



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**Σχολή Επιστημών Υγείας**  
**Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας**  
**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών**  
**«Βιοτεχνολογία – Ποιότητα διατροφής**  
**& περιβάλλοντος»**

## **Διπλωματική εργασία**

**«Επίδραση εξωγενών φυτορμονών στην έκφραση γονιδίων  
βιοσύνθεσης τριτερπενίων στα φυτά  
*Medicago truncatula* και *Lotus Japonicus*»**

Τσιάρας Δημήτριος

Λάρισα, 2014

**«Επίδραση εξωγενών φυτορμονών στην έκφραση γονιδίων  
βιοσύνθεσης τριτερπενίων στα φυτά  
*Medicago truncatula* και *Lotus Japonicus*»**

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

### **ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΚΑΛΛΙΟΠΗ (επιβλέπουσα)**

Αναπληρώτρια καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας και  
Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

### **ΜΑΤΘΙΟΠΟΥΛΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ**

Καθηγητής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του  
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

### **ΚΑΡΠΟΥΖΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ**

Επίκουρος καθηγητής του Τμήματος Βιοχημείας και  
Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Τα ψυχανθή είναι φυτά που ανήκουν στην οικογένεια των Χεδρωπών ή αλλιώς Κυμαμοειδών. Η πλειονότητα των ψυχανθών μπορούν να δεσμεύουν το άζωτο του αέρα μέσω των φυματίων στις ρίζες, ικανότητα στην οποία οφείλουν την εξελικτική, οικολογική και οικονομική τους επιτυχία. Τα ψυχανθή *Medicago truncatula* και *Lotus japonicus* έχουν καθιερωθεί ως κατάλληλα μοντέλα για τη μελέτη της βιολογίας των ψυχανθών. Τα τριτερπενοειδή ανήκουν στους δευτερογενείς μεταβολίτες και αποτελούν μια μεγάλη και ποικίλη τάξη οργανικών ενώσεων που παράγονται από τα ψυχανθή. Ο σχηματισμός του σκελετικής δομής αυτών των συστατικών καταλύεται από τις οξειδοαναγωγικές κυκλάσες (OSCs) μέσω της κυκλοποίησης του 2,3-οξειδοσκουαλενίου. Η συνθάση της β-αμυρίνης αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά ένζυμα στη πορεία παραγωγής των τριτερπενοειδών και κωδικοποιείται από το γονίδιο *βAS1* στο *M. truncatula* και το γονίδιο *AMY2* στο *L. japonicus*.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης εξωγενώς παρεχόμενων ορμονών στην έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση τριτερπενοειδών στα φυτά *Medicago truncatula* και *Lotus japonicus*. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι ορμόνες MeJa, BA και 2,4-D στο υπόστρωμα ανάπτυξης των φυτών. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA, κατασκευή cDNA και Real Time-PCR με χρήση εξειδικευμένων εκκινητών προκειμένου να μελετηθεί η έκφραση του γονιδίου *βAS1* στο *M. truncatula* και του γονιδίου *AMY2* στο *L. japonicus* που κωδικοποιούν τη συνθάση της β-αμυρίνης.

Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι το MeJa επάγει την έκφραση του γονιδίου *βAS1* στο *M. truncatula* και τόσο το MeJa όσο και το BA και το 2,4-D επάγουν την έκφραση του *AMY2* στο *L. japonicus*. Επομένως, φαίνεται ότι η βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών στο *M. truncatula* επάγεται από το MeJa και στο *L. japonicus* από το BA, το 2,4-D και το MeJa.

## **ABSTRACT**

Legumes are plants belonging to the family of Fabaceae or otherwise Leguminosae. Most legumes can fix the nitrogen from the air through the root nodules, capability on which they own their evolutionary, ecological and economic success. *M. truncatula* and *L. japonicus* are long-established models for the study of legume biology. Triterpenoids belong to the secondary metabolites and constitute a large and varied class of organic compounds produced by legumes. The formation of the skeletal structure of these components is constructed by oxidosqualene cyclases (OSCs) via cyclization of 2,3-oxidosqualene. One of the most important enzymes in the pathway of terpenoids production is  $\beta$ -amyrin synthase, which is encoded by the gene  $\beta$ AS1 in *M. truncatula* and **AMY2** in *L. japonicus*.

The aim of this work was to study the effect of exogenously supplied hormones in the expression of genes involved in the biosynthesis of terpenoids in plants *M. truncatula* and *L. japonicus*. For this purpose, hormones MeJA, BA and 2,4-D were used in plant growth substrate. Then, we performed isolation of RNA, construction of cDNA and Real Time-PCR using specific primers in order to study gene expression of  $\beta$ AS1 in *M. truncatula* and **AMY2** in *L. japonicus*.

Our findings showed that MeJA induces the expression of the *M. truncatula*  $\beta$ AS1 gene and MeJA, BA and 2,4-D induce the expression of the *L. japonicus* **AMY2** gene. Thus, MeJA is involved in the triterpene biosynthesis on *M. truncatula* and MeJA, BA and 2,4-D are involved in the triterpene biosynthesis on *L. japonicus*.

## Περιεχόμενα

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
A.1 Ψυχανθή.....	1
A.2 Συμβιωτική αζωτοδέσμευση.....	5
A.3 Δευτερογενείς μεταβολίτες.....	9
A.3.1 Τερπένια και τριτερπενοειδή.....	12
A.3.2 Κυκλάσες του οξειδοσκουαλενίου.....	16
A.3.3 Σαπωνίνες και P450s.....	19
A.4 Γονίδια OSC στο <i>M. truncatula</i> και στο <i>L. Japonicus</i> .....	20
A.4 Φυτορμόνες.....	23
A.4.1 Ιασμονικό οξύ, κάτι περισσότερο από άρωμα.....	24
A.4.2 Οι ορμόνες 2,4-D και BA.....	26
B. Σκοπός.....	28
Γ. Υλικά και Μέθοδοι.....	28
Γ.1 Τα ψυχανθή <i>M. truncatula</i> και <i>L. japonicus</i> ως φυτικά μοντέλα.....	28
Γ.2 Προετοιμασία των σπόρων.....	28
Γ.3 Χειρισμοί των φυτών <i>M. truncatula</i> και <i>L. japonicus</i> με MeJA, BA και 2,4-D.....	29
Γ.4 Απομόνωση ολικού RNA από τις ρίζες των φυτών.....	29
Γ.5 Χειρισμός του ολικού RNA με DNάση.....	30
Γ.6 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων.....	31
Γ.6.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	32
Γ.6.2 PCR για τον έλεγχο ύπαρξης γενωμικού DNA.....	34
Γ.6.3 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης με χρήση της αντίστροφης μεταγραφάσης.....	36
Γ.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου.....	37

Γ.7.1 Αντίδραση της Real Time PCR.....	39
Ε. Αποτελέσματα.....	42
Ε.1 Απομόνωση RNA .....	42
Ε.2 PCR για τον έλεγχο εύρεσης γονιδιωματικού DNA.....	42
Ε.3 Μελέτη έκφρασης του γονιδίου <i>βAS1</i> στο <i>M. truncatula</i> .....	43
Ε.4 Μελέτη έκφρασης του γονιδίου <i>AMY2</i> στο <i>L. japonicus</i> .....	44
ΣΤ. Συζήτηση.....	46
Δ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	48

## **A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **A.1 Ψυχανθή**

Τα ψυχανθή (< αρχ. ψυχή = πεταλούδα + άνθος) είναι υποοικογένεια φυτών και το όνομα τους προέρχεται από την απόδοση του λατινικού *Papilionoideae*. Καθορίζονται συνήθως από την τυπική δομή του άνθους και την ικανότητα πολλών εξ' αυτών να σχηματίζουν φυμάτια παρουσία συμβιωτικών βακτηρίων, των επονομαζόμενων ριζοβίων. Περιλαμβάνουν περισσότερα από 18.000 είδη τα οποία συνεισφέρουν στη διατήρηση της βιωσιμότητας της γεωργίας, και αποτελούν σημαντική πηγή τροφής και βιοκαυσίμων (1). Το μεγαλύτερο ποσοστό (88%) των ψυχανθών έχει την ικανότητα να δεσμεύει το άζωτο του αέρα μέσω των φυματίων στις ρίζες. Μάλιστα αυτή είναι η σημαντικότερη ιδιότητα στην οποία οφείλουν την εξελικτική, οικολογική και οικονομική τους επιτυχία (2).

Τα ψυχανθή κατέχουν τη δεύτερη θέση από πλευράς σπουδαιότητας στο βασίλειο των φυτών και την τρίτη θέση στα φυτά εντατικής καλλιέργειας. Καλλιεργούνται για την παραγωγή καρπών που χρησιμοποιούνται στη διατροφή του ανθρώπου και των ζώων, αλλά και ως φυτά χλωράς λίπανσης. Λόγω της ικανότητας δέσμευσης του αζώτου της ατμόσφαιρας, τα ψυχανθή όχι μόνο καλύπτουν τις ανάγκες τους σε άζωτο, αλλά παρέχουν τη δυνατότητα οικονομίας σε αζωτούχα λιπάσματα καθώς εμπλουτίζουν το έδαφος με άζωτο, το οποίο χρησιμοποιεί η καλλιέργεια που θα ακολουθήσει. Ήδη από τα αρχαία χρόνια καλλιεργούνταν ψυχανθή σε συστήματα αμειψισποράς κάτι το οποίο είναι αποδοτικό τόσο από οικονομικής όσο και από οικολογικής πλευράς. Στα ψυχανθή συμπεριλαμβάνονται φυτά όπως η φακή, το μπιζέλι, το λαθούρι, τα κουκιά, η σόγια και το τριφύλλι. Η ετήσια παραγωγή των ψυχανθών που καλλιεργούνται υπολογίζεται σε 40-60 εκατομμύρια τόνοι αζώτου (3). Από διατροφικής απόψεως οι σπόροι των



ψυχανθών είναι πλούσιοι σε πρωτεΐνες. Η περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνη εξαρτάται από το είδος του ψυχανθούς, από τις συνθήκες καλλιέργειας και ιδιαίτερα από την ποσότητα αζώτου που είναι διαθέσιμη προς χρησιμοποίηση από το φυτό. Επίσης, οι σπόροι έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε έλαια και είναι πλούσια πηγή υδατανθράκων, σιδήρου, ασβεστίου, φωσφόρου και βιταμινών (θειαμίνης, νιασίνης). Επιπλέον, περιέχουν μικρές ποσότητες ριβοφλαβίνης, καροτινίων, λυσίνης και ασκορβικού οξέος (4). Τέλος, έχουν τη δυνατότητα να παράγουν ένα ευρύ φάσμα δευτερογενών μεταβολιτών τα οποία χρησιμοποιούνται ως συστατικά φαρμάκων (5).

Δεδομένου της σπουδαιότητάς τους, είναι επιτακτική ανάγκη η δημιουργία ανθεκτικών φυτών σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις όπως είναι η αλατότητα, η οξύτητα του εδάφους και τα ζιζάνια (6). Επίσης, είναι ιδιαίτερα σημαντικό να κατανοηθεί σε βάθος η βιολογία των ψυχανθών έτσι ώστε να εκμεταλλευτούν στο έπακρο οι δυνατότητές τους. Την τελευταία δεκαετία έχουν αναδειχθεί δύο σημαντικά μοντέλα στη μελέτη της βιολογίας των ψυχανθών, το *Medicago truncatula* και το *Lotus japonicus*.

Τα ψυχανθή *M. truncatula* και *L. japonicus* ανήκουν στην οικογένεια των Χεδρωπών ή αλλιώς Κυαμοειδών (*Leguminosae* ή *Fabaceae*) και στην υπεροικογένεια *Trigonellinae*. Το *M. truncatula* εμφανίζει ετήσιο βιολογικό κύκλο και εντοπίζεται σε όλες τις περιοχές γύρω από τη λεκάνη της Μεσογείου. Μάλιστα, η Ελλάδα αποτελεί τη δεύτερη χώρα παγκοσμίως όσον αφορά τον αριθμό των ειδών του γένους *Medicago* (7). Συγκεκριμένα, στην Ελλάδα το είδος *M. truncatula* εντοπίζεται σχεδόν σε όλες τις περιοχές μέχρι τα 800m, εκτός από την Πίνδο και τη Δυτική Μακεδονία (7). Το *M. truncatula* είναι ένα φυτό σε σχήμα τριφυλλίου με χαμηλή ανάπτυξη με ύψος 10-60cm με τρίπτυχα φύλλα. Κάθε φύλλο είναι στρογγυλεμένο, με μήκος 1-2cm και συχνά παρουσιάζει μια σκοτεινή κηλίδα στο κέντρο (Εικόνα 1). Τα άνθη του είναι κίτρινα και ο καρπός είναι ένας ακανθώδης μικρός λοβός. Το *L. japonicus* αποτελείται από περισσότερα από 200 είδη και το φυσικό του ενδιαίτημα εντοπίζεται στην άπω Ανατολή (Κορέα, Κίνα,

Ιαπωνία). Το ενήλικο φυτό *L. japonicus* είναι θαμνώδες, αποτελείται από πολλούς βλαστούς με μήκος που μπορεί να ξεπεράσει τα 30 εκατοστά και τα άνθη του είναι κίτρινα όπως και του *M. truncatula* (Εικόνα 2).



Εικόνα 1. Τα φύλλα του *M. truncatula* (8).



Εικόνα 2. Το άνθος του *L. japonicus* (9).

Ήδη από τη δεκαετία του '90 τα ψυχανθή *M. truncatula* και *L. japonicus* αναγνωρίστηκαν ως κατάλληλα μοντέλα για μοριακές και γονιδιωματικές αναλύσεις. Σήμερα τα φυτά αυτά αποτελούν στόχο πολλών γονιδιωματικών ερευνών, προκειμένου να κατανοηθεί η βιολογία των συμβιωτικών φυτών σε μοριακό επίπεδο, καθώς και εξελικτικών ερευνών για τη μελέτη της προσαρμογής σε φαινοτυπικό και μοριακό επίπεδο. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα βασικά χαρακτηριστικά των δύο φυτών, τα οποία τα καθιστούν ένα πολύτιμο γενετικό μοντέλο για τη μελέτη της συμβιωτικής σχέσης μεταξύ ψυχανθών και ριζοβίων.

<b>Πλεονεκτήματα <i>M. Truncatula</i> και <i>L. japonicus</i> ως μοντέλα για τη μελέτη της συμβιωτικής σχέσης μεταξύ ψυχανθών – ριζοβίων</b>
<b>Διπλοειδές γονιδίωμα</b> (2n = 16)
<b>Μικρό γονιδίωμα</b> <i>M. truncatula</i> : περίπου 500 Mbp <i>L. japonicus</i> : 472.1 Mbp
<b>Αυτογονιμοποίηση</b>
<b>Ετήσια συμπεριφορά</b>
<b>Μικρός κύκλος ζωής</b> 2-3 μήνες
<b>Μικρό μέγεθος</b>
<b>Σημαντική παραγωγή σπόρων</b>
<b>Διαθεσιμότητα ποικίλους φυσικής ποικιλομορφίας</b>
<b>Καλή απόκριση σε γονιδιωματικό μετασχηματισμό – δυνατότητα δημιουργίας διαγονιδιακών φυτών</b>

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά γνωρίσματα των *M. truncatula* και *L. japonicus* (10,11,12).

## A.2 Συμβιωτική αζωτοδέσμευση

Η ατμόσφαιρα της γης αποτελεί την κύρια πηγή προέλευσης του οργανικού αζώτου όπου απαντάται στη μοριακή του μορφή ( $N_2$ ) σε ποσοστό που αγγίζει το 78%. Ωστόσο το άζωτο δεν είναι απευθείας αφομοιώσιμο σε αυτή τη μορφή από τους ανώτερους φυτικούς και κατ' επέκταση από τους ζωικούς οργανισμούς. Η βιολογική δέσμευση αζώτου αποτελεί τη βασικότερη διαδικασία μέσω της οποίας το ατμοσφαιρικό άζωτο μετατρέπεται σε αφομοιώσιμες μορφές για τα φυτά και τα ζώα. Συγκεκριμένα, η βιολογική δέσμευση αζώτου γίνεται με τη βοήθεια κυρίως προκαρυωτικών οργανισμών που διαθέτουν το ενζυμικό σύστημα της νιτρογενάσης. Η σημαντικότερη κατηγορία αζωτοδεσμευτικών μικροοργανισμών είναι αυτή που δημιουργεί συμβιωτικές σχέσεις με ανώτερα φυτά. Στους μικροοργανισμούς αυτούς περιλαμβάνονται βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Rhizobium*, *Shinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* και τα οποία αναφέρονται συνολικά ως ριζόβια. Κάτω από συνθήκες έλλειψης αφομοιώσιμου εδαφικού αζώτου, οι μικροοργανισμοί της ομάδας των ριζοβίων εγκαθιδρύουν εξειδικευμένες συμβιωτικές σχέσεις με φυτά που ανήκουν στην οικογένεια των ψυχανθών (*Fabaceae* ή *Leguminosae*). Η ικανότητα του βιολογικού συστήματος να δεσμεύει άζωτο εξαρτάται από την παρουσία του εξειδικευμένου ενζυμικού συμπλόκου της νιτρογενάσης. Το σύμπλοκο της νιτρογενάσης είναι ασταθές παρουσία οξυγόνου και καταλύει τη μετατροπή του  $NH_2$  σε  $NH_4^+$ . Σημειώνεται πως στη βιολογική αζωτοδέσμευση οι μικροοργανισμοί αντλούν την απαιτούμενη ενέργεια από την οξείδωση των υδατανθράκων που έχουν συσταθεί από τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα των φυτών.

