

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:

**«ΣΙΓΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *CYP45071D353* ΠΟΥ
ΕΜΠΛΕΚΕΤΑΙ ΣΤΗ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ
ΤΡΙΤΕΡΠΕΝΟΕΙΔΩΝ ΣΤΟ ΦΥΤΟ *Lotus japonicus*»**

ΚΟΥΦΟΓΙΑΝΝΗΣ ΑΣΤΕΡΙΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ:

ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΚΑΛΛΙΟΠΗ
ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2012

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Παπαδοπούλου Καλλιόπη
Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών

Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος
Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας

Τσίκου Δανιέλα
Διδάσκουσα ΠΔ 407 Βιοτεχνολογία Φυτών, Μοριακή και Αναπτυξιακή
Βιολογία Φυτών, Φυσιολογία Φυτών

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα της παρούσας εργασίας, την καθηγήτρια κ. Παπαδοπούλου Καλλιόπη για την ανάθεση του θέματος, τη βοήθεια και τις πολύτιμες συμβουλές ώστε να ολοκληρωθεί επιτυχώς.

Επίσης ευχαριστώ την κ. Τσίκου Δανιέλα και τον κ. Ματθιόπουλο Κωνσταντίνο που συγκροτούν μαζί με την κ. Παπαδοπούλου την τριμελή επιτροπή.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υπονήφια διδάκτορα Κροκιδά Αφροδίτη για τη βοήθεια και τις πολύτιμες συμβουλές της όλο αυτό το διάστημα, καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα και τη συνεργασία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1. Δευτερογενείς μεταβολίτες.....	8
1.1. Γενικά.....	8
1.2. Βιοσύνθεση τριτερπενοειδών.....	9
2. Γονιδιακές συστοιχίες.....	13
3. Οργάνωση OSC γονιδίων στο <i>Lotus japonicus</i>	18
3.1. Σκοπός της παρούσας μελέτης.....	19
4. Το ψυχανθές <i>Lotus japonicus</i> ως φυτικό μοντέλο.....	19
5. Φορείς pUbi – Τεχνολογία Gateway.....	20
6. <i>Agrobacterium rhizogenes</i> και μετασχηματισμός Hairy Root.....	21
7. RNAi σε φυτά.....	22
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	24
1. Το ψυχανθές <i>Lotus japonicus</i> ως φυτικό μοντέλο.....	24
1.1 Προετοιμασία των σπόρων.....	24
1.2. Καλλιέργεια ριζοβίων και μόλυνση των φυτών.....	24
1.3. Συνθήκες ανάπτυξης και καλλιέργειας του <i>L. Japonicus</i>	25
2. Απομόνωση ολικού RNA από φυτικούς ιστούς - Μέθοδος με LiCl.....	25
3. Χειρισμός του ολικού RNA με DNάση.....	26
4. Σύνθεση cDNA από RNA με το ένζυμο SuperscriptII RT, Invitrogen.....	27
5. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....	28
5.1. Πρωτόκολλο απομονωσης NucleoSpin Plasmid, Macherey – Nagel.....	28
5.2. Μέθοδος του βρασμού (Boiling method, Holmes and Quigley 1981).....	29
5.3. Πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδιακού φορέα από κύτταρα αγροβακτηρίου.....	29
6. Ανάλυση νουκλεϊνικών οξέων.....	31
6.1. Καθαρισμός νουκλεϊνικών οξέων με φαινόλη.....	31
6.2. Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων.....	31
6.3. Πέψη δεοξυριβονουκλεϊνικών οξέων με ένζυμα περιορισμού.....	32
6.4. Ανάλυση νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτή αγαρόζης.....	33
6.5. Επανάκτηση τμημάτων δεοξυριβονουκλεϊνικών οξέων από πηκτή αγαρόζης.....	34
7. Υποκλωνοποίηση τμήματος νουκλεϊνικών οξέων σε πλασμιδιακό φορέα.....	35
7.1. Προετοιμασία του πλασμιδιακού φορέα και του ενθέματος.....	35
7.2. Ενσωμάτωση τμήματος DNA σε πλασμιδιακό φορέα.....	35
7.3. Αντίδραση ανασυνδυασμού LR clonase (Invitrogen).....	36

8. Μετασχηματισμός «ικανών» κυττάρων <i>Escherichia coli</i>	37
8.1. Προετοιμασία ικανών κυττάρων προς μετασχηματισμό.....	37
8.2. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων.....	38
9. Μετασχηματισμός «ικανών» κυττάρων <i>Agrobacterium rhizogenes</i> LBA1334.....	39
9.1. Προετοιμασία ικανών κυττάρων προς μετασχηματισμό.....	39
9.2. Μετασχηματισμός κυττάρων αγροβακτηρίου.....	40
10. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης.....	40
10.1. Colony PCR.....	42
10.2. Αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου (Real - Time PCR).....	43
10.3. Επιλογή των εκκινητών.....	44
11. Μόλυνση των φυτών με το στέλεχος <i>Agrobacterium rhizogenes</i> LBA 1334 για επαγωγή του σχηματισμού «hairy roots».....	45
11.1. Ανάπτυξη φυταρίων.....	45
11.2. Μόλυνση φυταρίων με το <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	45
Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	47
1. Κατασκευή του πλασμιδιακού φορέα για τη σίγηση του γονιδίου <i>LjCYP71D</i>	47
2. Έλεγχος των μετασχηματισμένων φυτών	48
3. Έλεγχος της έκφρασης του γονιδίου <i>LjCYP71D</i> στις μετασχηματισμένες ρίζες <i>Lotus japonicus</i>	51
Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	53
Ε. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΥΛΙΚΩΝ-ΜΕΘΟΔΩΝ	56
ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	63

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τριτερπένια αποτελούν κύρια ομάδα της υπεροικογένειας των τερπενίων που ανήκουν στους δευτερογενείς μεταβολίτες. Ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων και ενζύμων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των τριτερπενίων έχει χαρακτηριστεί στα φυτά. Σε αρκετά φυτικά είδη έχει βρεθεί ότι τα γονίδια για τη βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών οργανώνονται σε γονιδιακές συστοιχίες. Επομένως, τα γονίδια που κωδικοποιούν συνθάσες τριτερπενίων αλλά και αυτά που κωδικοποιούν ένζυμα του κυτοχρώματος P-450 υπεύθυνα για τη βιολογική ενεργοποίηση των τριτερπενίων παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον. Ένα τέτοιο ένζυμο του κυτοχρώματος P-450 είναι και η CYP71D353 στο *Lotus japonicus*. Το γονίδιο που κωδικοποιεί για το ένζυμο CYP71D353 εντοπίστηκε στον ίδιο γονιδιωματικό κλώνο με το γονίδιο *AMY2* που κωδικοποιεί για μια συνθάση τριτερπενοειδών μεικτής δράσης και το γονίδιο *LjCYP88D5*. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε σίγηση του γονιδίου *LjCYP71D353*. Δημιουργήθηκε μια πλασμιδιακή κατασκευή RNA-φουρκέτας χρησιμοποιώντας τμήματα του ανοιχτού αναγνωστικού πλαισίου (ORF) του *LjCYP71D353*. Ακολούθως, μολύνθηκαν φυτά *Lotus japonicus* με τη μέθοδο Hairy Root ώστε να προκύψουν φυτά με μετασηματισμένες ρίζες. Τα μετασηματισμένα φυτά ελέγχθηκαν για τα επίπεδα έκφρασης του *LjCYP71D353* στις ρίζες μέσω RT-PCR. Στα αποτελέσματα προέκυψαν πέντε φυτικές σειρές με εμφανώς μειωμένη έκφραση του γονιδίου *LjCYP71D353*. Τα αποτελέσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ανάλυση των περιεχόμενων μεταβολιτών, να εξασφαλίσουν περαιτέρω στοιχεία για τη βιοσύνθεση τριτερπενοειδών στο *L. Japonicus*, καθώς και για τον έλεγχο της έκφρασης γονιδίων που δρουν στο ίδιο μεταβολικό μονοπάτι με το *LjCYP71D353* με απώτερο στόχο να διαπιστώσουμε αν τα γονίδια αυτά ανήκουν σε γονιδιακή συστοιχία.

ABSTRACT

Triterpenes are a major subgroup of the terpene superfamily of plant secondary metabolites (Xu et al., 2004). The formation of the skeleton structure of these compounds is catalysed by oxidosqualene cyclases (OSCs). Subsequent modifications of the basic backbone of these precursor scaffold molecules are carried out by enzymes such as cytochrome P450s, acyltransferases, glycosyltransferases and methyltransferases. Interestingly, genes for certain triterpenoid biosynthetic pathways exist as metabolic gene clusters (Osbourn, 2010) in oat and *Arabidopsis thaliana* plants. In *Lotus japonicus* we identified a cluster containing the *AMY2* OSC gene along with genes for two different classes of cytochrome P450, *CYP88D5* and *CYP71D353*. In the present work, a RNAi construct was used to silence *CYP71D353* using *Agrobacterium rhizogenes* hairy-root transformation. Five silenced lines with significantly lower *CYP71D353* were identified by Q-PCR. These plant lines will contribute to the validation of the *AMY2* gene cluster in *L. japonicus*.

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΙΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ

1.1 ΓΕΝΙΚΑ

Τα φυτά συνθέτουν μια πληθώρα μεταβολιτών. Τα τερπενοειδή είναι πιθανότατα η μεγαλύτερη κατηγορία μεταβολιτών στα φυτά με πάνω από 20.000 γνωστές δομές μέχρι σήμερα (Connolly and Hill, 1991). Αποτελούν είτε προϊόντα του πρωτογενούς είτε του δευτερογενούς μεταβολισμού. Προϊόντα όπως οι στερόλες και οι φυτορμόνες (γιβεριλλίνες, ABA, κυτοκινίνες) που συμμετέχουν στην αύξηση και την παραγωγή ενέργειας είναι πρωτογενείς μεταβολίτες (McGarvey and Croteau, 1995). Οι δευτερογενείς μεταβολίτες που απαντώνται σε όλα τα ανώτερα φυτά παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια και ανάλογα με τη χημική τους δομή ταξινομούνται σε κατηγορίες. Διακρίνουμε τα αλκαλοειδή, τα ισοπρενοειδή και τα τερπένια, τις φυτικές αμίνες, τις φαινόλες και τα σπάνια αμινοξέα (Gershenzon et al, 2004).

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι αρκετά γνωστοί για τη δράση τους ως μεσολαβητές της γονιμοποίησης και της διασποράς των σπερμάτων. Επίσης δρουν ως χημικά αμυντικά μέσα που απομακρύνουν τα παράσιτα και τα παθογόνα ή καταστέλλουν την ανάπτυξη γειτονικών φυτών (McGarvey and Croteau, 1995; Langenheim, 1994). Συγκεκριμένα φυτά συνθέτουν διαφορετικές κλάσεις δευτερογενών μεταβολιτών. Η ικανότητα τους αυτή, φαίνεται ότι είναι το κλειδί για την επιβίωση, τη διαφοροποίηση και επακόλουθα τη γέννηση ποικιλομορφίας ανάμεσα στα φυτικά είδη (Qi et al, 2004). Η βιοσύνθεση των δευτερογενών μεταβολιτών συχνά έχει οργανοειδική ή ιστοειδική φύση. Όργανα σημαντικά για την επιβίωση και την αναπαραγωγή περιέχουν αυξημένα επίπεδα δευτερογενών μεταβολιτών. Ο ρυθμός της βιοσύνθεσης τους στα νεαρά φύλλα είναι σημαντικά υψηλότερος σε σχέση με τα ώριμα φύλλα, καθώς αυτά έχουν αυξημένη ανάγκη για προστασία. Υψηλοί ρυθμοί σύνθεσης παρατηρούνται στους δευτερογενείς μεταβολίτες των ανθέων σε περιόδους επικονίασης και δραματική μείωση τους αμέσως μετά τη γονιμοποίηση (Gershenzon et al, 2000; Guterman et al, 2002; Dudareva et al, 2004).

Τα τερπένια είναι η πολυπληθέστερη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών. Προκύπτουν ως πολυμερή του ισοπρενίου (2-μέθυλο-1,3-βουταδιένιο) δηλαδή

δημιουργούνται όλα από την ίδια δομική μονάδα, το ισοπεντενύλιο (IPP) που είναι η ενεργοποιημένη μορφή του ισοπρενίου. Με βάσει τον αριθμό των μονάδων ισοπρενίου προκύπτουν τρεις ομάδες: Τα μονοτερπένια (C10) που αποτελούν πτητικά συστατικά των άνθεων, τα σεσκιτερπένια (C15) που υπάρχουν στα αιθέρια έλαια και λειτουργούν ως αντιμικροβιακές φυτοαλεξίνες και αποτρέπουν την προσβολή από έντομα και τα τριτερπένια (C30). Τα τριτερπενοειδή περιλαμβάνουν σαπωνίνες, στερόλες και στεροειδή (McGarvey and Croteau, 1995). Πιο γνωστά τριτερπενοειδή είναι η α-αμυρίνη, η β-αμυρίνη και η λουπεόλη. Πολλά απ' τα τριτερπενοειδή εμπλέκονται στην άμυνα των φυτών ενάντια σε μύκητες και παθογόνα (Paradopolou et al, 1999).

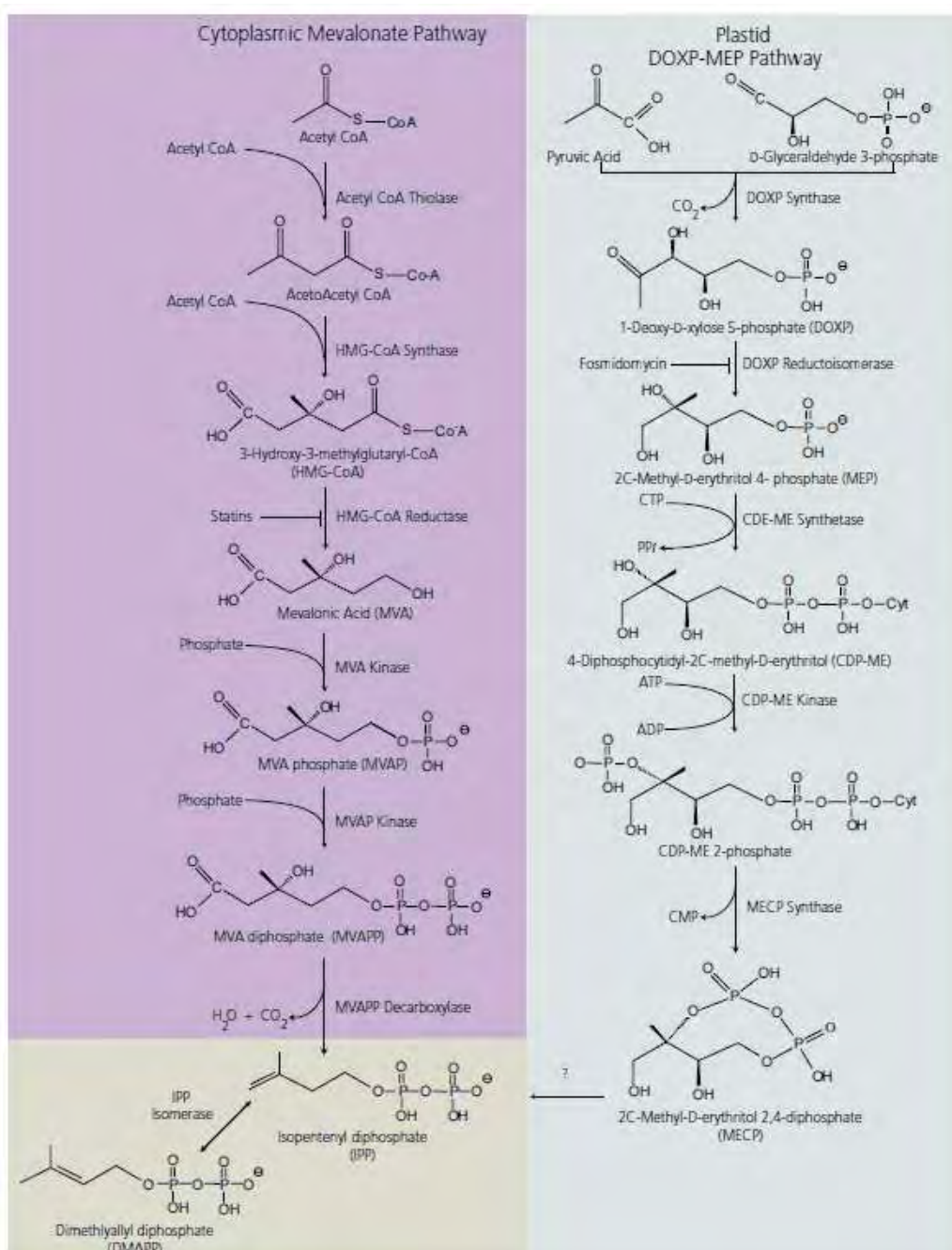
1.2 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΡΙΤΕΡΠΕΝΟΕΙΔΩΝ

Τα τριτερπενοειδή συντίθενται από το μεβαλονικό οξύ (Εικόνα 1.1), το οποίο προέρχεται απ' το ακετυλοσυνένζυμο Α, το μόριο εισόδου στον κύκλο του κιτρικού οξέος. Το μεβαλονικό οξύ φωσφορυλιώνεται δύο φορές από κινάσες, έπειτα απομακρύνεται ένα μόριο CO₂ από μια αποκαρβοξυλάση με την κατανάλωση ενός μορίου ATP και έτσι προκύπτει το ισοπεντενύλιο (IPP) (Rohmer et al, 1993). Ισομερής μορφή του IPP είναι το διφωσφορικό διμεθυλοαλλύλιο (DMAPP). Τα δύο ισομερή συμπυκνώνονται και έχουμε προσθήκη ενός ακόμα IPP που οδηγεί στο σχηματισμό του διφωσφορικού γερανύλιου (GPP). Με προσθήκη ενός ακόμα IPP σχηματίζεται το διφωσφορικό φαρνεσύλιο (FPP) που είναι η πρόδρομη ένωση των σεσκιτερπενίων και αποτελείται από 15 άτομα άνθρακα. Οι παραπάνω αντιδράσεις καταλύονται από ένζυμα που ανήκουν στην κατηγορία των πρενυλτρανσφερασών. Η διαδικασία λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα (Phillips et al, 2006).

Εκτός από την οδό του μεβαλονικού οξέος, τα φυτά εναλλακτικά βιοσυνθέτουν το ισοπρένιο μέσω του μονοπατιού της 4-φωσφορικής μεθυλ-ερυθρίτολης (MEP) (Εικόνα 1.1) που λειτουργεί σε διαφορετικό κυτταρικό διαμέρισμα απ' ότι το μονοπάτι του μεβαλονικού οξέος και συγκεκριμένα στους χλωροπλάστες. Το μονοπάτι ονομάστηκε έτσι επειδή η MEP είναι το πρώτο πρόδρομο μόριο (Eisenreich et al, 1998; Lichtenthaler and Hartmut, 1999; Rohmer, 1999). Η πρώτη αντίδραση στο μονοπάτι είναι η σύμπτυξη του πυροσταφυλικού και της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεύδης (McGarvey and Croteau 1995). Το πλαστιδιακό μονοπάτι θεωρείται υπεύθυνο για τη βιοσύνθεση των μονοτερπενίων, των διτερπενίων, των

καροτενοειδών και της φυτόλης, της πλευρικής αλυσίδας της χλωροφύλλης μέσω επόμενων σταδίων.

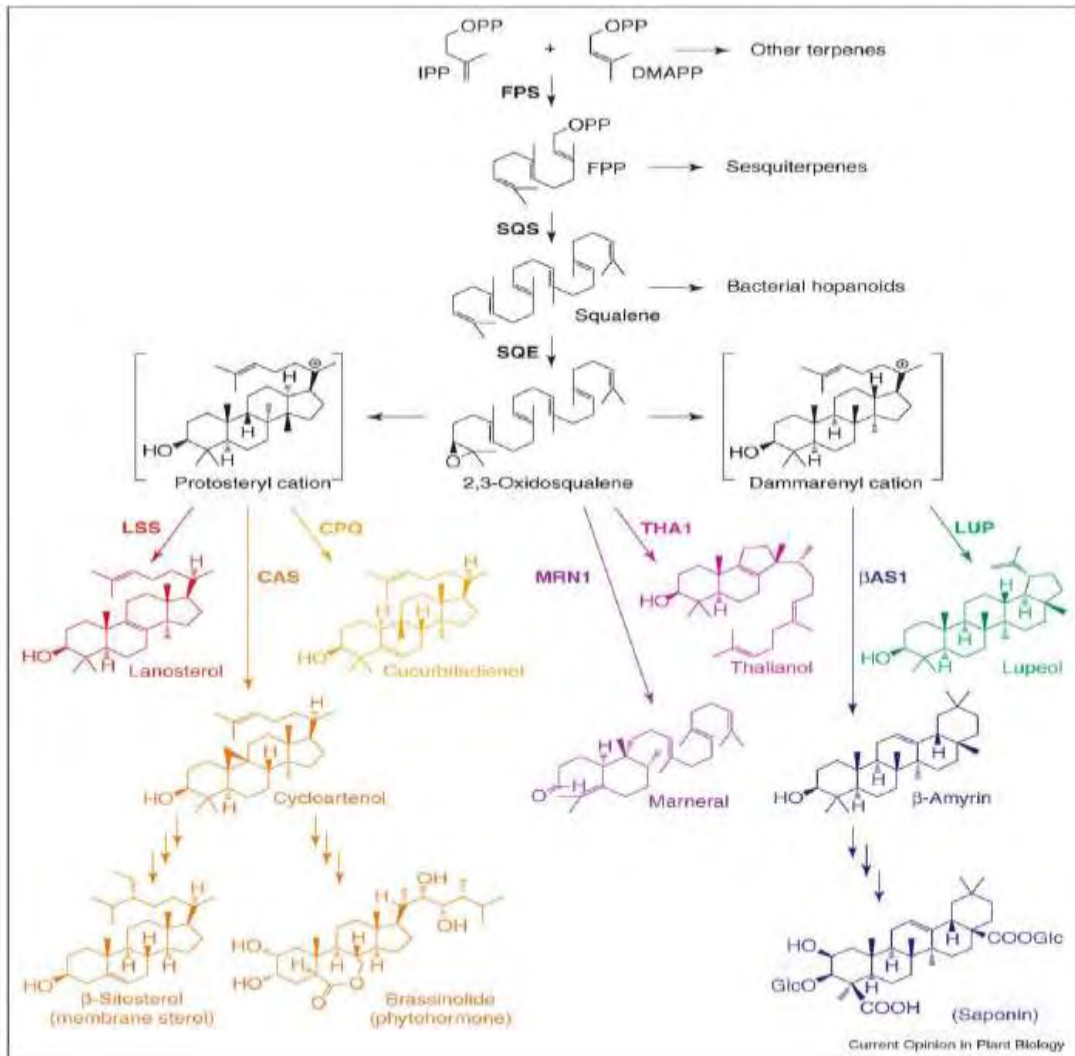
Σήμερα έχει αποδειχτεί ότι μεταξύ των δύο μονοπατιών που λειτουργούν παράλληλα υπάρχει ανταλλαγή πρόδρομων χημικών μορίων, ενώ κάποια τερπένια βιοσυντίθενται μέσω και των δύο μονοπατιών ανάλογα με τις ανάγκες του φυτού (Eisenreich et al, 2001; Rodriguez-Concepcion, 2006). Έχει παρατηρηθεί μεταφορά ισοπρενίων από το κυτταρόπλασμα στα πλαστίδια και αντίστροφα (Adam et al, 1998).



