

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Η ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΣΤΟΙΧΙΑΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΣΤΕΡΟΛΩΝ ΣΕ
ΦΥΤΑ ΤΟΜΑΤΑΣ»**

ΤΟΥΝΤΑΣΑΚΗ ΑΓΓΕΛΙΚΗ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ, 2018

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ, 2018

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής του Τμήματος Τεχνολόγων Γεωπόνων ,στο ΤΕΙ Πελοποννήσου.

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Δελής Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής

Τριμελής Επιτροπή

- Δελής Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής
- Δάρρας Αναστάσιος
- Σκούρας Παναγιώτης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η συγκεκριμένη διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο γενετικής, του Τμήματος Τεχνολόγων Γεωπόνων, του Τ.Ε.Ι. Πελοποννήσου. Για την ολοκλήρωση της συγκεκριμένης προσπάθειας συνέβαλλαν ορισμένοι άνθρωποι, στους οποίους θέλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου.

Αρχικά, ευχαριστώ τον κύριο Δελή Κωσταντίνο, καθηγητή και επίκουρο της Σχολής Τεχνολόγων Γεωπόνων του Τ.Ε.Ι. Πελοποννήσου, ο οποίος με την ανάθεση του παρόντος θέματος μου έδωσε την ευκαιρία να εμβαθύνω τις γνώσεις μου στην λαχανοκομία και συγκεκριμένα στην καλλιέργεια της τομάτας. Τον ευχαριστώ επίσης θερμά για την καθοδήγηση κατά τη διενέργεια των πειραμάτων και τη συγγραφή της διατριβής μου

Τέλος, ευχαριστώ βαθύτατα την οικογένεια και τους φίλους μου για την αμέριστη υποστήριξή τους καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της διατριβής μου.

Πίνακας περιεχομένων

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	3
Πίνακας περιεχομένων.....	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1 Δευτερογενείς μεταβολίτες.....	7
1.2. Η Κατάταξη των Δευτερογενών Μεταβολιτών στα Φυτά.....	8
1.3. Βιοσύνθεση τριτερπενοειδών και στερολών.....	9
1.3.1. Οι Κυκλάσες του Οξιδοσκουαλενίου.....	12
1.3.2. Κυτοχρώματα P-450.....	12
1.4. Οι Συστοιχίες Γονιδίων στα φυτά.....	12
1.5. Η Βιοσύνθεση των Τριτερπενοειδών και των Στερολών στη Τομάτα.....	14
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	16
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	25
3.1. Εντοπισμός Συστοιχιών Γονιδίων στο Γένωμα της Τομάτας.....	25
3.2. Η Έκφραση των Γονιδίων που συνδέονται με την Βιοσύνθεση την Κυκλοαρτενόλης.....	27
3.3. Φυλογενετική Ανάλυση.....	28
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	30
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	32

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα φυσικά προϊόντα των φυτών είναι ουσίες, οι οποίες έχουν σχετιστεί με φυσιολογικές δράσεις, όπως η απόκριση σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις, αλλά και σε αναπτυξιακές διεργασίες όπως είναι η ανάπτυξη των φυματίων στα ψυχανθή. Τα τριτερπενοειδή και οι στερόλες ανήκουν στην μεγαλύτερη ομάδα φυσικών προϊόντων και περιλαμβάνουν ευρύτατη γκάμα ουσιών με πολλαπλές φυσιολογικές δράσεις. Η μελέτη των γονιδίων που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών και των στερολών έδειξε ότι αυτά συσσωρεύονται στο γένωμα δημιουργώντας κατασκευές παρόμοιες με εκείνες των οπερονίων των βακτηρίων, οι οποίες ονομάστηκαν συστοιχίες γονιδίων (Gene Clusters). Στις μέχρι τώρα εργασίες έχει δείχθει ότι τα gene clusters σχηματίζονται εκ νέου στο γένωμα από συγκέντρωση παράλογων γονιδίων. Πράγματι δεν φαίνεται οι συστοιχίες να υπάρχουν σε κοινό πρόγονο ακόμη και συγγενικών φυτικών ειδών, αλλά αντίθετα είναι μοναδικά για το κάθε είδος. Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε εντοπισμός στο γονιδίωμα του φυτού της τομάτας περιοχών που μπορούν να φέρουν συστοιχίες γονιδίων, οι οποίες σχετίζονται με τη βιοσύνθεση των Τριτερπενοειδών και Στερολών. Πέντε γενωματικές περιοχές εντοπίστηκαν εκ των οποίων στην συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκε η συστοιχία που σχετίζεται με την βιοσύνθεση της Κυκλοαρτενόλης. Όλα τα συσχετιζόμενα γονίδια φαίνεται να συνεκφράζονται στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια του καρπού της τομάτας το οποίο αποτελεί βασικό κριτήριο για τον χαρακτηρισμό μία συστοιχίας γονιδίων. Τέλος, πραγματοποιήθηκε φυλογενετική ανάλυση τόσο για τα γονίδια των κυκλασών, όσο και για τα γονίδια των κυτοχρωμάτων (P-450) των γνωστών συστοιχιών. Τα συμπεράσματα που εξήχθησαν αφορούν στην συνέκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση την κυκλοαρτενόλης αλλά και στην εκ νέου συγκέντρωση των γονιδίων και την συσσώρευση τους στο γένωμα.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνηθεί το γένωμα της τομάτας για την ύπαρξη συστοιχιών γονιδίων που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση στερολών και τριτερπενοειδών. Η *in silico* διερεύνηση του γενώματος συνδυάστηκε με την μελέτη της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της κυκλοαρτενόλης ώστε να διαπιστωθεί η συνέκφραση των γονιδίων.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Δευτερογενείς μεταβολίτες

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες περιλαμβάνουν μικρού μοριακού βάρους ενώσεις με περιορισμένη κατανομή μεταξύ των φυτικών ειδών, οι οποίες δεν παίζουν πρωταρχικό ρόλο στην ανάπτυξη και αύξηση του φυτού. Η συγκεκριμένη ιδιότητα της μη εκτεταμένης διασποράς τους διαφοροποιεί από τους βασικούς, πρωτογενείς μεταβολίτες οι οποίοι θεωρούνται απαραίτητοι για την βιωσιμότητα του φυτικού οργανισμού. Η βασική διαφορά πρωτογενών και δευτερογενών μεταβολιτών είναι ότι η έλλειψη οποιοδήποτε δευτερογενούς μεταβολίτη δεν οδηγεί σε θάνατο του οργανισμού (Kessler and Kalske, 2018). Με αυτό τον τρόπο ως μη αναγκαία για την επιβίωση, τα βιοχημικά μονοπάτια βιοσύνθεσης των δευτερογενών μεταβολιτών εξελίχθηκαν ανεξάρτητα και διαφέρουν σε κάθε φυτική οικογένεια, αλλά πολλές φορές μεταξύ φυτών της ίδιας οικογένειας και αποτελούν χαρακτηριστικό του είδους. Ακόμη και στο ίδιο φυτικό σώμα μπορούν να συσσωρεύονται μόνο σε ιδιαίτερους ιστούς ή όργανα και σε συγκεκριμένα στάδια της ανάπτυξης. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι οι ουσίες που συντίθενται κατά τις μεταβολικές διαδικασίες των υδατανθράκων, των λιπών και των αμινοξέων και η ονομασία τους οφείλεται στη βιοσύνθεση τους και όχι στην σημασία τους για τα φυτά. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είχαν για τους ερευνητές μόνο με οικολογικούς ρόλους για την προσαρμογή των φυτών στο περιβάλλον (Harborne, 1999).

Οι φυσιολογικοί ρόλοι που έχουν αποδοθεί στους δευτερογενείς μεταβολίτες καλύπτουν πληθώρα φυσιολογικών και οικολογικών προσαρμογών των φυτών. Τα φυτά παράγουν πληθώρα δευτερογενών μεταβολιτών πολλοί από τους οποίους μπορούν να αναστείλουν την ανάπτυξη των μικροβίων *in vitro* (Osbourn, 1996). Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι επίσης γνωστοί σαν παράγοντες οι οποίοι μεσολαβούν στην επικοινωνία των φυτών. Επίσης βοηθούν την αμυντική λειτουργία του φυτού απομακρύνοντας τα έντομα και διάφορα παθογόνα ή καταστέλλουν την ανάπτυξη γειτονικών φυτών μέσω μηχανισμών αλληλοπάθειας. Η ικανότητα των φυτών να συνθέτουν συγκεκριμένες ομάδες δευτερογενών μεταβολιτών πιθανόν να οφείλεται στον διαφορετικό τρόπο με τον οποίο τα φυτά και τα ζώα αντιμετωπίζουν τους διάφορους εχθρούς και τις ασθένειες (Kessler and Kalske, 2018). Οι μεταβολίτες αυτοί πιθανόν να συντίθενται κατά τη διάρκεια της κανονικής αύξησης και ανάπτυξης του φυτού δημιουργώντας αντιμικροβιακά συστατικά, ενώ είναι πιθανό να απουσιάζουν από υγιή φυτά και να συσσωρεύονται μόνο σε περιπτώσεις σε παθογόνα ή καταπόνησης από αβιοτικό στρες ή παρουσίας παθογόνων (D'Auria and Gershenson, 2005).

1.2. Η Κατάταξη των Δευτερογενών Μεταβολιτών στα Φυτά

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες κατηγοριοποιούνται με βάση τη δομή τους σε ενώσεις για παράδειγμα που μπορούν να περιέχουν δακτυλίους ή σάκχαρα κ.ο.κ., με βάση τα μόρια που περιέχουν (παρουσία αζώτου ή μη), την διαλυτότητα τους σε διάφορους διαλύτες (πολικά, μη πολικά μόρια), το βιοχημικό μονοπάτι που βιοσυντίθενται (Harborne, 1999). Με βάση τα παραπάνω στα φυτά υπάρχουν τρεις βασικές ομάδες δευτερογενών μεταβολιτών. Τα φαινολικά, τα τερπένια και τα στεροειδή και τα αλκαλοειδή, φλαβονοειδή.

Για παράδειγμα, τα τερπένια, τα οποία συγκροτούν τη μεγαλύτερη μεγάλη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών μπορούν να δράσουν ως τοξίνες και να αποτρέψουν την βοσκή σε ένα μεγάλο αριθμό εντόμων και θηλαστικών (Harborne, 1999). Ορισμένα από αυτά έχουν ένα καλά χαρακτηρισμένο ρόλο στην φυτική αύξηση και ανάπτυξη των φυτών. Επίσης οι γιββερελλίνες, μια ομάδα φυτικών ορμονών, είναι διτερπένια. Τα καροτενοειδή είναι τετρατερπένια και λειτουργούν ως βοηθητικές χρωστικές στην φωτοσύνθεση (Kim et al., 2010).