Η ικανότητα συμβιωτικής σχέσης με βακτήρια της ομάδας των ριζοβίων περιορίζεται στην οικογένεια των ψυχανθών με μόνη εξαίρεση το γένος *Parasponia* των *Ulmaceae* (13). Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά αυτής της συμβίωσης είναι η εξειδίκευση των ριζοβίων ως προς τα ψυχανθή που είναι σε θέση να μολύνουν. Μάλιστα, ορισμένα ριζόβια έχουν την ικανότητα να

συμβιώνουν με ένα ευρύ φάσμα φυτών, ενώ άλλα με ένα πιο περιορισμένο αριθμό φυτών. Η συμβιωτική σχέση μεταξύ του κατάλληλου ζεύγους ριζοβίου-ψυχανθούς έχει σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός νέου φυτικού οργάνου που ονομάζεται φυμάτιο και φέρεται συνήθως στη ρίζα, σπανιότερα δε στο βλαστό του ψυχανθούς. Εάν το ριζόβιο δεν είναι συμβατό με το φυτό, είτε δεν είναι δυνατός ο σχηματισμός του φυματίου, είτε το φυμάτιο που σχηματίζεται δεν είναι λειτουργικό. Το φυμάτιο είναι ένα φυτικό όργανο με ιδιαίτερα μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά. Εντός του φυματίου, οι διαφοροποιημένες μορφές των ριζοβίων που ονομάζονται πλέον βακτηριοειδή, βρίσκουν το κατάλληλο περιβάλλον για να φέρουν σε πέρας τη βιοχημική μετατροπή του μοριακού αζώτου σε αμμωνία. Η παραπάνω σχέση είναι αμοιβαία επωφελής και για τους δύο συμβιώτες, αφού το φυτό παρέχει στα ριζόβια ένα περιβάλλον πλούσιο σε πηγές φωτοσυνθετικού οργανικού άνθρακα, απαλλαγμένο από τον ανταγωνισμό άλλων μικροοργανισμών, ενώ με τη σειρά τους τα ριζόβια καλύπτουν το μεγαλύτερο μέρος του φυτού σε αφομοιώσιμο άζωτο. Συγκεκριμένα το *M. truncatula* σχηματίζει φυμάτια αποκλειστικά κατά τη συμβίωσή του με το είδος *Sinorhizobium meliloti* (Εικόνα 3), το οποίο είναι ένα από τα πιο καλά χαρακτηρισμένα είδη ριζοβίων σε γενετικό επίπεδο (14).



Εικόνα 3. Φυμάτια στις ρίζες του *M. truncatula* (15).

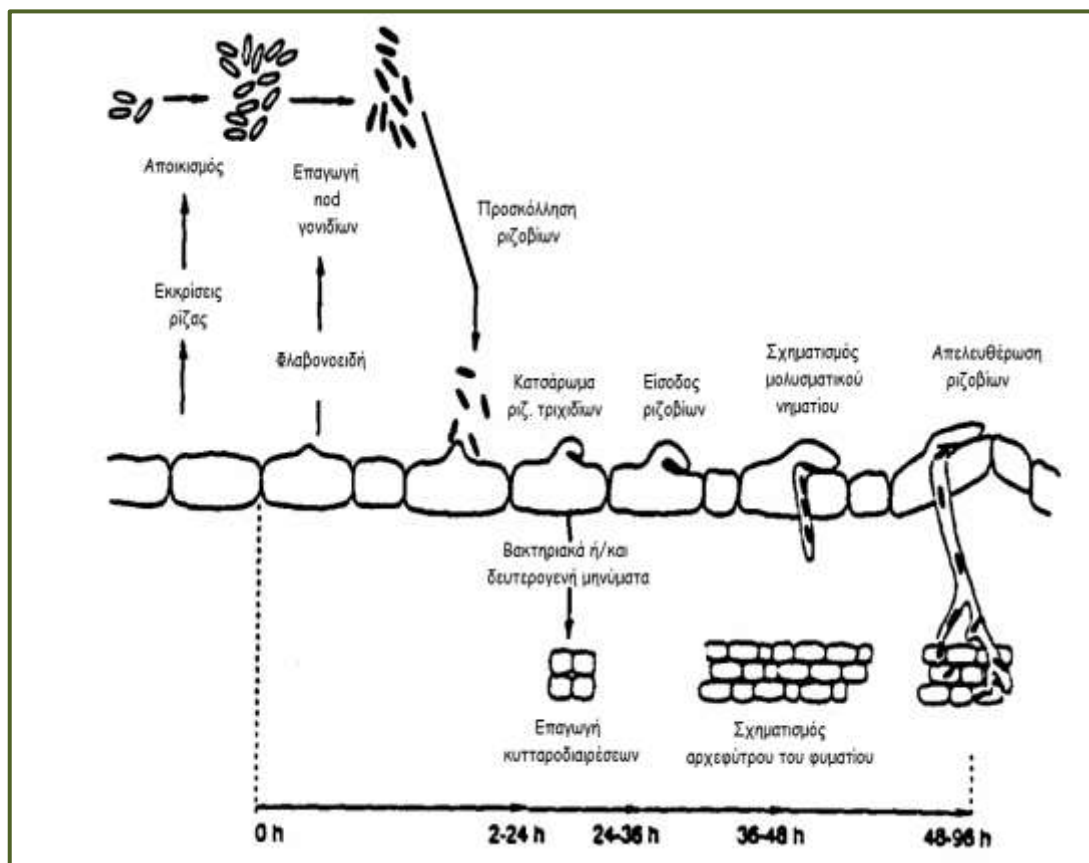
Η εδραίωση της συμβίωσης είναι μια πολύπλοκη βιολογική διαδικασία, η οποία περιλαμβάνει μια σειρά από επιμέρους στάδια, διεργασίες και αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συμβιωτών. Συνοπτικά η διαδικασία σχηματισμού των φυματίων ακολουθεί την εξής πορεία (Εικόνα 4) (16):

- 1)** Σχηματισμός φυματίου: αποικισμός της ριζόσφαιρας του ψυχανθούς από τα ριζόβια και έπειτα προσκόλληση των ριζοβίων στην επιφάνεια της ρίζας (ιδιαίτερα στην περιοχή των αναπτυσσόμενων ριζικών τριχιδίων).
- 2)** Είσοδος των ριζοβίων και σχηματισμός του μολυσματικού νηματίου: σε αυτό το στάδιο είναι χαρακτηριστική η παραμόρφωση (κύρτωση, διακλάδωση, κατσάρωμα) των ριζικών τριχιδίων με αποτέλεσμα να παγιδούνται τα ριζόβια που είναι προσκολλημένα σε αυτά.
- 3)** Είσοδος των ριζοβίων (μόλυνση): η είσοδος των ριζοβίων εντός του ριζικού τριχιδίου γίνεται μετά την τοπική υδρόλυση των τοιχωμάτων του φυτού στην περιοχή της κύρτωσης.
- 4)** Ανάπτυξη των ινών προσβολής.
- 5)** Ανάπτυξη των φυματίων, ελευθέρωση των ριζοβίων και μόλυνση των κυττάρων του φυματίου.

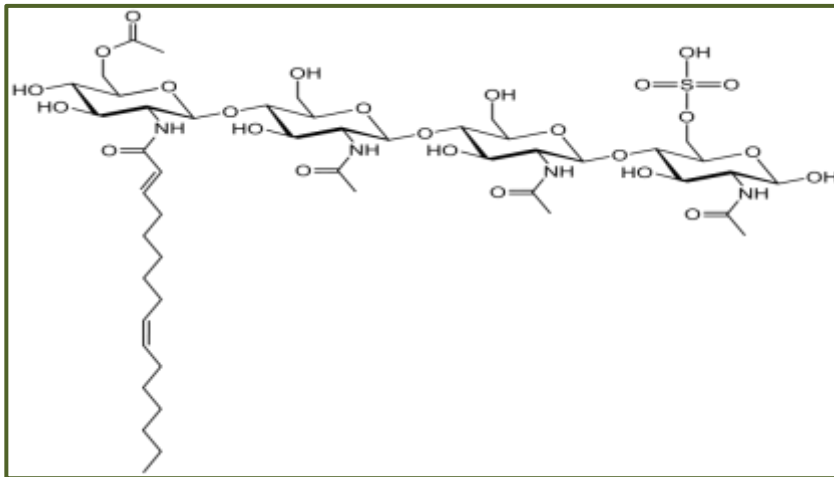
Πρέπει να σημειωθεί ότι το είδος των φυματίων που θα σχηματιστεί στις ρίζες του ψυχανθούς εξαρτάται από το είδος του φυτού. Το *M. truncatula* σχηματίζει μη καθορισμένα φυμάτια ενώ το *L. japonicus* σχηματίζει καθορισμένα φυμάτια. Η διαφορά στις δύο μορφές των φυματίων έγκειται στη χρονική διάρκεια των κυτταρικών διαιρέσεων του μεριστώματος. Στα μη καθορισμένα φυμάτια η μεριστωματική δραστηριότητα είναι παρούσα καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής των φυματίων ενώ στα καθορισμένα φυμάτια σταματά λίγο μετά τη μόλυνση της ρίζας με τα ριζόβια.

Η έναρξη της συμβίωσης πραγματοποιείται με την ανταλλαγή χημικών σημάτων μεταξύ του φυτού και του ριζοβίου, με τη μεσολάβηση διαφόρων σηματοδοτικών μορίων όπως αμινοξέα, οργανικά οξέα, λεκτίνες και δευτερογενείς μεταβολίτες. Αυτά τα σηματοδοτικά μόρια δρουν ως επαγωγείς του βακτηριακού γονιδίου *nodD* (17), το οποίο είναι υπεύθυνο

για τον σχηματισμό της πρωτεΐνης *NodD* που λειτουργεί με τη σειρά της ως γενικός επαγωγέας της έκφρασης των υπολοίπων *nod* βακτηριακών γονιδίων. Συγκεκριμένα στο *M. truncatula* έχουν βρεθεί τέσσερα γονίδια (*DMI1, DMI2, DMI3, NSP*) τα οποία ελέγχουν τις διαδικασίες του μεταγωγικού μονοπατιού των *Nod* παραγόντων (18). Οι *Nod* πρωτεΐνες είναι ένζυμα που καταλύουν τις αντιδράσεις βιοσύνθεσης των παραγόντων *Nod* (λιποολογοσαγχαρίτες) και παρουσιάζουν διαφορές ανάμεσα στα είδη των ριζοβίων, τόσο ως προς την εξειδίκευσή τους, όσο και ως προς τη δομή τους (19). Τελικά αυτοί οι παράγοντες προκαλούν έναν καταρράκτη διεργασιών οδηγώντας στο σχηματισμό ενός λειτουργικού φυματίου. Επιπλέον, σημειώνεται πως έχει βρεθεί ότι αυτοί οι παράγοντες οδηγούν στην επαγωγή της έκφρασης μιας σειράς γονιδίων (π.χ. γονίδια που συμμετέχουν στην αντίδραση του φυτού στα παθογόνα) (20).



Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση των διεργασιών που πραγματοποιούνται κατά τα πρώιμα στάδια σχηματισμού του φυματίου συμβιωτικής σχέσης μεταξύ ριζοβίων και ψυχανθών (21).



Εικόνα 5: Δομή nod παράγοντα του *S. melloti* (22).

### A.3 Δευτερογενείς μεταβολίτες

Τα φυτά παράγουν μεταβολίτες οι οποίοι χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες, τους πρωτογενείς και τους δευτερογενείς. Οι πρωτογενείς μεταβολίτες περιλαμβάνουν συστατικά τα οποία είναι απαραίτητα για τις κυτταρικές λειτουργίες όπως είναι τα αμινοξέα, τα απλά σάκχαρα, τα νουκλεϊκά οξέα και τα λιπίδια. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες προέρχονται από ενδιάμεσες ενώσεις του πρωτογενούς μεταβολισμού και παράγονται συνήθως σε επιμέρους ιστούς και σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια. Σε αντίθεση με τους κύριους πρωτογενείς μεταβολίτες που απαντώνται σε ολόκληρο το φυτικό βασίλειο, οι δευτερογενείς μεταβολίτες εμφανίζουν περιορισμένη κατανομή στο φυτικό βασίλειο, καθώς ορισμένοι εντοπίζονται συχνά μόνο σε ένα φυτικό είδος ή σε μια ομάδα ειδών που είναι ταξονομικά συγγενείς (23).

Ο ρόλος των δευτερογενών μεταβολιτών δεν είναι πλήρως καθορισμένος, καθώς σε αντίθεση με τους πρωτογενείς μεταβολίτες δεν σχετίζονται άμεσα με βασικές λειτουργικές διαδικασίες όπως είναι η φωτοσύνθεση, η αναπνοή, η μεταφορά διαλυμένων ουσιών και η αφομοίωση θρεπτικών συστατικών.



Οι δευτερογενείς μεταβολίτες παράγονται ως απόκριση στο στρες, όπως στην περίπτωση που δρουν ως αποτρεπτικοί παράγοντες για τα φυτοφάγα ζώα (24). Τα φυτά έχουν τη δυνατότητα να παρασκευάζουν πολλά διαφορετικά είδη δευτερογενών μεταβολιτών οι οποίοι στη συνέχεια γίνονται αντικείμενο εκμετάλλευσης από τον άνθρωπο λόγω του ευεργετικού τους ρόλου σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών (25). Συχνά οι δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών, αναφέρονται και ως φυτικά φυσικά προϊόντα λόγω των επιδράσεων τους στους άλλους οργανισμούς. Όταν ανακαλύφθηκαν θεωρούνταν μεταβολικά απόβλητα, μέχρι που τον 20ο αιώνα, προσέλκυσαν το ενδιαφέρον των ερευνητών εξαιτίας της σπουδαιότητάς τους ως ιατρικά φάρμακα, δηλητήρια, αρωματικές ουσίες και βιομηχανικά υλικά (26). Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των δευτερογενών μεταβολιτών είναι οι πολύ σημαντικές οικολογικές λειτουργίες που προσδίδουν στα φυτά. Κυρίαρχες ανάμεσα σε αυτές τις σπουδαίες λειτουργίες είναι οι αμυντικοί μηχανισμοί έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών και των φυτοφάγων ζώων. Δηλαδή, αυτές οι οργανικές ενώσεις, ενώ δεν είναι τοξικές για το ίδιο το φυτό και το μεταβολικό κόστος παραγωγής τους είναι χαμηλό, ταυτόχρονα είναι τοξικές και απωθητικές για παθογόνους μικροοργανισμούς και φυτοφάγα ζώα. Έτσι, τα φυτά καταφέρνουν να επιβιώσουν και να διατηρήσουν την αναπαραγωγική τους δυνατότητα. Επιπρόσθετα, λειτουργούν ως ελκτικές ουσίες για τους επικονιαστές, ως μόρια αντίδρασης σε καταπονήσεις και ως μόρια επικοινωνίας μεταξύ των φυτών (24).

Η σύνθεση των δευτερογενών μεταβολιτών μπορεί να γίνεται κατά την κανονική αύξηση ή ανάπτυξη του φυτού δημιουργώντας αντιμικροβιακά συστατικά, ενώ υπάρχει και η πιθανότητα να απουσιάζουν από υγιή φυτά και να συσσωρεύονται μόνο σε περιπτώσεις παρουσίας παθογόνων μικροοργανισμών ή καταπόνησης από αβιοτικό στρες (23,27). Σημειώνεται, πως η ικανότητα των φυτών να συνθέτουν συγκεκριμένες ομάδες δευτερογενών μεταβολιτών πιθανόν να οφείλεται στο διαφορετικό τρόπο με τον οποίο τα φυτά και τα ζώα αντιμετωπίζουν τους διαφορετικούς εχθρούς και τις ασθένειες. Μέχρι πρόσφατα, οι δευτερογενείς μεταβολίτες

θεωρούνταν συνδεδεμένοι μόνο με οικολογικούς ρόλους (28). Τα τελευταία χρόνια έχει βρεθεί ότι οι δευτερογενείς μεταβολίτες εμπλέκονται και σε πρωτογενείς διαδικασίες αύξησης, ανάπτυξης και αντίστασης του φυτού σε αβιοτικές καταπονήσεις. Σε ορισμένα τερπένια, λοιπόν, έχει αποδοθεί ένας καλά χαρακτηρισμένος ρόλος στην φυτική αύξηση και ανάπτυξη. Για παράδειγμα, οι γιββερελίνες, μία ομάδα φυτικών ορμονών, είναι διτερπένια. Επιπλέον, τα καροτενοειδή είναι τετρατερπένια και λειτουργούν σαν βοηθητικές ουσίες στη φωτοσύνθεση.

Από χημικής απόψεως υπάρχουν τρεις διακριτές ομάδες φυσικών δευτερογενών μεταβολιτών: τα τερπένια, οι φαινολικές ενώσεις και ενώσεις που περιέχουν άζωτο. Με βάση το πρόδρομο μόριο του μεταβολισμού από το οποίο προέρχονται και τον περαιτέρω μεταβολισμό του οι δευτερογενείς μεταβολίτες κατατάσσονται στις εξής πέντε βασικές κατηγορίες:

**1. Ενώσεις που περιέχουν άζωτο (indole and indole-sulfur compounds, glucosinolates):** Προέρχονται από αμινοξέα και είναι αλκαλοειδή, μπεταλαΐνες, αμίνες, κυανογόνα γλυκοζίδια, θειογλυκοζίτες, αμυντικές πρωτεΐνες και αμίνες.

**2. Φαινυλπροπανοειδή (phenylpropanoids):** Συντίθενται από το αρωματικό αμινοξύ φαινυλαλανίνη το οποίο προέρχεται από το μονοπάτι του σκιμικού ή του μηλικού οξέος. Η φαινυλαλανίνη μεταβολίζεται αρχικά σε κινναμικό οξύ και στη συνέχεια παράγονται τα φαινυλπροπανοειδή.

**3. Βενζοειδή (benzenoids):** Παράγονται από τη φαινυλαλανίνη με αφαίρεση δύο ατόμων άνθρακα (29).

**4. Φλαβονοειδή (flavonoids):** Παράγονται από τη φαινυλαλανίνη και από το μηλότυλο-CoA (29).

**5. Τερπένια (terpenes):** Πρόκειται για λιπίδια που συντίθενται από το ακέτυλο-συνένζυμο Α ή από βασικές ενδιάμεσες ενώσεις της γλυκολύσεως. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών και οι προτεινόμενες πρωταρχικές λειτουργίες του φυτού στις οποίες εμπλέκονται.