Εικόνα 1.1: Η οδός του μεβαλονικού οξέος (κυτταρόπλασμα) και η οδός της 4-φωσφορικής μεθυλ-ερυθριτόλης (πλαστίδια) στη βιοσύνθεση του διφωσφορικού ισοπεντενυλίου.

Τελικά δύο FFP μετά από μια αντίδραση συμπύκνωσης που καταλύεται απ' την σκουαλεϊνική συνθάση (SQS) σχηματίζουν το σκουαλένιο, το οποίο μετατρέπεται σε 2,3-οξειδοσκουαλένιο με τη δράση της εποξειδάσης του σκουαλενίου (SQE) η οποία είναι μια μονοξυγενάση.

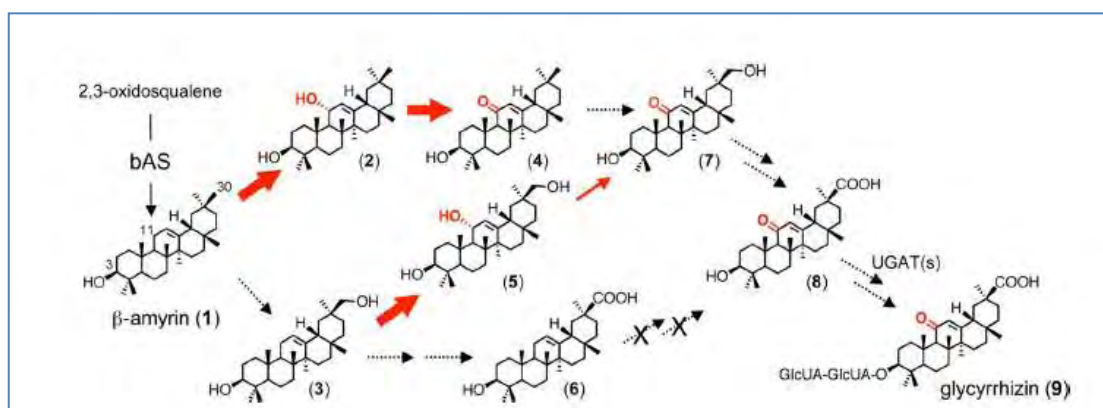
Το 2,3-οξειδοσκουαλένιο αποτελεί σημείο διακλάδωσης μεταξύ πρωτογενούς και δευτερογενούς μεταβολισμού, καθώς μπορεί είτε να κυκλοποιηθεί και να παραχθούν στερόλες και στεροειδή (πρωτογενείς μεταβολίτες) τα οποία αποτελούν βασικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών, είτε να κυκλοποιηθεί προς σχηματισμό τριτερπενοειδών αλκοολών ή αλδευδών (δευτερογενείς μεταβολίτες). Τα ένζυμα που καταλύουν την κυκλοποίηση του 2,3-οξειδοσκουαλένιου (συνθάσες ή κυκλάσες του 2,3-οξειδοσκουαλενίου, OSCs) σταθεροποιούν ενδιάμεσες δομές καρβοκατιόντων για να σχηματιστεί μέχρι και εξακυκλικός ανθρακικός σκελετός (Phillips et al, 2006). Οι στερόλες και τα στεροειδή παράγονται κυρίως απ' την κυκλοαρτενόλη, το σχηματισμό της οποίας καταλύει η συνθάση της κυκλοαρτενόλης (CAS) διαμέσου του ενδιάμεσου κατιόντος του προτεστερυλίου (protosteryl cation). Οι τριτερπενοειδείς αλκοόλες προκύπτουν απ' τη δράση των OSCs διαμέσου σχηματισμού του ενδιάμεσου καρβοκατιόντος του νταμαρενυλίου (dammarenyl cation). 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 (Tholl et al, 2001). Στις τριτερπενοειδείς αλκοόλες ανήκουν η λουπεόλη και η β-αμυρίνη. Από την τελευταία παράγονται και γλυκοζυλιωμένες μορφές που ονομάζονται σαπωνίνες (Phillips et al, 2006). Μετά το σχηματισμό του καρβοκατιόντος από το 2,3-οξειδοσκουαλένιο, ο βασικός σκελετός μπορεί να δεχθεί διάφορους υποκαταστάτες όπως υδροξυλομάδες, καρβονυλομάδες και κατάλοιπα σακχάρων με αποτέλεσμα να σχηματίζονται πολλαπλά παράγωγα (Vicken et al, 2007).



Εικόνα 1.2: Βιοσύνθεση τριτερπενοειδών. Τα ισομερή διφωσφορικό ισοπεντενύλιο (IPP) και διφωσφορικό διμέθυλοαλλήλιο (DMAPP) συμπυκνώνονται προς σχηματισμό διφωσφορικού φαρνεσύλιου (FPP), το οποίο η σκουαλεϊνική συνθάση (SQS) το μετατρέπει σε σκουαλένιο. Η εποξειδάση του σκουαλενίου (SQE) οξειδώνει το σκουαλένιο προς 2,3-οξειδοσκουαλένιο. Τα ένζυμα OSC κυκλοποιούν το 2,3-οξειδοσκουαλένιο με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή πολλαπλών προϊόντων (Phillips et al, 2006).

Στις αντιδράσεις αυτές εμπλέκονται ένζυμα που ανήκουν στην οικογένεια του κυτοχρώματος P450 όπως είναι οι P450 εξαρτώμενες μονοξυγενάσες, ακυλοτρανσφεράσες και γλυκοσυλιοτρανσφεράσες (Haralampidis et al, 2001). Τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 καταλύουν τις οξειδωτικές αντιδράσεις κατά τη βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών. Μια τέτοια σειρά οξειδωτικών αντιδράσεων οδηγεί στη σύνθεση της γλυκυριζίνης ή της αβενασίνης από την β-αμυρίνη. Η γλυκυριζίνη και η αβενασίνη είναι σαπωνίνες του φυτού γλυκόριζα (*Glycyrrhiza glabra*) και του *Avena Sativa* αντίστοιχα. Οι οξειδωτικές αντιδράσεις για το σχηματισμό της γλυκυριζίνης περιλαμβάνουν διαδοχικές υδροξυλιώσεις στον

άνθρακα 11 και 30 της β-αμυρίνης αντίστοιχα, που ακολουθούνται από μια γλυκοσυλίωση στη 3 θέση του υδροξυλίου. Οι διαδοχικές υδροξυλιώσεις βρέθηκε ότι καταλύονται από την CYP88D6, μια μονοξυγενάση του κυτοχρώματος P450 που ανήκει στην υπερικογένεια των CYP88 που παρουσιάζονται αποκλειστικά στα *Fabaceae* (Seki et al, 2008).



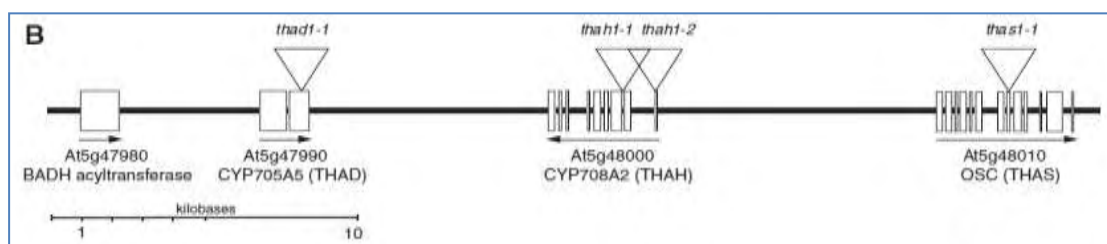
Εικόνα 1.3: Μονοπάτι βιοσύνθεσης γλυκυριζίνης (Seki et al, 2008)

2. ΓΟΝΙΔΙΑΚΕΣ ΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ

Έχει βρεθεί σε φυτά όπως το *Arabidopsis thaliana* και η βρώμη ότι τα γονίδια που εμπλέκονται στη σύνθεση των τριτερπενοειδών είναι οργανωμένα σε γονιδιακές συστοιχίες (clusters) στον ίδιο γενετικό τόπο (loci) (Chu et al, 2011). Σε αντίθεση με τους προκαρυώτες όπου πολλά από τα γονίδια είναι οργανωμένα σε οπερόνια, στα φυτά μια τέτοιου είδους οργάνωση δεν είναι συνηθισμένη (Osbourne, 2010). Οι μηχανισμοί και οι δυνάμεις που οδηγούν σε τέτοιους σχηματισμούς δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Υπάρχουν όμως αποδείξεις που υποδεικνύουν ότι σχηματίστηκαν *de novo* κατά την πρόσφατη εξελικτική ιστορία και δεν είναι αποτέλεσμα οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς απ' τα μικρόβια (Chu et al, 2011; Takos et al, 2011). Το πρώτο βήμα για το σχηματισμό των γονιδιακών συστοιχιών είναι ο γονιδιακός διπλασιασμός και ο λειτουργικός αναπρογραμματισμός ενός αρχικού γονιδίου. Αυτό το γεγονός πυροδοτεί τη στρατολόγηση γονιδίων που κωδικοποιούν CYP450s και άλλα ένζυμα που εμπλέκονται στην τροποποίηση του βασικού σκελετού των τριτερπενοειδών (Chu et al, 2011). Οι διαφορετικές γονιδιακές συστοιχίες στα φυτά φαίνεται ότι

εξελιχθηκαν ανεξάρτητα (Field and Osbourn, 2008). Τα γονίδια της συστοιχίας υπόκεινται σε στενή εναρμονισμένη ρύθμιση που διασφαλίζει ότι τα τελικά προϊόντα του μονοπατιού παράγονται στο σωστό μέρος την κατάλληλη στιγμή, ενώ παράλληλα αποτρέπει τη συγκέντρωση επιβλαβών ενδιάμεσων του μεταβολισμού (Chu et al, 2011).

Συνολικά μέχρι σήμερα έχουν χαρακτηριστεί τέσσερις και πέντε γονιδιακές συστοιχίες στα δικότυλα και στα μονοκότυλα αντίστοιχα. Στο *Arabidopsis thaliana* έχουν βρεθεί 13 γονίδια που κωδικοποιούν κυκλάσες του οξειδοσκουαλενίου (OSCs). Η έρευνα επικεντρώθηκε σε μια γενωμική περιοχή στο χρωμόσωμα 5 που περιλαμβάνει τέσσερα συνεχόμενα από τα 13 παραπάνω γονίδια με αποτέλεσμα να ταυτοποιηθεί η πρώτη γονιδιακή συστοιχία των δικότυλων στο *Arabidopsis thaliana* που περιλαμβάνει τα τέσσερα γειτονικά συνεκφραζόμενα ριζικά γονίδια που εμπλέκονται στη σύνθεση και στην τροποποίηση του τριτερπενίου θαλιανόλη (Εικόνα 3.1). Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν για μια OSC (*At5g48010*), δυο P450s (*At5g48000* και *At5g47990*) και μια ακυλοτρανσφεράση (ACT) (*At5g47980*) της οικογένειας BAHD. Η έκφραση και των τεσσάρων γονιδίων είναι συσχετιζόμενη σε υψηλό βαθμό και παρουσιάζεται κυρίως στα κύτταρα της επιδερμίδας της ρίζας, γεγονός που υποδεικνύει ότι τα γονίδια αυτά σχετίζονται λειτουργικά και είναι οργανωμένα σε μια συστοιχία (Field and Osbourn, 2008).

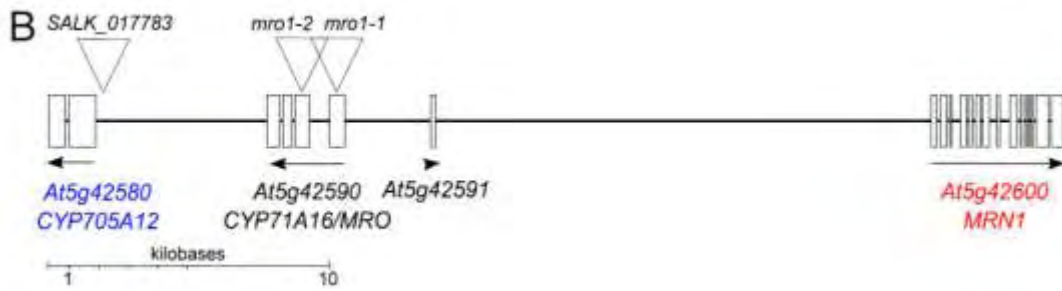


Εικόνα 2.1: Το cluster της θαλιανόλης στο *Arabidopsis thaliana* (Field and Osbourn, 2008)

Η OSC που κωδικοποιείται από το τελευταίο κατά σειράν γονίδιο της συστοιχίας, όπως φαίνεται στο χάρτη, ονομάστηκε συνθάση της θαλιανόλης (THAS) καθώς μετατρέπει το 2,3 οξειδοσκουαλένιο στο τριτερπενοειδές θαλιανόλη (thalianol) όταν εκφράζεται σε ζύμες. Το προϊόν θαλιανόλη δεν έχει αναφερθεί ξανά στα φυτά. Στη συγκεκριμένη μελέτη μόνο σε μικρή ποσότητα στη ρίζα και καθόλου στα φύλλα. Σίγηση του γονιδίου *At5g48010* σε εκχυλίσματα ρίζας οδήγησε σε μη ανιχνεύσιμη θαλιανόλη. Υπερέκφραση της συνθάσης της θαλιανόλης στα φύλλα οδήγησε στη

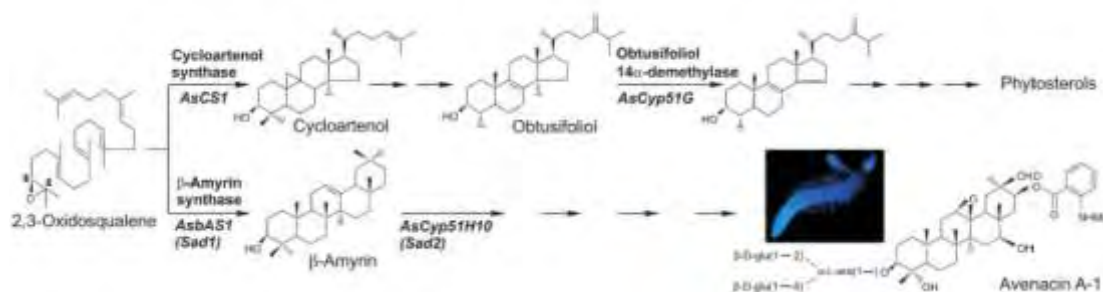
συσσώρευση θαλιανόλης σ' αυτά. Αυτά τα γεγονότα υποδεικνύουν ότι η THAS απαιτείται για τη σύνθεση της θαλιανόλης στο *Arabidopsis*. Το τρίτο κατά σειράν γονίδιο *At5g48000* κωδικοποιεί μια CYP450 (CYP708A2) που ανήκει στην λειτουργική CYP708 οικογένεια που εντοπίζεται στα φυτά της οικογένειας *Brassicaceae* (σταυρανθή). Αυτή η CYP450 είναι η υδροξυλάση της θαλιανόλης (THAH) και καταβολίζει τη θαλιανόλη προς θαλιαν-διόλη. Η δεύτερη CYP450 που κωδικοποιείται απ' το *At5g47990* ανήκει στην οικογένεια CYP705, είναι και αυτή ειδική για τα *Brassicaceae* και χαρακτηρίζεται ως desaturase της θαλιαν-διόλης (THAD) που προκαλεί τον περαιτέρω καταβολισμό της θαλιανόλης. Τα ένζυμα CYP450 είναι ικανά να καταλύουν αντιδράσεις desaturation. Τα δεδομένα δείχνουν ότι η THAS, η THAH και η THAD είναι ένζυμα που απαιτούνται για τρία διαδοχικά βήματα της σύνθεσης και της τροποποίησης της θαλιανόλης. Το τέταρτο γονίδιο της συστοιχίας και πρώτο κατά σειράν κωδικοποιεί όπως προαναφέραμε μια BAH2 ακετυλοτρανσφεράση (Field and Osbourn, 2008).

Πρόσφατα, ταυτοποιήθηκε μια ακόμα γονιδιακή συστοιχία στο *Arabidopsis* που είναι υπεύθυνη για τη σύνθεση και την τροποποίηση του *marneral* μιας ασυνήθιστης τριτερπενοειδούς αλδεύδης. Η σύγκριση με τη γονιδιακή συστοιχία της θαλιανόλης υποδεικνύει ότι οι δύο συστοιχίες πιθανόν προέκυψαν μέσω διπλασιασμού ενός προγονικού γονιδιακού ζεύγους. Η συστοιχία του *marneral* περιλαμβάνει τρία γονίδια. Ένα OSC γονίδιο, το MRN1 (*At5g42600*) το οποίο πλαισιώνεται από δύο συνεκφραζόμενα γονίδια του κυτοχρώματος P450 που ανήκουν σε διαφορετικές P450 οικογένειες (Εικόνα 3.2). Το MRN1 κωδικοποιεί τη συνθάση του *marneral*, ένζυμο που μετατρέπει το 2,3-οξειδοσκουαλένιο σε *marneral*. Το γονίδιο CYP71A16 (*At5g42590*) είναι μια οξειδάση του *marneral* που δημιουργεί πολλαπλά ισομερή του. Το τρίτο γονίδιο, το CYP705A12 (*At5g42580*) εμπλέκεται και αυτό στον καταβολισμό του *marneral*. Η υπερέκφραση των ενδιάμεσων του μονοπατιού της θαλιανόλης όσο και του *marneral* έχουν αρνητικό αντίκτυπο στην αύξηση και την ανάπτυξη του φυτού (Field et al, 2011).



Εικόνα 2.2: Το cluster του marnernal στο *Arabidopsis thaliana* (Field et al, 2011)

Στη βρώμη έχουν βρεθεί εννιά γονιδιακοί τόποι (loci), μέσω της δημιουργίας αρνητικών μεταλλαγμάτων σαπωνίνης *Sad* (Saponin deficient), που σχετίζονται με τη σύνθεση και την τροποποίηση της β-αμυρίνης που όπως αναφέραμε είναι το πρόδρομο μόριο για τη βιοσύνθεση των αβενασινών, των τριτερπενοειδών σαπωνινών που έχουν ισχυρή αντιμυκητιακή δράση στη βρώμη. Το γονίδιο *AsbAS1* που αντιστοιχεί στο γενετικό τόπο *Sad1* κωδικοποιεί τη συνθάση της β-αμυρίνης. Το *Sad2* κωδικοποιεί μια μονοξυγενάση του κυτοχρώματος P450. Αυτά τα δύο γονίδια μαζί με άλλα πέντε που είναι υπεύθυνα για την κωδικοποίηση επιπλέον ενζύμων για την τροποποίηση της β-αμυρίνης που της προσδίδει τις αντιμυκητιακές ιδιότητες και την μετατρέπει σε σαπωνίνες, είναι οργανωμένα σε μια γονιδιακή συστοιχία. Τα γονίδια που περιλαμβάνονται στη συστοιχία κωδικοποιούν γλυκοσυλιотransφεράσες (*Sad3*) και ακετυλοτρανσφεράσες (*Sad7*). Το *Sad4* είναι υπεύθυνο και αυτό για τη γλυκοζυλίωση της αβενασίνης, όπως το *Sad3*, αλλά πιθανόν δεν είναι τμήμα της συστοιχίας. Τα μεταλλάγματα *Sad3* και *Sad4* είναι υπεύθυνα για τη μείωση της ριζική ανάπτυξης. Η σωστή γλυκοσυλίωση είναι καθοριστικής σημασίας για να προκύψει η αντιμικροβιακή-αντιμυκητιακή δράση των σαπωνινών (Qi et al, 2004).



