτι συγκεκριμένο και εξειδικευμένο που παρατηρήθηκε πρώτη φορά στο εργαστήριο και απαιτεί περισσότερη διερεύνηση για τους βιοχημικούς μηχανισμούς που το προκαλούν.

Μελλοντικά, θα μπορούσε να γίνει επανάληψη του ίδιου πειράματος ώστε να υπάρχει μεγαλύτερος αριθμός μετασχηματισμένων φυτών και τα αποτελέσματα να είναι περισσότερο αντιπροσωπευτικά. Ακόμα, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σταθερά μετασχηματισμένα φυτά, ώστε να παρατηρηθεί εξ' αρχής η επιρροή της έλλειψης του ενζύμου για την παραγωγή διάφορων προϊόντων στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια, σε διαφορετικές συνθήκες και σε διαφορετικούς ιστούς. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε το *Agrobacterium rhizogenes* που προκαλεί παροδικά μετασχηματισμένες ρίζες. Επομένως, δεν είναι δυνατή η δημιουργία φυτών που να μπορούν να κληρονομήσουν την ιδιότητα στους απογόνους σταθερά, ενώ ταυτόχρονα έχει βρεθεί ότι η RNAi σίγηση στις ρίζες περιορίζεται στο ριζικό σύστημα και δεν εξαπλώνεται και στον βλαστό (Limpens et al, 2004).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Liu, Y., Wang, H., Ye, H. C., and Li, G. F. (2005) Advances in the plant isoprenoid biosynthesis pathway and its metabolic engineering, *J Integr Plant Biol* 47, 769-782
- Connolly J.D. and Hill R.A. 1991. Dictionary of Terpenoids. 1st Edn., Chapman and Hall, London, New York, ISBN: 041225770X, pp:80-182
- Barnard D.R., and Xue R. (2004). "Laboratory evaluation of mosquito repellents against *Aedes albopictus*, *Culex nigripalpus*, and *Ochlerotatus triseriatus* (Diptera: Culicidae)". *J. Med. Entomol.* 41(4): 726–730
- R.G. Danka, J.L. Williams and T.E. Rinderer (1990). "A bait station for survey and detection of honey bees". *Apidologie* 21 (4): 287–292
- Vranova, E., Coman, D., and Grussem, W. (2012). Structure and dynamics of the isoprenoid pathway network. *Mol. Plant.* 5,318–333.
- Philips D. R., Rasbery J. M., Bartel B. and Matsuda S.P.T. 2006. Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. *Current opinion in Plant Biology.*9:305-314
- Eisenreich W., Schwarz M., Cartayrade A., Arigoni D., Zenk MH., Bacher A. The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms. *Chem Biol.* 1998 Sep;5(9):R221-33
- Istvan E., Palnitkar M., Buchanan S. K. and Deisenhofer J. Crystal structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase: insights into regulation of activity and catalysis
- Pulido P., Perello C., Manuel R-C. New Insights into Plant Isoprenoid Metabolism *Molecular Plant*, September 2012, pages 964–967
- Vincken JP., Heng L., de Groot A and Gruppen H. 2007. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry.* 68:275-297
- Kushiro T, Shibuya M, Ebizuka Y 1999. β -amyrin synthase: Cloning of oxidosqualene cyclase that catalyzes the formation of the most popular triterpene among higher plants

- Iturbe-Ormaetxe I, Haralampidis K, Papadopoulou K and Osbourn A. Molecular cloning and characterization of triterpene synthases from *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus* *Plant Molecular Biology* 51: 731–743, 2003
- Rahman, A., Ahamed, A., Amakawa, T., Goto, N. and Tsurumi, S. 2001. Chromosaponin I specifically interacts with AUX1 protein in regulating the gravitropic response of Arabidopsis roots. *Plant Physiol.* 125: 990–1000.
- Suzuki H., Achnine L., Xu R., Seiichi P. T., Matsuda. SPT, Dixon R.A. A genomics approach to the early stages of triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula* *The Plant Journal* (2002) 32, 1033–1048
- Hostettman, K. A., and Marston, A. (1995) *Saponins*, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Fukushima E, Seki H, Sawai S, Suzuki M, Ohyama K, Saito K and Muranaka T. Combinatorial Biosynthesis of Legume Natural and Rare Triterpenoids in Engineered Yeast *Plant Cell Physiol.* 54(5): 740–749 (2013)
- Seki H., Ohyama K., Sawai S., Mizutani M., Ohnishi T., Sudo H., Akashi T., Aoki T., Saito K., Muranaka T. (2008): Licorice b-amyryn 11-oxidase, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the triterpene sweetener glycyrrhizin. *Proc Natl Acad. Sci.* 105:14204-14209
- Finding and Analyzing Plant Metabolic Gene Clusters Anne Osbourn, Kalliopi K. Papadopoulou, Xiaoquan Qi, Ben Field, Eva Wegel *Methods in Enzymology*, Volume 517; Elsevier Inc
- Osbourn, A., & Field, B. (2009). Operons. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66, 37555–37575.
- Wang Z, Guhling O, Yao R, Fengling Li F, Yeats T, Rose J, Jetter R Two Oxidosqualene Cyclases Responsible for Biosynthesis of Tomato Fruit Cuticular Triterpenoids *Plant Physiology*, January 2011, Vol. 155, pp. 540–552
- 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
- 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 USA.* 2004 May 25; 101 (21):8233-8