Τάξη	Αριθμός δομών	Προτεινόμενες λειτουργίες
Ινδολικές & Ινδολοθειϊκές ενώσεις	10	Άμυνα έναντι παθογόνων
Γλυκοσυνολικά οξέα	35	Άμυνα έναντι παθογόνων και φυτοφάγων ζώων
Φαινυλπροπανοειδή	20	Προστασία από υπεριώδη ακτινοβολία Άμυνα έναντι παθογόνων
Βενζενοειδή	25	Προσέλκυση επικονιαστών Άμυνα έναντι παθογόνων
Φλαβονοειδή	15	Προστασία από υπεριώδη ακτινοβολία Εμπλοκή στη μεταφορά αυξίνης Έλεγχος λήθαργου των σπόρων Άμυνα έναντι παθογόνων
Τερπένια	50	Άμυνα έναντι φυτοφάγων ζώων Αντίσταση στο οξειδωτικό στρες Άμυνα έναντι παθογόνων
Παράγωγα λιπαρών οξέων	15	Άμυνα έναντι παθογόνων

Πίνακας 2. Κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών και προτεινόμενες λειτουργίες στο φυτό *A. thaliana* (28).

### A.3.1 Τερπένια και τριτερπενοειδή

Τα τερπένια ή τερπενοειδή μεταβολίτες των ισοπέντενυλ πυροφωσφορικών (IPP) ολιγομερών. Συνιστούν τη μεγαλύτερη κλάση των δευτερογενών μεταβολιτών, καθώς έχουν βρεθεί πάνω από 20.000 χαρακτηρισμένα μέλη (30). Τα τερπένια ταξινομούνται βάσει του αριθμού των μονάδων με πέντε άτομα άνθρακα που περιέχουν, παρ' όλο που εξαιτίας των έντονων μεταβολικών μετατροπών μερικές φορές είναι ιδιαίτερα δύσκολο να διακριθούν τα πρωτότυπα υπολειμματικά μόρια των πέντε ατόμων άνθρακα. Τα τερπένια χωρίζονται σε επιμέρους κατηγορίες εκ των οποίων ιδιαίτερα σημαντική είναι αυτή των τριτερπενίων.

Τα τριτερπένια ή τριτερπενοειδή είναι μια κύρια υποομάδα των τερπενίων και αποτελούν μια μεγάλη και ποικίλη τάξη οργανικών ενώσεων, μικρού μοριακού βάρους που παράγονται από τα φυτά (31). Πρόκειται για επιμήκη τερπένια με 30 άτομα άνθρακα που παράγονται στο διαμέρισμα του κυτολύματος και του ενδοπλασματικού δικτύου. Συγκροτούν μια ποικιλία δομικά διαφορετικών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων των στεροειδών, πολλές από τις οποίες έχουν τροποποιηθεί ώστε να έχουν λιγότερα από 30 άτομα άνθρακα.

Η βιοσυνθετική πορεία σχηματισμού των τριτερπενοειδών έχει ως εξής (Εικόνα 6) (30):

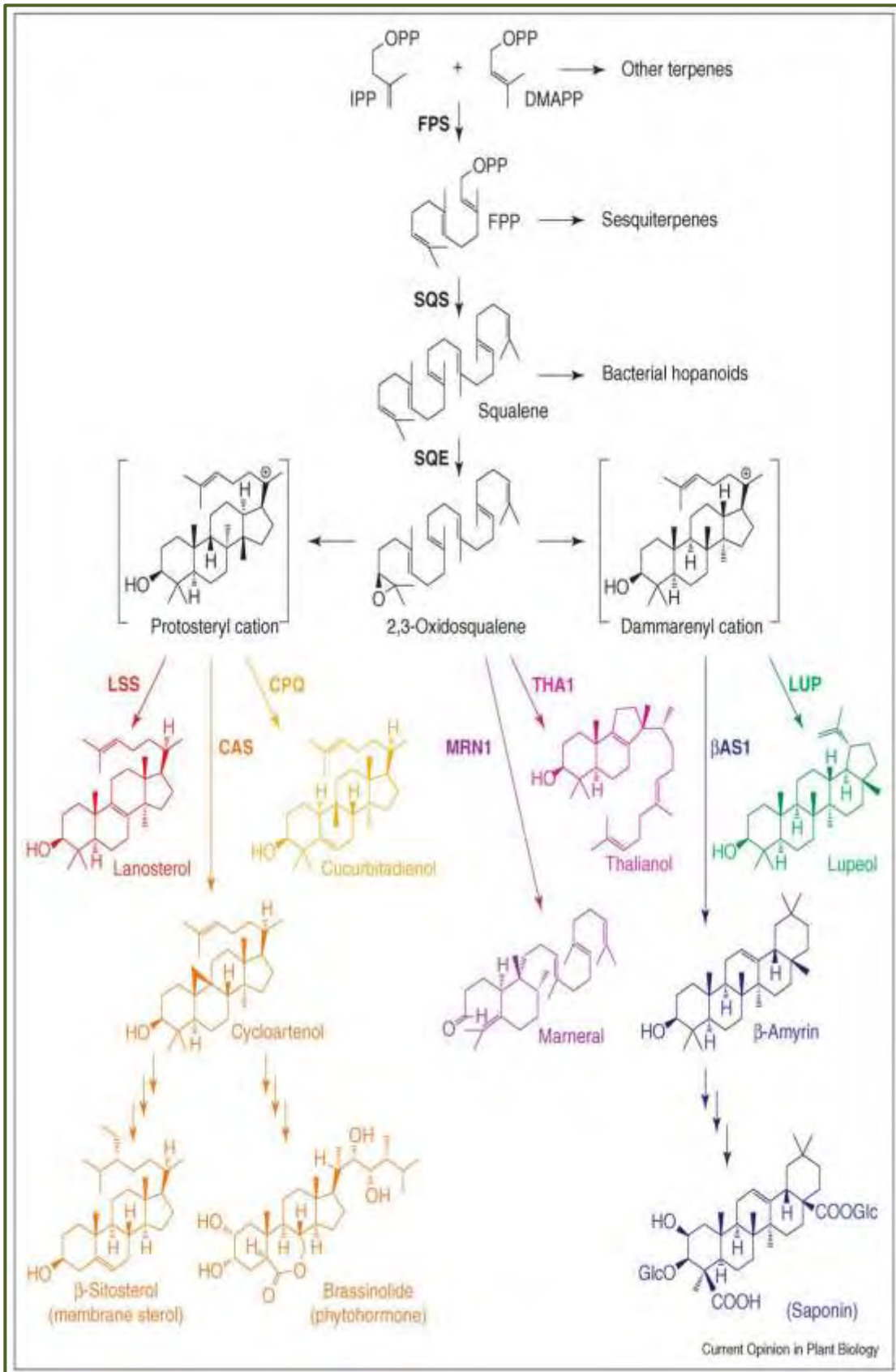
1. Το διφωσφορικό ισοπεντενύλιο (IPP) το οποίο παράγεται από το μεβαλονικό οξύ και η ισομερής του μορφή, το διφωσφορικό διμεθυλοαλύλιο (DMAPP) είναι τα ενεργά πρόδρομα μόρια με πέντε άτομα άνθρακα για τη σύσταση των τερπενίων. Με τη σύντηξη των IPP και DMAPP σχηματίζεται το διφωσφορικό γερανύλιο (GPP). Το GPP είναι το πρόδρομο μόριο σχεδόν όλων των μονοτερπενίων με 10 άτομα άνθρακα.
2. Το GPP συμπυκνώνεται με το IPP και σχηματίζεται το διφωσφορικό φαρνεζύλιο (FPP). Το FPP αποτελείται από δεκαπέντε άτομα άνθρακα και αποτελεί το πρόδρομο μόριο των σεσκιτερπενίων.
3. Δύο μόρια FPP συμπυκνώνονται με τη βοήθεια της συνθάσης του σκουαλενίου και προκύπτει το σκουαλένιο (C<sub>30</sub>) (SQS).
4. Το σκουαλένιο οξειδώνεται με τη δράση μιας μονοξυγενάσης, της εποξειδάσης του σκουαλενίου (SQE) και προκύπτει το 2,3 οξειδοσκουαλένιο.
5. Το 2,3 οξειδοσκουαλένιο μετατρέπεται σε κυκλική τριτερπενοειδή αλκοόλη με τη βοήθεια των κυκλασών του οξειδοσκουαλενίου.

Γενικά, στους φυτικούς οργανισμούς το 2,3 οξειδοσκουαλένιο εκτός από τριτερπενοειδές μπορεί να ακολουθήσει άλλο μεταβολικό μονοπάτι και να μετατραπεί σε στερόλες και σε στεροειδείς ορμόνες. Αυτές οι δύο εναλλακτικές επιλογές υπάρχουν μόνο στα φυτά, αφού στα ζώα ο μοναδικός

δρόμος του 2,3 οξειδοσκουαλενίου είναι να μετατραπεί σε λανοστερόλη μέσω της συνθάσης της λανοστερόλης (lanosterol synthase, LSS). Στη συνέχεια, η λανοστερόλη μετατρέπεται σε χοληστερόλη, η οποία μπορεί να παραμείνει αυτούσια ή να μετατραπεί σε στεροειδείς ορμόνες.

Αρκετές στεροειδείς αλκοόλες (στερόλες) είναι σημαντικά συστατικά στοιχεία των φυτικών μεμβρανών και αποτελούν πρόδρομες ενώσεις για τη βιοσύνθεση των ορμονών. Απαντώμενες κατά κύριο λόγο στη πλασματική μεμβράνη, οι στερόλες ελαττώνουν τη διαπερατότητα της μεμβράνης των μικρών μορίων ελαττώνοντας την κινητικότητα των αλυσίδων των λιπαρών οξέων. Ωστόσο, μέχρι σήμερα δεν έχει γίνει γνωστή η φυσιολογική τους σημασία στους φυτικούς οργανισμούς.

Η βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών φαίνεται να είναι ενεργή κατά την ανάπτυξη των φυτών, πράγμα που υποδεικνύει τη συμμετοχή αυτών των μεταβολιτών σε τέτοιες διαδικασίες (32). Αρκετά φυτά συσσωρεύουν σημαντικές ποσότητες τριτερπενοειδών με τη μορφή σαπωνινών, οι οποίες είναι μεταβολίτες της β-αμυρίνης και έχουν αντιμυκητιακή δράση (27,33). Επίσης, ως τοξίνες λειτουργούν αποτρεπτικά ως βοσκή σε ένα μεγάλο αριθμό φυτοεκτρεφόμενων εντόμων και θηλαστικών και έτσι αυτά φαίνονται ότι παίζουν σημαντικούς αμυντικούς ρόλους στο φυτικό βασίλειο (28).



Εικόνα 6. Συνοπτική αναπαράσταση βιοσυνθετικής πορείας τριτερπενοειδών (30).

### **A.3.2 Κυκλάσες του οξειδοσκουαλενίου**

Όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη ενότητα, οι κυκλάσες του οξειδοσκουαλενίου (Oxidosqualene cyclases-OSCs) είναι ένζυμα που μετατρέπουν το 2,3 οξειδοσκουαλένιο σε μία ή περισσότερες τριτερπενοειδείς αλκοόλες με έως και έξι καρβοξυλικούς δακτυλίους. Η κυκλοποίηση του 2,3 οξειδοσκουαλενίου αποτελεί είναι κομβικό σημείο μεταξύ του πρωτογενούς και του δευτερογενούς μεταβολισμού (32).

Οι OSCs διακρίνονται σε δύο κατηγορίες με βάση το ενδιάμεσο καρβοκατιόν που σχηματίζεται: σε αυτές που σχηματίζουν με διαμόρφωση ανάκλιντρου-λουτήρα-ανάκλιντρου το κατιόν του προτεστερυλίου (protosteryl cation) και σε αυτές που σχηματίζουν με διαμόρφωση ανάκλιντρου-ανάκλιντρου-ανάκλιντρου το κατιόν του νταμαρενυλίου (dammaranyl cation). Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν η συνθάση της λανοστερόλης και η συνθάση της κυκλοαρτενόλης. Οι κυκλάσες που σχηματίζουν ενδιάμεσα το κατιόν του νταμαρενυλίου απαντώνται αποκλειστικά στα φυτά με αγγειακό αγωγό σύστημα και είναι υπεύθυνες για την παραγωγή των τριτερπενοειδών αλκοολών. Σε αυτή τη κατηγορία ανήκουν η συνθάση της β-αμυρίνης και η συνθάση της λουπεόλης, καθώς και οι πολυλειτουργικές κυκλάσες που παράγουν μίγμα προϊόντων.

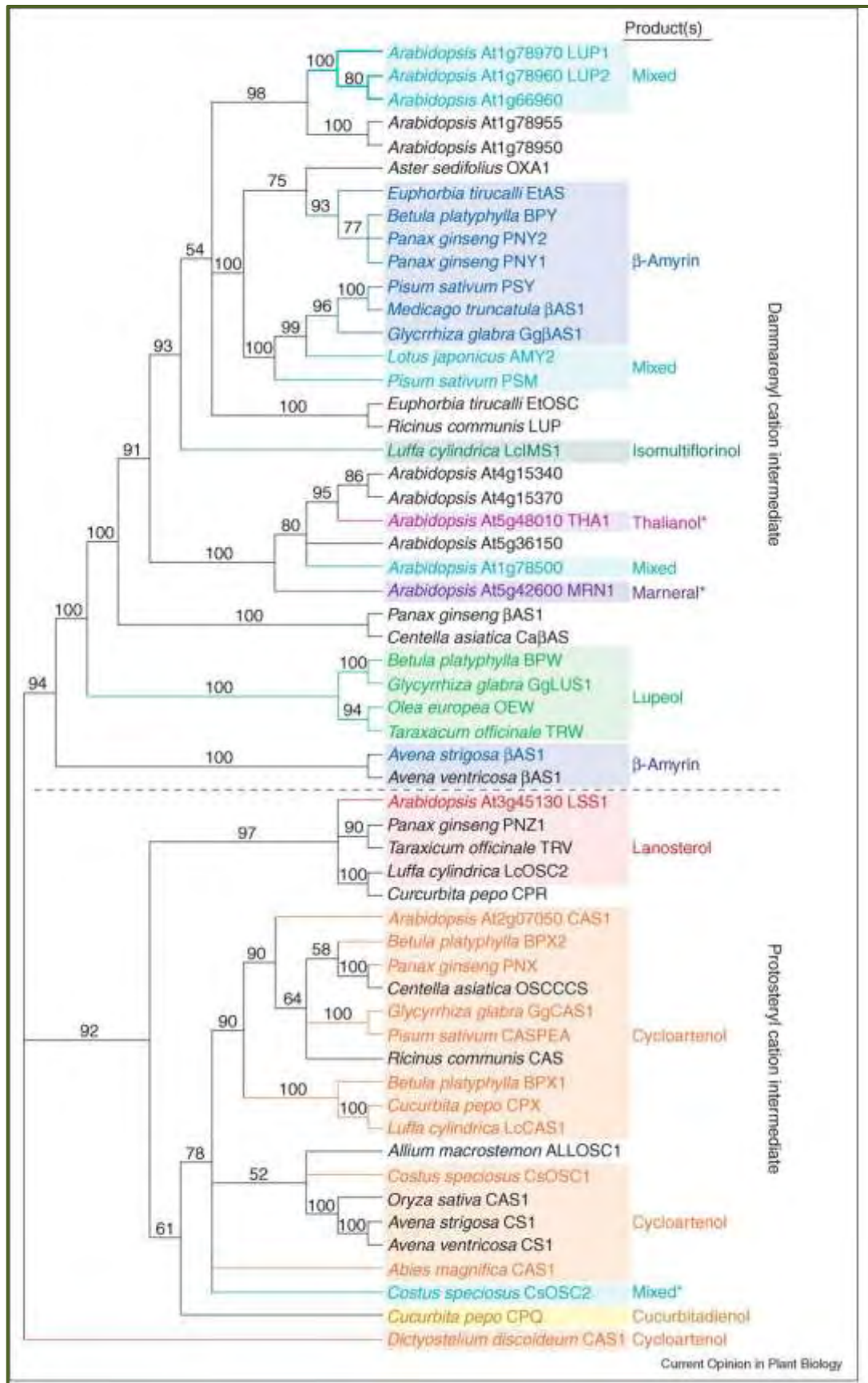
Όσον αφορά την εξελικτική πορεία των OSCs, η συνθάση της κυκλοαρτενόλης παρουσιάζει μεγάλη ομολογία μεταξύ των ειδών, γεγονός που επιβεβαιώνει το σημαντικό ρόλο της για την ομοιόσταση του φυτικού κυττάρου. Αντίθετα, οι κυκλάσες που χρησιμοποιούν ως ενδιάμεσο το κατιόν του νταμαρενυλίου εμφανίζουν μικρή ομολογία μεταξύ τους. Αυτό σημαίνει ότι έπειτα από το διαχωρισμό των ειδών είχαν τη δυνατότητα να συσσωρεύσουν ευνοϊκές μεταλλάξεις για την επιβίωση των ειδών στο εκάστοτε περιβάλλον. Κατά συνέπεια, οι περισσότερες από αυτές παράγουν προϊόντα που ευνοούν την προσαρμογή και επιβίωση του φυτού στο περιβάλλον, π.χ. σαπωνίνες και άμυνα έναντι μυκήτων (33). Στον παρακάτω

πίνακα παρουσιάζονται οι ταυτοποιημένες κυκλάσες οξειδοσκουαλενίου κάποιων χαρακτηριστικών φυτών-μοντέλων (30). Για παράδειγμα, στο γένωμα του *L. japonicus* απαντώνται γονίδια που κωδικοποιούν για 8 *OSCs* (*OSC1-OSC8*). Οι συνθάσες *OSC1*, *OSC3* και *OSC5* χαρακτηρίστηκαν σαν συνθάση της β-αμυρίνης, συνθάση της λουπεόλης και συνθάση της κυκλοαρτενόλης αντίστοιχα, έπειτα από ετερόλογη έκφραση των cDNA σε μεταλλάγματα κυττάρων ζύμης (34). Η συνθάση *OSC8* χαρακτηρίστηκε σαν πολυλειτουργική κυκλάση που παράγει ένα μίγμα β-αμυρίνης και λουπεόλης. Έχει βρεθεί ότι τα μεταγραφήματα των τριών γονιδίων *OSC1*, *OSC4* και *OSC7* συσσωρεύονται στα φύλλα. Αντίθετα, τα μεταγραφήματα των γονιδίων *OSC3* και *OSC8* ανιχνεύονται σε υψηλότερα επίπεδα στις ρίζες και τα φυμάτια. Σύμφωνα με τα παραπάνω, συνεπάγεται ότι τα τριτερπενοειδή είναι απαραίτητα για το φυτό με έναν όργανο – εξειδικευμένο τρόπο (34).