Εικόνα 2.3: Βιοσύνθεση στερολών και αβενασινών στη βρώμη. Η ένθετη εικόνα δείχνει το φθορισμό των ριζών σποριόφυτου βρώμης στο υπεριώδες (Qi et al, 2006).

Πρόσφατα, βρέθηκε ότι τα γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση του αντικαρκινικού αλκαλοειδούς νοσκαπίνη στο φυτό *Papaver somniferum* ανήκουν σε γονιδιακή συστοιχία παρόμοια με αυτές που αναφέρθηκαν παραπάνω (Winzer et al, 2012). Συγκεκριμένα στη συστοιχία ταυτοποιήθηκαν δέκα γονίδια, τρία γονίδια που κωδικοποιούν για Ο-μεθυλτρανσφεράσες (*PSMT1*, *PMST2*, *PMST3*), τέσσερα γονίδια που κωδικοποιούν για ένζυμα του κυτοχρώματος P450 (*CYP82X1*, *CYP82X2*, *CYP82Y1*, *CYP719A21*), ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για μία ακετυλτρανσφεράση (*RSAT1*), ένα γονίδιο καρβοξυλεστεράσης (*PSCXE1*) και ένα γονίδιο δευδρογενάσης / ρεδουκτάσης (*PSSDR1*). Τα ευρήματα αυτά επεκτείνουν την εμπλοκή των γονιδιακών συστοιχιών στην τάξη των αλκαλοειδών που ανήκουν στους δευτερογενείς μεταβολίτες των ανώτερων φυτών (Winzer et al, 2012). Επιπλέον, βρέθηκε ότι τα γονίδια που κωδικοποιούν για ένζυμα βιοσύνθεσης των κυανογόνων γλυκοσίδων στο φυτό *Lotus japonicus* οργανώνονται σε μια γονιδιακή συστοιχία (Takos et al, 2011). Η κυανογένεση θεωρείται εξελικτικός μηχανισμός για την άμυνα του φυτού, στον οποίο το πρώτο στάδιο μετατροπής ενός αμινοξέος σε ένα ενδιάμεσο οξύμη καταλύεται από ένα ένζυμο του κυτοχρώματος P450 που ανήκει στην οικογένεια CYP79. Στο φυτό *Lotus japonicus* το γονίδιο *CYP79D3* κωδικοποιεί για ένα ένζυμο που εμπλέκεται στη παραγωγή κυανογόνων γλυκοσίδων στα ώριμα φύλλα του φυτού. Στη γονιωματική περιοχή του γονιδίου *CYP79D3* περιλαμβάνονται τουλάχιστον πέντε γενετικοί τόποι που κωδικοποιούν για άλλα ένζυμα του βιοσυνθετικού μονοπατιού. Αυτοί περιλαμβάνουν τα γονίδια *CYP736A2* και *UGT85K3* που ολοκληρώνουν τη βιοσύνθεση των κυανογόνων γλυκοσίδων. Η οργάνωση σε γονιδιακή συστοιχία των γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των κυανογόνων γλυκοσίδων έχει επίσης παρατηρηθεί στα φυτά *Manihot esculenta* (cassava) και *Sorghum bicolor* (σόργο) (Takos et al, 2011). Έχουν βρεθεί ακόμα γονιδιακές συστοιχίες σε φυτά, όπως στο καλαμπόκι (*Zea mays*) για την βιοσύνθεση του 2,4 δινδροξυ-7-μέθοξυ-1,4 βενζοξαζιν-3-όνη (DIMBOA) που ήταν η πρώτη γονιδιακή συστοιχία που βρέθηκε χρονολογικά (Frey et al 1997). Στο ρύζι βρέθηκαν δύο συστοιχίες που κωδικοποιούν phytocassane και momilactone διτερπένια (Wilderman et al, 2004; Shimura et al, 2007; Swaminathan et al, 2009).

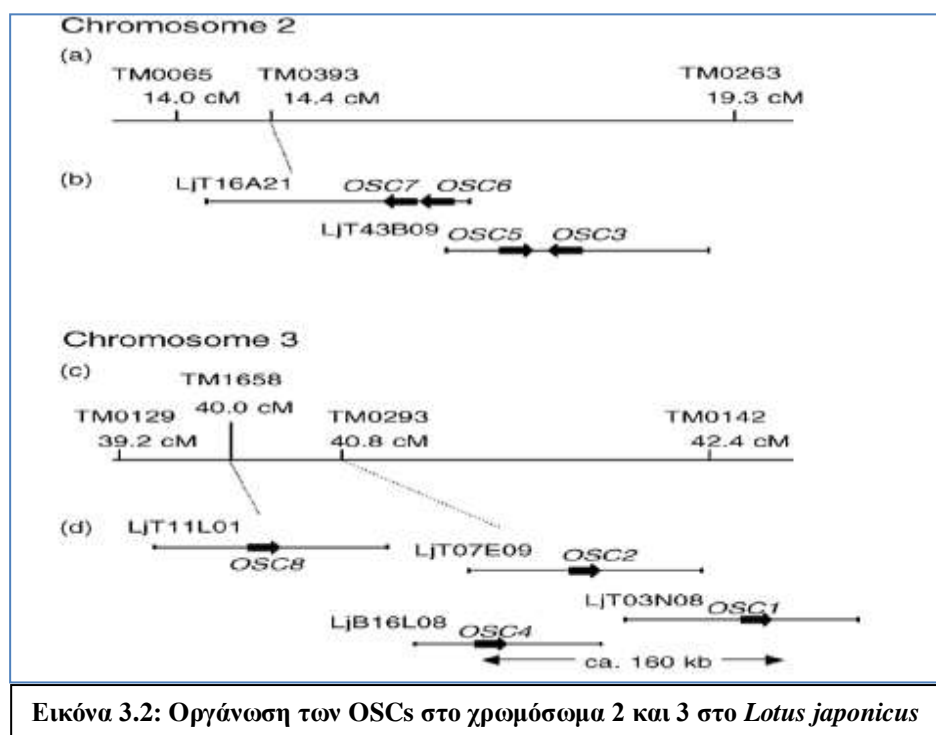
3.ΟΡΓΑΝΩΣΗ OSC ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΟ *Lotus japonicus*

Έχουν βρεθεί 13 γονίδια που κωδικοποιούν OSCs στο *Arabidopsis thaliana*, 8 γονίδια στο *Lotus japonicus* και ένα στο *Medicago truncatula*. Στο *Lotus japonicus* απομονώθηκε το γονίδιο της *AMY1*, χαρακτηρίστηκε βιοχημικά και βρέθηκε ότι κωδικοποιεί μια συνθάση της β-αμυρίνης που δίνει ως μόνο προϊόν τη β-αμυρίνη. Ακόμη βρέθηκε το γονίδιο *AMY2* που κωδικοποιεί μια κυκλάση μεικτής δράσης η οποία μπορεί να παράγει β-αμυρίνη και λουπεόλη. Κατά τους Sawai et al ταυτοποιήθηκαν διάφοροι γενομικοί κλώνοι που απεικονίζονται στην εικόνα 4.1.

Gene	Genomic clone	cDNA	ORF in the cDNA	Triterpene alcohols produced by the recombinant yeast GIL77
<i>OSC1</i>	LjT03N08	LjAMY1 [19] <i>cOSC1</i>	Partial Full	- β-Amyrin
<i>OSC2</i>	LjT07E09	-	-	-
<i>OSC3</i>	LjT43B09	<i>cOSC3</i>	Full	Lupeol
<i>OSC4</i>	LjB16L08	D9FR	Partial	-
<i>OSC5</i>	LjT43B09	<i>cOSC5</i>	Full	Cycloartenol
<i>OSC6</i>	LjT43B09, LjT16A21	Not cloned	-	-
<i>OSC7</i>	LjT16A21	Not cloned	-	-
<i>OSC8</i>	LjT11L01	LjAMY2 [19]	Full	β-Amyrin, lupeol [19]

Εικόνα 3.1: Ταυτοποιημένοι cDNA κλώνοι που κωδικοποιούν OSCs στο *Lotus japonicus*.

Από την ανάλυση βρέθηκε ότι τα γονίδια *OSC1*, *OSC2* και *OSC4* που εντοπίζονται σε μια περιοχή 160 kb συγκροτούν μια γονιδιακή συστοιχία που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 3. Τα γονίδια *OSC3*, *OSC5* και *OSC6* που εντοπίζονται στο χρωμόσωμα 2 ανήκουν και αυτά σε μια γονιδιακή συστοιχία (Sawai et al, 2006). Στο χρωμόσωμα 3 και συγκεκριμένα στο κλώνο LjT11L01 ανιχνεύεται το γονίδιο *OSC8* ή αλλιώς *AMY2*, το οποίο κωδικοποιεί για μία κυκλάση του 2,3-οξειδοσκουαλενίου μικτής δράσης.



Εικόνα 3.2: Οργάνωση των OSCs στο χρωμόσωμα 2 και 3 στο *Lotus japonicus*

3.1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η γενωμική περιοχή LjT11L01 του χρωμοσώματος 3 στην οποία ανήκει το γονίδιο *AMY2* διερευνήθηκε στις βάσεις δεδομένων για παρακείμενα γονίδια υποψήφια να συμμετέχουν σε παρόμοιο cluster βιοσύνθεσης τριτερπενοειδών. Ενδιαφέρον παρουσίασε το γεγονός ότι στη γενωμική περιοχή εντοπίστηκαν δύο γονίδια που κωδικοποιούν για ένζυμα δύο διαφορετικών κλάσεων των ενζύμων του κυτοχρώματος P450 (οικογένειες CYP88D και CYP71D) και ένα γονίδιο που πιθανολογείται να κωδικοποιεί για μία ρεδουκτάση (Krokida et al, Μη δημοσιευμένα αποτελέσματα). Επιπλέον, το ένζυμο LjCYP71D353 βρέθηκε ότι είναι γενετικά κοντά με το ένζυμο CYP71A16 το οποίο συμμετέχει στο cluster βιοσύνθεσης του marneral (Field et al, 2011). Υπόθεση εργασίας αποτελεί η ύπαρξη ενός καινούριου cluster στο Lotus, στο οποίο μετέχουν τα γονίδια *AMY2*, *LjCYP88D5*, *LjCYP71D353*. Πλασμιδιακές κατασκευές που προκαλούν σίγηση των γονιδίων *LjCYP88D5* και *AMY2* έχουν δημιουργηθεί και έχουν αναλυθεί τα αποτελέσματα (Krokida et al, Μη δημοσιευμένα αποτελέσματα). Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η δημιουργία πλασμιδιακής κατασκευής και η χρήση της στην παραγωγή φυτών *L.japonicus* που να χαρακτηρίζονται από σίγηση του γονιδίου *LjCYP71D353*. Όπως φαίνεται και στα αποτελέσματα προέκυψαν πέντε φυτικές σειρές με εμφανώς μειωμένη έκφραση του γονιδίου *LjCYP71D353*. Τα αποτελέσματα συγκεντρωτικά μπορούν να εξασφαλίσουν περαιτέρω στοιχεία για τη βιοσύνθεση τριτερπενοειδών στο Lotus και αν σε αυτή μετέχουν γονίδια που να ανήκουν σε γονιδιακή συστοιχία.

4. ΤΟ ΨΥΧΑΝΘΕΣ *Lotus japonicus* ΩΣ ΦΥΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ

Τα ψυχανθή (Leguminosae ή Fabales) είναι κατηγορία φυτών εξίσου σημαντική με τα σιτηρά, καθώς αποτελούν πηγή τροφής για τον άνθρωπο και τα ζώα και παρέχουν πρώτες ύλες για τη βιομηχανία (Graham and Vance, 2003). Η πλειοψηφία των ψυχανθών διαθέτουν ισχυρό ριζικό σύστημα στο οποίο αναπτύσσονται χαρακτηριστικές δομές που ονομάζονται φυμάτια. Οι δομές αυτές προκύπτουν λόγω της συμβίωσης ριζόβιων (*Rhizobiaceae*) βακτηρίων με το ψυχανθές. Αποτελούνται κυρίως από μάζα φυτικών κυττάρων που εποικίζονται στο εσωτερικό από βακτήρια. Έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν το ατμοσφαιρικό άζωτο και να το ενσωματώνουν σε οργανικές ενώσεις οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τα φυτά (Long,

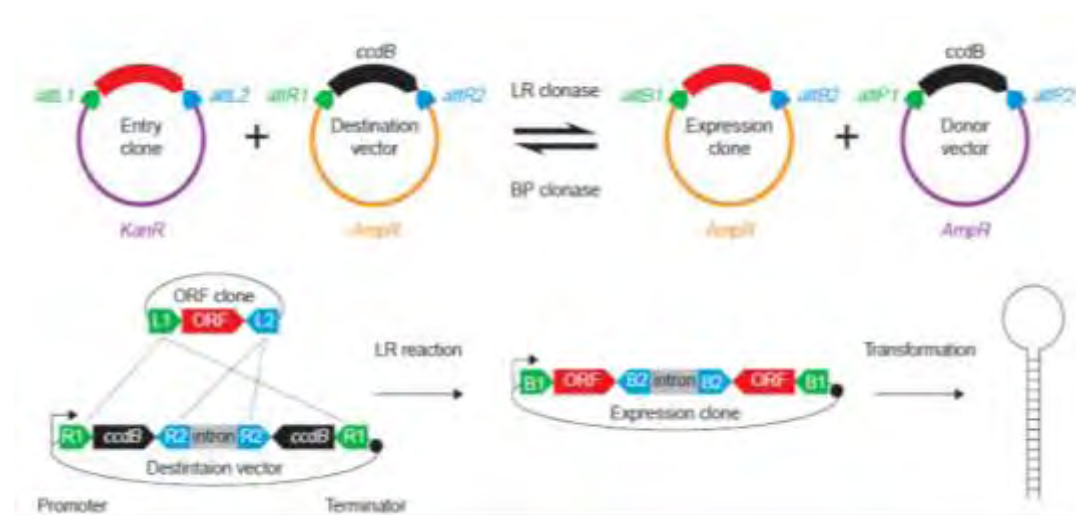
1989). Η δημιουργία των φυματίων στις ρίζες και η ικανότητα δέσμευσης του ατμοσφαιρικού αζώτου από τα ψυχανθή είναι ίσως το βασικό χαρακτηριστικό τους. Υπολογίζεται ότι περίπου 40-60 εκατομμύρια τόνοι αζώτου δεσμεύονται ετησίως από καλλιεργούμενα ψυχανθή (Smil, 1999). Αντιπροσωπευτικά ψυχανθή με εμπορική σημασία είναι η μηδική (*Medicago sativa*), η φακή (*Lens culinaris*), το μπιζέλι (*Pisum sativum*) και η σόγια (*Glycine max*). Αυτά τα είδη όμως δεν έχουν τα χαρακτηριστικά που επιτρέπουν εύκολους βιολογικούς χειρισμούς.

Το *Lotus japonicus* [Kingdom: Plantae, Division: Magnoliophyta, Order: Fabales (Leguminosae), Family: Fabaceae (Papilionaceae), Subfamily: Faboideae, Tribe: Loteae, Genus: Lotus] (Handberg and Stougaard, 1992). Παρόλο που είναι αγρονομικά ασήμαντο έχει χαρακτηριστικά όπως το μικρό μέγεθος, ο σχετικά μικρός κύκλος ζωής, ο μικρός διπλοειδής γενότυπος και η δυνατότητα εύκολης δημιουργίας διαγονιδιακών φυτών που το καθιστούν ιδανικό ως φυτικό-μοντέλο. Είναι μάλιστα εξίσου σημαντικό με το περισσότερο μελετημένο φυτικό-μοντέλο του *Arabidopsis thaliana*, καθώς σε αντίθεση με αυτό επιτρέπει την μελέτη της συμβιωτικής σχέσης ψυχανθών-βακτηρίων και ειδικότερα των διαδικασιών της φυματιογένεσης και της αζωτοδέσμευσης (Udvardi et al, 2005).

5. ΦΟΡΕΙΣ pUbi - ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ GATEWAY

Οι φορείς pUbi – Gateway είναι φορείς σίγησης ή υπερέκφρασης. Βασίζονται στο κορμό του δυαδικού φορέα pCambia 1300. Στην περιοχή του T-DNA περιέχουν ως γονίδια επιλογής το GFP ή ανθεκτικότητα στην υγρομυκίνη μπροστά από τον ικό προαγωγέα p35S. Η έκφραση της επιθυμητής κατασκευής καθοδηγείται από τον υποκινητή της ubiquitin – 1 *Lotus japonicus* μαζί με το πρώτο ιντρόνιο και ένα μικρό τμήμα του πρώτου εξωνίου. Η εισαγωγή της κατασκευής στο πλασμίδιο πραγματοποιείται με τη βοήθεια της τεχνολογίας Gateway. Εν συντομία, η τεχνολογία αυτή βασίζεται στην ικανότητα του φάγου λ να ενσωματώνεται στο βακτηριακό γένωμα ανάμεσα σε συγκεκριμένες θέσεις αναγνώρισης. Η κατασκευή αυτή ενδιαφέροντος τοποθετείται ανάμεσα σε 2 διακριτές θέσεις σε πλασμίδιο – φορέα εισαγωγής για κατευθυνόμενη ένθεση (pEntry). Ο φορέας pUbi φέρει τις αντίστοιχες θέσεις αναγνώρισης μπροστά από τον υποκινητή και γύρω από τα γονίδια ChlR, ccdB (γονίδια αυτοκτονίας σε συνηθισμένα βακτήρια). Τα πλασμίδια pEntry

και ρUbi αναμιγνύονται παρουσία των ενζύμων ένθεσης ώστε να επιτευχθεί αμοιβαία ανταλλαγή των τμημάτων ανάμεσα στις θέσεις αναγνώρισης. Μετά τον ανασυνδυασμό, η κατασκευή ενδιαφέροντος θα έχει ενσωματωθεί στον τελικό φορέα ρUbi και τα γονίδια ChlR, ccdB στον αρχικό ρEntry. Επομένως, μετασχηματίζοντας βακτηριακό στέλεχος με το μίγμα των πλασμιδίων παρουσία αντιβιοτικού επιβιώνουν μόνο αυτά με την τελική κατασκευή (Katzen 2007).



Εικόνα 6.1: Επάνω: Τεχνολογία Gateway, με κόκκινο χρώμα απεικονίζεται το επιθυμητό τμήμα του DNA. Κάτω: Δημιουργία φορέα έκφρασης RNA φουρκέτασε ένα βήμα με την τεχνολογία Gateway. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία των φορέων ρUbi του πειράματος (Katzen 2007).

6. *Agrobacterium rhizogenes* ΚΑΙ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ HAIRY ROOT

Το *Agrobacterium rhizogenes* είναι ένα Gram αρνητικό βακτήριο που ευθύνεται για την ανάπτυξη του φαινότυπου hairy root στα φυτά ο οποίος χαρακτηρίζεται από αυξημένη ανάπτυξη του ριζικού ιστού με πολλές διακλαδιζόμενες, σγουρές ρίζες μικρότερου μήκους από το φυσιολογικό. Στο *A. rhizogenes* υπάρχει το πλασμίδιο Ri που φέρει περιοχές T-DNA, οι οποίες μεταφέρονται και εκφράζονται στο φυτικό γένωμα με αποτέλεσμα την εμφάνιση των νεοπλαστικών δομών του hairy root (Sinkar et al, 1987; Zhu et al, 2000). Στο T-DNA υπάρχουν γονίδια βιοσύνθεσης για τις φυτορμόνες της οικογένειας των αυξινών και των κυτοκινών (White et al, 1985).

Η έκφραση των ορμονών στα μετασχηματισμένα φυτά οδηγεί σε αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό με συνέπεια τη δημιουργία των hairy root δομών. Τα γονίδια rolA, B, C, D του T-DNA που συμμετέχουν στη σύνθεση των κυτοκινών είναι υπεύθυνα για τον hairy root φαινότυπο (White et al, 1985; Chilton et al, 1982).

Η ενσωμάτωση του T-DNA μεσολαβείται από δύο συνοριακές αλληλουχίες 25bp όπου κάθε μια βρίσκεται σε κάθε άκρο του T-DNA. Η συχνότητα μετασχηματισμού αυξάνεται παρουσία συγκεκριμένων γειτονικών αλληλουχιών που δεν είναι απαραίτητες για τη μεταφορά και την ενσωμάτωση. Για την αποκοπή, τη μεταφορά αλλά και την ενσωμάτωση απαιτούνται τα προϊόντα των γονιδίων *vir* που κωδικοποιούνται από μια περιοχή εκτός του T-DNA (Zambryski et al, 1983; Gustavo et al, 1998). Ανάμεσα στα δύο συνοριακά μπορούμε να τοποθετήσουμε οποιαδήποτε αλληλουχία, έχει μεταφερθεί αλληλουχία με μήκος έως και 15kb με τη χρήση του *A.rhizogenes* (Stougaard et al, 1987). Λόγω του μεγάλου μήκους του πλασμιδίου Ri (>200 kb) για πιο εύκολους χειρισμούς χρησιμοποιούμε το δυαδικό σύστημα φορέων κατά το οποίο το T-DNA κλωνοποιείται σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα και εισάγεται σε βακτηριακό κλώνο που περιέχει δεύτερο πλασμίδιο με τα *vir* γονίδια για τη μεταφορά του T-DNA (Gustavo et al, 1998). Τονίζεται ότι τα φυτά που προκύπτουν μ' αυτή τη μέθοδο δεν είναι διαγονιδιακά, αλλά αποτελούνται από υπέργειες δομές αγρίου τύπου και μετασχηματισμένες ρίζες (Limpens et al, 2004). Επομένως, η μέθοδος προτιμάται σε μελέτες όπου τα γονίδια εκφράζονται μόνο στο ριζικό σύστημα ή όταν εξετάζεται η επίδραση γονιδίων και άλλων αλληλουχιών DNA επιλεκτικά σ' αυτό (Martirani et al, 1999; Kumagai and Kouchi, 2003).