Με βάση τις πρόδρομες ενώσεις που χρησιμοποιούνται για τη βιοσύνθεση τους, οι δευτερογενείς μεταβολίτες που έχουν ταυτοποιηθεί στο φυτό *Arabidopsis thaliana* ταξινομούνται στις εξής κατηγορίες (D'Auria and Gershenzon, 2005).

1. Ενώσεις που περιέχουν άζωτο (ινδολικές και ινδολοθειϊκές, γλυκοσυνολίτες)
2. Φαινυλπροπανοειδή
3. Βενζενοειδή
4. Φλαβονοειδή
5. Τερπένια

Έχει βρεθεί ότι οι ινδολικές και ινδολοθειϊκές ενώσεις βιοσυντίθενται χρησιμοποιώντας ως πρόδρομη ουσία το ινδολικό οξύ και συσσωρεύονται στα φυτά σε περιπτώσεις μόλυνσης από παθογόνα (Cerboneschi et al., 2016). Τα γλυκοσυνολικά οξέα είναι η ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών στο *Arabidopsis thaliana* η οποία είναι χαρακτηριστικό της οικογένειας Brassicaceae (Katsarou et al., 2016). Η βιοσύνθεση τους πραγματοποιείται μέσω της χρησιμοποίησης αμινοξέων που περιέχουν θείο (μεθειονίνη και η τρυπτοφάνη) ως πρόδρομες ουσίες. Τα γλυκοσυνολικά οξέα εντοπίζονται σε όλα τα φυτικά όργανα και πιστεύεται ότι βοηθούν την άμυνα του φυτού απέναντι σε παθογόνα και βόσκηση. Τα φαινυλπροπανοειδή ανήκουν στους αρωματικούς δευτερογενείς μεταβολίτες και σχηματίζονται μέσω του μονοπατιού των φαινυλπροπανοειδών με αρχικό μόριο τη φαινυλαλανίνη, ενώ χρησιμοποιούνται και ως πρόδρομες ενώσεις για τη βιοσύνθεση των βενζενοειδών (Sønderby et al., 2010). Τόσο οι ινδολικές και ινδολοθειϊκές ενώσεις όσο και

τα γλυκοσυνολικά οξέα παρέχουν προστασία στα φυτά έναντι παθογόνων καθώς και προστασία από υπεριώδη ακτινοβολία, ενώ βοηθούν και στην προσέλκυση επικονιαστών (Sønderby et al., 2010). Τα φλαβονοειδή βιοσυντίθενται μέσω κυρίως δύο μεταβολικών μονοπατιών με πρόδρομες ενώσεις την φαινυλαλανίνη και το μαλονικό οξύ. Τα φλαβονοειδή ταξινομούνται σε ανθοκυανίνες, φλαβόνες και φλαβονόλες (Petruzza et al., 2013).

Table 1

Major classes of secondary metabolites found in *A. thaliana*.

Class	Approximate number of structures ^a	Suggested functions	Reference(s)
Indole and indole-sulfur compounds	10	Defense against pathogens	[7]
Glucosinolates	35	Defense against pathogens and herbivores	[14,15]
Phenylpropanoids	20	UV protection. Defense against pathogens?	[21,23]
Benzenoids	25	Pollinator attractants? Defense against pathogens?	[28,56]
Flavonoids	15	UV protection. Auxin transport. Seed dormancy. Defense against pathogens?	[33,34,38,42,65]
Terpenes	50	Herbivore feeding deterrents? Resistance to oxidative stress? Defense against pathogens?	[43,44,51,52,66]
Fatty acid derivatives	15	Defense against pathogens? Volatile signals?	[18,60]

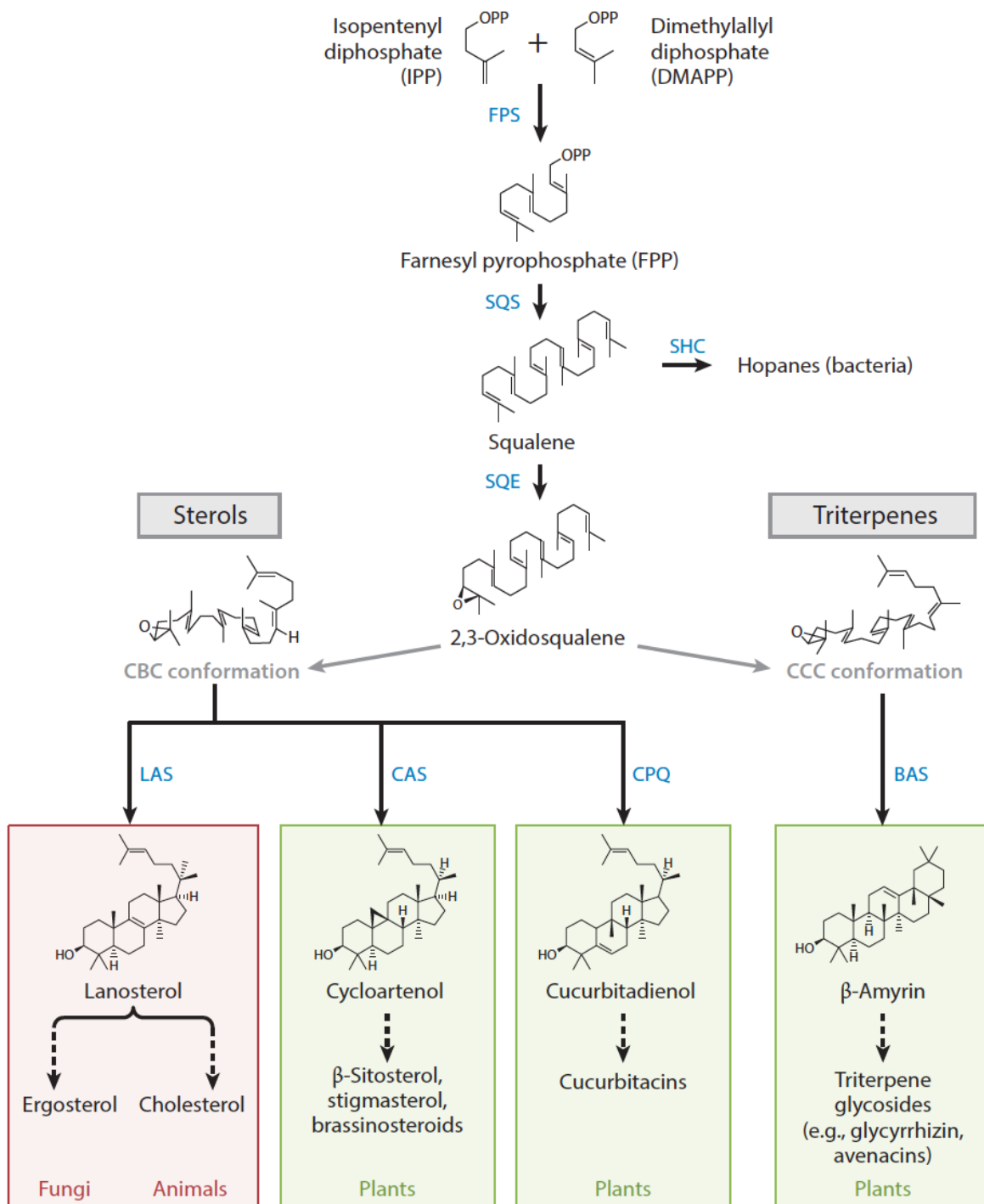
^a Including conjugates and cell-wall-bound structures. Excluding glucosinolate hydrolysis products and compounds reported in supplementary material of [6], for which the details of identification have not been reported.

Πίνακας 1: Κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών όπως αυτές απεικονίζονται στην εργασία (D’Auria and Gershenzon, 2005), δευτερογενείς αλλά και πρωταρχικές λειτουργίες του φυτού με τις οποίες εμπλέκονται.

1.3. Βιοσύνθεση τριτερπενοειδών και στερολών

Τα τριτερπένια είναι η πλέον πολυάριθμη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών, αριθμώντας πάνω από 20.000 μέλη πολυμερών του ισοπρενίου (Thimmapra et al., 2014). Δημιουργούνται με τη σύντηξη μονάδων πυροφωσφορικού ισοπεντενυλίου, η οποία αποτελεί την ενεργοποιημένη μορφή του ισοπρενίου που το καθιστά την πρόδρομη ουσία βιοσύνθεσης πολύπλοκων δομών. Ανάλογα με τις μονάδες ισοπρενίου από τις οποίες αποτελούνται κατατάσσονται σε μονοτερπένια (C10), σεσκιτερπένια (C15) και τριτερπένια (C30). Αντιπρόσωποι των δύο πρώτων κατηγοριών, όπως το λιμονένιο έχουν ανιχνευθεί ως πτητικά αέρια που εκλύουν τα φυτά μπροστά στον κίνδυνο βοράς από φυτοφάγα ζώα. Στα τριτερπενοειδή ανήκουν οι στερόλες, τα στεροειδή και οι σαπωνίνες με πιο γνωστά την α και β-αμυρίνη, τη λουπεόλη, την κυκλοαρτενόλη. Οι στερόλες χρησιμοποιούνται ως πρόδρομες ουσίες για τη βιοσύνθεση ορμονών στα φυτά και στα ζώα. Η βιολογική λειτουργία των τριτερπενοειδών στα φυτά δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί εκτός ελαχίστων περιπτώσεων όπου έχουν αποδοθεί συγκεκριμένοι ρόλοι, όπως η προστασία έναντι μικροοργανισμών (Papadopoulou et al., 1999). Αρκετά φυτά συσσωρεύουν μεγάλες ποσότητες τριτερπενοειδών κυρίως στις ρίζες τα οποία εμπλέκονται στην άμυνα των φυτών έναντι σε μύκητες και παθογόνα.