Συνθάση	Φυτό	Όνομα (Genbank accession)	Προϊόντα
Cycloartenol	<i>A. thaliana</i>	At2g07050/CAS1 (P38605)	Cycloartenol
Lanosterol	<i>A. thaliana</i>	At3g45130/LSS1/PEN7	Lanosterol
<b>b-Amyrin</b>	<b><i>M. truncatula</i></b>	<b>MtAMY1/bAS1 (CAD23247)</b>	<b>b-Amyrin</b>
Thalianol	<i>A. thaliana</i>	At5g48010/THA1/PEN4	Thalianol
Marneral	<i>A. thaliana</i>	At5g42600/MRN1/PEN5	Marneral
Mixed	<i>A. thaliana</i>	At1g78970/LUP1	Lupeol, 3b,20-dihydroxylupane, b-amyrin, germanicol, taraxasterol & c-taraxasterol
Mixed	<i>A. thaliana</i>	At1g78960/LUP2/YUP8 H12R.43	b-Amyrin, taraxasterol, tirucalla- 7,21-dien-3b-ol, lupeol, bauerenol, butyrospermol, multiflorenol, a- amyrin & c-taraxasterol
Mixed	<i>A. thaliana</i>	At1g66960/LUP5	Tirucalla-7,21-dien-3b-ol & additional uncharacterized
Mixed	<i>A. thaliana</i>	At1g78500/PEN6	Bauerenol, lupeol, a-amyrin & additional uncharacterized
<b>Mixed</b>	<b><i>L. japonicus</i></b>	<b>AMY2 (AAO33580)</b>	<b>β-amyrin &amp; dihydrolupeol</b>

Πίνακας 3. Ταυτοποιημένες κυκλάσες του οξειδοσκουαλενίου στα φυτά μοντέλα *M. truncatula*, *A. thaliana* και *L. japonicus* (32,35).



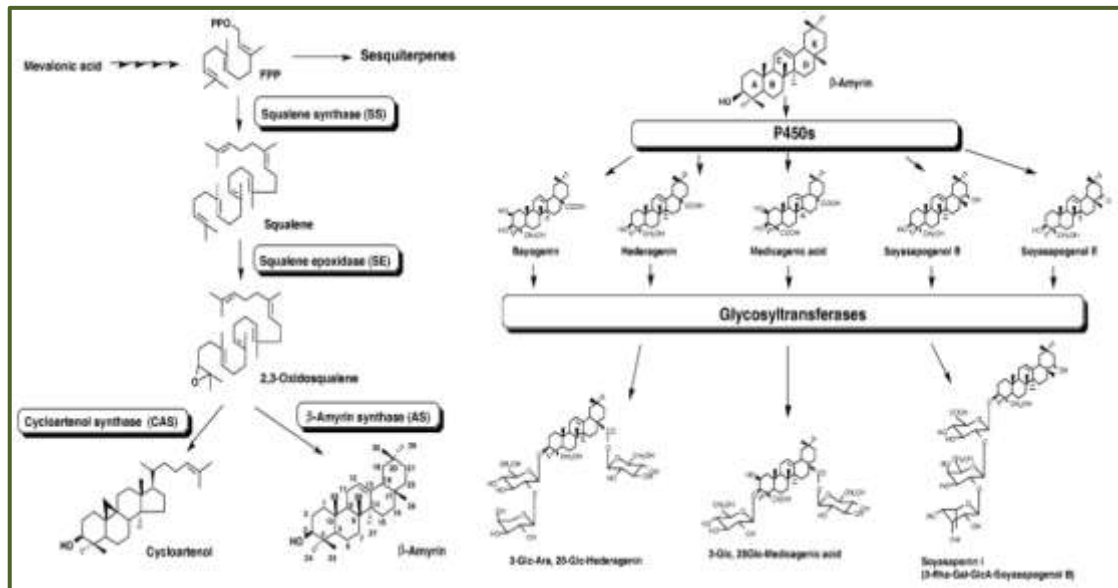


Εικόνα 7: Κατηγοριοποίηση *OSCs* και διαγραμματική παρουσίαση της ομολογίας που παρατηρείται μεταξύ τους (30).

### A.3.3 Σαπωνίνες και P450s

Τα τελευταία χρόνια έχει υπάρξει πρόοδος όσον αφορά τον χαρακτηρισμό των ενζύμων που εμπλέκονται στην τροποποίηση του κύριου σκελετού των τριτερπενοειδών δηλαδή, στις μονοξυγενάσες του κυτοχρώματος P450, τις γλυκοσυλτρανσφεράσες της διφωσφορικής ουριδίνης (UGTs) και άλλων ενζύμων (36). Τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 είναι μεμβρανοσυνδεδεμένες πρωτεΐνες, μονοξυγενάσες οι οποίες εμπλέκονται σε έναν αριθμό βιοσυνθετικών και αποτοξινωτικών μονοπατιών στα φυτά (36).

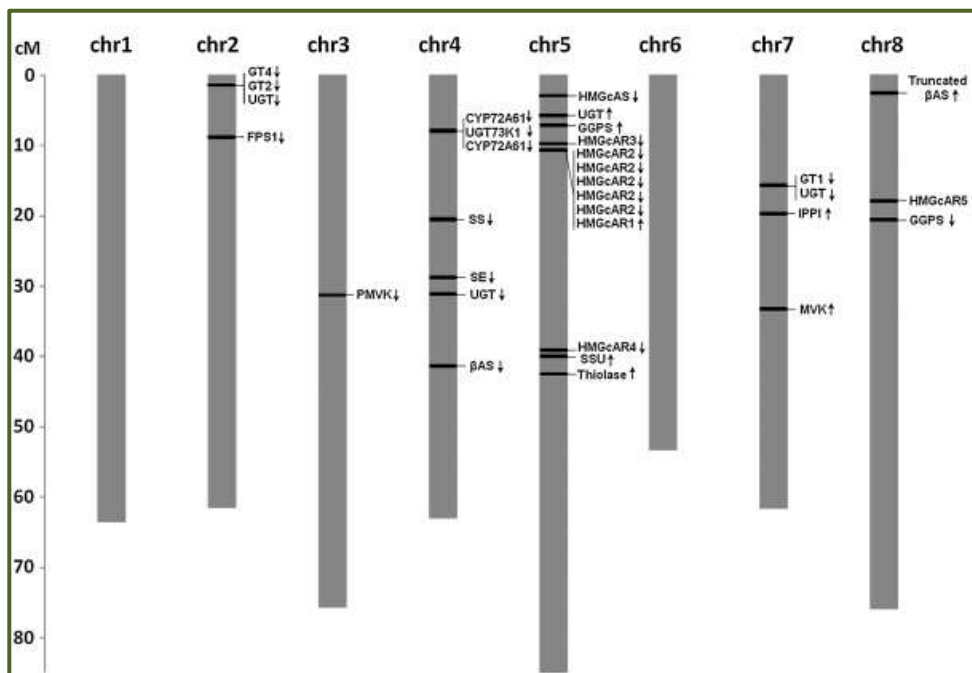
Τα γλυκοσίδια των τριτερπενοειδών σαπωνινών παρουσιάζουν ενδιαφέρον λόγω των πολλών βιολογικών τους δραστηριοτήτων. Οι τερπενοειδείς σαπωνίνες εντοπίζονται ευρέως στο γένος *Leguminosae* (5,37). Οι βιολογικές τους δραστηριότητες μπορεί να είναι τόσο θετικές όσο και αρνητικές (5). Έτσι, υπάρχουν σαπωνίνες που έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες και εντομοαπωθητικές δραστηριότητες, σαπωνίνες που είναι τοξικές για μονογαστρικά ζώα, δρουν ως αντιγευστικοί παράγοντες ή έχουν αρνητικές επιδράσεις στη πέψη τους από τα μηρυκαστικά (27,33,38,39,40). Άλλες σαπωνίνες έχουν χρήσιμες φαρμακολογικές ιδιότητες, όπως αντιχοληστερολαιμικές, αντικαρκινικές και ανοσοενισχυτικές (41,42,43). Παρά το προφανές ενδιαφέρον για την επαγωγή ή την αναστολή της παραγωγής τριτερπενοειδών σαπωνοειδών για την βελτίωση των καλλιεργειών ή την ανάπτυξη φαρμακευτικών παραγόντων, πολλά από τα βιοσυνθετικά βήματα παραμένουν μη χαρακτηρισμένα σε μοριακό επίπεδο. Το *M. truncatula* είναι ένα κατάλληλο φυτικό μοντέλο για λειτουργική γενωμική προσέγγιση της βιοσύνθεσης των τριτερπενοειδών σαπωνινών. Επτά διαφορετικές τριτερπενοειδείς αγλυκόνες, *soyasapogenol B*, *soyasapogenol E*, *medicagenic acid*, *hederagenin* και *bayogenin* αποτελούν τον πυρήνα των 37 σαπωνινών του *M. truncatula* που έχουν ταυτοποιηθεί (37). Όλες αυτές οι αγλυκόνες πιστεύεται πως προέρχονται από την β-αμυρίνη, το οποίο όπως αναφέρθηκε είναι το αρχικό προϊόν της κυκλοποίησης του 2,3-οξειδοσκουαλενίου, όπως φαίνεται στην Εικόνα 8.



Εικόνα 8. Η βιοσύνθεση της β-αμυρίνης και της κυκλοαρτενόλης και η συμβολή του κυτοχρώματος P450 στο *M. truncatula* (44).

#### A.4 Γονίδια OSC στο *M. truncatula* και στο *L. Japonicus*

Στην παρακάτω εικόνα φαίνονται οι θέσεις διαφόρων γονιδίων που πιθανόν εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών-ισοπρενοειδών.



Εικόνα 9. Θέσεις γονιδίων στα χρωμοσώματα του *M. truncatula* που πιθανόν εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών-ισοπρενοειδών (45).

Η συνθάση της β-αμυρίνης (β-AS) καταλύει το πρώτο δεσμευτικό βήμα στη βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών. Η β-AS έχει χαρακτηριστεί λειτουργικά στο *Panax Ginseng*, στο *pea* και στο *A. thaliana* και σχετίζεται στενά με τη φυτική συνθάση της κυκλοαρτενόλης, η οποία έχει επίσης χαρακτηριστεί λειτουργικά (44). Οι δυο διαφορετικοί τύποι της φυτικής OSC (κυκλάση του οξειδοσκουαλενίου) η συνθάση της κυκλοαρτενόλης και η β-AS, παρουσιάζουν υψηλή ομολογία αμινοξέων, αν και τα προϊόντα αντίδρασης διαφέρουν. Στο *M. truncatula* έχουν βρεθεί δυο πλήρους μήκους και δυο **truncated** κλώνοι β-AS (44). Σημειώνεται επίσης πως τα δύο ένζυμα που προηγούνται της OSC, η συνθάση του σκουαλενίου (SS) και η εποξειδάση του σκουαλενίου (SE) έχουν χαρακτηριστεί σε μεγάλο βαθμό στα θηλαστικά και στη ζύμη (46,47).

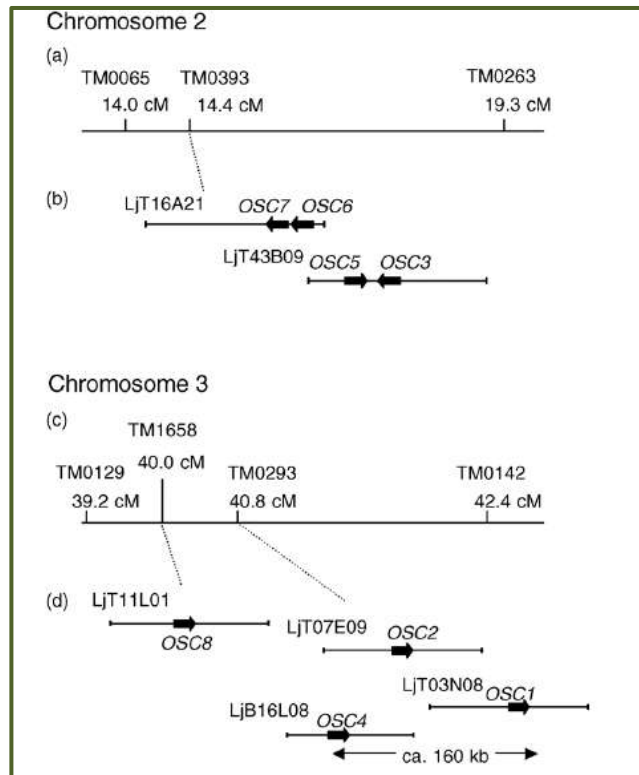
Η συνθάση του σκουαλενίου (SS) αντιπροσωπεύεται από τρεις πλήρους μήκους κλώνους και έναν truncated κλώνο στο *M. truncatula*. Η SS του *A. thaliana* κωδικοποιείται από δύο γονίδια, διαδοχικά οργανωμένα τα οποία έχουν ταυτόσημη οργάνωση σε σχέση με τη θέση των ιντρονίων και το μέγεθος των εξονίων και κωδικοποιούν ισομορφές οι οποίες παρουσιάζουν υψηλό επίπεδο συντηρημένων αλληλουχιών. Το mRNA της SS εντοπίζεται σε όλους τους ιστούς των φυτών (άνθη, φύλλα, μίσχος και ρίζα) αν και τα μεταγγραφα είναι ιδιαίτερα άφθονα στις ρίζες (48). Η εποξειδάση του σκουαλενίου (SE) υπάρχει σε δυο truncated αντίγραφα στο *M. truncatula*, και σε τρία πλήρους μήκους αντίγραφα στο *A. thaliana*. Ωστόσο, κανένα από αυτά δεν έχει χαρακτηριστεί λειτουργικά (44).

Επομένως, στο *M. truncatula* τα γονίδια *b-AS* και *SS* βρίσκονται σε δυο αντίγραφα. Οι δυο διαφορετικοί τύποι φυτικών *OSC*, η συνθάση της κυκλοαρτενόλης και η *b-AS*, παρουσιάζουν μια σχετική υψηλή ομοιότητα σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας, μολονότι τα τελικά τους προϊόντα είναι διαφορετικά (49,50).

Στο γονιδίωμα του *M. truncatula* έχουν βρεθεί οχτώ γονίδια, τα οποία έχουν μοναδικό πρότυπο έκφρασης και ομοιάζουν με τις γνωστές 2,3- κυκλάσες του οξειδοσκουαλενίου. Η έκφραση του Medtr5g00886, με τη βοήθεια του ζεύγους εκκινήτων Mtr.38244.1.S1\_at, εμφανίζει αρκετά ομοιόμορφη κατανομή στους ιστούς και πιθανόν αυτό να αντανakλά πιθανό του ρόλο στον πρωτογενή μεταβολισμό (44). Φυλογενετική ανάλυση τοποθετεί αυτό το γονίδιο στον κλάδο CAS, με το πλησιέστερο ομόλογό του (92% ομολογία αμινοξικής αλληλουχίας) να εντοπίζεται στο *P. sativum*. Δηλαδή, το κοντινότερο ομόλογο του γονιδίου *b-AS* του *M. truncatula* είναι στο *P. sativum*. Σημειώνεται ότι το *b-AS* εκφράζεται σε μεγαλύτερο βαθμό στους σπόρους και σε πιο προχωρημένα αναπτυξιακά στάδια στις ρίζες (51).

Τα γονίδια που εμπλέκονται σε μεγαλύτερο βαθμό στη βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών στο *M. truncatula* εντοπίζονται στο χρωμόσωμα 4, αν και υπάρχουν μερικά επιπλέον που εντοπίζονται στην αρχή του χρωμοσώματος 5. Αυτά τα γονίδια δεν συνδέονται στενά αλλά η διατήρηση της εντόπισής τους στο ίδιο χρωμόσωμα κατά την εξέλιξη προτείνει ότι ίσως υπάρχει κάποιο πλεονέκτημα να σχετίζονται φυσικώς αυτά τα γονίδια. Είναι πιθανόν ότι ρυθμιστικές επιδράσεις μπορεί να ασκούνται από σχετικά μακρινές αποστάσεις από την περιοχή αυτή στο χρωμόσωμα 4. Ένα μειωμένο σε μέγεθος αντίγραφο ενός γονιδίου με υψηλή συγγένεια για το *b-AS* έχει βρεθεί στο χρωμόσωμα 8 και αυτό εξηγεί γιατί σε μια DNA gel blot ανάλυση εμφανίζονται δύο αντίγραφα *b-AS* (44). Μέχρι στιγμής δεν έχει γίνει η πλήρης ανάλυση των πιθανών *OSC* γονιδίων στο *M. truncatula* που εμπλέκεται στο σχηματισμό των τριτερπενοειδών. Επίσης, στο *M. truncatula* δεν έχουν αναφερθεί ενώσεις με σκελετό α-αμυρίνης. Σημειώνεται πως περισσότερα από 90 διαφορετικοί τύποι σκελετών των τριτερπενίων θα μπορούσαν θεωρητικά να δημιουργηθούν με την κυκλοποίηση του 2,3-οξειδοσκουαλενίου (45).

Οι Sawai et al. απέδειξαν ότι τα 8 *OSC* γονίδια του *L. japonicus* σχηματίζουν 2 συστοιχίες γονιδίων στα χρωμοσώματα 2 και 3 (Εικόνα 10) (34).