8. RNAi ΣΕ ΦΥΤΑ

Το δίκλωνο RNA έχει αποδειχτεί ότι μπορεί να προκαλέσει μεταμεταφραστική σίγηση γονιδίων σε φυτά αλλά και σε άλλους οργανισμούς. Κατά την μέθοδο αυτή χρησιμοποιούμε δίκλωνο RNA «φουρκέτας» που αποτελείται από ένα τμήμα του ανοιχτού αναγνωστικού πλαισίου του γονιδίου στόχου (ORF) σε ανάστροφη επανάληψη (Sharp, 2001; Wesley et al, 2001). Ανάμεσα στην ανάστροφη επανάληψη υπάρχει ένα ιντρόνιο που όταν εκφραστεί σχηματίζει βρόγχο με αποτέλεσμα την καλύτερη σίγηση. Η κατασκευή βρίσκεται υπό τον έλεγχο ιδιοσυστατικού υποκινητή για να διατηρείται η έκφραση σε υψηλά επίπεδα σε σχεδόν όλους τους ιστούς και έτσι να επιτυγχάνουμε μεγαλύτερη σίγηση. Συνολικά, στους φορείς που έχουν σχεδιαστεί

υπάρχει ο υποκινητής, το ιντρόνιο και η αλληλουχία τερματισμού της έκφρασης (Helliwell and Waterhouse, 2003; Maekawa, 2007). Το τμήμα του ORF του γονιδίου-στόχου πρέπει να έχει μήκος 300-600 bp, είτε στο 3'-UTR είτε στο 5'-UTR του mRNA στόχου. Χρησιμοποιούνται ORF που δεν είναι συντηρημένα και δεν μοιάζουν με άλλες αλληλουχίες προκειμένου να επιτύχουμε ειδική σίγηση. Υπάρχουν περιπτώσεις που η σίγηση εξαπλώνεται και σε μη μετασχηματισμένους ιστούς. Με τη μέθοδο αυτή μπορεί να επιτευχθεί σίγηση που πλησιάζει το 100% (Helliwell and Waterhouse, 2003).

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΤΟ ΨΥΧΑΝΘΕΣ *Lotus japonicus* ΩΣ ΦΥΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ

Ως φυτικό υλικό για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε το ψυχανθές *Lotus japonicus* (*L.japonicus*, οικότυποι Gifu B-129 και MG20). Για την απομόνωση ολικού RNA χρησιμοποιήθηκαν ρίζες 20 ημερών.

1.1. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΣΠΟΡΩΝ

Για την ομοιόμορφη και γρήγορη βλάστηση των σπερμάτων του *L. japonicus* είναι απαραίτητη η τοποθέτησή τους σε πυκνό θειικό (H_2SO_4) οξύ για 5 λεπτά. Ακολουθούν δύο εκπλύσεις με απιονισμένο νερό. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αποστείρωση των σπερμάτων, εμβαπτίζονται σε διάλυμα 2% υποχλωριώδους νατρίου και 0.02% Tween 20 (BDH) για 20 λεπτά. Ακολούθως, τα σπέρματα ξεπλένονται 6 φορές με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό. Τέλος, τα σπέρματα απλώνονται σε τρυβλία που περιέχουν 2% άγαρ. Τα τρυβλία αφήνονται στο σκοτάδι, στους 22°C για 72 ώρες, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η προβλάστηση των σπερμάτων.

1.2. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΡΙΖΟΒΙΩΝ ΚΑΙ ΜΟΛΥΝΣΗ ΦΥΤΩΝ

Για τη μόλυνση των φυτών χρησιμοποιείται το ριζόβιο βακτήριο *Mesorhizobium loti* στέλεχος R7A. Τα ριζόβια αναπτύσσονται σε τρυβλία που περιέχουν θρεπτικό υλικό YMB με 1.5% Agar. Η επώαση των καλλιεργειών πραγματοποιείται στους 30°C για 72 ώρες. Η μόλυνση των φυτών γίνεται με τη διαβροχή των ριζιδίων των νεαρών εκφύτων με εναιώρημα των ριζοβίων οπτικής πυκνότητας 0,1 OD₆₀₀ σε διάλυμα PBS.

>> PBS (phosphate buffered saline) : 4.3mM Na₂HPO₄, 137mM NaCl, 2.7 KCl, 1.4 mM KH₂PO₄, pH 7.4.

1.3. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΤΟΥ

L. japonicus

Για την ανάπτυξή τους, τα νεαρά έκφυτα μεταφέρονται σε πλαστικά δοχεία που περιέχουν περλίτη και βερμικουλίτη σε αναλογία 1:1 και ποτίζονται με θρεπτικό διάλυμα Hoagland. Στην περίπτωση που τα φυτά έχουν μολυνθεί με ριζόβια, χρησιμοποιείται θρεπτικό διάλυμα Hoagland χωρίς άζωτο. Τα φυτά τοποθετούνται σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία 22°C, φωτοπερίοδος 16 ώρες φως / 8 ώρες σκοτάδι).

>> Hoagland (για 1 lt): 2 ml 1 M $MgSO_4$, 1 ml 1M KH_2PO_4 , 1 ml 0.1M FeEDTA, 5 ml 1M KNO_3 , 5 ml 1M $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, 1ml διαλύματος ιχνοστοιχείων.

>> Διάλυμα ιχνοστοιχείων (σε 1lt H_2O): αναμιγνύονται 2.86 gr H_3BO_3 , 1.81 gr $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0.11 gr $ZnCl_2$, 0.05 gr $CuCl_2 \cdot H_2O$, 0.02 gr H_2MoO_4 .

2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΑΠΟ ΦΥΤΙΚΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ – ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕ LiCl

- Ομογενοποίηση του φυτικού ιστού με λειοτρίβηση με υγρό άζωτο.
- Προσθήκη 800 μl διαλύματος REB και 600 μl φαινόλη / χλωροφόρμιο σε αναλογία 2:1. Ακολουθεί μηχανική ανάδευση και φυγοκέντρηση 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 φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα.
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα erpendorf και προσθήκη 500 μl χλωροφόρμιο / ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογία 49:1. Ακολουθεί μηχανική ανάδευση και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα.
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα erpendorf και προσθήκη 250 μl LiCl 8M. Ακολουθεί καθίζηση του RNA για 16 ώρες στους 4°C.

- Φυγοκέντρηση για 45 min στα 13.000 rpm στους 4°C προκειμένου να γίνει η συλλογή του RNA ως ίζημα.
- Επαναδιάλυση του RNA με 200 μl H₂O-DEPC.
- Προσθήκη 100% αιθανόλης σε όγκο ίσο με 2.5 όγκους της υδατικής φάσης και διαλύματος οξικού νατρίου pH 5.3 σε όγκο ίσο με το 1/10 του όγκου της υδατικής φάσης.
- Επάωση του RNA για κατακρήμνιση, είτε 60 min στους -80°C είτε για 16 ώρες στους -20°C.
- Φυγοκέντρηση για 30 min στα 13.000 rpm στους 4°C και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- Επαναδιάλυση του RNA ιζήματος με 70% αιθανόλη σε όγκο ίσο με τον όγκο της υδατικής φάσης.
- Φυγοκέντρηση για 20 min στα 13.000 rpm στους 4°C και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- Επαναδιάλυση του RNA ιζήματος με H₂O-DEPC.

>> REB : Tris – HCl 25mM pH 8.0, EDTA 25mM pH 8.0, NaCl 75mM, SDS 1%.

3. ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΜΕ DNάση

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

- Σε δείγμα RNA ποσότητας έως 1μg προστίθενται
 - 1μl 10X ρυθμιστικό διάλυμα DNάσηςI.
 - 1μl 1 U / μg RNA DNάσης ελεύθερης από RNάσες.
 - ddH₂O μέχρις όγκου 10 μl.
- Ακολουθεί επάωση στους 37°C για 45 λεπτά. Εναλλακτικά, η επάωση μπορεί να πραγματοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθήκη 1 μl EDTA 25 mM pH 8.0 για να τερματιστεί η αντίδραση.
- Επάωση στους 65°C για 10 λεπτά.

4. ΣΥΝΘΕΣΗ cDNA ΑΠΟ RNA ΜΕ ΤΟ ENZYMO SuperscriptII RT, Invitrogen

Σε συνολικό όγκο 20 μl μπορούν να χρησιμοποιηθούν 1 ng – 5 μg ολικού RNA ή 1 – 500 ng mRNA. Τα βήματα που ακολουθούνται είναι τα εξής :

- Σε σωλήνα erppendorf τοποθετούνται τα παρακάτω συστατικά :
 - 1 μl oligo(dT)₁₂₋₁₈(500 μg/ml), ή 50 – 250 ng τυχαίους εκκινητές
 - 1 ng – 5 μg ολικού RNA ή 1 – 500 ng mRNA
 - 1 μl 10mM μίγμα dNTPs (10mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP σε ουδέτερο pH)
 - αποστειρωμένο, ddH₂O μέχρις όγκου 12 μl.
- Το παραπάνω μίγμα θερμαίνεται στους 65°C για 5 λεπτά και αμέσως μετά τοποθετείται στον πάγο.
- Ακολουθεί γρήγορη φυγοκέντρωση και κατόπιν προστίθενται:
 - 4 μl 5X διάλυμα σύνθεσης πρώτης αλυσίδας
 - 2 μl 0,1M DTT
 - 0.5 μl RnaseOUT, που είναι ανασυνδυασμένος παρεμποδιστής ριβονουκλεασών (40 units/μl).
- Τα παραπάνω συστατικά αναμιγνύονται και επώάζονται στους 42°C για 2 λεπτά.
- Στη συνέχεια, προστίθεται 1 μl (200 units) του ενζύμου SuperScript II RT και ακολουθεί ανάμιξη με πιπέτα.
- Έπειτα, ο σωλήνας erppendorf αφήνεται για επώαση στους 42°C για 50 λεπτά.
- Η αντίδραση διακόπτεται με θέρμανση στους 70°C για 15 λεπτά.

5. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA

5.1. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΠΟΜΩΝΩΣΗΣ NucleoSpin Plasmid, Macherey – Nagel

- Μετά από φυγοκέντρηση 1.5 ml υγρής καλλιέργειας, τα βακτηριακά κύτταρα επαναδιασπείρονται σε 250 μl ρυθμιστικό διάλυμα A1 που περιέχει Rnάση A.
- Προστίθενται 250 μl διαλύματος κυτταρικής λύσης A2 και πραγματοποιείται ελαφρά ανακίνηση του φυγοκεντρικού σωλήνα (erppendorf) και επώαση 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προστίθενται επιπλέον 300 μl διαλύματος ουδετεροποίησης A3 και το erppendorf αναδεύεται 4-6 φορές. Το εναιώρημα θολώνει.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5-10 λεπτά στα 10.000 rpm, με αποτέλεσμα να σχηματιστεί ένα λευκό ίζημα.
- Το υπερκείμενο υγρό μεταφέρεται με πιπέτα σε στήλη φυγοκέντρησης.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 10.000 rpm και απορρίπτεται το υγρό που έχει διέλθει από το φίλτρο.
- Η στήλη ξεπλένεται με 500 μl διαλύματος AW, το οποίο έχει προθερμανθεί στους 50°C, ακολουθεί φυγοκέντρηση 1 λεπτό στα 10.000 rpm και απορρίπτεται το υγρό που έχει διέλθει από το φίλτρο.
- Η στήλη ξεπλένεται με 600 μl ρυθμιστικού διαλύματος A4 και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό.
- Το διερχόμενο από το φίλτρο υγρό απορρίπτεται και επαναφυγοκεντρείται για 1 λεπτό μέχρι να απαλειφθεί το υπολειπόμενο διάλυμα ξεπλύματος. Εάν παραμείνει αιθανόλη από το διάλυμα A4 ίσως παρεμποδιστούν περαιτέρω ενζυμικές αντιδράσεις.
- Η στήλη τοποθετείται σε καθαρό φυγοκεντρικό σωλήνα 1,5 ml. Προκειμένου να ληφθεί το DNA, προστίθεται διάλυμα 50 μl AE (5 mM Tris-HCl, pH 8.5) ή νερό. Το διάλυμα έκλυσης αφήνεται για 1 λεπτό και, τέλος, φυγοκεντρείται για 1 λεπτό, οπότε και λαμβάνεται το καθαρό πλασμιακό DNA.

5.2. ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΟΥ ΒΡΑΣΜΟΥ (Boiling method, Holmes and Quigley 1981)

- Από την βακτηριακή καλλιέργεια μεταφέρονται 1.5 ml σε σωλήνα eppendorf και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 13.000 rpm για 1 λεπτό.
- Το υπερκείμενο υγρό απομακρύνεται, το ίζημα επαναδιαλύεται σε 150 µl STET και προστίθενται 2 µl λυσοζύμη (50 mg/ml).
- Ακολουθεί επώαση στους 100°C για 45sec και φυγοκέντρηση στα 13.000 rpm για 20 λεπτά.
- Το ίζημα απομακρύνεται με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα, καθώς αποτελείται από βακτηριακά υπολείμματα.
- Για την κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA προστίθενται 180 µl ισοπροπανόλης, ακολουθεί καλή ανάδευση και φυγοκέντρηση στα 13.000 rpm για 5 λεπτά.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα ξεπλένεται με 70 % v/v αιθανόλη.
- Αφού στεγνώσει το ίζημα, επαναδιαλύεται σε 50 µl ρυθμιστικού διαλύματος TE ή ddH₂O.

>> STET : 8% sucrose (Merck), 5% Triton X100 (BDH), 50 mM Tris-HCl pH 8.0 (BDH), 50 mM EDTA (Serva)

>> TE: 10 mM Tris-HCl pH 8.0 (BDH), 1 mM EDTA (Serva)

>> Λυσοζύμη : 50 mg λυσοζύμης (Boehringer-Mannheim) διαλύονται σε 1 ml dH₂O. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C.

5.3. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ ΦΟΡΕΑ ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ ΑΓΡΟΒΑΚΤΗΡΙΟΥ

- Φυγοκέντρηση 1.5 ml βακτηριακής καλλιέργειας για 45 sec στη μέγιστη ταχύτητα και απόρριψη του υπερκείμενου. Το βήμα πραγματοποιείται 2 φορές.
- Μηχανική ανάδευση του ιζήματος σε μηχανικό αναδευτήρα (vortex), προσθήκη 100 µl διαλύματος MPS1, μηχανική ανάδευση ξανά και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

- Προσθήκη 8 μl 50 mg/ml λυσοζύμης και μηχανική ανάδευση στο σωλήνα erpendorf. Ακολουθεί σύντομη φυγοκέντρωση και επώαση για 15 λεπτά στους 37°C.
- Προσθήκη 200 μl φρέσκου παρασκευασμένου διαλύματος MPS2, ανάδευση του erpendorf με το χέρι 3 - 4 φορές και επώαση για 5 λεπτά στο πάγο.
- Προσθήκη 150 μl διαλύματος MPS3, μηχανική ανάδευση τουλάχιστον για 10 sec και επώαση για 5 λεπτά στο πάγο.
- Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στα 13.000 rpm και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα erpendorf.
- Προσθήκη 400 μl φαινόλη/χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογία 25:24:1, μηχανική ανάδευση για 30 sec, φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στα 13.000 rpm και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα erpendorf. Αυτό το βήμα πραγματοποιείται 2 φορές.
- Προσθήκη 400 μl χλωροφόρμιο, μηχανική ανάδευση για 30 sec, φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στα 13.000 rpm και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα erpendorf.
- Προσθήκη 300 μl ισοπροπανόλης και επώαση για 10 λεπτά στο πάγο.
- Φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στα 13.000 rpm και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- Προσθήκη 70% αιθανόλης, φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στα 13.000 rpm και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- Ακολουθεί επαναδιάλυση του ιζήματος με προσθήκη 25 μl διαλύματος TE και RNάση αφού το ίζημα έχει απαλλαχθεί πλήρως από την αιθανόλη.
- Χρήση 2 μl από τον απομονωμένο πλασμιδιακό φορέα σε αντίδραση PCR.

>> MPS1 : 50mM glucose, 10mM EDTA, 25mM Tris pH 8.0

>> MPS2 : 0.2N NaOH, 1% SDS, H₂O

>> MPS3 : 5M potassium acetate, glacial acetic acid, H₂O

6. ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΙΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

6.1. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΝΟΥΚΛΕΙΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΜΕ ΦΑΙΝΟΛΗ

- Στο υδατικό διάλυμα του DNA προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης pH 8,0. Αναδεύεται καλά και φυγοκεντρείται σε 13.000 rpm για 5 λεπτά.
- Η υδατική υπερκείμενη φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα erpendorf και προστίθεται ίσος όγκος μίγματος φαινόλης / χλωροφορμίου (1:1). Αναδεύεται καλά και φυγοκεντρείται σε 13.000 rpm για 5 λεπτά.
- Η υδάτινη υπερκείμενη φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα και προστίθεται ίσος όγκος χλωροφορμίου. Αναδεύεται καλά και φυγοκεντρείται σε 13.000 rpm για 5 λεπτά.
- Η υδάτινη υπερκείμενη φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα erpendorf και τα νουκλεϊνικά οξέα κατακρημνίζονται με προσθήκη 1/10 του όγκου διαλύματος 3M οξικού νατρίου pH 5.2 και διπλάσιου όγκου αιθανόλης.
- Το δείγμα επωάζεται στους -20°C για 16 ώρες περίπου ή για 60 λεπτά στους -80°C και κατόπιν φυγοκεντρείται σε 13.000 rpm για 15 λεπτά στους 4°C .
- Το ίζημα ξεπλένεται με 70% αιθανόλη και επαναδιαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα TE ή H_2O .

6.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΝΟΥΚΛΕΙΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

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

- Σε ειδική κυβέττα χαλαζία, που περιείχε 600 μl dH_2O , τοποθετήθηκαν 3 μl δείγματος και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του διαλύματος σε μήκος κύματος 260nm.

- Η συγκέντρωση των νουκλεϊνικών οξέων, χωρίς την παρουσία άλλων προσμίξεων, όπως πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες, δίνεται από τον τύπο :
 - $C = O.D._{260} * D * \text{συντελεστής αραίωσης}$, όπου O.D. είναι η απορρόφηση του δείγματος στα 260nm και D είναι η σταθερά που εξαρτάται από το είδος του νουκλεϊνικού οξέος. Σε καθαρά διαλύματα DNA η σταθερά D ισούται με 50 mg/ml, σε διαλύματα RNA ισούται με 40 mg/ml, ενώ στην περίπτωση ολιγονουκλεοτιδίων ισούται με 30 mg/ml.
- Προκειμένου να υπολογιστεί η καθαρότητα ενός δείγματος νουκλεϊνικών οξέων, υπολογίζονται οι λόγοι $O.D._{260}/O.D._{280}$ και $O.D._{240}/O.D._{260}$. Όταν οι τιμή του πρώτου λόγου κυμαίνεται μεταξύ 1,8 – 2,0 και του δεύτερου στο 0,5, τότε το δείγμα θεωρείται ικανοποιητικής καθαρότητας.

6.3. ΠΕΨΗ ΔΕΟΞΥΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΜΕ ENZYMA ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ

Οι πέψεις δειγμάτων DNA με ένζυμα περιορισμού πραγματοποιούνται σε όγκους που κυμαίνονται από 20 μl έως 100 μl, ανάλογα με την ποσότητα του DNA που υποβάλλεται σε πέψη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 2 ένζυμα περιορισμού για την ενσωμάτωση του γονιδίου *LjCYP71D353* στο φορέα pENTRY (βλέπε παράρτημα).

- Σε σωλήνα erppendorf τοποθετείται το δείγμα του DNA, το ρυθμιστικό διάλυμα που απαιτείται για τη δράση του ενζύμου, Rnάση A αν το δείγμα περιέχει RNA και, τέλος, dH₂O μέχρι τον επιθυμητό όγκο. Μια τυπική αντίδραση πέψης σε τελικό όγκο 30 μl περιλαμβάνει :
 - Δείγμα DNA 1-5 μl
 - 10X ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου 3 μl
 - Rnάση A (2,5 mg/ml) 1 μl
 - dH₂O έως τελικό όγκο 29 μl
- Προστίθεται 1 μl ενδονουκλεάση περιορισμού. Συνήθως, χρησιμοποιείται μια μονάδα ενζύμου (1 unit) ανά μικρογραμμάριο δείγματος DNA.
- Το δείγμα αναμιγνύεται καλά και επωάζεται για 3 με 4 ώρες στην κατάλληλη θερμοκρασία.