- McGarvey D. J. and Croteau R. 1995. Terpenoid Metabolism. *The plant cell*,7:1015-1026
- Long S.R 1989 Rhizobium-legume nodulation: life together in the underground. *Cell* 56:203-14
- Smil V. 1999 Nitrogen in crop production: an account of global flows. *Global Biogeochemical cycles* 13:647-662
- Σκάγια Α. (2012) Χαρακτηρισμός και φυλογενετική ανάλυση συμβιωτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα φυμάτια της *Medicago Marina*
- Barker D., Bianchi S., Blondon F., Dattee Y., Duc G. et al. , 1990, *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the Rhizobium-legume symbiosis. *Plant Molecular Biology*,8: 40-49.
- Thanopoulos R (2007) The genus *Medicago* in Greece: 1. A review of species diversity, geographical distribution and ecological adaption, *Flora Mediterranea.*, 17: 217-276
- Chabaud M., Larssonneau C., Marmouget C., Huguet T., 1995, Transformation of barrel medic (*Medicago truncatula* Gaertn.) by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration via somatic embryogenesis of transgenic plants with the MtENOD12 nodulin promoter fused to the gus reporter gene, *Plant Cell Reports*, 15:305-310
- Rose R.J. (2008) *Medicago truncatula* as a model for understanding plant interaction with other organisms, plant development and stress biology: past,present and future, *Functional Plant Biology*, 35: 253-264
- Chilton, M-D., D.A. Tepfer, A. Petit, C. David, F. Casse-Delbart, and J. Tempe. 1982. *Agrobacterium rhizogenes* inserts a T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature* 295:432-434.
- Yadav NS, Vanderleyden J, Bennett DR, Barnes WM, Chilton M-D. Short direct repeats flank the T-DNA on a nopaline Ti plasmid. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1982;79:6322–6326
- Vilaine F, Casse-Delbart F. Independent induction of transformed roots by the T_L and T_R regions of the Ri plasmid of agropine type *Agrobacterium rhizogenes*. *Mol Gen Genet*. 1987;206:17–23.

- Spena A, Schmulling T, Koncz C, Schell J. Independent and synergistic activity of the rol A, B and C loci in stimulating abnormal growth in plants. EMBO J. 1987;6:3891–3899.
- Mano Y, Nabeshima N, Matsui C, Ohkawa H. Production of tropane alkaloids by hairy root cultures of *Scopolia japonica*. Agric Biol Chem. 1986;50:2715–2722.
- Χατζόπουλος Π. Βιοτεχνολογία φυτών, εκδόσεις ΕΜΒΡΥΟ 2004 101
- Stougaard J., Abildsten D. and Marcker K.A. 1987. The *Agrobacterium rhizogenes* Ri T₁-DNA segment as a gene vector system for transformation of plants
- Limpens E., Ramos J., Franken C., Raz V., Compaan B., Franssen H., Bisseling T., Guerts R. 2004 RNA interference in *Agrobacterium Rhizogenes*-transformed roots of *Arabidopsis* and *Medicago Truncatula*. Journal of Experimental Botany 55:983-992
- Martirani L., Stiller J., Mirabella R., Alfano F., Lamberti A., Radutoiu SE., Iaccarino M, Gresshoff PM., Chiurazzi M (1999) A fast and experimental system for T-DNA tagging in the model legume *Lotus japonicus*. Trapping frequencies, expression patterns and potential for insertional mutagenesis. Molecular Plant Microbe Interactions, 12:275-284
- Jouanin L, Guerche D, Pamboukdjian N, Tourneur C, Casse-Delbart F, Tourneur J. Structure of T-DNA in plants regenerated from roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes* strain A4. Mol Gen Genet. 1987; 206:387–392.
- Napoli, C., C. Lemieux and R. Jorgensen (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible cosuppression of homologous genes in trans. Plant Cell 2: 279–289.
- Baulcombe, D. (1996) Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. Plant Cell 8: 1833–1844.
- Brodersen P, Voinnet O. 2006 The diversity of RNA silencing pathway in plants Vol.22 No.5
- Matzke M, Kanno T, Daxinger L, Huettel B, Matzke AJM. RNA-mediated chromatin-based silencing in plants. Curr Opin Cell Biol. 2009;21:367–376.

- Helliwell C. and Waterhouse P. 2003. Constructs and methods for high throughput silencing in plants. *Methods* 30:289-295
- Brodersen P, Voinnet P 2006. The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends in Genetics* Vol.22 No.5 May 2006
- Hostettmann K, Hostettmann M, Marston M (1991) *Methods Plant Biochem* 7:434
- Krokida A, Delis C, Geisler K, Garagounis C, Tsikou D, Rodriguez L, Katsarou D, Field B, Osbourn A, Papadopoulou K (2013) A metabolic gene cluster in *Lotus japonicus* discloses novel enzyme functions and products in triterpene biosynthesis
- Baier M, Barsch A, Kuster H, Hohnjec N. Antisense Repression of the *Medicago truncatula* Nodule-Enhanced Sucrose Synthase Leads to a Handicapped Nitrogen Fixation Mirrored by Specific Alterations in the Symbiotic Transcriptome and Metabolome
- Limpens E, Ramos J, Franken C, Raz V, Compaa B, Franssen H, Bisseling T, Geurts R (2004) RNA interference in *Agrobacterium rhizogenes* transformed roots of *Arabidopsis* and *Medicago truncatula*