Εικόνα 10. Οργάνωση των OSC γονιδίων στο *L. japonicus* (34).

Οι *OSC1*, *OSC2* και *OSC4* εντοπίζονται γειτνιάζοντα σε μία χρωμοσωμική περιοχή 160 kb στο χρωμόσωμα 3. Επιπλέον, ένα γονίδιο *OSC* (προσωρινά ονομασμένο *OSC8*) με μία κωδική αλληλουχία υψηλά ομόλογη με το *LjAMY2* εντοπίστηκε στο χρωμόσωμα 3. Το γονίδιο *OSC2* βρέθηκε να είναι 1 kb μικρότερο από τα άλλα λειτουργικά OSC γονίδια και στερείται 7 εξωνίων, επομένως πρόκειται για ψευδογονίδιο. Στο χρωμόσωμα 2 εντοπίζονται τα γονίδια *OSC3*, *OSC5*, *OSC6* και *OSC7* (34).

#### A.4 Φυτορμόνες

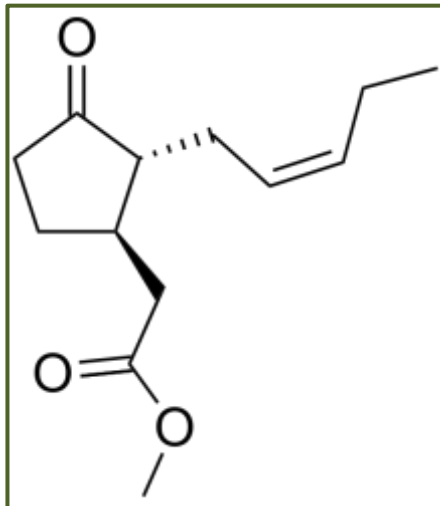
Η αύξηση του φυτού πρέπει να είναι αυστηρά συντονισμένη από διάφορα συστήματα ελέγχου, καθώς είναι ένα δυναμικό και πολύπλοκο φαινόμενο. Μία σειρά από ενδογενείς χημικές ουσίες οι ονομαζόμενες φυτορμόνες, φυτοαυξητικές ουσίες ή φυτοαυξητικοί ρυθμιστές διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της αύξησης και της ανάπτυξης του φυτού. Γενικά, είναι αποδεκτό ότι βάσει τόσο των φυσιολογικών δράσεων όσο και της χημικής

τους σύστασης οι φυτορμόνες διακρίνονται σε 5 βασικές κατηγορίες. Στις πρώτες τρεις κατηγορίες συμπεριλαμβάνονται οι αυξητικοί προωθητές, δηλαδή οι αυξίνες, οι γιββερελλίνες και οι κυτοκινίνες, στην τέταρτη οι αυξητικοί αναστολείς και στην πέμπτη το αιθυλένιο που είναι η μοναδική ορμόνη σε αέρια κατάσταση. Ωστόσο, υπάρχουν φυτικές ορμόνες και αυξητικοί ρυθμιστές που δεν μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με ευκολία σε κάποια από τις παραπάνω ομάδες. Μπορεί να υπάρχουν φυσικά ή να συντίθεται από τον άνθρωπο ή άλλους οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένου χημικών που αναστέλλουν την ανάπτυξη του φυτού ή παρεμβάλλονται σε φυσικές βιολογικές διαδικασίες (52). Παραδείγματα τέτοιων χαρακτηρισμένων ρυθμιστών της φυτικής ανάπτυξης είναι οι πολυαμίνες, οι στριγγολακτόνες και το ιασμονικό οξύ (Jasmonate).

#### **A.4.1 Ιασμονικό οξύ, κάτι περισσότερο από άρωμα**

Το ιασμονικό οξύ (JA) και ο μεθυλεστέρας του (MeJA), παράγονται από λιπαρά οξέα και ρυθμίζουν πολλές φυσιολογικές διαδικασίες στα φυτά αποτελώντας μια ξεχωριστή κατηγορία φυτορμόνης (53,54). Από τη στιγμή της ανακάλυψής τους το 1960, οι JAs ορίστηκαν ως παράγοντες που ανευρίσκονται στα αιθέρια έλαια του άνθους του *Jasminum sp.*. Μόνο δύο δεκαετίες μετά, ανακαλύφθηκαν οι πρώτες φυσιολογικές επιδράσεις των JAs και αναγνωρίστηκαν ως παράγοντες γήρανσης, αναστολείς της ανάπτυξης ή επαγωγείς του δευτερογενούς μεταβολισμού σε ποικίλα φυτικά είδη (55). Το Ιασμονικό μεθύλιο (MeJA) είναι μια πτητική οργανική ένωση (Εικόνα 11) η οποία χρησιμοποιείται στην άμυνα των φυτών και σε πολλές διαφορετικές αναπτυξιακές οδούς. Προέρχεται από το ιασμονικό οξύ με μια αντίδραση η οποία καταλύεται από την S-αδενοσυλ-L-μεθειονίνη μια μεθυλοτρανσφεράση του καρβοξυλίου του ιασμονικού οξέος.

Ήδη από το 1992, αναφέρθηκε ότι η εξωγενής χορήγηση του MeJA επάγει τη βιοσύνθεση πολλών δευτερογενών μεταβολιτών και καθιέρωσε τη χρήση του ιασμονικού μεθυλίου ως ενεργοποιητή του δευτερογενούς μεταβολισμού



Εικόνα 11. Απεικόνιση του οργανικού τύπου του MeJA (56).

σε φυτικούς ιστούς (57). Ανάμεσα στους δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από επίδραση με MeJA συμπεριλαμβάνονται και τα τερπενοειδή (57,58,59).

Μελέτες που έχουν γίνει με έκθεση καλλιεργειών σε MeJA στο *M. truncatula* (60) στο *A. thaliana* (61) και σε άλλα φυτά έχουν καταδείξει έναν εκτεταμένο γενετικό επαναπρογραμματισμό στο μεταβολισμό που εμφανίζει θετική συσχέτιση με τις παρατηρούμενες αλλαγές στη βιοσύνθεση των μεταβολιτών που μας ενδιαφέρουν. Συγκεκριμένα, ανάλογα με το είδος του φυτού, έγινε μεταγραφική επαγωγή σε διαφορετικά βιοσυνθετικά μονοπάτια, οδηγώντας για παράδειγμα σε φαινυλπροπανοειδή και τριτερπενοειδείς σαπωνίνες στο *M. truncatula* (60) και μονολιγνόλες στο *A. thaliana* (61). Σε όλες τις περιπτώσεις, τα γονίδια που εμπλέκονταν σε ένα συγκεκριμένο βιοσυνθετικό μονοπάτι ήταν στενά συν-ρυθμιζόμενα και η επαγωγή τους συνέβη αξιοσημείωτα νωρίς (συνήθως εντός 1-4 ωρών), υποδεικνύοντας ότι ενεργοποίηση του δευτερογενούς μεταβολισμού είναι άμεσο και καλά οργανωμένο αποτέλεσμα του JA. Επιπλέον, όταν υπήρχε επαγωγή περισσότερων του ενός μονοπατιού, συχνά το καθένα από αυτά ενεργοποιούνταν σε διακριτό χρόνο ή σε εύρος ανάλογο της ευαισθησίας των μορίων που συμμετέχουν σε αυτό, σε JA. Για παράδειγμα, στα κύτταρα



του *M. truncatula*, τα βιοσυνθετικά γονίδια των φαινυλπροπανοειδών επαγόταν παροδικά με μέγιστη κορυφή δύο ώρες μετά την προσθήκη MeJA, μόνο σε χαμηλές συγκεντρώσεις (0.5–5 mM), ενώ τα μετάγραφα των γονιδίων των τριτερπενίων έφτασαν στο μέγιστο μετά από 12–24ώρες παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων MeJA (5–500mM) (60). Έτσι, η μεσολάβηση JA για την παραγωγή διαφορετικών δευτεροπαθών μεταβολικών οδών υπακούει σε διαφορετικά ρυθμιστικά πλαίσια, τα οποία είτε αυτορυθμίζονται ή ρυθμίζονται από κοινά μόρια-μεσολαβητές.

#### **A.4.2 Οι ορμόνες 2,4-D και BA**

Το 2,4 διχλωροφαινοξυοξικό οξύ (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid/2,4-D), είναι μια συνθετική αυξίνη, η οποία όπως αναφέρθηκε είναι μια τάξη φυτικών ορμονών. Πρόκειται για ένα κοινό παρασιτοκτόνο/φυτοκτόνο το οποίο βρίσκει εφαρμογή στα πλατύφυλλα φυτά. Μάλιστα είναι ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα φυτοκτόνα στον κόσμο και το τρίτο πιο συχνά χρησιμοποιούμενο παρασιτοκτόνο στη Βόρεια Αμερική. Στα εργαστήρια χρησιμοποιείται για ερευνητικούς σκοπούς στα φυτά και ως συμπλήρωμα σε θρεπτικό μέσο φυτικών καλλιεργειών όπως το MS medium. Μετά από εξωγενή χορήγηση της, απορροφάται από τα φύλλα και έπειτα μετατοπίζεται στα μεριστώματα του φυτού. Έχει βρεθεί ότι οι αυξίνες και ιδιαίτερα το 2,4-D, δρουν ως ισχυροί καταστολείς του δευτερογενούς μεταβολισμού σε κυτταρικές καλλιέργειες φυτών, καθώς και ως ρυθμιστές των κοινών διαδικασιών της αύξησης των κυττάρων και της κυτταρικής διαφοροποίησης (62,63,64). Συγκεκριμένα ο Whitmer και οι συνεργάτες του παρατήρησαν μείωση της συσσώρευσης των αλκαλοειδών (καταστολή της γονιδιακής έκφρασης μορίων του μονοπατιού ΤΙΑ) στο *Cantharanthus roseus* μετά από επίδραση με 2,4-D (64).

Η 6-βενζυλαμινοπουρίνη ή βενζυλο-αδενίνη (6-Benzylaminopurine / benzyl adenine / BAP, BA) είναι ένα συνθετικό της φυτορμόνης κυτοκίνης που επάγει την ανάπτυξη των φυτών και αναπτυξιακές διαδικασίες και βοηθά την άνθηση και την καρποφορία, διεγείροντας την κυτταρική διαίρεση. Αποτελεί

αναστολέα της αναπνευστικής κινάσης στα φυτά και έχει βρεθεί ότι σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους βοηθά στη διατήρηση της ποιότητας φυτών, όπως είναι το μπρόκολο. Όπως και με το 2,4-D έχει παρατηρηθεί συσσώρευση αλκαλοειδών στο *C. roseus* μετά από επίδραση με BA (65).

## **B. Σκοπός**

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης εξωγενώς παρεχόμενων ορμονών στην έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση τριτερπενοειδών στα φυτά *Medicago truncatula* και *Lotus japonicus*.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι ορμόνες MeJa, BA και 2,4-D στο υπόστρωμα ανάπτυξης των φυτών. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA, κατασκευή cDNA και Real Time-PCR με χρήση εξειδικευμένων εκκινήτων προκειμένου να μελετηθεί η έκφραση του γονιδίου *βAS1* στο *M. truncatula* και του γονιδίου *AMY2* στο *L. japonicus* που κωδικοποιούν τη συνθάση της β-αμυρίνης.

## **Γ. Υλικά και Μέθοδοι**

### **Γ.1 Τα ψυχανθή *M.truncatula* και *L.japonicus* ως φυτικά μοντέλα**

Ως φυτικά υλικά για τη διεξαγωγή των πειραμάτων που αφορούν στη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *βAS1* και *AMY2* χρησιμοποιήθηκαν τα ψυχανθή *M. truncatula* και *L. japonicus*, αντίστοιχα.

### **Γ.2 Προετοιμασία των σπόρων**

Για την ομοιόμορφη και γρήγορη βλάστηση των σπερμάτων του *M. truncatula* και του *L. japonicus* είναι απαραίτητη η τοποθέτησή τους σε πυκνό θειϊκό ( $H_2SO_4$ ) οξύ για 5 λεπτά. Ακολουθούν πέντε εκπλύσεις με απιονισμένο κρύο 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 και απλώνονται σε τρυβλία, ο πάτος των οποίων καλύπτεται με 2 φύλλα διηθητικού χαρτιού Whatmann 3MM, εμποτισμένα με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό. Τα τρυβλία αφήνονται στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου για 72 έως 96 ώρες, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η προβλάστηση των σπερμάτων. Στη συνέχεια αφαιρείται το αλουμινόχαρτο.

### **Γ.3 Χειρισμοί των φυτών *M. truncatula* και *L.japonicus* με MeJA, BA και 2,4-D**

Τα νεαρά έκφυτα μεταφέρονται σε τρυβλία που περιέχουν MS και 1% σουκρόζη και ορμόνες σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Τα φυτά αναπτύσσονται σε θάλαμο υπό ελεγχόμενες συνθήκες (θερμοκρασία 23°C, φωτοπερίοδος 16 ώρες φως / 8 ώρες σκοτάδι). Οι 3 διαφορετικοί χειρισμοί που πραγματοποιήθηκαν περιγράφονται παρακάτω:

Τα νεαρά έκφυτα μεγαλώνουν για 7 μέρες σε τρυβλία με MS που περιέχουν MeJA σε συγκέντρωση 10μM ή 25μM, BA σε συγκέντρωση 0,6mg/l και 2,4-D σε συγκέντρωση 0,15mg/l. Επιπλέον, νεαρά έκφυτα μεγαλώνουν σε τρυβλία MS που περιέχουν 0,1μM 2,4 – D και 0,5μM BA. Σαν φυτά μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν φυτά που αναπτύσσονται σε τρυβλία με MS και φυτά που αναπτύσσονται σε θρεπτικό MS που περιέχει αιθανόλη, καθώς το meJA και το 2,4-D διαλύονται σε αιθανόλη. Οι ρίζες συλλέγονται και αποθηκεύονται στους -80°C μέχρι την εξαγωγή των RNA και την κατασκευή των cDNA.

### **Γ.4 Απομόνωση ολικού RNA από τις ρίζες των φυτών**

Για την απομόνωση ολικού RNA από τους φυτικούς ιστούς χρησιμοποιήθηκε το RNeasy Plant Mini Kit της εταιρίας QIAGEN. Η διαδικασία έχει ως εξής:

1. Χρησιμοποιούνται 100mg φυτικού ιστού τα οποία ομογενοποιούνται με ελαιοτριβίση σε σωλήνα erpendorf 2 ml μαζί με υγρό άζωτο.
2. Προσθήκη 500μl buffer RLT [σε 1ml buffer RLT έχει προστεθεί 10μl β-μερκαπτεθανόλη (β-ME)].

3. Ακολουθεί πολύ καλή ανάδευση σε μηχανικό αναδευτήρα και επώαση στους 56°C για ένα έως τρία λεπτά.
4. Μεταφορά του δείγματος σε στήλη φυγοκέντρησης QIAshredder, η οποία τοποθετείται σε σωλήνα erpendorf 2ml και φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές ανά λεπτό (rpm) για 2 λεπτά.
5. Προσεκτικά μεταφέρεται με πιπέτα το υπερκείμενο χωρίς να διαταραχθεί το ίζημα σε νέο σωλήνα erpendorf 1,5ml.
6. Προσθήκη 250μl αιθανόλη (96-100 %), το 1/2 του αρχικού όγκου του διαλύματος και ανάμιξη με την πιπέτα.
7. Μεταφορά του διαλύματος (750μl) σε στήλη φυγοκέντρησης RNeasy η οποία τοποθετείται σε σωλήνα erpendorf 2ml. Φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 2 λεπτά και απόρριψη του υπερκείμενου.
8. Προσθήκη 500μl buffer RPE και φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 2 λεπτά. Απόρριψη του υπερκείμενου και νέα φυγοκέντρηση στις ίδιες στροφές και λεπτά. Τοποθέτηση της στήλης σε νέο σωλήνα erpendorf 1,5ml.
9. Προσθήκη 50μl "RNase-free" νερού στο κέντρο της στήλης και φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 1 λεπτό για έκπλυση του RNA.

## **Γ.5 Χειρισμός του ολικού RNA με DNάση**

Με αυτή τη μέθοδο απομακρύνεται το γονιδιωματικό DNA που, ίσως, συνυπάρχει με το RNA που απομονώθηκε από τον ιστό. Αρχικά προστίθεται DNάση στο αρχικό δείγμα RNA και στη συνέχεια γίνεται μεταχείριση με φαινόλη και χλωροφόρμιο για τον "καθαρισμό" του RNA. συνολικά ακολουθούνται τα εξής βήματα :

1. Σε 25,5μl ολικού RNA που απομονώθηκε με την προηγούμενη διαδικασία προστίθεται:
  1. 3μl 10X ρυθμιστικό διάλυμα DNάσης.
  2. 0,5μl αναστολέα RNase.
  3. 1 μlDNάση ελεύθερης από RNάσες (1U / μg RNA).

2. Ο τελικός όγκος είναι 30μl και ακολουθεί επώαση στους 37°C για 20 λεπτά.
3. Προστίθενται 3 όγκοι αρχικού διαλύματος ddH<sub>2</sub>O (90μl) και 4 όγκοι αρχικού διαλύματος φαινόλη (120μl). Το μίγμα αναδεύεται σε μηχανικό αναδευτήρα και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 5 λεπτά.
4. Η πάνω φάση του υδατικού διαλύματος που προκύπτει (περίπου 120μl) μεταφέρεται σε νέο σωλήνα erpendorf και η ίδια διαδικασία ακολουθείται και κατά την ανάμιξη με φαινόλη/χλωροφόρμιο σε αναλογία 1:1 και σε ανάμιξη με ίσο όγκο χλωροφόρμιο.
5. Η κατακρήμνιση του RNA γίνεται με προσθήκη 1/20 του όγκου του διαλύματος CH<sub>3</sub>COONa pH=5,3 και προσθήκη 2,5 όγκων αιθανόλης. Το δείγμα διατηρείται στους -20°C για 12 ώρες τουλάχιστον ή εναλλακτικά στους -80°C για 1 ώρα.
6. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 20 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C και αφαιρείται το υπερκείμενο.
7. Προστίθεται ίσος όγκος αρχικού διαλύματος αιθανόλη 70% και ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 20 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C. Αφαιρείται το υπερκείμενο και επιπροσθέτως μπορεί να πραγματοποιηθεί και μία δεύτερη φυγοκέντρηση για 5 λεπτά για την πλήρη αφαίρεση της αιθανόλης.
8. Το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει στον πάγο για περίπου 15 λεπτά και επαναδιαλύεται σε 21μl ddH<sub>2</sub>O.