- Μετά το πέρας της διαδικασίας τα προϊόντα αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης

6.4. ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Ο διαχωρισμός των δεοξυριβονουκλεϊνικών οξέων γίνεται, με βάση το μέγεθος και τη διαμόρφωσή τους, με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Αν πρέπει να διαχωριστούν γραμμικά δίκλινα μόρια, η σχέση που συνδέει την κινητικότητα των μορίων με το μέγεθός τους είναι ημιλογαριθμική. Η κινητικότητα μη γραμμικών μορίων εντός του ηλεκτρικού πεδίου της πηκτής δεν είναι άμεση συνάρτηση του μεγέθους τους, αλλά εξαρτάται και από τη διαμόρφωσή τους στο χώρο. Το εύρος των μεγεθών που μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτή αγαρόζης εξαρτάται από τη συγκέντρωση της πηκτής σε αγαρόζη, για παράδειγμα σε 0,8% συγκέντρωση αγαρόζης μπορούν να διαχωριστούν, ανάλογα με το μοριακό τους βάρος, τμήματα του DNA που κυμαίνονται από 1 έως 12 kb (Χατζόπουλος, 2001). Τα μόρια του DNA γίνονται ορατά με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και να φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός. Η προετοιμασία της πηκτής των δειγμάτων γίνεται ως εξής :

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

>> TAE : 50XTAE : 24.2% (w/v) Tris (BDH), 57.1 ml/l CH₃COOH (BDH), 100 ml/l 0.5 M EDTA (Serva)

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

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

6.5. ΕΠΑΝΑΚΤΗΣΗ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΔΕΟΞΥΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΙΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΑΠΟ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ανάκτησης τμημάτων από πηκτή αγαρόζης της εταιρίας Macherey – Nagel:

- Έπειτα από το πέρας της ηλεκτροφόρησης, απομονώνεται από τη πηκτή με ζυραφάκι η επιθυμητή ταινία του DNA.
- Ζυγίζεται το κομμάτι της πηκτής και προστίθενται 200 µl NT1 ανά 100 mg πηκτής.
- Ακολουθεί επώαση στους 50°C για 5 – 10 λεπτά έως ότου λιώσει πλήρως η πηκτή. Γι' αυτό συνίσταται ανάδευση με μηχανικό αναδευτήρα κάθε 2 – 3 λεπτά.
- Το μίγμα μεταφέρεται σε στήλη NucleoSpin Gel and PCR Clean-up column και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 30 sec στα 11.000 g. Το υγρό που έχει διέλθει από το φίλτρο απορρίπτεται.
- Προστίθενται 700 µl από το διάλυμα NT3 και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 30 sec στα 11.000 g. Το υγρό που έχει διέλθει από το φίλτρο απορρίπτεται. Το βήμα πραγματοποιείται 2 φορές.
- Εκ νέου φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 11.000 g προκειμένου να απομακρυνθεί όλη η αιθανόλη του διαλύματος NT3.
- Η στήλη NucleoSpin Gel and PCR Clean-up column μεταφέρεται σε νέο σωλήνα eppendorf 1.5 ml και προστίθενται 15 – 30 µl διαλύματος NE.

- Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 11.000 g προκειμένου να γίνει η έκλυση του επιθυμητού DNA.

7.ΥΠΟΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΝΟΥΚΛΕΙΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ

7.1. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ ΦΟΡΕΑ ΚΑΙ ΤΟΥ ΕΝΘΕΜΑΤΟΣ

Ο πλασμιαδικός φορέας και το ένθεμα υποβάλλονται σε πέψη με το κατάλληλο ένζυμο περιορισμού και καθαρίζονται με φαινόλη (κεφάλαια 7.3 και 7.1 αντίστοιχα). Στη παρούσα μελέτη το ένθεμα *LjCYP71D353* ενσωματώθηκε στο πλασμιαδικό φορέα pENTRY (βλέπε παράρτημα), έπειτα από κατεργασία με τα ένζυμα περιορισμού.

7.2. ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΤΜΗΜΑΤΟΣ DNA ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ

Στην αντίδραση ενσωμάτωσης, η αναλογία των μορίων του πλασμιαδικού φορέα και του τμήματος DNA που πρόκειται να ενσωματωθεί στο πλασμιαδικό φορέα εξαρτάται από το σχετικό μέγεθός τους. Η συνολική συγκέντρωση και των δύο δε πρέπει να ξεπερνάει τα 10 ng / μl. Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν η T4 DNA λιγάση της εταιρίας Promega.

Οδηγίες κατασκευαστή για χρήση της λιγάσης της εταιρίας Promega:

- Μηχανική ανάδευση του διαλύματος 2X rapid ligation buffer.
- Σε σωλήνα erppendorf 0.5 ml αναμιγνύονται τα παρακάτω:

2X rapid ligation buffer	5 μ l
50 ng πλασμιδιακού φορέα	1 μ l
Ένθεμα DNA	X μ l
T4 DNA λιγάση (3 Weiss units / μ l)	1 μ l
dH ₂ O	Μέχρις όγκου 10 μ l

- Ανάδευση της αντίδρασης με πιπέτα.
- Επώαση της αντίδρασης 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Εναλλακτικά επώαση για 16 ώρες στους 4°C.

7.3. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ LR clonase (Invitrogen)

Ο τύπος των αντιδράσεων αυτών βασίζεται στην ικανότητα του φάγου λ να αποκόπτεται από το γονιδίωμα βακτηρίων – φορέων παρουσία των πρωτεϊνών Int, Xis και IHF. Το μίγμα LR clonase mix II περιέχει αυτές τις πρωτεΐνες μαζί με το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης. Όταν το μίγμα αυτό προστίθεται σε μίγμα πλασμιδίων Entry (φέρει θέσεις attL γύρω από επιθυμητό τμήμα DNA) και Destination (φέρει θέσεις attR γύρω από κασέτα επιλογής) καταλύει τον ανασυνδυασμό των πλασμιδίων και τη μεταφορά του επιθυμητού DNA στο φορέα στόχο Destination vector. Στη παρούσα εργασία ο ενδιάμεσος φορέας ήταν ο pENTRY και ο φορέας προορισμού ήταν ο pUbi-GWS-GFP (βλέπε παράρτημα) και χρησιμοποιήθηκε το μίγμα LR clonase mix II της εταιρίας Invitrogen με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή:

- Σε σωλήνες eppendorf 1.5 ml προστίθενται:
 - 1 – 7 μ l Entry clone (50 – 150 ng)
 - 1 μ l Destination clone (150 ng)
 - TE buffer pH 8.0 μέχρις όγκου 8 μ l

- Το μίγμα LR clonase mix II ξεπαγώνεται και αναδεύεται μηχανικά στο vortex για 2 sec.
- Στο μίγμα της αντίδρασης προστίθενται 2 μl από το LR clonase mix II και ακολουθεί ανάδευση με πιπέτα.
- Η αντίδραση επώάζεται στους 25° C για 1 – 16 ώρες. Ακόμα και 1 ώρα επώαση αρκεί, αλλά μεγαλύτερος χρόνος επώασης αυξάνει τον αριθμό ανασυνδυασμένων κλώνων και συνίσταται για μεγαλύτερα πλασμίδια.
- Η αντίδραση τερματίζεται με τη προσθήκη 1 μl proteinase K και επώαση στους 37° C για 10 λεπτά.
- Μικρή ποσότητα της αντίδρασης χρησιμοποιείται για το μετασχηματισμό δεκτικών βακτηριακών κυττάρων και ακολουθεί η επιλογή των επιθυμητών κλώνων.

8. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ «ΙΚΑΝΩΝ» ΚΥΤΤΑΡΩΝ *Escherichia coli*

8.1. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΙΚΑΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΡΟΣ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ

Το στέλεχος του βακτηρίου *Escherichia coli* (*E.coli*) που χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία ικανών κυττάρων για μετασχηματισμό ήταν το DH5a. Η διαδικασία ήταν η παρακάτω:

- 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 αιωρήματος να φτάσει την τιμή $O.D._{600}=0,2-0,3$.
- Τα βακτηριακά κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στα 6.000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C.
- Το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 50 ml διαλύματος 0,1M παγωμένου $MgCl_2$ και επώάζεται στο πάγο για 30 λεπτά.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 6.000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C.

- Τα κύτταρα επαναδιασπείρονται σε 25 ml διαλύματος 0,1M CaCl₂ και αφήνονται στον πάγο για 20 λεπτά.
- Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 6.000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C και επαναδιασπείρονται σε 10 ml διαλύματος 0,1M CaCl₂, το οποίο βρίσκεται στον πάγο.
- Η αποθήκευση των δεκτικών κυττάρων γίνεται στους -80°C με την προσθήκη 20% γλυκερόλης.

8.2. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

- Σωλήνας erpendorf που περιέχει 100 μl δεκτικά κύτταρα του στελέχους DH5α ξεπαγώνουν στο 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 για 1 λεπτό στους 42°C, προκειμένου να διευκολυνθεί η εισαγωγή του πλασμιδίου.
- Προστίθενται 200 μl υγρού θρεπτικού υποστρώματος LB και τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 37°C για 50 – 60 λεπτά.
- Τα κύτταρα στρωματώνονται σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό που περιέχουν το κατάλληλο αντιβιοτικό για την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων.
- Η επώαση των τρυβλίων πραγματοποιείται για 16 ώρες στους 37°C.
- Η φύλαξη των τρυβλίων γίνεται στο ψυγείο στους 4°C.

Στην περίπτωση χρήσης πλασμιδιακών φορέων που φέρουν τμήμα του γονιδίου LacZ' που κωδικοποιεί για τη β-γαλακτοσιδάση (π.χ. pGEM-T-easy) προσθέτουμε στα κύτταρα – πριν αυτά απλωθούν στο τρυβλίο – 10 μl 100mM IPTG και 50 μl 2% X-Gal. Οι αποικίες που φέρουν μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο εμφανίζονται μπλε, λόγω της δράσης της β-γαλακτοσιδάσης. Αντίθετα, οι αποικίες που φέρουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο εμφανίζονται λευκές.

>> LB : Για την παρασκευή ενός λίτρου διαλύματος προστίθενται : 10 g Bactotryptone, 10 g yeast extract, 5 g NaCl. Για την παρασκευή θρεπτικού μέσου

τρυβλίων προστίθενται στα παραπάνω 15g άγαρ. Το θρεπτικό διάλυμα αποστειρώνεται και φυλάσσεται στους 4°C.

>> 100 mM IPTG : 23,8 g IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, Boehringer-Mannheim) διαλύονται σε 1 ml dH₂O. Το διάλυμα αποστειρώνεται με φιλτράρισμα (0.22 μm Millipore) και φυλάσσεται στους -20°C.

9. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ «ΙΚΑΝΩΝ» ΚΥΤΤΑΡΩΝ *Agrobacterium rhizogenes* LBA1334

9.1. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΙΚΑΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΡΟΣ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ

Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *Agrobacterium rhizogenes* LBA 1334, η μόλυνση του οποίου στα φυτά έχει σαν αποτέλεσμα το φαινόμενο «Hairy root».

- Εμβολιασμός 50 ml θρεπτικού μέσου LB με 2 ml καλλιέργειας αγροβακτηρίου. Η καλλιέργεια αφήνεται για ανάπτυξη στους 28°C με ανάδευση στα 250 rpm έως ότου η οπτική πυκνότητα να φτάσει τη τιμή OD: 1.5 – 1.0 (η τιμή 0.6 είναι η ιδανική).
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων για 5 λεπτά στα 3.000 g στους 4°C και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 1 ml διαλύματος CaCl₂ 20 mM.
- Τα κύτταρα μοιράζονται ανά 100 μl σε σωλήνες eppendorf οι οποίοι έχουν προψυχθεί.
- Τα κύτταρα αποθηκεύονται στους -80°C.

9.2. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΓΡΟΒΑΚΤΗΡΙΟΥ

Στη παρούσα μελέτη τα κύτταρα του αγροβακτηρίου μετασχηματίστηκαν με το δυαδικό φορέα pUbi-GWS-GFP, ο οποίος φέρει στη περιοχή του T-DNA τη κατασκευή για τη σίγηση του γονιδίου *LjCYP71D353* και ένα γονίδιο αναφοράς για την επιλογή των μετασχηματισμένων φυτών.

- Ο σωλήνας που περιέχει 100 μl δεκτικά κύτταρα αγροβακτηρίου τοποθετείται στο πάγο και τα κύτταρα ξεπαγώνουν εκεί.
- Ακολουθεί προσθήκη 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 sec στα 4.000 rpm και απόρριψη του υπερκείμενου.
- Επαναδιάλυση του ιζήματος με 100 μl LB και στρώσιμο των κυττάρων σε τρυβλία με τα κατάλληλα αντιβιοτικά.
- Τα τρυβλία επωάζονται στους 28° C για 2 – 3 ημέρες.

10. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

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

- Θέρμανση σε υψηλή θερμοκρασία (93 – 95°C) ώστε να αποδιαταχθεί το DNA (denaturation step).

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

Η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω επαναλαμβάνεται για 25 – 35 κύκλους συνήθως. Κατά τη διάρκεια των κύκλων η παραγωγή των προϊόντων της αντίδρασης γίνεται με εκθετικό ρυθμό, εφόσον βέβαια δεν παρουσιαστούν περιοριστικοί παράγοντες, όπως για παράδειγμα έλλειψη νουκλεοτιδίων. Μετά το πέρας της αντίδρασης το προϊόν ενίσχυσης αναλύεται ή χρησιμοποιείται για περαιτέρω πειραματικές διαδικασίες. Η PCR βρίσκει εφαρμογή σε πολλούς τομείς και, τελευταία, έχουν αναπτυχθεί πολλές παραλλαγές της παραπάνω βασικής αντίδρασης. Μία ευρέως χρησιμοποιούμενη παραλλαγή είναι η RT-PCR, κατά την οποία χρησιμοποιείται - ως μήτρα για ενίσχυση - RNA, το οποίο πρώτα μεταγράφεται σε cDNA με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (Reverse transcriptase, κεφάλαιο 4). Για μια τυπική αντίδραση ενίσχυσης (τελικού όγκου 50 μ l) αναμιγνύονται:

Μήτρα DNA	1 μ l
Ορθόδρομος εκκινητής 5 μ M	5 μ l
Οπισθόδρομος εκκινητής 5 μ M	5 μ l
dNTPs (10mM το κάθε ένα)	1 μ l
Taq DNA πολυμεράση	1 μ l (1 unit/ μ l)
10X ρυθμιστικό διάλυμα	5 μ l

dH ₂ O	Μέχρις όγκου 50 μl
-------------------	--------------------

Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα Phusion High-Fidelity DNA Polymerase της εταιρίας Finnzymes και Kapa Taq DNA Polymerase της εταιρίας Kapa Biosystems σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το ένζυμο Phusion High-Fidelity DNA Polymerase χρησιμοποιήθηκε για την ακριβή ενίσχυση του τμήματος του γονιδίου *LjCYP71D353* που χρησιμοποιήθηκε στη κατασκευή σίγησης. Οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν για την ενίσχυση του *LjCYP71D353* φέρουν ένζυμα στα άκρα, το NcoI βρίσκεται στον ορθόδρομο εκκινητή και το SalI στον οπισθόδρομο. Έπειτα από τη PCR, το ένθεμα υπέστη πέψη με τα ένζυμα περιορισμού για να υποκλωνοποιηθεί στον φορέα pENTRY. Το ένζυμο Kapa Taq DNA Polymerase χρησιμοποιήθηκε για απλούστερες διαδικασίες, π.χ. PCR σε RNA δείγματα για έλεγχο ύπαρξης επιπλέον γονιδιωματικού DNA και Colony PCR (κεφάλαιο 10.1). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη έχουν καταγραφεί στο παράρτημα υλικών – μεθόδων.

10.1. Colony PCR

Η μέθοδος αυτή αποτελεί παραλλαγή της PCR, όπου ως μήτρα για την αντίδραση χρησιμοποιείται αποικία βακτηριακών κυττάρων. Στηρίζεται στη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος το οποίο περιέχει KCl και Triton, το οποίο παρέχει αυξημένη συγκέντρωση ιόντων και απορρυπαντικού. Αυτό, σε συνδυασμό με το πρώτο βήμα της αντίδρασης όπου εφαρμόζεται αυξημένη θερμοκρασία, έχει ως αποτέλεσμα να πραγματοποιείται λύση των βακτηριακών κυττάρων. Παράλληλα, το ρυθμιστικό διάλυμα διατηρεί ευνοϊκές συνθήκες για τη δράση της πολυμεράσης. Στη παρούσα εργασία η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε διαγνωστικά, προκειμένου να βρεθούν οι βακτηριακές αποικίες που περιέχουν το επιθυμητό πλασμίδιο pENTRY-*LjCYP71D353* και pUbi-GWS-GFP-*LjCYP71D353*.

- Στο μίγμα της αντίδρασης προστίθεται επιπλέον MgCl₂ καθώς το ρυθμιστικό διάλυμα δε περιέχει.

- Έπειτα από τη προετοιμασία του μίγματος σε σωλήνα erpendorf 0.5 ml, προστίθεται μικρή ποσότητα κυττάρων.
- Ακολουθεί μηχανική ανάδευση για να ξεκινήσει η ρήξη των μεμβρανών.
- Οι σωλήνες erpendorf 0.5 ml μεταφέρονται σε θερμικό κυκλοποιητή.
- Το υπόλοιπο της αποικίας μεταφέρεται σε υγρό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης LB (κεφάλαιο 9.2) μέχρι να αποδειχτεί ότι η βακτηριακή αποικία φέρει το επιθυμητό πλασμίδιο.

10.2. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ PCR ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (Real - Time PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time PCR) ή αλλιώς και ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) είναι μια μέθοδος που βασίζεται στην PCR και χρησιμοποιείται για να ενισχύσει τμήματα DNA. Επιτρέπει την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση πολλαπλών τμημάτων DNA - στόχων σε απόλυτο αριθμό με τη χρήση προτύπων διαφόρων συγκεντρώσεων DNA. Η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος πραγματοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ο φθορισμός μετριέται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια 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.

- Στη παρούσα εργασία, η ενίσχυση των cDNA πραγματοποιήθηκε με qRT-PCR kit της εταιρίας Kara Biosystems χρησιμοποιώντας εξειδικευμένους εκκινητές (κεφάλαιο 10.3). Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε συσκευή Mx3005P (Stratagene). Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με το ίδιο θερμοκρασιακό πρόγραμμα και καταγράφονταν για 45 κύκλους. Στο τέλος κάθε αντίδρασης ακολουθούσε η παρακολούθηση της καμπύλης αποδιάταξης βάση της οποίας επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη ενός μόνο προϊόντος στην κάθε αντίδραση. Τα δεδομένα φθορισμού εισήχθησαν στο πρόγραμμα LinRegPCR και υπολογίστηκε η απόδοση (E) από την κλίση της εφαιπτομένης της καμπύλης φθορισμού της αντίδρασης. Υψώνοντας το 1+E στον αριθμό Ct

κάθε αντίδρασης προκύπτει η σχετική ποσότητα αντιγράφων του γονιδίου ενδιαφέροντος και του γονιδίου αναφοράς *LjUbiquitin* για κάθε αντίδραση. Διαιρώντας τη σχετική ποσότητα του γονιδίου ενδιαφέροντος με τη σχετική ποσότητα του γονιδίου αναφοράς *LjUbiquitin* προκύπτει η σχετική έκφραση του γονιδίου ενδιαφέροντος σε κάθε δείγμα ή χειρισμό. Για κάθε δείγμα η αντίδραση πραγματοποιείται εις τριπλούν και στην παρουσίαση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιείται ο μέσος όρος της σχετικής έκφρασης των τριών επαναλήψεων.

- Στις αντιδράσεις real-time PCR χρησιμοποιήθηκαν optical tubes στα οποία προστέθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια μέχρι τελικό όγκο 20 μ l:
 - 10 μ l 2X buffer
 - 0,8 μ l 5 μ M εκκινητής ορθόδρομος
 - 0,8 μ l 5 μ M εκκινητής οπισθόδρομος
 - 1 μ l cDNA
 - 0,4 μ l χρωστική αναφοράς ROX
 - 7 μ l ddH₂O

10.3. ΕΠΙΛΟΓΗ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ

Στην παρούσα εργασία, οι εκκινητές επιλέχθηκαν σε μη συντηρημένες περιοχές των γονιδίων, όπως προέκυψε με ομοπαράθεση 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 *L. japonicus*. Η επιλογή των εκκινητών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του εξειδικευμένου προγράμματος επιλογής εκκινητών Beacon designer v7.0. Το μέγεθος των ενισχυόμενων τμημάτων για τη real-time PCR ήταν περίπου 100-150 ζεύγη βάσεων. Οι εκκινητές επιλέχθηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός ομοδιμερών ή ετεροδιμερών. Η δημιουργία ομο- και ετερο-διμερών από τους εκκινητές έχει ως αποτέλεσμα την εκπομπή μη εξειδικευμένου φθορισμού κατά την αντίδραση της PCR πραγματικού χρόνου.

11. ΜΟΛΥΝΣΗ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΜΕ ΤΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ *Agrobacterium rhizogenes* LBA1334 ΓΙΑ ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ «Hairy Roots»

11.1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΥΤΑΡΙΩΝ

- Σπόροι *Lotus japonicus* αποστειρώνονται και τοποθετούνται σε τρυβλία με 0.8% άγαρ.
- Τα τρυβλία καλύπτονται με αλουμινόχαρτο και τοποθετούνται κάθετα σε θάλαμο ανάπτυξης για 2 – 3 ημέρες.
- Μετά το πέρας των 2 – 3 ημερών, αφαιρείται το αλουμινόχαρτο και τα φυτάρια μεγαλώνουν σε θάλαμο ανάπτυξης σε φωτοπερίοδο 16 ώρες φως / 8 ώρες σκοτάδι για 2 – 3 ημέρες.

11.2. ΜΟΛΥΝΣΗ ΦΥΤΑΡΙΩΝ ΜΕ ΤΟ *Agrobacterium rhizogenes*.