Ο βασικός σκελετός με τριάντα άτομα άνθρακα των τριτερπενοειδών βιοσυντίθεται από ενώσεις με πέντε άτομα άνθρακα και συγκεκριμένα το πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο. Το IPP και η ισομερής του μορφή το πυροφωσφορικό διμεθυλοαλύλιο (DMAPP) είναι τα ενεργά C5 δομικά συστατικά των τερπενίων (**Εικόνα 1**). Τα δύο αυτά ισομερή αντιδρούν και σχηματίζουν το πυροφωσφορικό γερανύλιο (GPP) το οποίο αποτελεί την πρόδρομο μορφή σχεδόν όλων των μονοτερπενίων με 10 άτομα C. Στη συνέχεια το πυροφωσφορικό γερανύλιο συμπυκνώνεται με το IPP και σχηματίζεται το πυροφωσφορικό φαρνεζύλιο (FPP) με 15 άτομα C πρόδρομος ένωση των σεσκιτερπενίων. Το τελευταίο βήμα για την δημιουργία των τριτερπενοειδών είναι η συμπύκνωση δύο FPP προκειμένου να σχηματιστεί το 2,3 σκουαλένιο (C30) με τη βοήθεια της συνθάσης του σκουαλενίου (SQS) (**Εικόνα 1**).



Εικόνα 1. Η βιοσύνθεση βασικών σκελετών άνθρακα για την δημιουργία Τριτερπενοειδών και Στερολών (Thimmappa et al., 2014).

1.3.1. Οι Κυκλάσες του Οξιδοσκουαλενίου

Η κυκλοποίηση του 2,3-οξιδοσκουαλενίου καταλύεται από ένζυμα που είναι γνωστά και χαρακτηρισμένα στα φυτά ως κυκλάσες του οξιδοσκουαλενίου (OSCs). Η δράση των συγκεκριμένων ενζύμων μπορεί να οδηγήσει στην βιοσύνθεση τριτερπενοειδών και στερολών και περιλαμβάνει, τόσο την σύνδεση των αρχικών δομικών μορίων του IPP, όσο και την κυκλοποίηση των ανθρακικών σκελετών (Thimmappa et al., 2014). Το κρίσιμο βήμα για τη δημιουργία των κυκλικών σκελετών άνθρακα είναι η αναδίπλωση (folding) των ευθύγραμμων αλυσίδων του 2,3 οξιδοσκουαλενίου. Περισσότερες από 80 OSCs έχουν χαρακτηριστεί στα φυτά, το ένα τρίτο από αυτές αποτελούν OSCs, οι οποίες συνδέονται με τη βιοσύνθεση των στερολών στις οποίες συμπεριλαμβάνονται κυρίων συνθάσες της κυκλοαρτενόλης (CAS) και της λανοστερόλης (Ohyama et al., 2009; Suzuki et al., 2002).

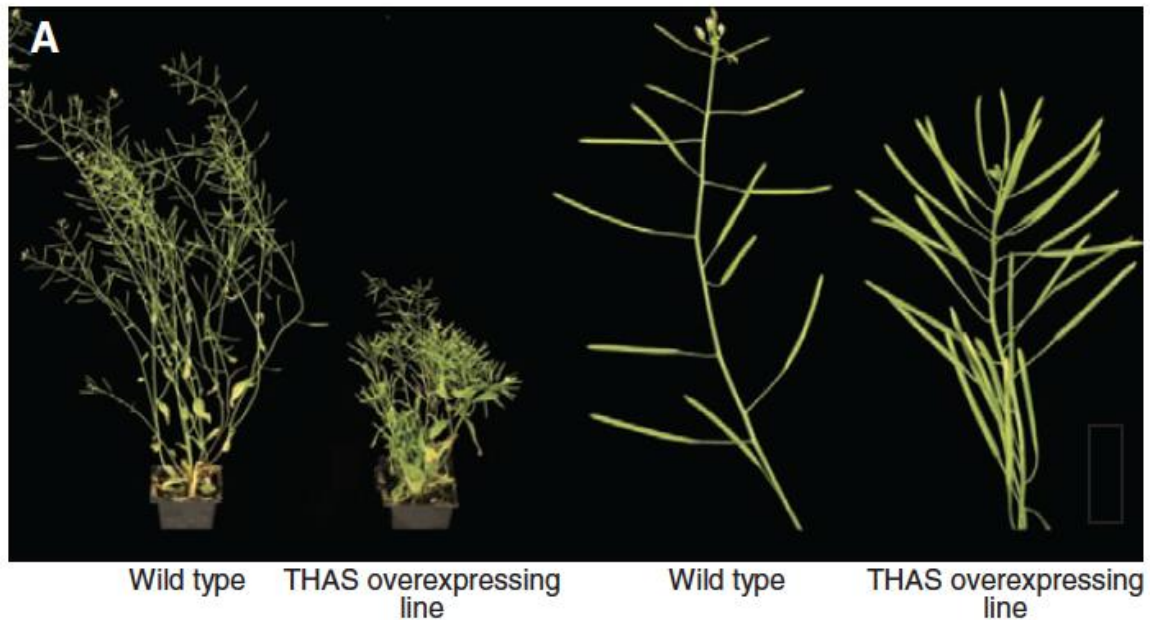
1.3.2. Κυτοχρώματα P-450

Τα κυτοχρώματα P-450 μεσολαβούν ώστε να προστεθούν στους αρχικούς ανθρακικούς σκελετούς άνθρακα των τριτερπενοειδών και των στερολών πρόσθετες ομάδες, όπως για παράδειγμα υδροξυλικές ομάδες, κετόνες, αλδεϋδικές ομάδες, καρβοξυλικές ομάδες ή και εποξυδικές ομάδες (Nelson and Werck-Reichhart, 2011; Thimmappa et al., 2014). Η δράση των ενζύμων αυτών έχει συνδεθεί έντονα με την βιολογική δράση των δευτερογενών μεταβολιτών και κυρίως των τριτερπενοειδών και των στερολών (Field and Osbourn, 2008; Krokida et al., 2013; Osbourn and Field, 2009; Qi et al., 2004). Η δράση των P-450 στους αρχικούς σκελετούς αποτελεί την αρχική τροποποίηση των μορίων, ώστε να μπορέσουν στη συνέχεια να δράσουν επιπλέον ένζυμα που τροποποιούν τους σκελετούς όπως οι ακετυλομεταφοράσες και οι μεταφοράσες σακχάρων που συνδέονται έντονα με την βιολογική εξειδίκευση των φυσικών αυτών προϊόντων (Haralampidis et al., 2002; Osbourn et al., 2003).

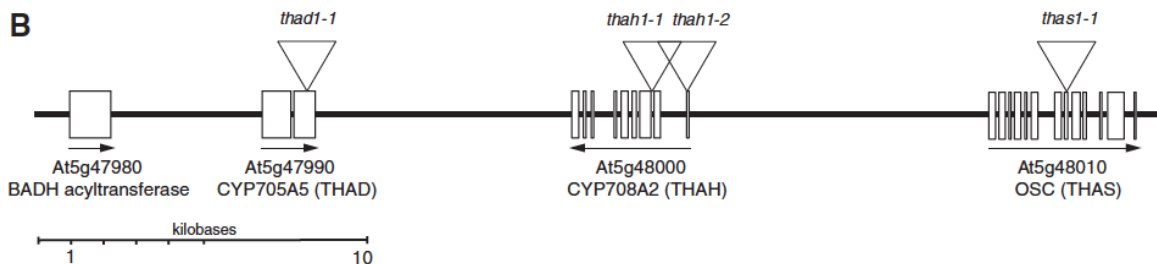
1.4. Οι Συστοιχίες Γονιδίων στα φυτά

Τα μεταβολικά μονοπάτια διαμεσολαβούνται από τη δράση γονιδίων που στους ανώτερους οργανισμούς βρίσκονται διάσπαρτα στα χρωμοσώματα. Ωστόσο, στους προκαρυωτικούς οργανισμούς τα γονίδια που συμμετέχουν σε ένα μεταβολικό μονοπάτι μπορούν συσσωρεύονται στο γονιδίωμα δημιουργώντας δομές που είναι ευρύτερα γνωστές με τον όρο οπερόνια (Hippel et al., 1974). Με τη δημιουργία αυτών των δομών τα γονίδια των βακτηρίων μπορούν να συνρρυθμίζονται διευκολύνοντας έτσι την ταυτόχρονη έκφραση των γονιδίων.

Με την συσσώρευση αποτελεσμάτων που αφορούσαν τα φυτικά γένωματα άρχισε να γίνεται σαφές ότι για μερικά μεταβολικά μονοπάτια του δευτερογενούς μεταβολισμού τα γονίδια συσσωρεύονταν επίσης στο γένωμα, δημιουργώντας δομές παρόμοιες με εκείνες των οπερονίων των βακτηρίων που ονομάστηκαν συστοιχίες γονιδίων (gene clusters) (Osbourn, 2010; Osbourn and Field, 2009). Μέχρι σήμερα αρκετές συστοιχίες γονιδίων έχουν εντοπιστεί σε φυτά. Η πρώτη συστοιχία που εντοπίστηκε αφορούσε το φυτό *Avena strigosa* (Βρώμη) στο οποίο έχουν εντοπιστεί αρκετά γονίδια που συνδέονται με τη βιοσύνθεση της αβενασίνης (Mugford et al., 2009; Mylona et al., 2008; Qi et al., 2004; Qi et al., 2006; Wegel et al., 2009). Η δεύτερη συστοιχία γονιδίων που χαρακτηρίστηκε αφορούσε τη βιοσύνθεση της θιανόλης του *Arabidopsis thaliana* (Field and Osbourn, 2008) (**Εικόνα 2, 3**). Στη συγκεκριμένη εργασία χαρακτηρίστηκε μία OSC και δύο γονίδια που κωδικοποιούσαν για κυτοχρώματα P-450, τα οποία συσσωρεύονταν στο γένωμα του φυτού (**Εικόνα 3**).