## **Γ.6 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων**

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 49μl dH<sub>2</sub>O, τοποθετήθηκαν 1μl 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 50mg/ml, σε διαλύματα RNA ισούται με 40mg/ml, ενώ στην περίπτωση ολιγονουκλεοτιδίων ισούται με 30mg/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 η τιμή του πρώτου λόγου κυμαίνεται μεταξύ 1,8 – 2,0 και του δεύτερου στο 0,5, τότε το δείγμα θεωρείται ικανοποιητικής καθαρότητας.

### **Γ.6.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)**

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) είναι ο *in vitro* πολλαπλασιασμός αλληλουχιών DNA με ταυτόχρονη επέκταση των δύο συμπληρωματικών αλυσίδων. Η διαδικασία περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους κύκλους σε διαφορετικές θερμοκρασίες, με γρήγορη μετάβαση από τη μια θερμοκρασία στην άλλη. Σε χρονικό διάστημα ολίγων ωρών, η συγκεκριμένη περιοχή του DNA που επεκτείνεται (DNA στόχος), πολλαπλασιάζεται σε ένα μεγάλο αριθμό αντιγράφων. Τα απαραίτητα αντιδραστήρια για την PCR είναι DNA στόχος, εκκινητές "primers", τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια, ένζυμο Taq DNA πολυμεράση, ιόντα Mg<sup>++</sup> απαραίτητα για την ενζυμική δράση και κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (pH ≈ 8.2) για τη δράση του ενζύμου.

Το DNA στόχος, πολλαπλασιάζεται μετά από πολλαπλές αντιγραφές, σε σημείο που να είναι ανιχνεύσιμο. Το DNA στόχος αποτελεί το πρότυπο DNA στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης και ως αφετηρίες χρησιμοποιούνται 2 συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (18-22 βάσεων) που έχουν

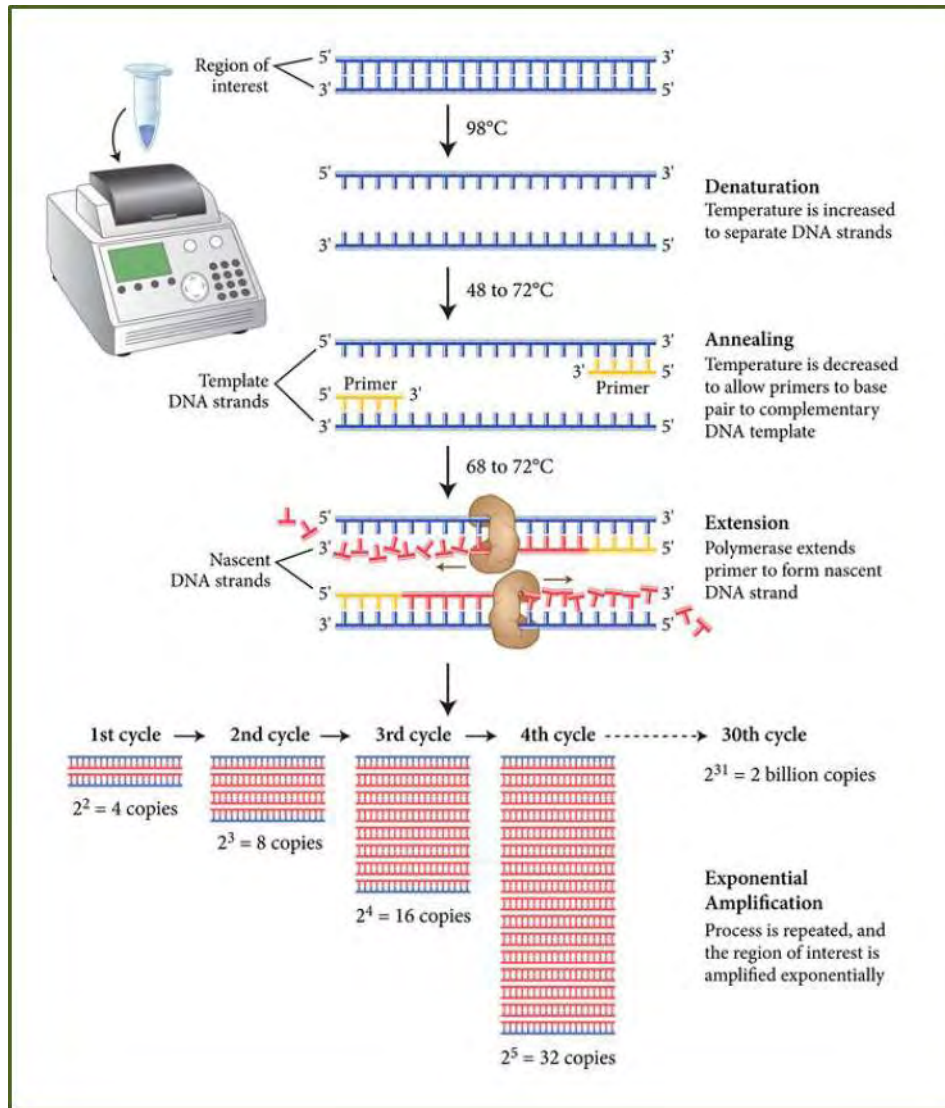
δομή συμπληρωματική προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA στόχου, το καθένα αντίστοιχα προς τον ένα κλώνο του στόχου και με αντίθετη κατεύθυνση.

Κάθε κύκλος περιλαμβάνει :

- Θέρμανση σε υψηλή θερμοκρασία (93–95°C) ώστε να αποδιαταχθεί το DNA (denaturation step) και από δίκλωνο μετατρέπεται σε μονόκλωνο.
- 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. Ένας 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 (extention step). Κατά τη διάρκεια αυτού του βήματος λαμβάνει χώρα η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA, με τη δράση της DNA πολυμεράσης. Έτσι σχηματίζονται δύο καινούργιες αλυσίδες ή κλώνοι DNA συμπληρωματικές προς αυτές των δύο κλώνων του προτύπου DNA με αποτέλεσμα το διπλασιασμό του DNA στόχου.

Η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω επαναλαμβάνεται για 25–30 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. 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).





Εικόνα 12. Σχηματική αναπαράσταση βασικών διαδικασιών της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (66).

## Γ.6.2 PCR για τον έλεγχο ύπαρξης γενωμικού DNA

Πραγματοποιείται η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης στο ολικό RNA που απομονώθηκε για να διαπιστωθεί τυχόν ύπαρξη DNA. Για αυτό το σκοπό θα ενισχυθεί το γονίδιο της συμπλοκωϊτίνης το οποίο εκφράζεται σε όλους τους φυτικούς ιστούς.

Σε σωλήνα errendorf προστίθενται τα παρακάτω σε τελικό όγκο 20μl.

- 15,42μl ddH<sub>2</sub>O
  - 2μl 10X ρυθμιστικό διάλυμα Kara Taq
  - 0,4μl μίγμα dNTPs
  - 0,5μl ολικό RNA
  - 0,8μl εκκινητής έμπροσθεν
  - 0,8μl εκκινητής ανάστροφος
  - 0,08μl DNA πολυμεράση kara Taq (1 Unit/μl)
- Το μίγμα αναμιγνύεται με γρήγορη φυγοκέντρηση και τοποθετείται στη συσκευή PCR, προκειμένου να εκτελεστεί το παρακάτω πρόγραμμα:

Διαδικασία	Θερμοκρασία	Χρόνος	Αριθμός κύκλων
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	2 λεπτά	1
Αποδιάταξη αλυσίδων DNA	95 °C	30 δευτερόλεπτα	35
Υβριδοποίηση εκκινητών		30 δευτερόλεπτα	35
Σύνθεση νέων αλυσίδων DNA	72 °C	30 δευτερόλεπτα	35
Τελική επιμήκυνση	72 °C	10 λεπτά	1

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για να ενισχύσουν το γονίδιο της ουμπικουΐτινης στα *L. japonicus*:

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

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

και στο *M. truncatula*:

εκκινητής έμπροσθεν Mtc27F: 5'-TGAGGGAGCAACCAATACC-3'

εκκινητής ανάστροφος Mtc27R: 5'-GCGAAAACCAAGCTACCATC-3'

Μετά το τέλος της διαδικασίας το προϊόν της PCR αναλύεται σε πηκτική αгарόζης.

### **Γ.6.3 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης με χρήση της αντίστροφης μεταγραφάσης**

Στην PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR) ως αρχικό δείγμα χρησιμοποιείται το ολικό RNA το οποίο μετατρέπεται σε cDNA παρουσία του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης (reverse transcriptase). Για τη μεταγραφή αυτή χρησιμοποιούνται τυχαία εξαμερή ή εννιαμερή όλιγοdTs και το cDNA που θα παραχθεί θα χρησιμοποιηθεί ως εκμαγείο για την DNA πολυμεράση στη συνήθη τεχνική της PCR. Εξελίξεις στην RT-PCR περιλαμβάνουν την ανάπτυξη απλών πρωτοκόλλων στα οποία η σύνθεση cDNA και η αντίδραση PCR εκτελούνται σε ένα στάδιο (one step RT-PCR). Τα πρωτόκολλα αυτά βασίζονται στην αξιοποίηση της διπλής ιδιότητας ορισμένων θερμοσταθερών DNA πολυμερασών όπως η *Thermus Thermophilus* (Tth) DNA πολυμεράση να μεταγράψουν αντίστροφα RNA παρουσία  $Mn^{2+}$ , ενώ ταυτόχρονα δρουν και ως DNA πολυμεράσες.

Η σύνθεση του cDNA έγινε χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο ImProm-II™ Reverse Transcription System της εταιρίας Promega και πραγματοποιείται σε ένα στάδιο.

Αρχικά σε σωλήνα erpendorf τοποθετούνται τα παρακάτω συστατικά

- 1ng – 5mg ολικού RNA
- 1μl oligo(dT)15 primer (0,5mg / αντίδραση)
- δις απεσταγμένο νερό (ddH<sub>2</sub>O) μέχρι τελικό όγκο 5μl.

Το παραπάνω μίγμα φυγοκεντρείται γρήγορα και θερμαίνεται στους 70°C για πέντε λεπτά.

Τοποθετείται αμέσως στον πάγο για 5 λεπτά, φυγοκεντρείται γρήγορα και διατηρείται στον πάγο μέχρι να ετοιμαστεί το επόμενο μίγμα.

Σε δεύτερο σωλήνα erpendorf δημιουργείται το μίγμα της αντίδρασης με την αντίστροφη μεταγραφάση το οποίο περιέχει τα παρακάτω συστατικά:

- ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο 15μl
- 4μl ImProm-II™ 5X Reaction Buffer
- 0,5μl MgCl<sub>2</sub> (final concentration 1.5–8.0mM)
- 1μl dNTP Mix (final concentration 0.5mM each dNTP)

- 1μl αναστολέας RNάσης (20 units)
- 1μl ImProm-II™ αντίστροφη μεταγραφάση

Το παραπάνω μίγμα φυγοκεντρείται γρήγορα και προστίθεται στο πρώτο σωλήνα erpendorf ο οποίος περιέχει το αρχικό δείγμα. Έτσι προκύπτει τελικός όγκος 20μl.

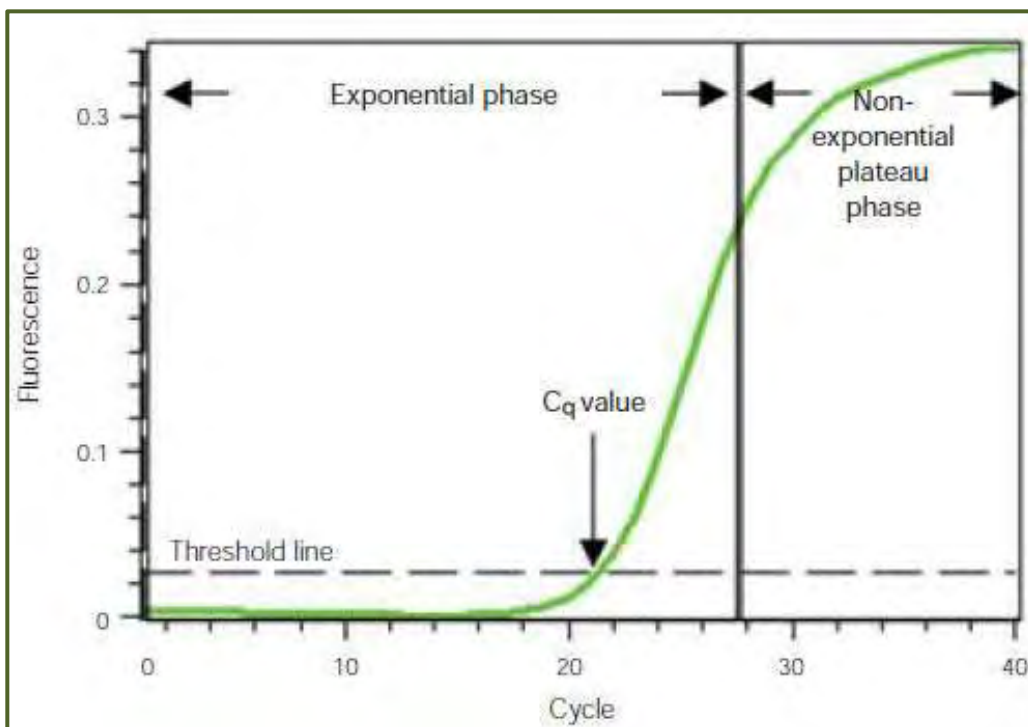
Το τελικό διάλυμα τοποθετείται στην συσκευή PCR όπου πραγματοποιούνται τα παρακάτω στάδια:

Στάδια	Θερμοκρασία	Χρόνος
1 <sup>ο</sup> στάδιο	25 °C	6 λεπτά
2 <sup>ο</sup> στάδιο	42 °C	60 λεπτα
3 <sup>ο</sup> στάδιο	70 °C	15 λεπτά

## **Γ.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου**

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 και η οποία επιτρέπει την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων αλληλουχιών-στόχων. Επιτρέπει την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση πολλαπλών τμημάτων DNA 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.

Πολλές φορές η real-time PCR συνδυάζεται με την πρότερη μετατροπή μιας ποσότητας RNA σε DNA, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής, με σκοπό κυρίως την μελέτη των επιπέδων έκφρασης γονιδίων. Στη βασική έρευνα χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση και παρακολούθηση της διαφορικής έκφρασης γονιδίων-στόχων μετά από μεταχειρίσεις ή για την αναπτυξιακή μελέτη των επιπέδων έκφρασης γονιδίων-στόχων.



Εικόνα 13. Χαρακτηριστική καμπύλη αλυσιδωτής αντίδρασης πραγματικού χρόνου (67).

### **Επιλογή των εκκινήτων**

Οι αλληλουχίες γονιδίων που κωδικοποιούσαν για τα ίδια ένζυμα του βιοχημικού μονοπατιού ομοπαράτέθηκαν με τον αλγόριθμο ClustalW. Οι εκκινήτες επιλέχθηκαν σε μη συντηρημένες περιοχές των γονιδίων, ώστε να αποφευχθεί ο μη εξειδικευμένος υβριδισμός των εκκινήτων. Σε περιπτώσεις μη επικαλυπτόμενων αλληλουχιών που κωδικοποιούσαν για το ίδιο γονίδιο οι εκκινήτες επαναδιερευνήθηκαν με τον αλγόριθμο BLAST σε όλες τις γονιδιακές βάσεις δεδομένων. Τελικά επιλέχθηκαν εκκινήτες που υβριδοποιήθηκαν πλήρως μόνο με την αλληλουχία του γονιδίου *βAS1* στο *M.*

*truncatula* και του γονιδίου *AMY2* στο *L. japonicus*. Η επιλογή των εκκινητών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του εξειδικευμένου προγράμματος επιλογής εκκινητών Beacon designer v7.0. Το μέγεθος των ενισχυόμενων τμημάτων ήταν περίπου 100 ζεύγη βάσεων. Οι εκκινητές επιλέχθηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός ομοδιμερών ή ετεροδιμερών. Η δημιουργία ομο- και ετερο-διμερών από τους εκκινητές έχει ως αποτέλεσμα την εκπομπή μη εξειδικευμένου φθορισμού κατά την αντίδραση της PCR πραγματικού χρόνου.