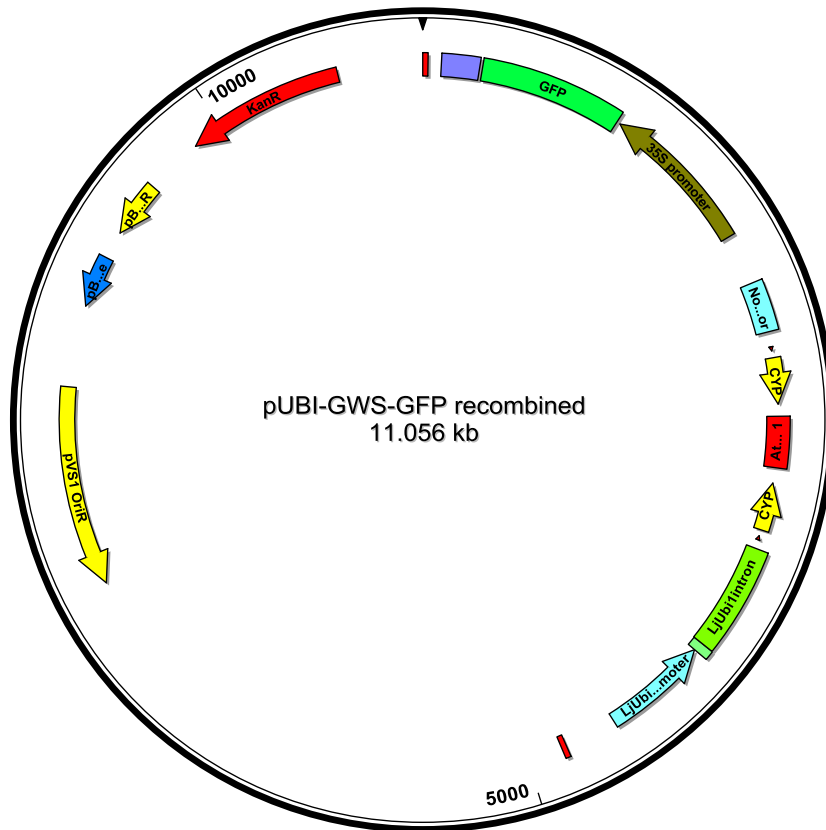
- Το *Agrobacterium rhizogenes* που φέρει τη κατάλληλη πλασμιδιακή κατασκευή αναπτύσσεται σε τρυβλίο LB παρουσία των κατάλληλων αντιβιοτικών για 2 – 3 ημέρες στους 28° C.
- Στο τρυβλίο με τη βακτηριακή καλλιέργεια προστίθενται 2 – 2.5 ml αποστειρωμένου H₂O και δημιουργείται εναιώρημα αυτής.
- Το βακτηριακό εναιώρημα μεταφέρεται σε αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί και τα φυτάρια τοποθετούνται πάνω σε αυτό.
- Οι ρίζες των φυταρίων κόβονται με νυστέρι και απομακρύνονται. Τα φυτάρια παραμένουν στο βακτηριακό εναιώρημα για 5 λεπτά.
- Στη συνέχεια τα φυτάρια μεταφέρονται σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο B5 και καλύπτονται με αλουμινόχαρτο για 2 μέρες. Τα φυτάρια αναπτύσσονται σε θάλαμο ανάπτυξης σε οριζόντια θέση.
- 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 αντιβιοτικό κεφοταξίμη και αναπτύσσονται κάθετα σε θάλαμο ανάπτυξης σε φωτοπερίοδο 16 ώρες φως / 8 ώρες σκοτάδι για 7 ημέρες.
- Τα φυτά μεταφέρονται σε τρυβλία Jensen και αναπτύσσονται κάθετα σε θάλαμο ανάπτυξης σε φωτοπερίοδο 16 ώρες φως / 8 ώρες σκοτάδι για 7 – 10 ημέρες, έως την ανάπτυξη ριζικού συστήματος.
- Τα φυτά με αναγεννημένες ρίζες τοποθετούνται σε πλαστικές θήκες με υπόστρωμα περλίτη / βερμικουλίτη σε αναλογία 1:1.

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ ΦΟΡΕΑ ΓΙΑ ΤΗ ΣΙΓΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *LjCYP71D353*

Χρησιμοποιώντας την τεχνική της PCR και κατάλληλα σχεδιασμένους εκκινητές ενισχύθηκε ένα τμήμα του γονιδίου *LjCYP71D353*. Ακολουθώντας τη διαδικασία που περιγράφηκε στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι, προέκυψε ο δυαδικός φορέας *pUbi-GWS-GFP-LjCYP71D353*. Η κατασκευή που δημιουργήθηκε με τη τεχνολογία Gateway φέρει το ένθεμα *LjCYP71D353* 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 *attB1*, τη σημαίνουσα φορά *LjCYP71D353*, το *attB2*, το ιντρόνιο *AtWRKY33*, το *attB2*, την αντισημαίνουσα σημαίνουσα φορά *LjCYP71D353*, το *attB1*, τον υποκινητή *LjUbiquitin* μαζί με το πρώτο εξόνιο και ιντρόνιο του ίδιου γονιδίου και, τέλος, το δεξί συνοριακό άκρο. Σύμφωνα με το μοντέλο ενσωμάτωσης, προβλέπεται ότι το T-DNA ενσωματώνεται πάντα πρώτα με το δεξί συνοριακό και έπειτα με το αριστερό. Επομένως, η κατασκευή με το ένθεμα στις δύο κατευθύνσεις εντοπίζεται πιο κοντά στο δεξί συνοριακό, ενώ το γονίδιο μάρτυρας / επιλογής τοποθετείται δίπλα στο αριστερό συνοριακό. Η τελική κατασκευή στο πλασμίδιο που περιγράφηκε φαίνεται στη παρακάτω εικόνα. Με το δυαδικό φορέα μετασχηματίστηκαν κύτταρα *Agrobacterium rhizogenes*, με τα οποία μολύνθηκαν τα φυτά *Lotus japonicus*.



Εικόνα 1.1: Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που φέρει το ένθεμα *LjCYP71D353* ενσωματωμένο εκατέρωθεν του ιντρονίου με 2 προσανατολισμούς (3' – 5' και 5' – 3') και το γονίδιο GFP.

2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ

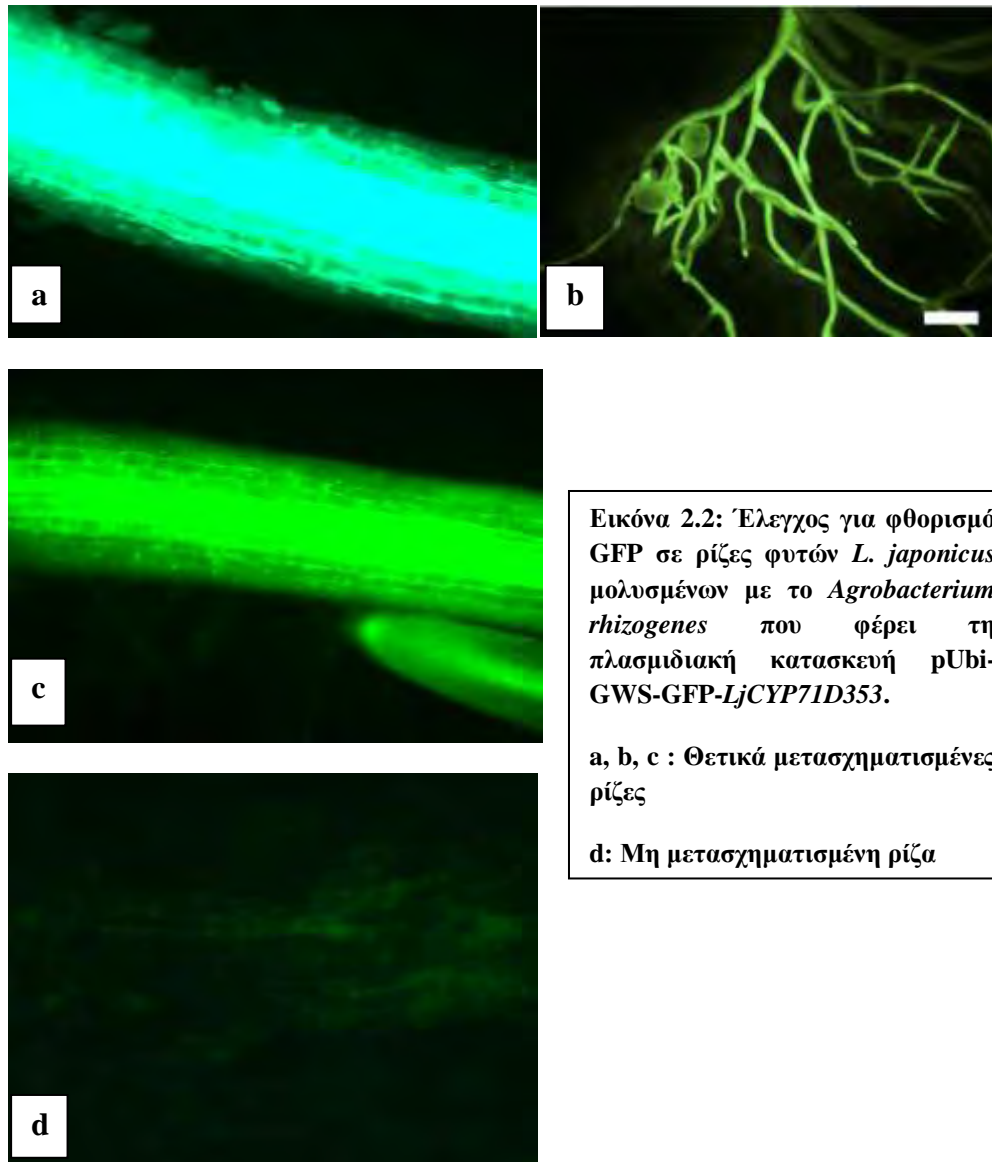
Οι ρίζες των φυτών που μετασχηματίστηκαν με το *A.rhizogenes* εμφάνισαν το φαινότυπο hairy root. Οι ρίζες εμφανίζονται σγουρές, θυσανώδεις και πιο μικρές σε σύγκριση με τις ρίζες αγρίου τύπου. Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται μία ρίζα αγρίου τύπου (wild type) και μία ρίζα με το φαινότυπο hairy root.



Εικόνα 2.1: Ρίζα αγρίου τύπου (wild type) και ρίζα με το φαινότυπο hairy root.

Έπειτα από τη μόλυνση των φυτών με το αγροβακτήριο, τα φυτά αναπτύχθηκαν σε τρυβλία μέχρι να εμφανίσουν το νέο ριζικό σύστημα. Τα φυτά φυτεύτηκαν σε πλαστικές θήκες με υπόστρωμα περλίτη / βερμικουλίτη για 20 ημέρες. Κάποια φυτά εμφάνισαν το φαινότυπο hairy root και κάποια όχι. Πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία από τις ρίζες όλων των φυτών και τα δείγματα ελέγχθησαν στο μικροσκόπιο για ανίχνευση φθορισμού GFP. Χρησιμοποιήθηκε μικροσκόπιο Leica DM2000 σε μεγέθυνση 10X με διεγείρουσα ακτινοβολία UV. Ρίζες που έδειξαν πιο έντονο φθορισμό σε σύγκριση με τις μη μετασχηματισμένες ρίζες θεωρήθηκαν ως θετικά μετασχηματισμένες και χρησιμοποιήθηκαν για εξαγωγή RNA και ταυτοποίηση της σίγησης. Οι μη μετασχηματισμένες ρίζες παρουσιάζουν φθορισμό σε μικρό βαθμό λόγω της παρουσίας φθορίζουσων ενώσεων στα τοιχώματα των ριζικών κυττάρων. Εντούτοις, τα μετασχηματισμένα φυτά με έντονο φθορισμό μπορούν να διακριθούν με μεγάλη ευκολία. Επιπλέον, στα ριζικά δείγματα των μετασχηματισμένων φυτών που ελέγχθησαν υπήρξε μία διαβάθμιση του φθορισμού. Αυτό μπορεί να οφείλεται στη θέση ενσωμάτωσης της κατασκευής στο φυτικό γονιδίωμα, η οποία επηρεάζει τα ποσοστά έκφρασης των γονιδίων. Παρακάτω φαίνονται φωτογραφίες από μετασχηματισμένες και μη μετασχηματισμένες ρίζες. Οι φωτογραφίες λήφθηκαν με φωτογραφική συσκευή Leica DFC 490, η οποία είναι

συνδεδεμένη στο μικροσκόπιο και στον ηλεκτρονικό υπολογιστή με το αντίστοιχο λογισμικό της Leica Microsystems.



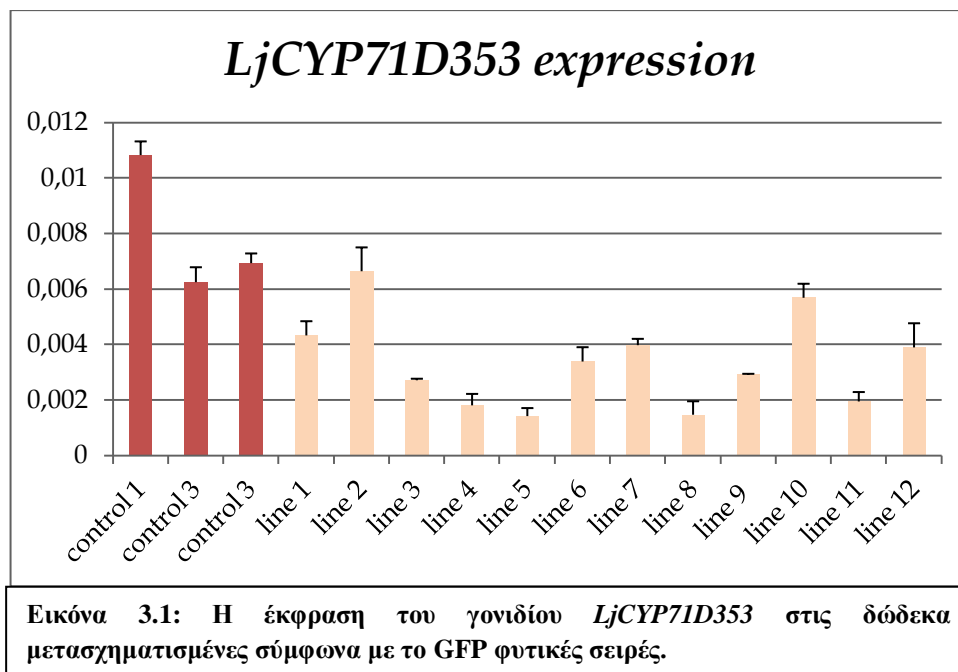
Εικόνα 2.2: Έλεγχος για φθορισμό GFP σε ρίζες φυτών *L. japonicus* μολυσμένων με το *Agrobacterium rhizogenes* που φέρει τη πλασμιδιακή κατασκευή pUbi-GWS-GFP-LjCYP71D353.

a, b, c : Θετικά μετασηματισμένες ρίζες

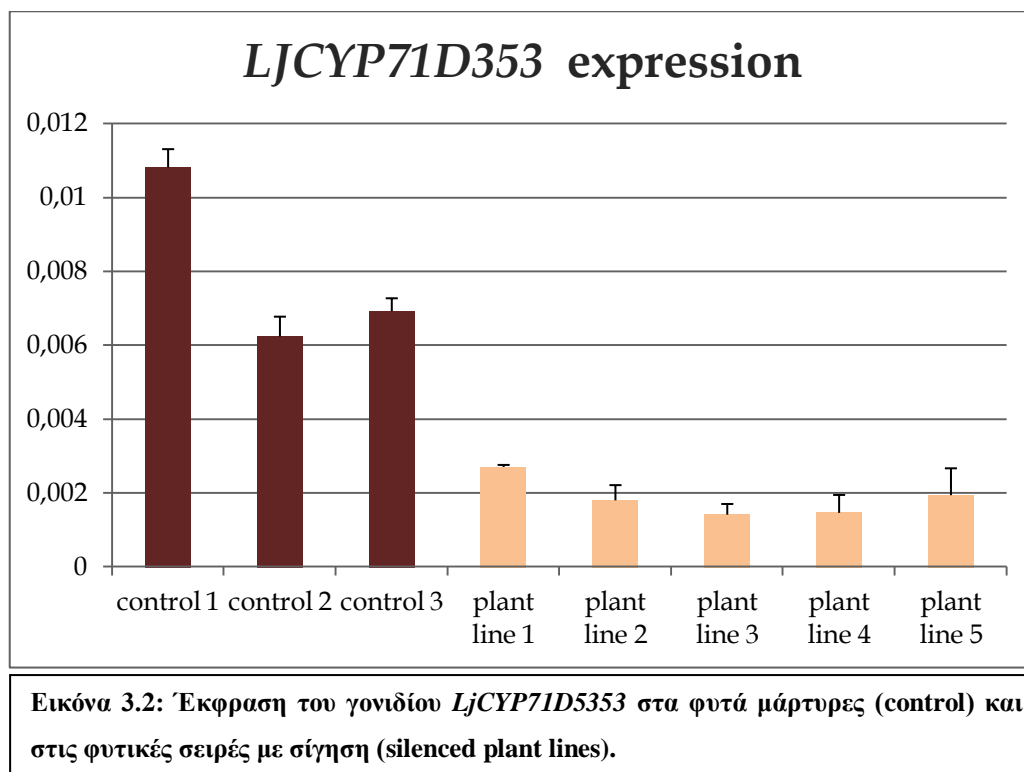
d: Μη μετασηματισμένη ρίζα

3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *LjCYP71D353* ΣΤΙΣ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΕΣ ΡΙΖΕΣ *Lotus japonicus*.

Ριζικός ιστός από συνολικά 12 μετασχηματισμένες ρίζες *L. japonicus* ηλικίας 20 ημερών χρησιμοποιήθηκαν για εξαγωγή ολικού RNA. Τα RNA δειγматы υπέστησαν χειρισμό με DNάση και κατασκευάστηκαν τα αντίστοιχα cDNA. Τα cDNA αυτά αφού κανονικοποιήθηκαν με το ενδογενές γονίδιο *LjUbiquitin*, χρησιμοποιήθηκαν σε αντίδραση Real-time PCR με εξειδικευμένους εκκινητές για το γονίδιο *LjCYP71D353*. Με τη Real-time PCR ανιχνεύτηκαν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *LjCYP71D353* σε όλες τις μετασχηματισμένες ρίζες και συγκρίθηκαν με τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *LjCYP71D353* στα φυτά μάρτυρες. Από τις 12 θετικά μετασχηματισμένες ρίζες με βάση το φθορισμό τους, προέκυψαν 5 ρίζες στις οποίες φαίνεται ότι η έκφραση του γονιδίου *LjCYP71D353* είναι εμφανώς μειωμένη σε σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες. Οι 12 μετασχηματισμένες φυτικές σειρές που ελέγχθησαν σε σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες φαίνονται στο γράφημα.



Οι 5 φυτικές σειρές που επιλέχθηκαν γιατί είναι μετασηματισμένες και παρουσιάζουν σίγηση του γονιδίου *LjCYP71D353* φαίνονται ξεχωριστά στο παρακάτω γράφημα.



Όπως φαίνεται στο γράφημα, δεν υπάρχει φυτική σειρά στην οποία να έχει προκληθεί πλήρης γονιδιακή σίγηση. Σε όλες τις φυτικές σειρές το γονίδιο *LjCYP71D353* έχει υποστεί μερική σίγηση, πιθανόν λόγω λειτουργικότητας της κατασκευής σίγησης. Επιπλέον, το ποσοστό σίγησης είναι διαφορετικό στις 5 silenced φυτικές σειρές, πιθανόν λόγω διαφορετικής θέσης ενσωμάτωσης στο φυτικό γονιδίωμα.

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων και ενζύμων που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των τριτερπενίων έχουν χαρακτηριστεί στα φυτά (Osbourn et al, 2011; Augustin et al, 2011; Sawai and Saito, 2011). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στη βρώμη και το *Arabidopsis thaliana* τα γονίδια που εμπλέκονται στα μονοπάτια βιοσύνθεσης τριτερπενοειδών οργανώνονται σε γονιδιακές συστοιχίες (clusters) στον ίδιο γενετικό τόπο (Chu et al, 2011). Το cluster στη βρώμη απαιτείται για τη σύνθεση αντιμικροβιακών συστατικών, γνωστών ως αβενασίνες, οι οποίες εμπλέκονται στην άμυνα του φυτού (Papadopoulou et al, 1999; Qi et al, 2004; Qi et al, 2006). Το πρώτο cluster που ανιχνεύτηκε στο *Arabidopsis* είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση και τροποποίηση του τριτερπενοειδούς θαλιανόλη (Field and Osbourn, 2008). Πρόσφατα αναφέρθηκε το δεύτερο cluster στο *Arabidopsis* που εμπλέκεται στη βιοσύνθεση του ασυνήθιστου τριτερπενοειδούς *marneral* (Field et al, 2011). Τα τελευταία χρόνια ο αριθμός των clusters που έχουν ταυτοποιηθεί σε διάφορα φυτικά είδη και εμπλέκονται στο δευτερογενή μεταβολισμό του φυτού έχει αυξηθεί σημαντικά (Chu et al, 2011; Takos et al, 2011). Ενδιαφέρον, επίσης, παρουσιάζει το γεγονός ότι για όλα τα χαρακτηρισμένα clusters υπάρχουν ενδείξεις ή και αποδείξεις εμπλοκής τους στην άμυνα του φυτού έναντι μικροβίων, παθογόνων ή στην ανθεκτικότητα σε καταπονήσεις (Papadopoulou et al, 1999; Wilderman et al, 2004; Shimura et al, 2007; Ahmad et al, 2011; De Silva et al, 2011).