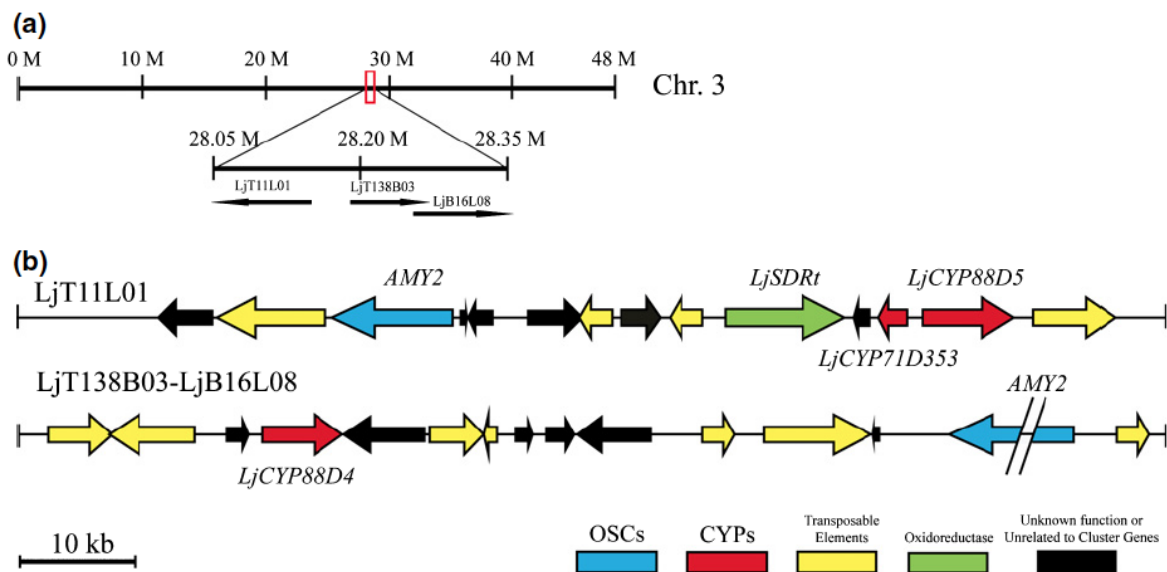
Εικόνα 2. Ο φαινότυπος της υπερέκφρασης του γονιδίου της συνθάσης της θιανόλης σε φυτά *A. thaliana*



Εικόνα 3. Σχηματική παράσταση των γονιδίων που συμμετέχουν στη συστοιχία γονιδίων της βιοσύνθεσης της θιανόλης.

Η επόμενη συστοιχία γονιδίων που εντοπίστηκε αφορούσε στο ψυχανθές *Lotus japonicus* και τη βιοσύνθεση του τριτερπενοειδούς της β-αμυρίνης (Krokida et al., 2013). Επιπλέον στη συγκεκριμένη εργασία περιγράφεται μία ακόμη μη λειτουργική συστοιχία γονιδίων (**Εικόνα 4**). Είναι σημαντικό ότι στη συγκεκριμένη εργασία διαπιστώθηκε ότι τα γονίδια που βρίσκονται κοντά στο γένωμα συνρρυθμίζονται μέσω μηχανισμών μεθυλίωσης του DNA.

Σε όλες τις εργασίες που μελετήθηκαν συστοιχίες γονιδίων έγινε αμέσως αντιληπτό ότι υπήρχαν κοινά σημεία. Τα γονίδια που μπλέκονταν (OSCs, P-450, γονίδια τροποποίησης) συνεκφράζονταν στους ιστούς που μελετήθηκαν (Field and Osbourn, 2008; Krokida et al., 2013). Συνεπώς η συνέκφραση των γονιδίων είναι βασικό κριτήριο για την ύπαρξη ή μη μίας συστοιχίας γονιδίων. Η φυλογενετική ανάλυση σε όλες της εργασίες έδειξε ότι δεν υπήρξε κοινός πρόγονος από τον οποίο μεταφέρθηκαν οι συστοιχίες στα υπάρχοντα φυτικά είδη. Άρα ο σχηματισμός των συστοιχιών πρέπει να έγινε με τη λογική των παράλογων γονιδίων και οι συστοιχίες σχηματίζονται εκ νέου στο φυτικό γένωμα (Field and Osbourn, 2008; Krokida et al., 2013).



Εικόνα 4. Σχηματική παράσταση των γονιδίων που συμμετέχουν στις συστοιχίες γονιδίων της στο φυτό *Lotus japonicus*.

1.5. Η Βιοσύνθεση των Τριτερπενοειδών και των Στερολών στη Τομάτα

Η βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών και των στερολών στη τομάτα έχει μελετηθεί αρκετά (Wang et al., 2011; Whitaker, 1988). Έχουν χαρακτηριστεί για τη λειτουργία τους δύο OSCs σε φυτά τομάτας από τις οποίες η πρώτη συνδέεται με τη βιοσύνθεση της β-αμυρίνης και η δεύτερη με τη βιοσύνθεση κατά 48% της δ-αμυρίνης και έξι διαφορετικών

άλλων τριτερπενοειδών (Wang et al., 2011). Τα δύο αυτά μόρια συσσωρεύονται στην επιδερμίδα των φρούτων γεγονός που μπορεί να υποδεικνύει την συμμετοχή τους στην άμυνα έναντι μικροοργανισμών (Isaacson et al., 2009).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Καλλιεργητικές συνθήκες και φυτικό υλικό

Φυτά τομάτας *Solanum lycopersicum* var. χίου αναπτύχθηκαν σε συνθήκες θερμοκηπίου μέχρι το ύψος 15 εκατοστών και στη συνέχεια μεταφυτεύθηκαν σε ειδικούς σάκους υδροπονίας της εταιρίας LAVA. Οι αποστάσεις φύτευσης των φυτών ήταν 60 εκατοστά. Κάθε φυτό ποτίζονταν στάγδην με διάλυμα υδροπονίας και σταλάκτη 4 λίτρων ανά ώρα. Το πότισμα των φυτών γίνονταν για 24 ώρες και για 10 περίπου λεπτά ανά ώρα. Το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για το πότισμα των φυτών περιγράφεται σε προηγούμενες εργασίες (Darras et al., 2017). Οι τομάτες και τα άνθη συλλέγονταν από τον τρίτο και τον τέταρτο κόμβο του φυτού και οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν για όλα τα στάδια ανάπτυξης των καρπών την ίδια ημέρα. Οι ρίζες, οι κοτύλες, βλαστοί, και τα φύλλα συλλέχθηκαν από φυτά ενός περίπου μήνα. Οι ιστοί που συλλέγονταν για την απομόνωση του RNA μεταφέρονταν άμεσα σε υγρό άζωτο και πραγματοποιούνταν ομογενοποίηση σε αποστειρωμένο ιγδίο.

Η απομόνωση του ολικού RNA πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους (Delis et al., 2011), 0,2-0,3 gr νεπού φυτικού ιστού ομογενοποιούνται σε γουδί λειοτριβήσεως παρουσία υγρού αζώτου.

Βήματα μεθόδου

1. Το δείγμα μεταφέρθηκε με αποστειρωμένη σπάτουλα σε σωλήνα erpendorf που περιέχει 300 μl διαλύματος εκχύλισης RNA (REB) και 300 μl μίγματος φαινόλη/χλωροφόρμιο/ 1:1 (PC) pH 8,3.
2. Ακολουθεί πολύ καλή ανάδευση σε μηχανικό αναδευτήρα (vortex) για τουλάχιστον 30 sec.
3. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 13.000 στροφές ανά min (rpm). για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Η υδατική φάση (υπερκείμενο) μεταφέρθηκε προσεκτικά σε νέο σωλήνα erpendorf και επαναλαμβάνεται η εκχύλιση με 300 μl μίγματος PC.
5. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 15.000 rpm για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Η υδατική φάση (υποκείμενο) μεταφέρθηκε εκ νέου σε σωλήνα erpendorf και τα νουκλεϊκά οξέα κατακρημνίστηκαν με την προσθήκη 1/10 όγκου 3M οξικού νατρίου pH 5,2 και ενός όγκου ισοπροπανόλης.
7. Φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm. για 15 min στους 4°C.

-
8. Το ίζημα των νουκλεϊκών οξέων επαναδιαλύεται σε 563 μ l διαλύματος 10T/10E και το RNA κατακρημνίστηκε εκλεκτικά με την προσθήκη 188 μ l διαλύματος 8M LiCl μετά από επώαση στους 4°C για τουλάχιστον 12 h.
 9. Το ολικό RNA συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση στις 15.000 rpm. για 15 min στους 4°C.
 10. Το ίζημα ξεπλύθηκε με 70% v/v αιθανόλη
 11. Στη συνέχεια αφού αφέθηκε να στεγνώσει, επαναδιαλύθηκε σε κατάλληλο όγκο διαλύματος TE.
 - a. Διάλυμα εκχύλισης RNA: 50 mM Tris-HCl pH 8,3, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA (Serva), 1% Lauryl sarcosine.
 - b. Διάλυμα 10T/10E: 10 mM Tris-HCl pH 8,3 , 10 mM EDTA.
 - c. Διάλυμα TE: 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1 mM EDTA.
-

Καθαρισμός Νουκλεϊνικών Οξέων με Φαινόλη

1. Σε σωλήνα φυγοκέντρου που περιείχε το δείγμα των νουκλεϊνικών οξέων προς καθαρισμό, προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος φαινόλης pH 8,0 και το μίγμα ανακινείται καλά για την ανάμιξη των δύο φάσεων.
2. Οι δύο φάσεις διαχωρίστηκαν με φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm. για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Η υπερκείμενη υδάτινη φάση, που περιείχε τα νουκλεϊνικά οξέα, μεταφέρθηκε με προσοχή σε νέο σωλήνα φυγοκέντρου που περιείχε ίσο όγκο μίγματος φαινόλης/χλωροφορμίου αλκοόλης PC (1:1) και ακολουθούσε καλή ανάμιξη των φάσεων.
4. Η υδάτινη φάση διαχωρίστηκε με φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα φυγοκέντρου, ο οποίος περιείχε ίσο όγκο μίγματος χλωροφορμίου.
5. Ακολουθούσε ο τελικός διαχωρισμός της υδάτινης φάσης με φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και η μεταφορά της σε νέο σωλήνα φυγοκέντρησης, όπου τα νουκλεϊνικά οξέα κατακρημνίστηκαν με την προσθήκη 1/10 όγκου διαλύματος 3 M οξικού νατρίου pH 5,2 και δύο όγκων αιθανόλης.
6. Το δείγμα παραμένει στους -20°C για 12 h και τα νουκλεϊνικά οξέα συλλέχτηκαν με φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm. για 15 min στους 4°C .
7. Το ίζημα ξεπλύθηκε με 70% v/v αιθανόλη και αφού στεγνώσει επαναδιαλύθηκε σε κατάλληλο όγκο dH₂O ή ρυθμιστικού διαλύματος TE.

Προσδιορισμός Συγκέντρωσης και Καθαρότητας Νουκλεϊνικών Οξέων

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των νουκλεϊνικών οξέων σε υδατικό διάλυμα πραγματοποιήθηκε με την φωτομετρική μέθοδο.