Οι εκκινητές οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

Σύμβολο εκκινητή	Νουκλεοτιδική αλληλουχία εκκινητή
Mtc27F	5'-TGAGGGAGCAACCAAATACC-3'
Mtc27R	5'-GCGAAAACCAAGCTACCATC-3'
MtBasIF	5'-ACGCCATGGTAAGCTATAAGCTATGA-3'
MtBasIR	5'-AGCGCTCGAGTAAATATTCTACCTATGC-3'
LiUbiF	5'-TTC ACC TTG TGC TCC GTC TTC-3'
LiUbiR	5'-AAC AAC AGC ACA CAC AGC CAA TCC-3'
AMY2F	5'-GCAGTTTAACTTGTTAAAGATAGC-3'
AMY2R	5'-GGCAACAAACCGACACTAAATAC-3'

### Γ.7.1 Αντίδραση της Real Time PCR

Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με το ίδιο θερμοκρασιακό πρόγραμμα σε συσκευή Mx3005P (Stratagene) και καταγράφηκαν για 45 κύκλους. Στο τέλος κάθε αντίδρασης ακολουθεί η παρακολούθηση της καμπύλης αποδιάταξης βάση της οποίας επιβεβαιώνεται η ύπαρξη ενός μόνο προϊόντος στην κάθε αντίδραση. Σε όλες τις περιπτώσεις το μίγμα της αντίδρασης προετοιμάστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας (Stratagene), ενώ στην τελική αντίδραση χρησιμοποιήθηκε η χρωστική αναφοράς ROX. Μετά το τέλος των αντιδράσεων τα δεδομένα εξάχθηκαν με τη μορφή πινάκων και επεξεργάζονταν με τη χρήση του προγράμματος LinRegPCR προκειμένου να προσδιοριστούν η αποτελεσματικότητα των εκκινητών (efficiency) της κάθε αντίδρασης αλλά και ο αριθμός των κύκλων ορίου (Ct), ο οποίος αντιπροσωπεύει των αριθμό των κύκλων της αντίδρασης πάνω από τους οποίους είναι δυνατή η

ανίχνευση φθορισμού. Για κάθε μία από τις βιολογικές επαναλήψεις πραγματοποιήθηκαν τρεις τεχνικές επαναλήψεις. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Αρχικά πραγματοποιήθηκε η PCR πραγματικού χρόνου για το γονίδιο της ουμπικουΐτινης ώστε να γίνει κανονικοποίηση – ποσοτικοποίηση στα αρχικά δείγματα cDNA. Για το σκοπό αυτό σε optical tubes προστέθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια μέχρι τελικό όγκο 20μl.

- 10μl 2X buffer
- 0,8μl εκκινητής έμπροσθεν
- 0,8μl εκκινητής ανάστροφος
- 1μl cDNA (αραιωμένο 1:10)
- 0,4μl χρωστική αναφοράς ROX
- 7μl ddH<sub>2</sub>O

Παρακολουθώντας την έκφραση του γονιδίου της ουμπικουΐτινης σε κάθε δείγμα βλέπουμε την πυκνότητα του cDNA που πήραμε από κάθε ιστό και κάνοντας τις κατάλληλες αραιώσεις ισοσκελίζουμε τις συγκεντρώσεις cDNA από κάθε δείγμα. Στη συνέχεια πραγματοποιείται η PCR πραγματικού χρόνου για κάθε γονίδιο (βAS1,AMY2) για να διαπιστωθεί η έκφραση του σε κάθε ιστό και σε κάθε ηλικία του φυτού. Αρχικά πραγματοποιήθηκε η PCR πραγματικού χρόνου για το γονίδιο της ουμπικουΐτινης ώστε να γίνει κανονικοποίηση – ποσοτικοποίηση στα αρχικά δείγματα cDNA. Για το σκοπό αυτό σε optical tubes προστέθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια μέχρι τελικό όγκο 20μl.

- 10μl 2X buffer
- 0,8μl εκκινητής έμπροσθεν
- 0,8μl εκκινητής ανάστροφος
- 1μl cDNA (αραιωμένο 1:10)
- 0,4μl χρωστική αναφοράς ROX
- 7μl ddH<sub>2</sub>O

Παρακολουθώντας την έκφραση του γονιδίου της ουμπικουΐτινης σε κάθε δείγμα βλέπουμε την πυκνότητα του cDNA που πήραμε από κάθε ιστό και

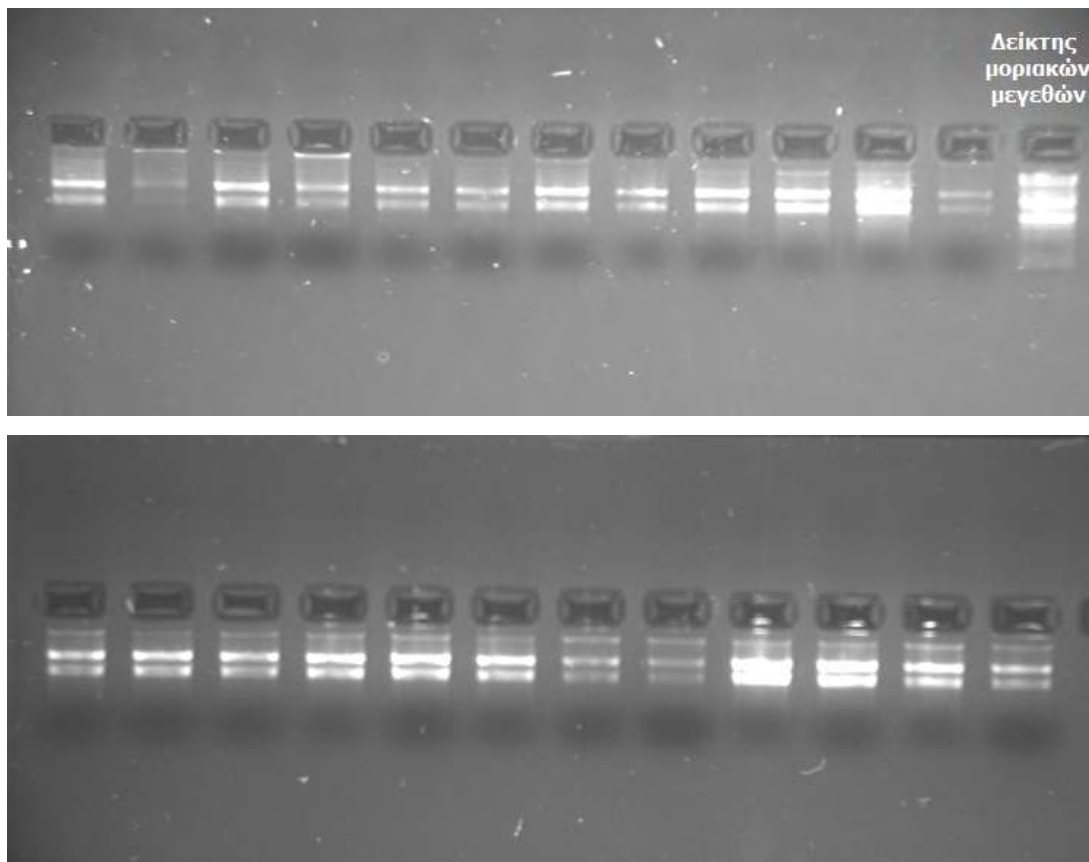
κάνοντας τις κατάλληλες αραιώσεις ισοσκελίζουμε τις συγκεντρώσεις cDNA από κάθε δείγμα. Στη συνέχεια πραγματοποιείται η PCR πραγματικού χρόνου για τα γονίδια *βAS* και *AMY2*, για να διαπιστωθεί η έκφραση τους στις ρίζες των φυτών.



## Ε. Αποτελέσματα

### Ε.1 Απομόνωση RNA

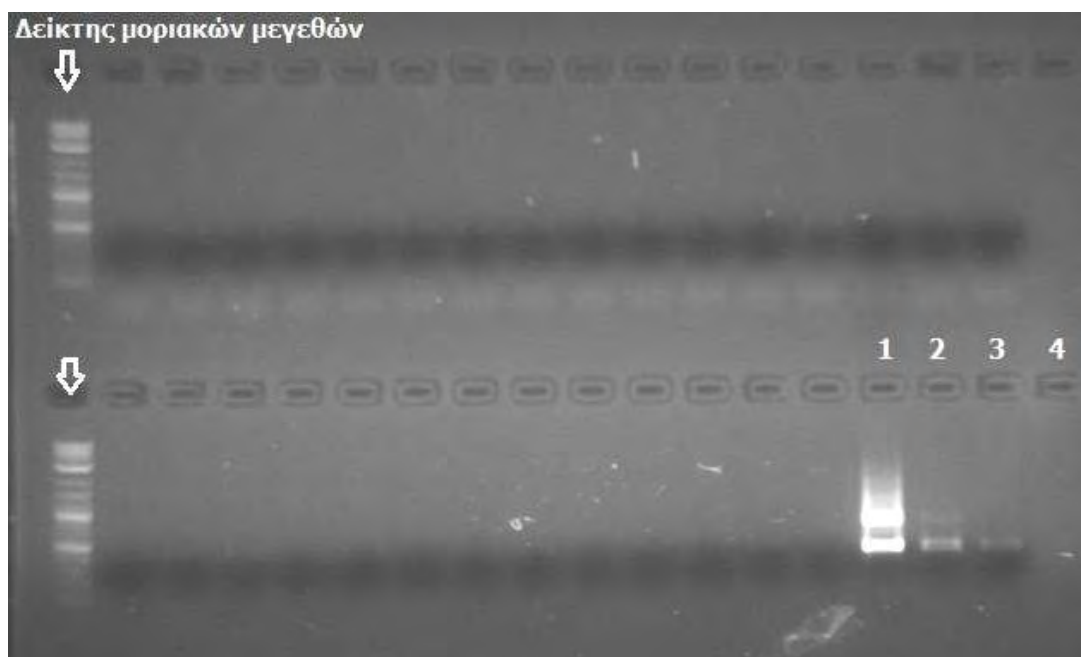
Στις παρακάτω φωτογραφίες φαίνονται τα RNA που απομονώθηκαν από τις ρίζες ηλικίας 12 ημερών των φυτών *M. truncatula* (επάνω) και το *L. japonicus* (κάτω), με τη χρήση του RNeasy Plant Mini Kit της εταιρίας QIAGEN.



### Ε.2 PCR για τον έλεγχο εύρεσης γονιδιωματικού DNA.

Πραγματοποιήθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης στο ολικό RNA που απομονώθηκε για να διαπιστωθεί τυχόν ύπαρξη DNA με την ενίσχυση το γονίδιο της ουμπικουϊτίνης, το οποίο εκφράζεται σε όλους τους φυτικούς ιστούς. Η εικόνα που παρουσιάστηκε στην πηκτή φαίνεται στην παρακάτω

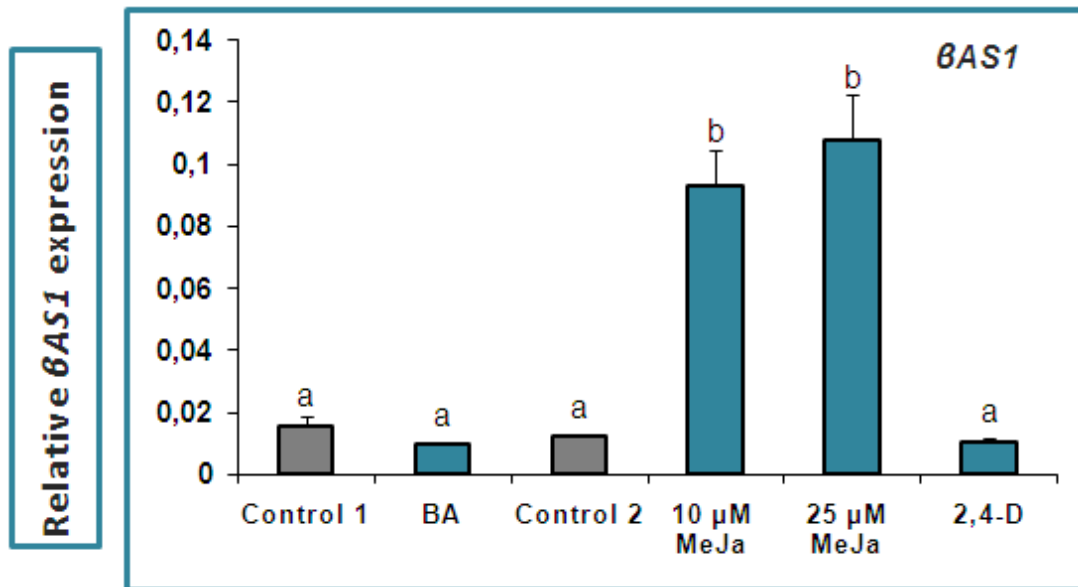
φωτογραφία. Αριστερά βρίσκεται ο δείκτης μοριακών μεγεθών, στις θέσεις 1,2,3 οι θετικοί μάρτυρες, στην 4 ο αρνητικός μάρτυρας και στις υπόλοιπες τα δείγματα μας. Όπως φαίνεται δούλεψε μόνο ο θετικός μάρτυρας καθώς δεν υπήρξε κάποια μπάντα που να αντιστοιχεί σε κάποιο από τα δείγματα.



### **E.3 Μελέτη έκφρασης του γονιδίου *βAS1* στο *M. truncatula***

Η ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου *βAS1* του *M. truncatula* πραγματοποιήθηκε υπό την επίδραση των ορμονών BA, MeJa και 2,4-D καθώς και απουσία οποιαδήποτε ορμόνης. Για τη διεξαγωγή του πειράματος απομονώθηκε ολικό RNA από τις ρίζες ηλικίας 12 ημερών του *M. truncatula*. Πραγματοποιήθηκε PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR) και ακολούθησε PCR πραγματικού χρόνου (real time PCR) ώστε να ανιχνευτούν τα επίπεδα του *βAS1*.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν έπειτα από σχετική κανονικοποίηση παρουσιάζονται στο Γράφημα 1.



Γράφημα 1: Επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης του *BAS1* στους διαφορετικούς χειρισμούς.

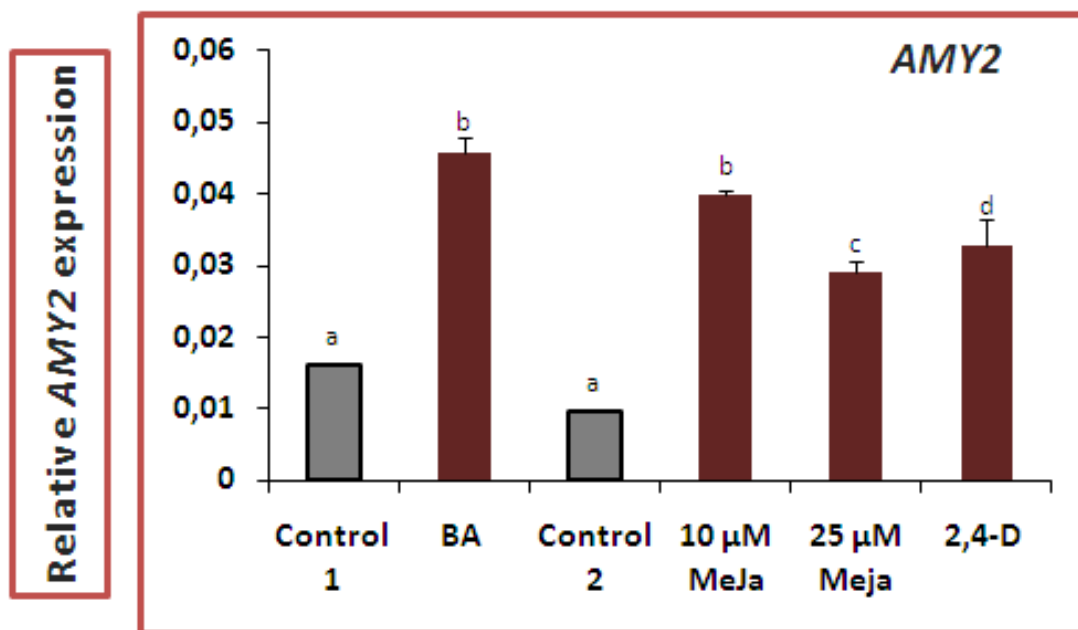
Όπως φαίνεται στο γράφημα 1, δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *BAS1* σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου όταν στο υπόστρωμα ανάπτυξης των φυτών χρησιμοποιήθηκαν οι ορμόνες BA και 2,4-D. Στα δείγματα όμως που χρησιμοποιήθηκε στο υπόστρωμα ανάπτυξης το MeJA παρουσιάστηκε αύξηση στα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης του γονιδίου *BAS1*. Μάλιστα φαίνεται ότι στα δείγματα στα οποία χρησιμοποιήθηκε στο υπόστρωμα MeJA (25 $\mu$ M) παρουσιάστηκαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου σε σχέση με αυτά στα οποία έγινε επίδραση με χαμηλότερη συγκέντρωση MeJA (10 $\mu$ M), χωρίς ωστόσο να είναι στατιστικά σημαντική αυτή η διαφορά.

#### **E.4 Μελέτη έκφρασης του γονιδίου *AMY2* στο *L. japonicus***

Η ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου *AMY2* του *L. japonicus* πραγματοποιήθηκε υπό την επίδραση των ορμονών BA, MeJa και 2,4-D καθώς και απουσία οποιαδήποτε ορμόνης.

Για τη διεξαγωγή του πειράματος απομονώθηκε ολικό RNA από τις ρίζες ηλικίας 12 ημερών του *L. japonicus*, τα φύλλα και τα φυμάτια. Πραγματοποιήθηκε PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR) και ακολούθησε PCR πραγματικού χρόνου (real time PCR) ώστε να ανιχνευτούν τα επίπεδα του *AMY2*.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν έπειτα από σχετική κανονικοποίηση παρουσιάζονται στο Γράφημα 2.



Γράφημα 2: Επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης του *AMY2* στους διαφορετικούς χειρισμούς.

Όπως φαίνεται στο Γράφημα 2 παρατηρήθηκε αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *AMY2* σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου όταν στο υπόστρωμα ανάπτυξης των φυτών χρησιμοποιήθηκαν οι ορμόνες MeJA, BA και 2,4-D. Φαίνεται ότι η BA έχει τη μεγαλύτερη επίδραση χωρίς ωστόσο να είναι σημαντική η διαφορά της με τις υπόλοιπες ορμόνες. Επιπλέον, η επαγωγή με MeJA (25μM) οδήγησε σε χαμηλότερα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης σε σχέση με τις υπόλοιπες ορμόνες.