Ο αυστηρός συντονισμός ρύθμισης των γονιδίων που μετέχουν στις συστοιχίες εξασφαλίζει ότι τα τελικά προϊόντα των μονοπατιών παράγονται μόνο στο σωστό μέρος και την κατάλληλη στιγμή. Επιπλέον, με τη συνρύθμιση αποτρέπεται η ακούσια συσσώρευση επιζήμιων ενδιάμεσων του μεταβολισμού (Chu et al, 2011). Η συσσώρευση υψηλών επιπέδων μεταβολικών ενδιάμεσων στα μονοπάτια των συστοιχιών σε βρώμη και *Arabidopsis*, έδειξε ότι συνοδεύεται με επιζήμια επίδραση στη φυτική αύξηση και ανάπτυξη (Field and Osbourn, 2008; Mylona et al, 2008; Field et al, 2011). Η τοξικότητα ορισμένων ενδιάμεσων στα μονοπάτια αυτά μπορεί να συνεισφέρει στην φυσική επιλογή για σχηματισμό και διατήρηση των συστοιχιών (Chu et al, 2011).

Στο φυτό *L.japonicus* έχουν χαρακτηριστεί οκτώ γονίδια που κωδικοποιούν για συνθάσες ή κυκλάσες του 2,3-οξιδοσκουαλενίου, ένζυμα που μετατρέπουν το 2,3-

οξειδοσκουαλένιο σε κυκλικές τριτερπενοειδείς αλκοόλες (Iturbe-Ormaetxe et al, 2003; Sawai et al, 2006). Το γονίδιο *AMY2* κωδικοποιεί για μία κυκλάση μικτής δράσης, η οποία μπορεί να παράγει λουπεόλη και β-αμυρίνη (Iturbe-Ormaetxe et al, 2003). Το γονίδιο *AMY2* εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 3 του *L.japonicus* (Sawai et al, 2006). Η γονιδιωματική περιοχή στην οποία ανήκει το γονίδιο *AMY2* διερευνήθηκε για παρακείμενα γονίδια υποψήφια να συμμετέχουν σε παρόμοιο cluster βιοσύνθεσης τριτερπενοειδών. Ενδιαφέρον παρουσίασε το γεγονός ότι στη γενωμική περιοχή εντοπίστηκαν δύο γονίδια που κωδικοποιούν για ένζυμα δύο διαφορετικών κλάσεων των ενζύμων του κυτοχρώματος P450 (οικογένειες CYP88D και CYP71D) και ένα γονίδιο που πιθανολογείται να κωδικοποιεί για μία ρεδοκτάση (Krokida et al, Μη δημοσιευμένα αποτελέσματα). Το ένζυμο LjCYP71D353 βρέθηκε ότι είναι γενετικά κοντά με το ένζυμο CYP71A16 το οποίο συμμετέχει στο cluster βιοσύνθεσης του marneral (Field et al, 2011). Η ταυτόχρονη υπερέκφραση των γονιδίων *AMY2*, *LjCYP71D353* και *LjCYP88D* στο *Nicotiana benthamiana* προσδιόρισε μία καινούρια δομή τριτερπενίου, τη dihydrolupeol. Επιπλέον, το ένζυμο LjCYP71D353 χαρακτηρίστηκε βιοχημικά, καθώς οξειδώνει περαιτέρω τη dihydrolupeol προς το μόριο 20-hydroxybetulinic acid (αδημοσίευτα αποτελέσματα). Επομένως, αποδείχτηκε ότι το ένζυμο LjCYP71D353 μετέχει στη βιοσύνθεση τριτερπενοειδών στο *L.japonicus* (Krokida et al, Μη δημοσιευμένα αποτελέσματα).

Η εργασία αυτή είναι μία προσπάθεια αποσιώπησης του γονιδίου *LjCYP71D353* στο φυτό *L.japonicus*. Επομένως, μπορεί να παρέχει πληροφορίες για την επίδραση στη βιοσύνθεση τριτερπενοειδών όταν απουσιάζει ένα ένζυμο του βιοχημικού μονοπατιού.

Φυτά *L.japonicus* συγκαλλιεργήθηκαν με στέλεχος *A.rhizogenes*, το οποίο φέρει κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα για την απενεργοποίηση του γονιδίου *LjCYP71D353*. Τα φυτά παρέμειναν σε τρυβλία μέχρι να εμφανίσουν ριζικό σύστημα και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε πλαστικές θήκες με υπόστρωμα περλίτη / βερμικουλίτη. Έπειτα από είκοσι ημέρες, τα μετασχηματισμένα φυτά επιλέχθηκαν στο μικροσκόπιο καθώς ο πλασμιδιακός φορέας φέρει το γονίδιο αναφοράς που κωδικοποιεί για τη πρωτεΐνη πράσινου φθορισμού. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε εξαγωγή RNA από τα μετασχηματισμένα φυτά και κατασκευή cDNA. Τελικά, με χρήση εξειδικευμένων εκκινήτων για το γονίδιο *LjCYP71D353* σε αντίδραση Real-time PCR βρέθηκε ποιες φυτικές σειρές παρουσιάζουν σίγηση του γονιδίου *LjCYP71D353*. Από τις δώδεκα φυτικές σειρές που επιλέχθηκαν στο μικροσκόπιο ως μετασχηματισμένες, οι πέντε

παρουσιάζουν γονιδιακή σίγηση του *LjCYP71D353* σε σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες. Όπως φαίνεται στο γράφημα στα αποτελέσματα, όλα τα φυτά έχουν διαφορετικό ποσοστό σίγησης του *LjCYP71D353*. Επιπλέον, καμία φυτική σειρά δε παρουσιάζει πλήρη σίγηση, αν και υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές ότι μία RNA φουρκέτα μπορεί να προκαλέσει πλήρη γονιδιακή σίγηση. Πιθανόν η κατασκευή δεν εκφράζεται σε αρκετά υψηλό βαθμό ώστε να προκαλέσει πλήρη σίγηση, λόγω της θέσης στην οποία ενσωματώθηκε στο DNA. Εναλλακτικά, ενδέχεται οι ρίζες των φυτών να είναι χμιαρικές, δηλαδή να απαρτίζονται από κύτταρα στα οποία έχει ενσωματωθεί η κατασκευή σίγησης και από κύτταρα αγρίου τύπου. Επομένως, το μεταγράφημα του *LjCYP71D353* μπορεί να ανιχνεύεται στα κύτταρα αγρίου τύπου αλλά όχι στα επίπεδα που εκφράζεται στα φυτά μάρτυρες.

Μέχρι τώρα, έχουν δημιουργηθεί φυτικές σειρές που να παρουσιάζουν σίγηση του γονιδίου *AMY2* και φυτικές σειρές με σίγηση του *LjCYP88D5*. Στις φυτικές αυτές σειρές έχει μελετηθεί το πρότυπο έκφρασης όλων των υποψήφιων γονιδίων του cluster της *AMY2* (αδημοσίευτα αποτελέσματα). Μελλοντικά, στις πέντε φυτικές σειρές με σίγηση του γονιδίου *LjCYP71D353* θα μελετηθεί το πρότυπο έκφρασης όλων των υπόλοιπων υποψήφιων γονιδίων του cluster της *AMY2*. Επιπλέον, σε πειραματική επανάληψη σίγησης του γονιδίου *LjCYP71D353* θα μπορούσε να μελετηθεί αν το γονίδιο *LjCYP71D353* εμπλέκεται στη συμβιωτική σχέση με το ριζόβιο βακτήριο *Mesorhizobium loti*, μέσω παρατήρησης του αριθμού και της λειτουργικότητας των φυματίων. Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος αγροβακτηρίου το οποίο προκαλεί μόνο μετασχηματισμένες ρίζες. Επομένως, δεν είναι δυνατή η δημιουργία φυτών που να μπορούν να κληρονομήσουν την ιδιότητα στους απογόνους σταθερά. Επειδή αποδείχτηκε ότι το γονίδιο *LjCYP71D353* εμπλέκεται στο βιοσυνθετικό cluster της *AMY2* (αδημοσίευτα αποτελέσματα), μία μελλοντική πειραματική προσέγγιση είναι η δημιουργία σταθερά μετασχηματισμένων φυτών μέσω *Agrobacterium tumefaciens*. Οι διαγονιδιακές φυτικές σειρές θα χρησιμοποιηθούν σε πειράματα ανάλυσης περιεχόμενων μεταβολιτών και θα δώσουν περαιτέρω ενδείξεις και πληροφορίες για το βιοσυνθετικό μονοπάτι και για το cluster της *AMY2*.

Ε. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΥΛΙΚΩΝ - ΜΕΘΟΔΩΝ

1. Αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν για την επιλογή των βακτηριακών στελεχών που φέρουν τις πλασμιδιακές κατασκευές.

Αντιβιοτικό	Stock διαλύματα ***			Συγκέντρωση στο θρεπτικό υλικό**
	Συγκέντρωση*	διαλύτης	Θερμοκρασία φύλαξης	
Αμπικιλίνη(Amp)	100mg/ml	ddH ₂ O	-20 ⁰ C	100μg/ml
Καναμικίνη(Kan)	50mg/ml	ddH ₂ O	-20 ⁰ C	50μg/ml
Ριφαμικίνη(Rif)	25mg/ml	μεθανόλη	-20 ⁰ C	50μg/ml
Σπεκτινομυκίνη(Spe)	50mg/ml	ddH ₂ O	-20 ⁰ C	250μg/ml
Σεφοταξάμη(Cef)	200mg/ml	ddH ₂ O	-20 ⁰ C	200μg/ml

2. Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία, τα κυριότερα χαρακτηριστικά τους και συνθήκες ανάπτυξης.

Όνομασία στελέχους	Χαρακτηριστικά	Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης θερμοκρασία
DH5a	Στέλεχος <i>E.coli</i> που χρησιμοποιείται για μετασχηματισμό με πλασμίδια κατά την διαδικασία κατασκευής τους. Έχει υποστεί ένα έλλειμμα στο οπερόνιο lac, οπότε είναι συμβατό με blue/white screening.	LB 37 ⁰ C
LBA 1334	Στέλεχος <i>A.rhizogenes</i> το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την μεταφορά και ενσωμάτωση της κατασκευής στο φυτικό γένωμα με συνέπεια την παραγωγή μετασχηματισμένων hairy roots.	YEB/YEP/LB 28 ⁰ C

	Έχει ενδογενή ανθεκτικότητα στην ριφαμπικίνη (χρωμοσωμικός τόπος) και στην σπεκτινομυκίνη, εξαιτίας του Ri πλασμιδίου της αγροπίνης, το οποίο έχει διατηρημένα τα <i>vir</i> και τα <i>rol</i> γονίδια για τη μεταφορά T-DNA στο φυτικό γένωμα, αλλά απενεργοποιημένα τα γονίδια παραγωγής οπινών.	
R7A	Στέλεχος <i>Mesorhizobium loti</i> της οικογένειας <i>Rhizobiaceae</i> . Χρησιμοποιήθηκε για την επαγωγή φυματίων στις μετασχηματισμένες ρίζες του <i>Lotus japonicus</i>	YMB/TYR 30°C
DB3.1	Στέλεχος <i>E.coli</i> που χρησιμοποιείται για μετασχηματισμό με πλασμίδια. Φέρει το γονίδιο <i>ccdA</i> οπότε παρουσιάζει ανθεκτικότητα στο <i>ccdB</i> που προκαλεί διάσπαση δικλωνού DNA μέσω της γυράσης. Ως εκ τούτου χρησιμοποιείται για διατήρηση πλασμιδίων που φέρουν αυτό το γονίδιο.	LB 37°C

3. Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης και συντήρησης βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στη πειραματική διαδικασία.

Ονομασία θρεπτικού υλικού	Είδος βακτηρίου για το οποίο χρησιμοποιείται	Συστατικά
LB	<i>E.coli, A.rhizogenes</i>	1%(w/v) NaCl, 1%(w/v) καζεΐνη 0,5 %(w/v) yeast extract 1,5 %(w/v) (για τρυβλίο)
YEB/ YEP	<i>A.rhizogenes</i>	1%(w/v) peptone bacteriological 1%(w/v) yeast extract 0,5 %(w/v) NaCl 0,124 g MgSO ₄ *7H ₂ O 1,5 %(w/v) άγαρ(για τρυβλίο)
TYR	<i>Mesorhizobium loti</i>	0,3%(w/v) yeast extract 0,5%(w/v) tryptone 1,8 ml CaCl ₂ 0,5 M
YMB (Yeast Mannitol Broth)	<i>Mesorhizobium loti</i>	1%(w/v) μαννιτόλη 0,05%(w/v) K ₂ HPO ₄ 0,02%(w/v) MgSO ₄ 0,01%(w/v) NaCl 0,05%(w/v) yeast extract

4. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη.

LjUbiquitin F	5'- ATGCAGATCTTTTGTGAAGAC-3'
LjUbiquitin R	5'- ACCACCACGGAAGACGGAG-3'
Rt-Lj Ubiquitin F	5'-TTCACCTTGTGCTCCGTCTTC-3'
Rt-Lj Ubiquitin R	5'AACAACAGCACACAGCCAATCC-3'
LjCYP71D NcoI	5'-CCTCCATGGGCCAAAGAGGTGTTGAA-3'
LjCYP71D SalI	5'-CCTGTCGACCCAAAAGCTGCCCTTGCA-3'
RtCYP71D F	5'-ACATTAAGCCGTTCTTCAGGAC-3'
PtCYP71D R	5'-CCTCAACATACCCTCTGCTACC-3'

Οι εκκινητές LjCYP71D NcoI και LjCYP71D SalI φέρουν ένζυμα στα άκρα προκειμένου να γίνει η υποκλωνοποίηση στον ενδιάμεσο φορέα pENTR4. Η αλληλουχία των ενζύμων φαίνεται υπογραμμισμένη.

5. Ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη και οι αλληλουχίες που αναγνωρίζουν. Με τα βέλη σημαίνονται οι θέσεις περιορισμού.

NcoI	5'... <u>CCATGG</u> ...3' 3'...GGTACC...5'
SalI	5'... <u>GTCGAC</u> ...3' 3'...CAGCTG...5'

6. Θρεπτικά μέσα για ανάπτυξη των φυτών

B5 (στερεό υπόστρωμα 0.8% άγαρ)

3,87g/L B5 basal salt mix

20g/L sucrose

8g/L άγαρ

Σε αποσταγμένο H₂O

Ρύθμιση pH στο 5.5 με προσθήκη NaOH 1N

Αποστείρωση σε αυτόκαυστο.

Μετά την αποστείρωση προστίθεται διάλυμα B5 vita' mix για τελική συγκέντρωση

1x και αν είναι επιθυμητό 10ml/L διάλυμα Cef 30mg/ml

Jensen Μέσο

Συστατικά	Stock διάλυμα	ml/l
CaHPO ₄	100g/l	1
K ₂ HPO ₄	20g/l	1
MgSO ₄ 7H ₂ O	20g/l	1
NaCl (20g/l)	20g/l	1
Fe citrate*	-	0,010 g
Na ₂ MoO ₄ 4H ₂ O	40g/l	2,5
Mixed stock*		2,5
H ₃ BO ₃	12,7 g/l	2,5

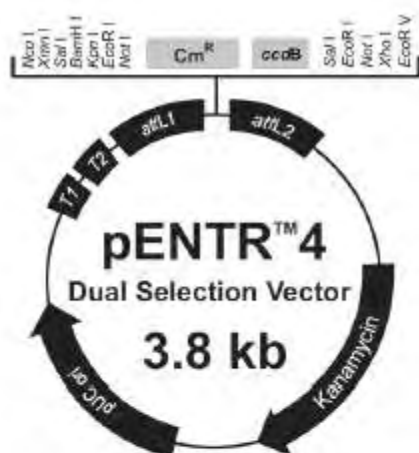
Πίνακας 12: Σύσταση

* Το Fe citrate ως φωτοευαίσθητο δεν παρασκευάζεται για αυτό μητρικό διάλυμα αλλά προστίθεται κατευθείαν στο τελικό διάλυμα.

Συστατικό	Ποσότητα(g/l)
CuSO ₄ *5H ₂ O	3,5
MnSO ₄ *4H ₂ O	61
ZnSO ₄ *7H ₂ O	9,7

Πίνακας 13: Σύσταση Mixed stock του Jensen

7. Πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη



pENTR4™: Αποτελεί έναν από τους φορείς διπλής επιλογής (entry vector) για κλωνοποίηση τμημάτων DNA που θα χρησιμοποιηθούν σε αντιδράσεις της τεχνολογίας Gateway (Invitrogen).

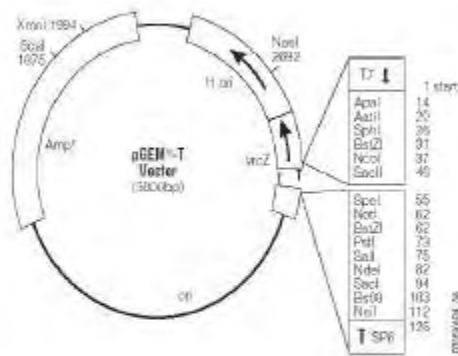
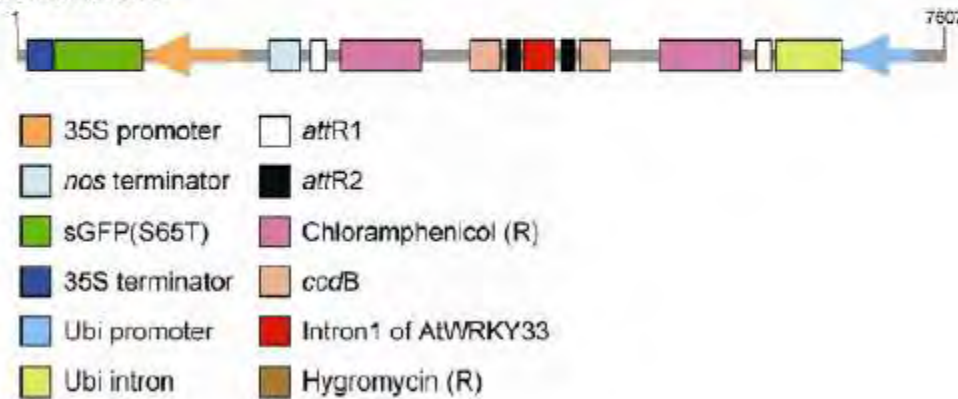
Περιέχει αλληλουχία τερματισμού *trnB* για αναστολή έκφρασης του ενσωματωμένου DNA σε *E. coli*, θέσεις *attL1* και *attL2* για κατευθυνόμενο ανασυνδυασμό με φορέα προορισμού

(destination vector) χρησιμοποιώντας αντίδραση LR Clonase. Φέρει επίσης πλαίσιο Kozac για βελτιωμένη έκφραση του ενσωματωμένου DNA σε ευκαρυωτικά συστήματα, κασέτα διπλής επιλογής με γονίδιο ανθεκτικότητας στη χλωραμφενικόλη (CmR) και το θνησιγόνο γονίδιο *ccdB* (προκαλεί θάνατο σε συνηθισμένα στελέχη όπως DH5α και TOP10) ανάμεσα στις θέσεις *attL*, γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη για επιλογή σε *E. coli* και αλληλουχία αντιγραφής του *pUC* για διατήρηση σε *E. coli* (medium-low copy number). Λόγο του γονιδίου *ccdB* η διατήρηση του φορέα γίνεται σε βακτηριακά στελέχη με το γονίδιο *ccdA* που αναιρεί τη δράση του *ccdB* (τέτοια στελέχη είναι το TOP10F' και DB3.1). Η ενσωμάτωση του επιθυμητού τμήματος DNA γίνεται ώστε να αντικατασταθεί η κασέτα διπλής επιλογής, οπότε ο ανασυνδυασμένος φορέας μπορεί να μετασχηματιστεί σε συμβατικό στέλεχος *E. coli* το οποίο θα είναι ευαίσθητο στην Chloramphenicol αλλά ανθεκτικό σε Kanamycin.

pUBI-GWS-GFP: Κατασκευάστηκε και περιγράφηκε αναλυτικά από τους Maekawa et al 2007. Είναι δυαδικός φορέας, βασίζεται στον κορμό του pCambia 1300 (περιγράφηκε προηγουμένως), μόνο που στην περιοχή T-DNA φέρει, αντί για γονίδιο ανθεκτικότητας σε Hygromycin, γονίδιο GFP για έκφραση σε φυτικά κύτταρα. Επίσης το MCS έχει αντικατασταθεί από κατασκευή για έκφραση RNA

φουρκέτας. Η κατασκευή εκφράζεται υπο τον έλεγχο του υποκινητή LjUbiquitin1 μαζί με μικρό τμήμα του πρώτου ιντρονίου ενώ τερματίζεται από την αλληλουχία τερματισμού nos. Στο ενδιάμεσο υπάρχουν κασέτες διπλής επιλογής CmR και ccdB (βλέπε pENTR4™) ανάμεσα σε θέσεις ανασυνδυασμού attR1 και attR2 δύο φορές εκατέρωθεν του ιντρονίου AtWRKY για άμεση εισαγωγή του επιθυμητού τμήματος DNA και με τις δυο κατεύθυνσης από φορέα εισαγωγής (entry vector) χρησιμοποιώντας αντίδραση LR Clonase. Στο επόμενο σχήμα φαίνεται το T-DNA του φορέα ξεκινώντας από το αριστερό συνοριακό.

pUB-GWS-GFP



RNA πολυμεράσης.

pGemT-easy™: Χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση τμημάτων. Προσδίδει ανθεκτικότητα στην ampicillin και έχει μέγεθος 3,0 kb. Δίνει την δυνατότητα άμεσης κλωνοποίησης τμημάτων μέσω TA cloning, εντός lacZ γονιδίου. Περιέχει θέση έναρξης της αντιγραφής για το *E.coli*. διαθέτει εκατέρωθεν του MCS T7 & SP6 εκκινητές για την πρόσδεση της