1. Ποσότητα από το δείγμα (συνήθως 1 μl) μεταφέρθηκε σε σωλήνα erpendorf, όπου και αραιώθηκε με απεσταγμένο νερό (dH₂O) σε αναλογία 1:100. Το δείγμα που προκύπτει τοποθετήθηκε σε ειδική κυβέτα χαλαζία και προσδιορίστηκε το φάσμα απορρόφησης από τα 240 έως τα 300 nm.
2. Σε υδατικά διαλύματα νουκλεϊνικών οξέων χωρίς την παρουσία άλλων προσμίξεων, όπως πρωτεΐνες και πολυσακχαρίδια, η συγκέντρωση των νουκλεϊνικών οξέων δίδεται από την εξίσωση:

$$D \times \text{O.D.}_{260} \times \text{συντελεστής αραιώσης}$$

όπου: O.D._{260} , η οπτική πυκνότητα του δείγματος στα 260 nm.

D σταθερά που εξαρτάται από το είδος του νουκλεϊνικού οξέος του περιέχεται στο δείγμα.

Σε καθαρά διαλύματα DNA, η σταθερά D ισούται με 50 mg/ml ενώ στην περίπτωση διαλύματος RNA η σταθερά D ισούται με 40 mg/ml. Τέλος, στην περίπτωση διαλύματος ολιγονουκλεοτιδίων, η σταθερά D ισούται με 30 mg/ml.

Για την εκτίμηση της καθαρότητας ενός δείγματος νουκλεϊνικών οξέων υπολογίστηκε ο λόγος O.D.260/O.D.280 και O.D.240/O.D.260. Για τιμές μεταξύ 1,8-2,0 και 0,5, αντιστοίχως, το δείγμα θεωρήθηκε ικανοποιητικής καθαρότητας.

Ανάλυση Δεσοξυριβοζονουκλεϊνικών (Bednarek and Osbourn) Οξέων σε Πηκτή Αγαρόζης

Ο διαχωρισμός των δεσοξυριβοζονουκλεϊνικών οξέων με βάση το μέγεθος και τη διαμόρφωσή τους, πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Στην περίπτωση διαχωρισμού γραμμικών δίκλωνων μορίων DNA, η σχέση που συνδέει την κινητικότητα των μορίων με το μέγεθος τους είναι γραμμική ημιλογαριθμική. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα μη γραμμικών μορίων DNA δεν είναι ευθεία συνάρτηση του μεγέθους τους αλλά εξαρτάται και από τη διαμόρφωση του μορίου στο χώρο, όπως για παράδειγμα τα κυκλικά μόρια του DNA. Το εύρος μεγεθών που μπορούν να διαχωρισθούν σε πηκτή αγαρόζης εξαρτάται από τη συγκέντρωση της πηκτής σε αγαρόζη (π.χ σε 0,8% συγκέντρωση αγαρόζης μπορούν να διαχωριστούν, ανάλογα με το μοριακό τους βάρος, τμήματα του DNA που κυμαίνονται από 1 έως 12 kb).

Τα μόρια του DNA γίνονται ορατά με την προσθήκη Sybersafe (Invitrogen), το οποίο έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και να φθορίζει στο υπεριώδες φως.

Η προετοιμασία της πηκτής των δειγμάτων γίνεται ως εξής:

-
1. Κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης προστέθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X TAE και θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι το σημείου βρασμού.
 2. Στη λιωμένη αγαρόζη προστέθηκε 0,001% v/v διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου, ενώ στη συνέχεια αφήθηκε να κρυώσει μέχρι περίπου τους 50°C.
 3. Η πηκτή τοποθετήθηκε σε κατάλληλο εκμαγείο της συσκευής οριζόντιας ηλεκτροφόρησης και αφήθηκε να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου. Στην πηκτή βυθίζεται ειδική «χτένα» που δημιουργεί τις υποδοχές των δειγμάτων.
 4. Στα δείγματα του DNA που πρόκειται να αναλυθούν, προστέθηκε 1/10 όγκου διαλύματος χρωστικής 10X DLB.
-

-
5. Μόλις στερεοποιήθηκε η πηκτή, απομακρύνθηκε η «χτένα» και τοποθετήθηκε στο δοχείο ηλεκτροφόρησης το οποίο συμπληρώθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X TAE.
 6. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε ηλεκτρικό πεδίο εντάσεως μέχρι 5 Vcm^{-2} .
 - a. Διάλυμα ηλεκτροφόρησης 50XTAE: 24,2% (w/v) Tris (BDH), 57,1 ml/lit οξικό οξύ (BDH), 100 ml/lit 0.5 M EDTA..
 - b. Διάλυμα 10X DBL: 0.25% Μπλέ της βρωμοφαινόλης (Haberer et al.), 0,25% κυανό του ξυλενίου (Haberer et al.) και 35% γλυκερόλη (BDH).
-

Ενίσχυση Ακολουθιών mRNA με τη Χρήση της Τεχνικής PCR πραγματικού χρόνου (RT-PCR)

Όλα τα δείγματα ολικού RNA, τα οποία απομονώθηκαν από φυτικούς ιστούς υπόκεινται σε επεξεργασία με DNaseI για 20 min στους 37°C, ώστε να εξαλειφθεί κάθε πρόσμιξη υπολειμμάτων DNA. Στη συνέχεια τα δείγματα καθαρίζονταν με την εφαρμογή της τεχνικής φαινόλη/χλωροφόρμιο. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η εξάλειψη κάθε πρόσμιξης DNA όλα τα υπό μελέτη δείγματα υποβλήθηκαν σε αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης με εκκινητές του γονιδίου σταθερής έκφρασης της ουβικουΐτινης. Σε καμία περίπτωση δεν ανιχνεύθηκε προϊόν από τις αντιδράσεις μετά την επεξεργασία με τη DNaseI.

Η αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου είναι μία εναλλακτική και ταυτόχρονα επαναστατική μέθοδος λογαριθμικής ενίσχυσης και ποσοτικού προσδιορισμού αλληλουχιών DNA. Σε αντίθεση με την κλασική μέθοδο PCR, δίνει τη δυνατότητα παρακολούθησης της πορείας της αλυσιδωτής αντίδρασης, καθόλη τη διάρκεια που λαμβάνει χώρα, σε πραγματικό χρόνο. Η ικανότητα παρακολούθησης της εξέλιξης της αντίδρασης δίνεται από τη μέτρηση των επίπεδων φθορισμού της χρωστικής Sybergreen, η οποία έχει την ικανότητα να φθορίζει κατά την πρόσδεσή της στα δίκλιωνα μόρια του DNA. Με αυτό τον τρόπο πραγματοποιούνται μετρήσεις των επιπέδων του φθορισμού στο τέλος κάθε κύκλου της αντίδρασης με τη χρήση ρομποτικού σαρωτή. Στην παρούσα εργασία η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με τη μέθοδο της (αντιστροφής μεταγραφάσης)RT-PCR, για τον ποσοτικό προσδιορισμό μικρών αλληλουχιών mRNA, δίνοντας τη δυνατότητα μελέτης της έκφρασης γονιδίων σε συγκεκριμένους ιστούς, κύτταρα ή αναπτυξιακά στάδια.

Η δημιουργία της πρώτης αλυσίδας cDNA για τη μεθοδό των δύο βημάτων πραγματοποιήθηκε με τη μεταγραφή 1 μg ολικού RNA ακολουθώντας τη διαδικασία:

1. Αποδιάταξη στους 65°C για 5 min και άμεση μεταφορά των δειγμάτων στον πάγο.
2. Προσθήκη 12 μl μίγματος αντίδρασης, το οποίο περιέχει 500 ng oligo(dT)_{12-18mer} και 1 μl of 10 mM dNTPs.
3. Προσθήκη 4 μl ρυθμιστικού διαλύματος αντίδρασης (5x First-strand buffer).
4. Προσθήκη 1 μl (5 units) παρεμποδιστή δράσης RNAσών.
5. Προσθήκη 2 μl DTT 0.1 M.
6. Προθέρμανση των δειγμάτων στους 42°C για 2 min.
7. Προσθήκη 1 μl (200 U) της αντίστροφης μεταγραφάσης (SuperScript II).

8. Επώαση των δειγμάτων στους 42°C για 50 min.
9. Απενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης στους 70° C για 15 min.

Η ενίσχυση των cDNA πραγματοποιήθηκε είτε με τη μέθοδο PCR είτε με τη μέθοδο το qRT-PCR χρησιμοποιώντας εξειδικευμένους εκκινητές, ενώ τα προϊόντα της αντίδρασης αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1-2% (w/v).

Στη συνέχεια, έγινε με τη χρήση λογισμικού (Beacon designer v7.0) πραγματοποιήθηκε η επιλογή κατάλληλων εκκινητών για την εύρεση της συσσώρευσης των μεταγραφημάτων 37 γονιδίων με τη μέθοδο του ποσοτικού PCR πραγματικού χρόνου (Real Time-PCR). Στον πίνακα αναφέρονται αναλυτικά οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινητών, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Επιλογή των εκκινητών