## ΣΤ. Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών στα ψυχανθή. Τα ψυχανθή είναι υποοικογένεια φυτών και το όνομα τους προέρχεται από την απόδοση του λατινικού *Papilionoideae*. Καθορίζονται συνήθως από την τυπική δομή του άνθους και την ικανότητα πολλών εξ' αυτών να σχηματίζουν φυμάτια παρουσία συμβιωτικών βακτηρίων, των επονομαζόμενων ριζοβίων. Το μεγαλύτερο ποσοστό των ψυχανθών έχει την ικανότητα να δεσμεύει το άζωτο του αέρα μέσω των φυματίων στις ρίζες, ικανότητα στην οποία οφείλουν την εξελικτική, οικολογική και οικονομική τους επιτυχία. Την τελευταία δεκαετία έχουν αναδειχθεί δύο σημαντικά μοντέλα στη μελέτη της βιολογίας των ψυχανθών, το *Medicago truncatula* και το *Lotus japonicus*. Τα δύο αυτά φυτά μοιράζονται αρκετά κοινά χαρακτηριστικά που τα καθιστούν κατάλληλα ερευνητικά μοντέλα, αλλά διαφέρουν φυλογενετικά και παρουσιάζουν δύο διαφορετικά αναπτυξιακά συστήματα φυματίων.

Τα τριτερπενοειδή ανήκουν στους δευτερογενείς μεταβολίτες, ή αλλιώς δευτερογενή προϊόντα ή φυσικά προϊόντα και αποτελούν μια μεγάλη και ποικίλη τάξη οργανικών ενώσεων, μικρού μοριακού βάρους που παράγονται από τα φυτά (31). Ο σχηματισμός του σκελετικής δομής αυτών των συστατικών καταλύεται από τις οξειδοαναγωγικές κυκλάσες (*OSCs*) μέσω της κυκλοποίησης του 2,3-οξειδοσκουαλενίου. Σημαντικά ένζυμα στη πορεία παραγωγής των τριτερπενοειδών είναι η συνθάση της β-αμυρίνης (*βAS*), η συνθάση της α-αμυρίνης (*αAS*) και η συνθάση της λουπεόλης (*LuS*).

Η συνθάση της β-αμυρίνης (*β-AS*) καταλύει το πρώτο δεσμευτικό βήμα στη βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών. Η *β-AS* έχει χαρακτηριστεί λειτουργικά στο *Panax Ginseng*, στο *pea* και στο *Arabidopsis thaliana* και σχετίζεται στενά με τη φυτική συνθάση της κυκλοαρτενόλης, η οποία έχει επίσης χαρακτηριστεί λειτουργικά (44). Το γονίδιο *β-AS1* εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 4 του *M. truncatula* όπου εντοπίζονται τα περισσότερα γονίδια

που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών. Το γονίδιο *AMY2* κωδικοποιεί τη συνθάση της β αμυρίνης στο *L. japonicus* και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 3 του γενώματος του.

Στην παρούσα εργασία, έγινε προσθήκη των τριών φυτορμονών, MeJA, BA και 2,4-D προκειμένου να μελετηθούν οι αλλαγές που προκαλούν στα επίπεδα έκφρασης του *βAS1* και του *AMY2*. Το MeJA προκαλεί την επαγωγή πολλών δευτερογενών μεταβολιτών στα φυτά, και εκδηλώνεται κυρίως κάτω από συνθήκες περιβαλλοντικούς στρες (68). Όσον αφορά τη βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών έχει αναφερθεί ότι το MeJA επάγει την έκφραση του γονιδίου *βAS1* στο *M. truncatula* (44). Επίσης, έχει προταθεί ότι εξαιτίας της διασταυρούμενης επικοινωνίας των ορμονικών δικτύων που υπάρχουν στα φυτά, είναι πιθανόν και άλλες ορμόνες να ενισχύουν και να εξειδικεύουν τέτοιες επαγωγές (69). Επιπλέον έχει αναφερθεί ότι οι αυξίνες (2,4-D) και οι κυτοκίνες (BA) μεταβάλλουν το επίπεδο των αλκαλοειδών σε κυτταρικές καλλιέργειες *C. roseus* (64,65).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας το MeJA προκαλεί αύξηση της έκφρασης του γονιδίου *βAS1* στο *M. truncatula*, κάτι το οποίο συμφωνεί με τη βιβλιογραφία (44). Ωστόσο το BA και 2,4-D δεν προκάλεσαν αύξηση της έκφρασης του γονιδίου *βAS1* στο *M. truncatula*. Όσον αφορά το *L. japonicus* παρατηρήθηκε ότι και τρεις ορμόνες προκαλούν αύξηση της έκφρασης του γονιδίου *AMY2*. Επομένως, φαίνεται ότι η βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών στο *M. truncatula* επάγεται από το MeJA και στο *L. japonicus* από το BA, το 2,4-D και το MeJA.

## Δ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Polhill RM. 1994. Classification of the Leguminosae. In: Bisby FA, Buckingham J, Harborne JB (editors). *Phytochemical Dictionary of the Leguminosae*. vol. 1, pp. 35–56.
2. Faria SM, Lewis GP, Sprent JI, Sutherland JM. 1989. Occurrence of nodulation in the Leguminosae. *New Phytol.* vol. 111, no. 4, pp. 607–619.
3. Smil V. 1999. **Nitrogen in crop production: an account of global flows**. *Global Biogeochem. Cycles* 13, 647622.
4. Γαλανοπούλου Ν, Ζαμπετάκης Γ, Μαυρή Μ, Σαφιάκα Α. 2007. **Διατροφή και Χημεία Τροφίμων**. Αθήνα: Σταμούλη.
5. Dixon RA, Sumner LW. 2003. Legume natural products: Understanding and manipulation of complex pathway for human and animal health. *Plant Physiol.* 131:878-85.
6. Graham PH, Vance CP. 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* 131:872-7.
7. Thanopoulos R. 2000. The genus *Medicago* in Greece: A review of species diversity, geographical distribution and ecological adaptation. *Flora Mediterranea.* 17: 217-276.
8. [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Medicago\\_truncatula\\_A17\\_shoot.JPG](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Medicago_truncatula_A17_shoot.JPG).
9. [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Lotus\\_japonicus.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Lotus_japonicus.jpg).
10. Handberg K, Stoygaard J. 1992. *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *Plant J.* 2:487-496.
11. Cook DR. 1999. *Medicago truncatula* - a model in the making! *Curr Opin Plant Biol.* 2:301-4.
12. Trieu AT, Burleigh SH, Kardailsky IV, Maldonado-Mendoza IE, Versaw WK, Blaylock LA, Shin H, Chiou TJ, Katagi H, Dewbre GR, Weigel D, Harrison MJ. 2000.

Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings or flowering plants with *Agrobacterium*. *Plant J.* 22:531-41.

**13.** Trinick MJ, Galbraith J. 1976. Structure of root nodules formed by *Rhizobium* on the non legume *Trena cannabina* var. *scabra*. *Arch. Microbiol.* 108:159-166.

**14.** Galibert F, Finan TM, Long SR, Puhler A, Abola P, Ampe F, Barloy-Hubler F, Barnett MJ, Becker A, Boistard P, Bothe G, Boutry M, Bowser L, Buhrmester J, Cadieu E, Capela D, Chain P, Cowie A, Davis RW, Dreano S, Federspiel NA, Fisher RF, et al. 2001. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science.* 293:668-72.

**15.** [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Medicago\\_italica\\_root\\_nodules\\_2.JPG](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Medicago_italica_root_nodules_2.JPG).

**16.** Sprent JI. 2008 Evolution and diversity of legume symbioses. In: James EK, Sprent JI, Dilworth MJ, Newton WE (editors). *Nitrogen Fixing Leguminous Symbioses*. Springer, The Netherlands, pp. 1-21.

**17.** Kobayashi H, Broughton WJ. 2008. Fine-tuning of symbiotic genes in rhizobia: flavonoid signal transduction cascade. In: *Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses* (eds. Dilworth MJ, James EK, Sprent JI, Newton WE). Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 117-152.

**18.** Catoira R, Galera C, de Billy F, Penmetsa RV, Journet EP, Maillet F, Rosenberg C, Cook D, Gough C, Dénarié J. 2000. Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a nod factor transduction pathway. *Plant Cell.* 12:1647-66.

**19.** Patriarca EJ. 2004. Organogenesis of legume root nodules. *Int Rev Cytol* 234:201-62.

**20.** Savouré A, Sallaud C, El-Turk J, Zuanazzi J, Ratet P, Schultze M, Kondorosi A, Esnault R, Kondorosi E. 1997. Distinct response of *Medicago* suspension cultures and roots to Nod factors and chitin oligomers in the elicitation of defense-related responses. *Plant J.* 11:277-287.

**21.** Djordjevic MA, Weinman JJ. 1991. Factors Determining Host Recognition in the Clover-*Rhizobium* Symbiosis. *Aust J Plant Physiol.* 18:543–557.



- 22.** [http://en.wikipedia.org/wiki/File:NodSm-IV\\_\(Ac,C16-2,S\).svg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:NodSm-IV_(Ac,C16-2,S).svg).
- 23.** Τσέκος Ι. 2004. Μηχανισμοί άμυνας των φυτών και δευτερογενείς μεταβολίτες: Φυσιολογία Φυτών. Θεσσαλονίκη: εκδοτικός οίκος αδελφών Κυριακίδη Α.Ε. 541-568.
- 24.** Keeling CI, Bohlmann J. 2006. Genes, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens. *New Phytol.* 170:657-75.
- 25.** Balandrin MF, Klocke JA, Wurtele ES, Bollinger WH. 1985. Natural plant chemicals: Sources of industrial and medicinal materials. *Science.* 228:1154-1160.
- 26.** Agosta W. 1996. Bombardier beetle and fever trees: A close up look at chemical warfare and signals in animals and plants. **Helix Books.** ISBN: 0201626586.
- 27.** Osbourn AE. 1996 Preformed Antimicrobial Compounds and Plant Defense against Fungal Attack. *Plant Cell.* 8:1821-1831.
- 28.** D'Auria JC, Gershenzon J. 2005. The secondary metabolism of *Arabidopsis thaliana*: growing like a weed. *Curr Opin Plant Biol.* 8:308-16.
- 29.** Orlova I, Marshall-Colón A, Schnepf J, Wood B, Varbanova M, Fridman E, Blakeslee JJ, Peer WA, Murphy AS, Rhodes D, Pichersky E, Dudareva N. 2006. Reduction of Benzenoid Synthesis in *Petunia* Flowers Reveals Multiple Pathways to Benzoic Acid and Enhancement in Auxin Transport. *Plant Cell.* 18:3458-75.
- 30.** Phillips DR, Rasbery JM, Bartel B, Matsuda SP. 2006. Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. *Curr Opin Plant Biol.* 9:305-14.
- 31.** Zwenger S, Chhandak B. 2008. Plant terpenoids: applications an future potentials. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews* Vol. 3 (1). pp.001-007.
- 32.** Iturbe-Ormaetxe I, Haralampidis K, Papadopoulou K, Osbourn AE. 2003. Molecular cloning and characterization of triterpene synthases from *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant Mol Biol.* 51:731-43.

- 33.** Papadopoulou K, Melton RE, Leggett M, Daniels MJ, Osbourn AE. 1999. Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:12923-8.
- 34.** 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.
- 35.** Krokida A, Delis C, Geisler K, Garagounis C, Tsikou D, Peña-Rodríguez LM, Katsarou D, Field B, Osbourn AE, Papadopoulou K. 2013 A metabolic gene cluster in *Lotus japonicus* discloses novel enzyme functions and products in triterpene biosynthesis. *New Phytol*. 200:675-90.
- 36.** Haralampidis K, Trojanowska M, Osbourn AE. 2002. Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol*. 75: 31–49.
- 37.** Huhman DV, Sumner LW. 2002. Metabolic profiling of saponins in *Medicago sativa* and *Medicago truncatula* using HPLC coupled to an electrospray ion-trap mass spectrometer. *Phytochemistry*. 59:347-60.
- 38.** Pedersen NC. 1976. Serologic studies of naturally occurring feline infectious peritonitis. *Am J Vet Res*. 37:1449-53.
- 39.** Tava A, Odoardi M. 1997. Saponins from *Medicago* spp: chemical characterization and biological activity against insects. In: Waller G, Yamasaki K. (editors). *Saponins Used in Food and Agriculture*. New York: Plenum Press, pp. 97–109.
- 40.** Oleszek W, Junkuszew M, Stochmal A. 1999. Determination and toxicity of saponins from *Amaranthus cruentus* seeds. *J Agric Food Chem*. 47:3685-7.
- 41.** Cheeke NK. 1976 Nutritional and physiological properties of saponins. *Nutr. Report Int*. 315–324.
- 42.** Mujoo K, Haridas V, Hoffmann JJ, Wächter GA, Hutter LK, Lu Y, Blake ME, Jayatilake GS, Bailey D, Mills GB, Gutterman JU. 2001. Triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Bentham) decrease tumor cell proliferation and induce apoptosis. *Cancer Res*. 5486-90.

- 43.** Marciani DJ, Press JB, Reynolds RC, Pathak AK, Pathak V, Gundy LE, Farmer JT, Koratich MS, May RD. 2000. Development of semisynthetic triterpenoid saponin derivatives with immune stimulating activity. *Vaccine*. 18:3141-51.
- 44.** Suzuki H, Achnine L, Xu R, Matsuda SP, Dixon RA. 2002. A genomics approach to the early stages of triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula*. *Plant J*. 32:1033-48.
- 45.** Naoumkina MA, Modolo LV, Huhman DV, Urbanczyk-Wochniak E, Tang Y, Sumner LW, Dixon RA. 2010. Genomic and coexpression analyses predict multiple genes involved in triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula*. *Plant Cell*. 22:850-66.
- 46.** Jandrositz A, Turnowsky F, Högenauer G. 1991. The gene encoding squalene epoxidase from *Saccharomyces cerevisiae*: cloning and characterization. *Gene*. 107:155-60.
- 47.** Laden BP, Tang Y, Porter TD. 2000. Cloning, heterologous expression, and enzymological characterization of human squalene monooxygenase. *Arch Biochem Biophys*. 374:381-8.
- 48.** Kribii R, Arró M, Del Arco A, González V, Balcells L, Delourme D, Ferrer A, Karst F, Boronat A. 1997. Cloning and characterization of the *Arabidopsis thaliana* SQS1 gene encoding squalene synthase – involvement of the C-terminal region of the enzyme in the channeling of squalene through the sterol pathway. *Eur J Biochem*. 249:61-9.
- 49.** Kushiro T, Shibuya M, Ebizuka Y. 1998. b-Amyrin synthase: cloning of oxidosqualene cyclase that catalyzes the formation of the most popular triterpene among higher plants. *Eur J Biochem*. 256:238-44.
- 50.** Hayashi H, Hiraoka N, Ikeshiro Y, Kushiro T, Morita M, Shibuya M, Ebizuka Y. 2000. Molecular cloning and characterization of a cDNA for *Glycyrrhiza glabra* cycloartenol synthase. *Biol Pharm Bull*. 23:231-4.
- 51.** Benedito VA, Torres-Jerez I, Murray JD, Andriankaja A, Allen S, Kakar K, Wandrey M, Verdier J, Zuber H, Ott T, Moreau S, Niebel A, Frickey T, Weiller G, He

J, Dai X, Zhao PX, Tang Y, Udvardi MK. 2008. A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J.* 55:504-13.

**52.** Robert M, Thornton T, Elliot Weier C. 1979. *Botany: a brief introduction to plant biology.* New York: Wiley. pp. 155–170. ISBN: 0-471-02114-8.

**53.** Creelman RA, Mullet JE. 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Plant Mol. Biol.* 48: 355–381.

**54.** Wasternack C, Parthier B. 1997. Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends Plant Sci.* 2: 302–307.

**55.** Balbi V, Devoto A. 2008. Jasmonate signalling network in *Arabidopsis thaliana*: crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. *New Phytol.* 177:301-18.

**56.** [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Methyl\\_jasmonate\\_skeletal.svg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Methyl_jasmonate_skeletal.svg).

**57.** Yukimune Y, Tabata H, Higashi Y, Hara Y. 1996. Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. *Nat Biotechnol.* 14:1129-32.

**58.** Mandujano-Chávez A, Schoenbeck MA, Ralston LF, Lozoya-Gloria E, Chappell J. 2000. Differential induction of sesquiterpene metabolism in tobacco cell suspension cultures by methyl jasmonate and fungal elicitor. *Arch Biochem Biophys.* 381:285-94.

**59.** Martin D, Tholl D, Gershenzon J, Bohlmann J. Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of Norway spruce stems. *Plant Physiol.* 129:1003-18.

**60.** Suzuki H, Reddy MS, Naoumkina M, Aziz N, May GD, Huhman DV, Sumner LW, Blount JW, Mendes P, Dixon RA. 2005. Methyl jasmonate and yeast elicitor induce differential transcriptional and metabolic re-programming in cell suspension cultures of the model legume *Medicago truncatula*. *Planta.* 220:696-707.

**61.** Pauwels L, Morreel K, De Witte E, Lammertyn F, Van Montagu M, Boerjan W, Inzé D, Goossens A. 2008. Mapping methyl jasmonate-mediated transcriptional reprogramming of metabolism and cell cycle progression in cultured *Arabidopsis* cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:1380-5.

- 62.** Lindsey K, Yeoman MM. 1985. Dynamics of plant cell cultures. In: Vasil IK (editors). Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Academic Press, San Diego. Vol 2, pp 61-101.
- 63.** Sakuta M, Komamine A. 1987. Cell growth and accumulation of secondary metabolites. In: Constabel F, Vasil IK (editors). Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Academic Press, San Diego. Vol 4, pp 97–114.
- 64.** Whitmer S, Verpoorte R, Canel C. 1998. Influence of auxins on alkaloid accumulation by a transgenic cell line of *Catharanthus roseus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 53: 135–141.
- 65.** Yahia A, Kevers C, Gaspar T, Chenieux J-C, Rideau M, Creche JI. 1998. Cytokinins and ethylene stimulate indole alkaloid accumulation in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* by two distinct mechanisms. Plant Science 133: 9–15.
- 66.** <https://www.neb.com/applications/dna-amplification-and-pcr>.
- 67.** <http://www.bio-rad.com/en-us/applications-technologies/qpcr-real-time-pcr>.
- 68.** Zhao J, Davis LC, Verpoorte R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Advances 23:283–333.
- 69.** Pauwels L, Inze D, Goossens A. 2009. Jasmonate-inducible gene: what does it mean? Trends in Plant Science 1: 87–91.