TAACAGTTTGGCATTCAGCCCTGACACAAATAGGACTACCTATTTGATTTGGCTCCCTCCCTGGCACTGCC
70
ATTGTCAAACCGTAAAGTGGACGCTTTTATCTCAGTGGAAATAACAAAGAGAGGGAGGACGTCAGCG
3
- Q F G I Q P A Q I G L T L L L I C S P S L H C
1
N S L A F S L H K . D S P Y . F A L P P C T A
2
L T V W H S A C T N R T H L I D L L S L P A L P
0
5
CTTTTGCTAATGATGGAGGATCATTCTTATCCTTCCCCATCCTTCTCAGTCTTATGGTCTCTTAATGT
0
GAAAACGATTACTACCTCCTAGTAAAGAATAGGAAGGGTAGGAAGAGTCAAGATACCAGGAGAATTACA
3
P F A N D G G S F L I L P H P S Q S Y G P L N V
1
L L L M M E D H F L S F P I L L S L M V L L M
2
F C . . W R I I S Y P S P S F S V L W S S . C
0
5
TTATGATCCTAAGAGATTTAAAACCAACACAGCCCTCAATCTTCCACCAGGGCCATGGAAGCTGCC
0
AATACTAGGATCTCTAAATTTTGGTGTGTGTCGGAGGTAGAGGTTGGTCCCGGTACCTTCGACGG
3
Y D P K E I . N H K H S L Q S S T R A M E A A
1
F M I L K R F K T T N T A S N L F P P G H W K L P
2
L . S . R D L K P Q T Q P P I F H Q G H G S C
0
5
AATTTTCGGAAGCATACACCACCTCATTGGCTCCCTTCCCACCACCCGCTGAGAGGTTATCCAAAGAAA
0
TTAAAAGCCTTCGTATGTGGTGGAGTAACCGAGGGAAGGGTGGTGGCGGACTCTCTCAATAGTTCCTT
3
TAAAAGCCTTCGTATGTGGTGGAGTAACCGAGGGAAGGGTGGTGGCGGACTCTCTCAATAGTTCCTT
0
5
N F R K H T P P P H W L P S P P P P P E R V I Q E
1
I F G S I H H L I G S L P H H R L R E L S K K
2
Q F S E A Y T T S L A P P T T A . E S Y P R N
0
5
TATGCCCTCTCATGCACCTGCAACTGGAGAGACATCAGCCATTGTGGTTTCTTTCAGAAATGGCA
0
ATACCGGAGAGTACGTGGACGTTGAACCTCTCTGTAGTCGGTAACACCAAGAAGTCTTTAACGGT
3
I W P S H A P A T W R D I S H C G F F F R N C Q
1
Y G P L M H L Q L G E T S A I V V S S E I A
2
M A L S C T C N L E R H Q P L W F L L Q K L P
0
5
AAGAGGTGTGAAAACATCAATAACATTTGCTCAACGACCTCGATCACTTGGTGCAGAAATACAAC
0
TTCTCCACAACTTTTGGTACTTTAGTGTAAACGAGTTGCTGGAGCTAGTGAACACGCTTTAATGTGT
3
R G V E N S . N H I C S T T S I T W C R N Y N
1
K E V L K T H E I T F A Q R P R S L G A E I T T
2
K R C . K L M K S H L L N D P L D H L V Q K L Q
0
5
TTATGGTTTCACTGACATTCGCTTTTATCATATGGAGACTACTGGAGGACGTAAGAAAATATGCGCA
0
AATACCAAGTACTGTAACGAAAAGTAGTATACCTCTGATGACCTCCGTCGATCTTTTATACGCGT
3
L W F F H . R C L F A I W K N M R
1
Y G F T D I A F S S Y G D Y W R Q L R K I C A
2
L M V S L T L P F H H M E T T G G S . E K Y A H
0
5
CTGGAGCTGTGAGTCTAAATGTGGCATCATTCCATTCAATTAGGAGGAGAGGTATCAAAATTTAA
0
GACCTCGACAACCTCAAGATTTACACAGCTAGTAAAGTAACTTCCCTCCTTCTCCATAGTTAAAT
3
T G A V E C . M C A I I P F N . G G R G I K F N
1
L E L L S A K C V R S F H S I R E E E V S N L
2
W S C . V L N V C D H S I Q L G R K R Y Q I .
0
5
TAAGATATATATCTATGAACACCGGATCATGTCAACCTCACGGATATAGTTTTATCTATGACATATAG
0
ATTCATATATAGTACTTTGGCCCTAGTACACAGTTGGAGTGCCTATATCAAAATAGTACTGTATATC
3
K I Y I Y E H R I M C Q P H G Y S F I Y D I .
1
I R Y I S M N T G S C V N L T D I V L S M T Y S
2
. D I Y L . T P D H V S T S R I . F Y L . H I
0
5
CATAGTTGCAAGGGCAGCTTTTGGTATAAATGCAAGGACCAAGAAGCATATATCCTTTCATGAAGAAA
0
GTATCAACGTTCCCGTCAAAAACCACTATTACGTTCCCTGCTTCTCGTATATAGGAGAAGTACTTCTTT
3
GTATCAACGTTCCCGTCAAAAACCACTATTACGTTCCCTGCTTCTCGTATATAGGAGAAGTACTTCTTT
0
5
H S C K G S F W . . M Q G P R S I Y P L H E E
1
I V A R A A F G D K C K D Q E A Y I L F M K K
2
A . L Q G Q L L V I N A R T K K H I S S S . R K
0
5
AGTATGAGAGTGGCTGAAAGTTTCAAGTACTAATTTGTTCCCTTCCCAACGCTGGCTACTTGTGATTA
0
TCATACTTCCAGGACTTTCAAGTCACAATGATTAACAAGGAGGGTTGGACCGATGAACACTAAT
3
K Y E S G . K F Q C Y . F V S F P T L A T C D .
1
S M R V A E S F S V T N L F P S Q R W L L V I
2
V . E W L K V S V L L I C F L P N A G Y L . L
0
5
GTGGAGCATGAATAAATTAAGGAATTCATAGAATCTGACAAAGTTCTAGAAAAATCATCACTGA
0
CACCTCGCTACTTAAATTTTAAAGTATCTGATGACTGTCCAAGTCTTTTGTAGTACTGACT
3
W S D E . I . G I A . N Y . Q G S R K N H H .
1
S G A M N K F K E L H R T T D K V L E K I I T E
2
V E R . I N L R N C I E L L T R F . K K S S L
0
5
AGCAACGAAAGAGTGGTGGAGTGAAGTCTTCTTCTATTTTGAATCTGAAAGATCATGGTGAC
0
TCGTTGCTTCTTCCACCACTTACCTTCAAGAAAGATAAGAAAACCTTAGACTTTCTAGTACCCTG
3
S N S K E W W R W K S S F Y S F E S E R S W .
1
A T A K S G G D G S L L S I L L N L K D H G D
2
K Q Q Q R V V E M E V F F L F F . I . K I M V T
0
5
CCTGAATTCATTGACCATCAACAATTAAGCCCTTCTCAGGACATGTTATTGCTGGAATGAGA
0
GGACTTAAAGTAAACTGGTAGTTGTTAATTTCCGCAAGAGTCTGTACAAATAACGACCTTCACTCT
3
P . I S F D H Q Q H . S R S S G H V Y C W K . D
1
P E F H L T I N N I K A V L L Q D M F I A G S V R
2
L N F I . P S T T L K K P F F R T M F I A G S V R
0
5
CATCATCTACAGTTTGAATGGACTTCTCAGAAATGCTGAAGAACCAGAGTGTGAAAAGGGCTCA
0
GTAGTAGTGGTCAAACTTACCTGAAAGAGTCTTTACGACTTCTGGGTTCTCACTACTTTTCCCGAGT
3
I I Y Q F G M D F L R N A E E P K S D E K G S
1
T S S T S L E W T F S E M L K N P R V M K R A Q
2
H H L P V W N G L S Q K C . R T Q E . . K G L
0
5
AGCAGAAGTAGGCAAGTTTTTGGTAGCAGAGGTATGTTGAGGAAATGGCTCTTGAAGAACTGAAATTT
0
TCGTTTCAATCCGTTCAAAAACCATCGTCTCCATACAACCTTACCAGAACTTCTGACTTTAAA
3
S R S . A S F W . Q R V C . G N G S . R T E I
1
A E V R Q V F G S R G Y V E E M A L E E L K F
2
K Q K L G K F L V A E G M L R K W L L K N . N F
0
5
TTAAAAGCAGTATTAAGAAACTTTGAGATTACACCCCTTATCTCTTTATTTCAAGAGAGTGGTGT
0
TTTGACACTCTAACTACCAATGTGTATGGTATCCTTGGGTTTCAATTAACACTTATGTACCCTTAACC
3
N V . D . W L H N T S R N P S N C E Y M G N W
1
E T C E I D G Y T I P V G T Q V I V N T T W A I G
2
K R V R L M V T Q Y Q . E P K . L . I H G Q L
0
5
AAGAGACCTTTGGTGGAGTGAAGAAGAGATTTTATCCTGAGAGATTCCTGGATTGTCCAATGACTAC
0
TTCTCTGGAACGACCTCACTTCTCTTCAAAATAGGACTCTTAAGGACCTAACAGGTTAACTGATG
3
K R P L L L S R R E V L S R I P G L S N . L
1
R D L C W S E E E K F Y P E R F L D C P I D Y
2
E E T F A G V K K R S F I L R D S W I V Q L T T
0
5
AAGGGTCCAATTTGAATTCATACCTTTGGTGCAGGAAAGAGAACTGTCCTGGCATTTTGTTGGCTC
0
TTCCCCAGTTAAACTTAAGTATGAAACACAGTCTTCTCTAGACAGGACCTTAAACAAACGAG
3
Q G V Q F . I H T F W C R K E N L S W H I L V C S
1
K G S N F E F I P F G A G K R I C P G I L F A
2
R G P I L N S Y L L V Q E R E S V L A F C L L
0
5
TACCAAAATTTGACTCCCTCAGACAAATGCTGACTATTTTGAATGGGAACTTCCATTTGGAACATG

8. Το γονίδιο πλήρους μήκους *LjCYP71D353* και οι εκκινητές που ενίσχυσαν το τμήμα που χρησιμοποιήθηκε στη κατασκευή της αποσιώπησης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Connolly, J.D. and Hill, R.A. 1991. Dictionary of Terpenoids. 1st Edn., Chapman and Hall, London, New York, ISBN: 041225770X, pp: 80-182
2. McGarvey D. J. and Croteau R. 1995. Terpenoid Metabolism. *The Plant Cell*, 7:1015-1026
3. Langenheim J. H. 1994. Higher plant terpenoids: A phytocentric overview of their ecological roles. *Journal of Chemical Ecology* 20: 1223-1280
4. Phillips 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
5. Vincken JP, Heng L., de Groot A and Gruppen H. 2007. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*. 68:275–297
6. Graham P.H. and Vance C.P. 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* 131, 872–877
7. Long S.R. 1989. Rhizobium – legume nodulation: life together in the underground. *Cell* 56:203-14
8. Smil V. 1999 Nitrogen in crop production: an account of global flows. *Global Biogeochemical Cycles* 13:647-662
9. Handberg K., Stougaard J. 1992. *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *Plant Journal* 2:487-496
10. Udvardi M., Tabata S., Parniske M., Stougaard J. 2005. *Lotus japonicus*: legume research in the fast lane. *TRENDS in Plant Science*. 10:222-228.
11. Katzen F. 2007. Gateway® recombinational cloning: a biological operating system. *Expert Opinion in Drug Discovery*. 2:571-589
12. Sinkar V.P., White F.F. and Gordon M. P.1987. Molecular biology of Ri plasmid—A review. *Journal of Biosciences* 11:47–57
13. Zhu J., Oger P.M., Schrammeijer B., Hooyakas P.J.J., Farand S.K. and Winans S.C. 2000. The Bases of Crown Gall Tumorigenesis. *Journal of Bacteriology*. 182:3885–3895
14. White F.F., Taylor B.H., Huffman G.A., Gordon M.P. and Nester E.W. 1985. Molecular and Genetic Analysis of the Transferred DNA Regions of the Root-Inducing Plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of Bacteriology*. 164:33-44

15. Chilton M.D., Tepfer D.A., Petit A., David C., Casse-Delbert F. and Tempe J. 1982. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature*. 295:432-434
16. Zambryski P., Joos H, Genetello C., Leemans J., Van Montagu and Schell J. 1983. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of the normal regeneration capacity. *EMBO J* 2:2143-2150
17. Gustavo A., González-Cabrera J., Vázquez-Padrón R., Ayra-Pardo C. 1998. The *agrobacterium tumefaciens* gene transfer to plant cell. *Electronic Journal of Biotechnology*.
18. Stougaard J., Abildsten D. and Marcker K.A. 1987. The *Agrobacterium rhizogenes* Ri TL-DNA segment as a gene vector system for transformation of plants. *Molecular General Genetics*. 207:251-255
19. Limpens E, Ramos J, Franken C, Raz V, Compaan B, Franssen H, Bisseling T and Geurts R 2004 RNA interference in *Agrobacterium rhizogenes* transformed roots of *Arabidopsis* and *Medicago truncatula*. *Journal of Experimental Botany* 55:983–992
20. Martirani L, Stiller J, Mirabella R, Alfano F, Lamberti A, Radutoiu SE, Iaccarino M, Gresshoff PM, Chiurazzi M (1999) A fast and efficient 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
21. Kumagai H. and Kouchi H. 2003. Gene silencing by expression of hairpin RNA in *Lotus japonicus* roots and root nodules. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 16:663-668
22. Sharp P.A. 2001. RNA interference—2001. *Genes and Development*. 15:485– 490
23. Wesley S.V., Helliwell C.A., Smith N.A., Wang M.B., Rouse D.T., Liu Q., Gooding P.S., Singh S.P., Abbott D., Stoutjesdijk P.A., Robinson S.P., Gleave A.P. and Waterhouse P.M. 2001. *Plant Journal*. 27:581–590
24. Helliwell C. and Waterhouse P. 2003. Constructs and methods for highthroughput silencing in plants. *Methods* 30:289-295.
25. Maekawa T., Kusakabe M., Shimoda Y., Sato S., Tabata S., Murooka Y. and Hayashi M. 2007. Polyubiquitin promoter-based binary vectors for overexpression and gene silencing in *Lotus japonicus*. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 21:375-382

26. Papadopoulou K., Melton RE, Leggett M, Daniels MJ, Osbourn AE. (1999): Compromized disease resistance in saponin-deficient plants. *Proc Natl Acad Sci*, 12923-12928.
27. Haralampidis K., Bryan G., Qi X., Papadopoulou K., Bakht S., Melton R., Osbourn A. (2001): A new class of oxidosqualene cyclases directs synthesis of antimicrobial phytoprotectants in monocots. *Proc Natl Acad Sci*, 13431-13436.
28. Sawai S., Shindo T., Sato S., Kaneko T., Tabata S., Ayabe S., Aoki T. (2006): Functional and structural analysis of genes encoding oxidosqualene cyclases of *Lotus japonicus*. *Plant Science*, 170: 247-257.
29. Seki H, Ohyama K, Sawai S, Mizutani M, Ohnishi T, Sudo H, Akashi T, Aoki T, Saito K, Murunaka 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.
30. Gershenzon J, McConkey ME, Croteau RB. Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint. *Plant Physiol.* 2000 Jan;122(1):205-14.
31. Guterman I, Shalit M, Menda N, Piestun D, Dafny-Yelin M, Shalev G, Bar E, Davydov O, Ovadis M, Emanuel M, Wang J, Adam Z, Pichersky E, Lewinsohn E, Zamir D, Vainstein A, Weiss D. Rose scent: genomics approach to discovering novel floral fragrance-related genes. *Plant Cell.* 2002 Oct;14(10):2325-38. Erratum in: *Plant Cell.* 2002 Nov;14(11):2975..
32. Dudareva N, Pichersky E, Gershenzon J. . Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiol.* 2004 Aug;135(4):1893-902.
33. Rohmer M, Knani M, Simonin P, Sutter B, Sahn H. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem J.* 1993 Oct 15;295 (Pt 2):517-24.
34. Rohmer M. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *NatProdRep.* 1999 Oct;16(5):565-74.
35. 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.
36. Eisenreich W, Rohdich F, Bacher A. Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends Plant Sci.* 2001 Feb;6(2):78-84

37. Lichtenthaler HK. , Hartmut K. (1999). THE 1-DEOXY-D-XYLULOSE-5-PHOSPHATE PATHWAY OF ISOPRENOID BIOSYNTHESIS IN PLANTS. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1999 Jun;50:47-65.
37. Rodríguez-Concepción M. Early Steps in Isoprenoid Biosynthesis: Multilevel Regulation of the Supply of Common Precursors in Plant Cells. *Phytochemistry Reviews* (2006) 5: 1–15.
38. Adam KP, Thiel R, Zapp J, Becker H. Involvement of the mevalonic acid pathway and the glyceraldehyde-pyruvate pathway in terpenoid biosynthesis of the liverworts *Ricciocarpos natans* and *Conocephalum conicum*. *Arch Biochem Biophys.* 1998 Jun 1;354(1):181-7.
39. Tholl D, Croteau R, Gershenzon J. Partial purification and characterization of the short-chain prenyltransferases, geranyl diphosphate synthase and farnesyl diphosphate synthase, from *Abies grandis* (grand fir). *Arch Biochem Biophys.* 2001 Feb 15;386(2):233-42.
40. Qi X, Bakht S, Leggett M, Maxwell C, Melton R, Osbourn A. A gene cluster for secondary metabolism in oat: implications for the evolution of metabolic diversity in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 May 25;101(21):8233-8.
41. 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.
42. Osbourn A. Gene clusters for secondary metabolic pathways: an emerging theme in plant biology. *Plant Physiol.* 2010 Oct;154(2):531-5.
43. Takos AM, Knudsen C, Lai D, Kannangara R, Mikkelsen L, Motawia MS, Olsen CE, Sato S, Tabata S, Jørgensen K, Møller BL, Rook F. Genomic clustering of cyanogenic glucoside biosynthetic genes aids their identification in *Lotus japonicus* and suggests the repeated evolution of this chemical defence pathway. *Plant J.* 2011 Oct;68(2):273-86
44. Field B, Osbourn AE. Metabolic diversification--independent assembly of operon-like gene clusters in different plants. *Science.* 2008 Apr 25;320(5875):543-7.
45. Field B, Fiston-Lavier AS, Kemen A, Geisler K, Quesneville H, Osbourn AE. Formation of plant metabolic gene clusters within dynamic chromosomal regions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Sep 20;108(38):16116-21.
46. Qi X, Bakht S, Qin B, Leggett M, Hemmings A, Mellon F, Eagles J, Werck-Reichhart D, Schaller H, Lesot A, Melton R, Osbourn A. A different function for a

member of an ancient and highly conserved cytochrome P450 family: from essential sterols to plant defense. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Dec 5;103(49):18848-53.

47. Winzer T, Gazda V, He Z, Kaminski F, Kern M, Larson TR, Li Y, Meade F, Teodor R, Vaistij FE, Walker C, Bowser TA, Graham IA. A *Papaver somniferum* 10-gene cluster for synthesis of the anticancer alkaloid noscapine. *Science*. 2012 Jun 29;336(6089):1704-8.

48. Frey M, Chomet P, Glawischnig E, Stettner C, Grün S, Winklmaier A, Eisenreich W, Bacher A, Meeley RB, Briggs SP, Simcox K, Gierl A. Analysis of a chemical plant defense mechanism in grasses. *Science*. 1997 Aug 1;277(5326):696-9.

49. Wilderman PR, Xu M, Jin Y, Coates RM, Peters RJ. Identification of syn-pimara-7,15-diene synthase reveals functional clustering of terpene synthases involved in rice phytoalexin/allelochemical biosynthesis. *Plant Physiol*. 2004 Aug;135(4):2098-105.

50. Shimura K, Okada A, Okada K, Jikumaru Y, Ko KW, Toyomasu T, Sassa T, Hasegawa M, Kodama O, Shibuya N, Koga J, Nojiri H, Yamane H. Identification of a biosynthetic gene cluster in rice for momilactones. *J Biol Chem*. 2007 Nov 23;282(47):34013-8.

51. Swaminathan S, Morrone D, Wang Q, Fulton DB, Peters RJ. CYP76M7 is an ent-cassadiene C11 α -hydroxylase defining a second multifunctional diterpenoid biosynthetic gene cluster in rice. *Plant Cell*. 2009 Oct;21(10):3315-25.

52. Sawai S, Saito K. Triterpenoid biosynthesis and engineering in plants. *Front Plant Sci*. 2011;2:25.

53. Ahmad S, Veyrat N, Gordon-Weeks R, Zhang Y, Martin J, Smart L, Glauser G, Erb M, Flors V, Frey M, Ton J. Benzoxazinoid metabolites regulate innate immunity against aphids and fungi in maize. *Plant Physiol*. 2011 Sep;157(1):317-27.

54. Mylona P, Owatworakit A, Papadopoulou K, Jenner H, Qin B, Findlay K, Hill L, Qi X, Bakht S, Melton R, Osbourn A. Sad3 and sad4 are required for saponin biosynthesis and root development in oat. *Plant Cell*. 2008 Jan;20(1):201-12.

55. Iturbe-Ormaetxe I, Haralampidis K, Papadopoulou K, Osbourn AE. Molecular cloning and characterization of triterpene synthases from *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant Mol Biol*. 2003 Mar;51(5):731-43.