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

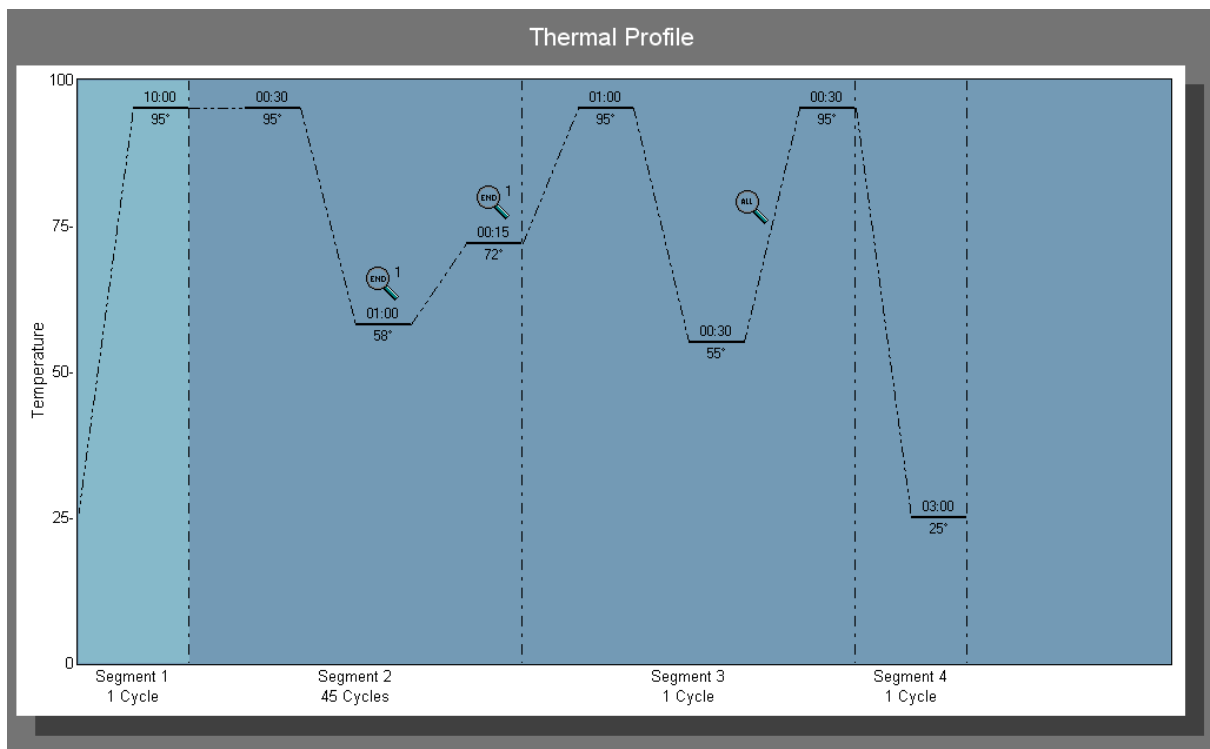
Η επιλογή των εκκινητών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του εξειδικευμένου προγράμματος επιλογής εκκινητών Beacon designer v7.0. Το μέγεθος των ενισχυόμενων τμημάτων ήταν περίπου 150 ζεύγη βάσεων. Οι εκκινητές επιλέχθηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός ομοδιμερών ή ετεροδιμερών. Η δημιουργία ομο και ετεροδιμερών από τους εκκινητές έχει ως αποτέλεσμα την εκπομπή μη εξειδικευμένου φθορισμού κατά την αντίδραση της PCR πραγματικού χρόνου (**Πίνακας 2**). Ως γονίδιο σταθερής έκφρασης χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της ουβικουιτίνης που περιγράφεται στην εργασία (Tsaniklidis et al., 2016).

α/α	Γονίδιο	Εμπρόσθιος εκκινητής (5'-3')	Οπίσθιος εκκινητής (5'-3')
1	Συνθάση της Κυκλοαρτενόλης CAS (Solyc05g047580)	ATAATGGAAGTCAACTAT GG	TAGAATGCTGCCTATA CC
2	CYP37A100 (Solyc5g047530)	GGCAGAAGCGTGATGGAT G	GATGAAGTATCGTCTT GATTTGAGG
3	CYP78A3 (Solyc05g047680)	GTTGAAGCATTATCAGAC TC	GTTGGTTACATCAGAC TCC
4	Μεταφοράση Σακχάρου (Solyc05g047560)	ACCTACAGTAAGTGAATT GAAGAG	GTTACCTGAGATACAA AGAAATAGC
5	Εστεράση (Solyl05g047590)	GTGGTCGGGTTATCATAT AATGG	TAGATTAGTGGGAAG AAATTAAATAAAC

Πίνακας 2. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία

Αντίδραση της qRT-PCR

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε συσκευή Mx3005P Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στην **Εικόνα (5)**.



Εικόνα 5. Θερμοκρασιακό πρόγραμμα της πραγματικού χρόνου αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης.

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 αντίδρασης.

Σε όλες τις περιπτώσεις το μίγμα της αντίδρασης προετοιμάζονταν σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας (Roche Applied Science), ενώ στην τελική αντίδραση χρησιμοποιήθηκε η χρωστική αναφοράς ROX.

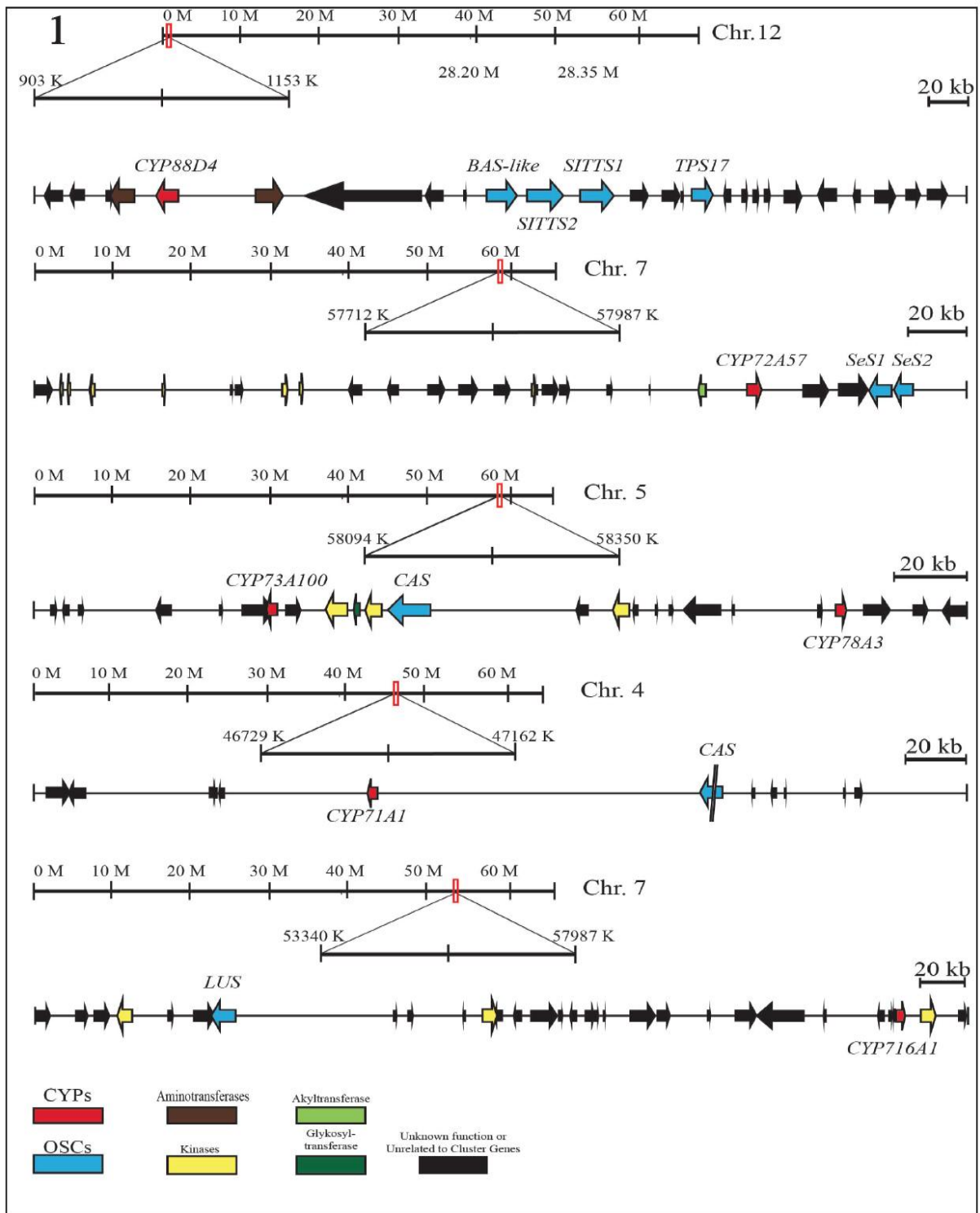
Μετά το τέλος των αντιδράσεων τα δεδομένα εξάχθηκαν με τη μορφή πινάκων και επεξεργάζονταν με τη χρήση του προγράμματος LinRegPCR προκειμένου να προσδιοριστούν η αποτελεσματικότητα των εκκινήτων (efficiency) της κάθε αντίδρασης αλλά και ο αριθμός των κύκλων ορίου (Ct), ο οποίος αντιπροσωπεύει τον αριθμό 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 (Livak and Schmittgen, 2001).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Εντοπισμός Συστοιχιών Γονιδίων στο Γένωμα της Τομάτας

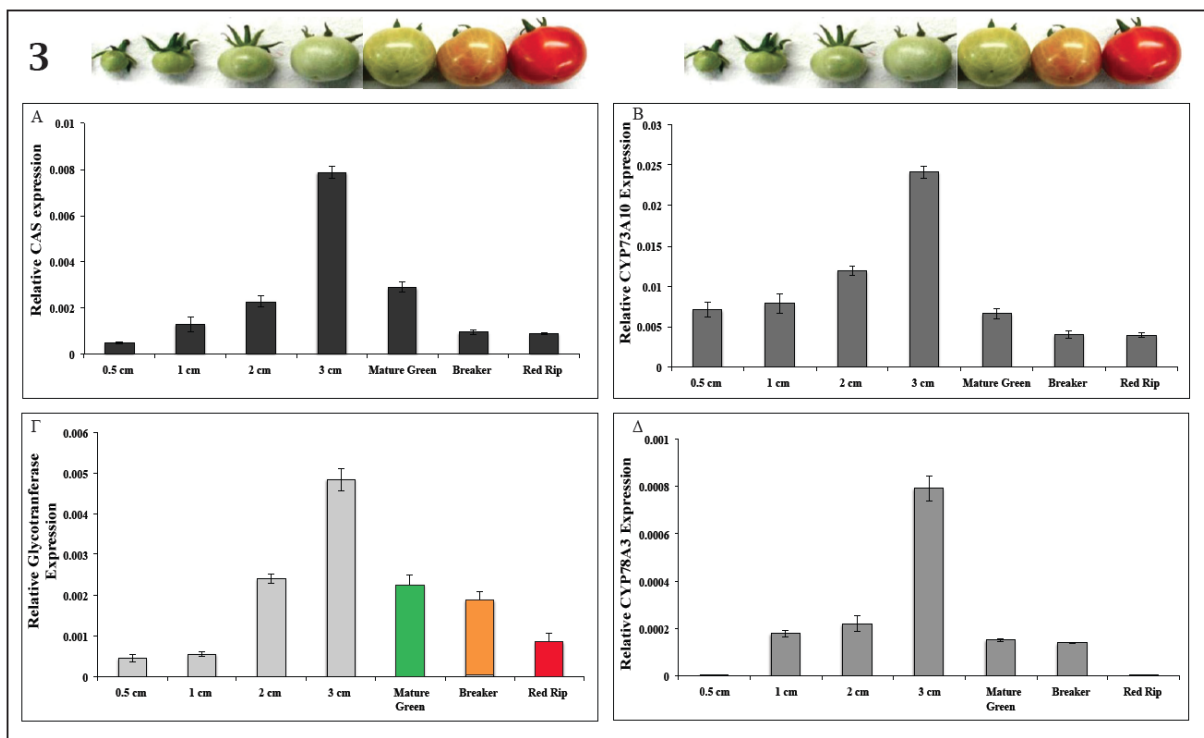
Το γένωμα της τομάτας διερευνήθηκε με τον αλγόριθμο blast στην δημόσια διαθέσιμη ιστοσελίδα <https://solgenomics.net> όπου έχει αναρτηθεί η πλήρης αλληλουχία του, για την ανίχνευση γενωματικών περιοχών στις οποίες υπάρχουν OSCs. Ως ανιχνευτές χρησιμοποιήθηκαν ήδη χαρακτηρισμένες OSCs από τα φυτά της βρώμης, του *A. thaliana* και του *Lotus japonicus* που αποτελούν μέλη συστοιχιών γονιδίων (Field and Osbourn, 2008; Krokida et al., 2013; Qi et al., 2004). Μέσω της εφαρμογής genome browser (https://solgenomics.net/jbrowse_solgenomics/?data=data%2Fjson%2FSL2.50&loc=SL2.50ch00%3A8724305..13085469&tracks=DNA&highlight=) του γενώματος της τομάτας διερευνήθηκαν οι γενωματικές περιοχές εκατέρωθεν των γονιδίων των OSCs που εντοπίστηκαν για την ύπαρξη γονιδίων που μπορεί να συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των στερολών και των τριτερπενοειδών. Με αυτό τον τρόπο εντοπίστηκαν πέντε γενωματικές περιοχές στις οποίες συσσωρεύονται γονίδια που μπορούν να τροποποιούν χημικά μόρια στερολών και τριτερπενοειδών (**Εικόνα 6**).



Εικόνα 6. Η οργάνωση των γενετικών τόπων που περιέχουν γονίδια σε οργάνωση συστοιχίας για τη βιοσύνθεση των στερολών και των τριτερπενοειδών.

3.2. Η Έκφραση των Γονιδίων που συνδέονται με την Βιοσύνθεση την Κυκλοαρτενόλης

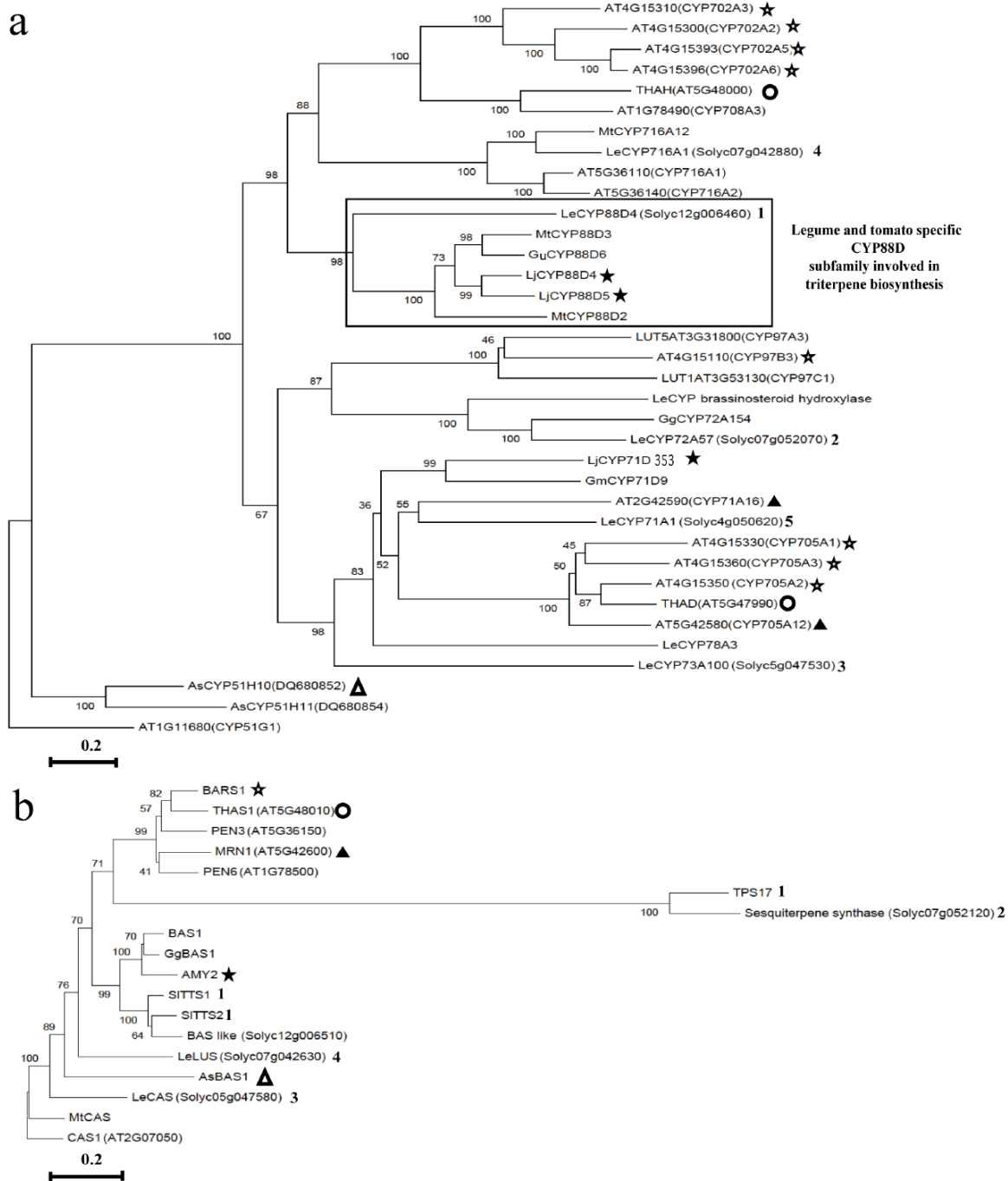
Η έκφραση των γονιδίων που διαπιστώθηκε ότι μπορεί να συμμετέχουν στη βιοσύνθεση της κυκλοαρτενόλης και βρίσκονται στον ίδιο γενετικό τόπο διερευνήθηκε με την χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου. Τέσσερα γονίδια της τρίτης συστοιχίας η συνθάση της κυκλοαρτενόλης, δύο κυτοχρώματα P-450 (CYP73A10 και CYP78A3) και μία μεταφοράση σακχάρων παρουσίασαν το ίδιο πρότυπο συσσώρευσης μεταγραφημάτων κατά την ανάπτυξη των καρπών της τομάτας. Η μέγιστη έκφραση των γονιδίων παρουσιάστηκε στο στάδιο αναπτυσσομένου καρπού 3cm. Η έκφραση όλων των γονιδίων βαίνει αυξανόμενη μέχρι το στάδιο των 3 εκατοστών που όπως αναφέρθηκε παίρνει τη μέγιστη τιμή της και στην συνέχεια μειώνεται έως το στάδιο του ώριμου καρπού (**Εικόνα 7**). Το γονίδιο της εστεράσης της πηκτίνης δεν έδωσε έκφραση στον καρπο της τομάτας και φαίνεται να μην εμπλέκεται στη συστοιχία των γονιδίων.



Εικόνα 7. Η σχετική έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στη συστοιχία γονιδίων για τη βιοσύνθεση της κυκλοαρτενόλης. Στο πάνω μέρος της εικόνας φαίνονται τα στάδια της τομάτας στα οποία μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων. Ως γονίδιο σταθερής έκφρασης χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της ουβικουτίνης (Tsaniklidis et al., 2016)

3.3. Φυλογενετική Ανάλυση

Φυλογενετικά δένδρα των πρωτεϊνικών αλληλουχιών των (a) OSCs και των (b) CYPs οι οποίες είτε σχετίζονται με τη βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών και στερολών είτε σχηματίζουν συστοιχίες γονιδίων για τη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο (neighbour-joining) με 1000 bootstrap επαναλήψεις. Η κλίμακα αντιπροσωπεύει τον αριθμό αντικατάστασης των αμινοξέων σε κάθε αναλυόμενο μέλος. Τα ίδια σύμβολα και όμοιοι αριθμοί αντιστοιχούν γονίδια που βρίσκονται στις ίδιες συστοιχίες γονιδίων για τα φυτά της τομάτας.



Εικόνα 8. Η φυλογενετική ανάλυση των χαρακτηρισμένων για τη συμμετοχή τους σε συστοιχίες γονιδίων πρωτεϊνικών αλληλουχιών γονιδίων και (a) CYPs και (b) OSCs

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η *in silico* ανάλυση για το γένωμα της τομάτας έδειξε και επιβεβαίωσε την ύπαρξη πέντε γενωματικών περιοχών (loci) στις οποίες συσσωρεύονται γονίδια που συμμετέχουν στην βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών και στερολών. Ο αριθμός των συστοιχιών μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ των φυτών. Έτσι στο *A. thaliana* εντοπίζονται 8 συστοιχίες και στο *L. japonicus* δυο εκ των οποίων η μία μη λειτουργική και μία συστοιχία στη Βρώμη (Field et al., 2011; Field and Osbourn, 2008; Krokida et al., 2013; Osbourn and Field, 2009; Qi et al., 2004). Συνεπώς ο αριθμός των συστοιχιών γονιδίων είναι μάλλον τυχαίο γεγονός καθώς ακόμα και σε συγγενικά είδη μπορεί να διαφέρει (Field et al., 2011). Τα ευρήματα αυτά ενισχύουν την άποψη ότι ο σχηματισμός των συστοιχιών πραγματοποιείται εκ νέου σε κάθε φυτό μέσω κάποιου αγνώστου μέχρι σήμερα μηχανισμού ανακατασκευής του γενώματος.

Τα πιο πάνω συμπεράσματα προκύπτουν και από την φυλογενετική ανάλυση των γονιδίων η οποία έδειξε ότι τα γονίδια που συμμετέχουν δεν είναι κατ ανάγκη ορθόλογα αλλά πρόκειται μάλλον για παράλογα γονίδια που δημιουργήθηκαν μέσω διπλασιασμού στον ίδιο οργανισμό (Osbourn and Field, 2009). Για αυτό το λόγο τα γονίδια δεν ομαδοποιούνται μεταξύ των συστοιχιών και γονίδια που κωδικοποιούν για κυτοχρώματα μπορεί να απέχουν αρκετά γενετικά μεταξύ τους παρόλο που συνεδράζονται με την ίδια OSC.

Σε όλες τις συστοιχίες γονιδίων που μελετήθηκαν υπάρχει μεγάλος αριθμός διάσπαρτων μεταθετών στοιχείων (Osbourn and Field, 2009). Το γεγονός αυτό δεν έχει εξηγηθεί επαρκώς ωστόσο μπορεί η αναδιάρθρωση του γενώματος να σχετίζεται με αυτό το εύρημα. Στην τομάτα όπως και στο *A. thaliana* και τη βρώμη οι συστοιχίες των γονιδίων εντοπίζονται στις άκρες των χρωματοσωμάτων. Οι περιοχές αυτές είναι εξαιρετικά ενεργές και θεωρούνται σημαντικές για την δημιουργία νέων γονιδίων και άρα ενισχύεται η άποψη της *de novo* δημιουργίας των συστοιχιών των γονιδίων.

Ένα βασικό κριτήριο για την ύπαρξη ή μη μίας συστοιχίας γονιδίων είναι η συνέκφραση των γονιδίων που την αποτελούν (Field and Osbourn, 2008; Krokida et al., 2013; Qi et al., 2004; Qi et al., 2006). Στην παρούσα εργασία η συνέκφραση των γονιδίων που συμμετέχουν στην συστοιχία βιοσύνθεσης της κυκλοαρτενόλης επιβεβαιώθηκε. Η μέγιστη έκφραση στο στάδιο του καρπού τριών εκατοστών συμπίπτει με την μέγιστη ανάπτυξη του καρπού. Συνεπώς η βιοσύνθεση της στερόλης μπορεί να σχετίζεται με την ανάπτυξη του καρπού της τομάτας. Οι στερόλες αντίθετα με τα τριτερπενοειδή που συσσωρεύονται στην επιδερμίδα του καρπού και έχουν μάλλον προστατευτικό ρόλο αποτελούν πρόδρομες ουσίες αρκετών φυτικών ορμονών (Corey et al., 1993). Η άποψη της συμμετοχής της κυκλοαρτενόλης στην ανάπτυξη της τομάτας ενισχύεται και από ευρήματα

στο *L. jaronicus* όπου η λουπεόλη αν και δεν εντοπίζεται σε συστοιχία γονιδίων διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εγκαθίδρυση της συμβιωτικής σχέσης μεταξύ ριζόβιου και φυτού αλλά και στην ανάπτυξη των αζωτοδεσμευτικών δομών που ονομάζονται φυμάτια (Delis et al., 2011).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Bednarek, P., Osbourn, A., 2009. Plant-microbe interactions: chemical diversity in plant defense. *Science* 324, 746-748.
- Cerboneschi, M., Decorosi, F., Biancalani, C., Ortenzi, M.V., Macconi, S., Giovannetti, L., Viti, C., Campanella, B., Onor, M., Bramanti, E., Tegli, S., 2016. Indole-3-acetic acid in plant-pathogen interactions: a key molecule for in planta bacterial virulence and fitness. *Research in Microbiology* 167, 774-787.
- Corey, E.J., Matsuda, S.P., Bartel, B., 1993. Isolation of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding cycloartenol synthase by functional expression in a yeast mutant lacking lanosterol synthase by the use of a chromatographic screen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 11628-11632.
- D'Auria, J.C., Gershenzon, J., 2005. The secondary metabolism of *Arabidopsis thaliana*: growing like a weed. *Current Opinion in Plant Biology* 8, 308-316.
- Darras, A.I., Kotsiras, A., Delis, C., Nifakos, K., Pavlakos, E., Demopoulos, V., 2017. Reaction of the native Greek tomato varieties 'Chondrokatsari Messinias' and 'Katsari Santorinis' to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *Rhizoctonia solani* infection. *Hellenic Plant Protection Journal* 10, 70-79.
- Delis, C., Krokida, A., Georgiou, S., Pena-Rodriguez, L.M., Kavroulakis, N., Ioannou, E., Roussis, V., Osbourn, A.E., Papadopoulou, K.K., 2011. Role of lupeol synthase in *Lotus japonicus* nodule formation. *New Phytol* 189, 335-346.
- Field, B., Fiston-Lavier, A.S., Kemen, A., Geisler, K., Quesneville, H., Osbourn, A.E., 2011. Formation of plant metabolic gene clusters within dynamic chromosomal regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 16116-16121.
- Field, B., Osbourn, A.E., 2008. Metabolic diversification--independent assembly of operon-like gene clusters in different plants. *Science* 320, 543-547.
- Haberer, G., Young, S., Bharti, A.K., Gundlach, H., Raymond, C., Fuks, G., Butler, E., Wing, R.A., Rounsley, S., Birren, B., Nusbaum, C., Mayer, K.F.X., Messing, J., 2005. Structure and architecture of the maize genome. *Plant Physiology* 139, 1612-1624.
- Haralampidis, K., Trojanowska, M., Osbourn, A.E., 2002. Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 75, 31-49.
- Harborne, J.B., 1999. Recent advances in chemical ecology. *Nat Prod Rep* 16, 509-523.

Hippel, P.H.V., Revzin, A., Gross, C.A., Wang, A.C., 1974. Non-specific DNA Binding of Genome Regulating Proteins as a Biological Control Mechanism: 1. The lac Operon: Equilibrium Aspects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71, 4808-4812.

Isaacson, T., Kosma, D.K., Matas, A.J., Buda, G.J., He, Y., Yu, B., Pravitasari, A., Batteas, J.D., Stark, R.E., Jenks, M.A., Rose, J.K.C., 2009. Cutin deficiency in the tomato fruit cuticle consistently affects resistance to microbial infection and biomechanical properties, but not transpirational water loss. *The Plant Journal* 60, 363-377.

Katsarou, D., Omirou, M., Liadaki, K., Tsikou, D., Delis, C., Garagounis, C., Krokida, A., Zambounis, A., Papadopoulou, K.K., 2016. Glucosinolate biosynthesis in *Eruca sativa*. *Plant Physiology and Biochemistry* 109, 452-466.

Kessler, A., Kalske, A., 2018. Plant Secondary Metabolite Diversity and Species Interactions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*.

Kim, J.E., Cheng, K.M., Craft, N.E., Hamberger, B., Douglas, C.J., 2010. Over-expression of *Arabidopsis thaliana* carotenoid hydroxylases individually and in combination with a beta-carotene ketolase provides insight into in vivo functions. *Phytochemistry* 71, 168-178.

Krokida, A., Delis, C., Geisler, K., Garagounis, C., Tsikou, D., Pena-Rodriguez, L.M., Katsarou, D., Field, B., Osbourn, A.E., Papadopoulou, K.K., 2013. A metabolic gene cluster in *Lotus japonicus* discloses novel enzyme functions and products in triterpene biosynthesis. *New Phytol* 200, 675-690.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25, 402-408.

Mugford, S.T., Qi, X., Bakht, S., Hill, L., Wegel, E., Hughes, R.K., Papadopoulou, K., Melton, R., Philo, M., Sainsbury, F., Lomonosoff, G.P., Roy, A.D., Goss, R.J., Osbourn, A., 2009. A serine carboxypeptidase-like acyltransferase is required for synthesis of antimicrobial compounds and disease resistance in oats. *Plant Cell* 21, 2473-2484.

Mylona, P., Owatworakit, A., Papadopoulou, K., Jenner, H., Qin, B., Findlay, K., Hill, L., Qi, X., Bakht, S., Melton, R., Osbourn, A., 2008. Sad3 and Sad4 Are Required for Saponin Biosynthesis and Root Development in Oat. *Plant Cell*.

Nelson, D., Werck-Reichhart, D., 2011. A P450-centric view of plant evolution. *Plant J* 66, 194-211.

Ohyama, K., Suzuki, M., Kikuchi, J., Saito, K., Muranaka, T., 2009. Dual biosynthetic pathways to phytosterol via cycloartenol and lanosterol in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 725-730.

Osbourn, A., 2010. Gene clusters for secondary metabolic pathways: an emerging theme in plant biology. *Plant Physiol* 154, 531-535.

Osbourn, A.E., 1996. Preformed Antimicrobial Compounds and Plant Defense against Fungal Attack. *Plant Cell* 8, 1821-1831.

Osbourn, A.E., Field, B., 2009. Operons. *Cell Mol Life Sci* 66, 3755-3775.

Osbourn, A.E., Qi, X.Q., Townsend, B., Qin, B., 2003. Dissecting plant secondary metabolism - constitutive chemical defences in cereals. *New Phytologist* 159, 101-108.

Papadopoulou, K., Melton, R.E., Leggett, M., Daniels, M.J., Osbourn, A.E., 1999. Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 12923-12928.

Petrussa, E., Braidot, E., Zancani, M., Peresson, C., Bertolini, A., Patui, S., Vianello, A., 2013. Plant Flavonoids—Biosynthesis, Transport and Involvement in Stress Responses. *International Journal of Molecular Sciences* 14.

Qi, X., Bakht, S., Leggett, M., Maxwell, C., Melton, R., Osbourn, A., 2004. A gene cluster for secondary metabolism in oat: Implications for the evolution of metabolic diversity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 8233-8238.

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., 2006. A different function for a member of an ancient and highly conserved cytochrome P450 family: From essential sterols to plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 18848-18853.

Sønderby, I.E., Geu-Flores, F., Halkier, B.A., 2010. Biosynthesis of glucosinolates – gene discovery and beyond. *Trends in Plant Science* 15, 283-290.

Suzuki, H., Achnine, L., Xu, R., Matsuda, S.P., Dixon, R.A., 2002. A genomics approach to the early stages of triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula*. *Plant J* 32, 1033-1048.

Thimmappa, R., Geisler, K., Louveau, T., O'Maille, P., Osbourn, A., 2014. Triterpene Biosynthesis in Plants. *Annual Review of Plant Biology* 65, 225-257.

Tsaniklidis, G., Kotsiras, A., Tsafouros, A., Roussos, P.A., Aivalakis, G., Katinakis, P., Delis, C., 2016. Spatial and temporal distribution of genes involved in polyamine metabolism during tomato fruit development. *Plant Physiol Biochem* 100, 27-36.

Wang, Z., Guhling, O., Yao, R., Li, F., Yeats, T.H., Rose, J.K.C., Jetter, R., 2011. Two Oxidosqualene Cyclases Responsible for Biosynthesis of Tomato Fruit Cuticular Triterpenoids. *Plant Physiology* 155, 540.

Wegel, E., Koumproglou, R., Shaw, P., Osbourn, A., 2009. Cell type-specific chromatin decondensation of a metabolic gene cluster in oats. *Plant Cell* 21, 3926-3936.

Whitaker, B.D., 1988. Changes in the sterol lipid content and composition of tomato fruit during ripening. *Phytochemistry* 27, 3411-3416.