



Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Πελοποννήσου

Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής

Τμήμα Τεχνολόγων Γεωπόνων

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

“Η ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΣΥΣΤΗΧΙΑΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ (GENE CLUSTER) ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΣΤΕΡΟΛΩΝ ΣΤΟ ΦΥΤΟ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ”

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ:

ΠΑΠΑΖΟΓΛΟΥ ΘΕΟΔΟΥΛΑ-ΜΑΡΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ :

ΔΕΛΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2018

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ:	4
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1.1 Το Φυτό της Τομάτας	6
1.2 ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΙΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ, ΤΡΙΤΕΡΠΕΝΟΕΙΔΗ ΚΑΙ ΣΤΕΡΟΛΕΣ	9
1.3 ΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ (G-clusters)	16
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	19
2.1 Καλλιεργητικές συνθήκες και φυτικό υλικό	19
2.2 Απομόνωση RNA	20
2.3 Καθαρισμός Νουκλεϊνικών οξέων με φαινόλη	20
2.4 Προσδιορισμός Συγκέντρωσης και Καθαρότητας Νουκλεϊνικών Οξέων.....	21
2.5 Ανάλυση Δεσοξυριβοζονουκλεϊνικών (DNA) Οξέων σε Πηκτή Αγαρόζης.....	22
2.6 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΑΚΟΛΟΥΘΙΩΝ mRNA ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ PCR (RT-PCR).....	23
2.7 ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	24
2.8 Αντίδραση της qRT-PCR.....	25
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	26
3.1 Η δομή της συστοιχίας των γονιδίων που περιλαμβάνουν την <i>LUS</i>	26
3.2 Η συνέκφραση των γονιδίων της συστοιχίας που περιλαμβάνει το γονίδιο της <i>LUS</i> ..	27
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	31

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πρώτα από όλα, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω να πω στον δάσκαλό μου κ.Κώστα, με τον οποίον δούλεψα και ολοκλήρωσα ένα τέτοιο αριστούργημα. Ήταν πάντα πρόθυμος να με βοηθήσει, καθώς και να απαντήσει σε όλες μου τις απορίες. Αρκετά καθοδηγητικός, καλός και προπάντων υπομονετικός θα έλεγα.

Έπειτα ένα ευχαριστώ θαρρώ θα ήταν σωστό στους γονείς μου να εκφράσω, διότι μου δώσανε την δυνατότητα να καταφέρω να φτάσω έως εδώ και συνεπώς να τελειώσω τις σπουδές μου. Μπαμπά, μαμά, χάρις εσάς μεγάλωσε ανάμεσα μας ένας επιστήμονας. Ιδού και οι αποδείξεις!

ΠΕΡΙΛΗΨΗ:

Η τομάτα η οποία ανήκει στην οικογένεια των Σολανωδών, είναι ένα από τα πιο ευρέως καλλιεργούμενα φυτά. Είναι ένα λαχανικό στο οποίο, κατόπιν των πολλών προσπαθειών γενετικής βελτίωσης, έχουν δημιουργηθεί ποικιλίες και υβρίδια που επιτρέπουν την καλλιέργεια του σχεδόν σε όλα τα μήκη και τα πλάτη του πλανήτη.

Η οικολογική και φαρμακευτική σημασία των τριτερπενίων, καθώς και η σημαντική θέση που κατέχει η βιοσύνθεση τους στο μεταβολικό δίκτυο των φυτών έχουν περιγραφεί σε αρκετά ερευνητικά έργα. Η ανακάλυψη των συστάδων γονιδίων για τη σύνθεση εξειδικευμένων μεταβολιτών σε φυτά θυμίζει προηγούμενα ευρήματα σε βακτηρίδια και μύκητες. Ένα τυπικό χαρακτηριστικό των βακτηριακών γονιδιωμάτων είναι η οργάνωση των γονιδίων για πολλαπλό-βήμα με διαδικασίες σε οπερόνια και συστάδες. Οι περισσότερες από τις συστάδες γονιδίων των φυτών μεταβολισμού που έχουν ανακαλυφθεί μέχρι στιγμής είναι για τη σύνθεση των ενώσεων που εμπλέκονται στην έμφυτη και επαγόμενη αντίσταση στις ασθένειες, αντοχή σε έντομα, αβιοτικές ανοχή του στρες και / ή αλληλοπάθειας.

Στην παρούσα πτυχιακή μελετήθηκε η δομή και η συνέκφραση των γονιδίων που περιλαμβάνονται στη συστοιχία των γονιδίων με κεντρικό γονίδιο την *LUS*. Η συγκεκριμένη συστοιχία περιλαμβάνει εκτός του γονιδίου της *LUS*, ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για ένα κυτόχρωμα *CYP716A1* και ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για μία κινάση (*KIN*). Είναι η πρώτη φορά που εντοπίζεται συστοιχία γονιδίων που το κεντρικό γονίδιο της συστοιχίας είναι η *LUS*. Το γεγονός αυτό μας δείχνει ότι οι συστοιχίες των γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών δεν αποτελούν ορθόλογα γονίδια, τα οποία σχηματίστηκαν σε κάποιο κοινό πρόγονο, αλλά ότι σχηματίζονται ανεξάρτητα και *de novo* στα γενώματα των φυτών από κάποιο άγνωστο μέχρι σήμερα μηχανισμό. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε εκτός των άλλων η έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στη συστοιχία της *LUS* ώστε να διευκρινιστεί εάν και κατά πόσο τα γονίδια συνεκφράζονται και σε ποιους ιστούς. Αρχικά η έκφραση των γονιδίων μελετήθηκε στα διαφορετικά στάδια ανάπτυξης και ωρίμανσης του καρπού της τομάτας. Αυτό έγινε γιατί η οικονομική σημασία του καρπού είναι τέτοια που και η έρευνα στρέφεται σε αυτή την κατεύθυνση. Παρόλα αυτά μεταγραφήματα των συγκεκριμένων γονιδίων δεν εντοπίστηκαν στους καρπούς της τομάτας. Αντίθετα, η μέγιστη έκφραση των γονιδίων εντοπίζεται στις κοτύλες και

τα άνθη. Επιπλέον τα γονίδια εκφράζονται σε μικρότερο βαθμό στα φύλλα, στους βλαστούς και τις ρίζες. Τα αποτελέσματα διαφέρουν από εκείνα της έκφρασης του γονιδίου της *LUS* σε φυτά *L. japonicus* όπου η *LUS* εκφράζονταν αποκλειστικά και μόνο σε υπόγεια τμήματα του φυτού. Το πρότυπο έκφρασης για όλα τα υπό μελέτη γονίδια είναι παρόμοιο και ενισχύει την άποψη ότι γονίδια που συμμετέχουν σε συστοιχίες γονιδίων συνεκφράζονται. Επομένως, είναι δυνατόν να διατυπωθεί η άποψη ότι η συνέκφραση ή μη των γειτονικών γονιδίων αποτελεί κριτήριο για τη συμμετοχή ενός ενζύμου σε συγκεκριμένο βιοσυνθετικό μονοπάτι όπως αυτό των τριτερπενοειδών.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Το Φυτό της Τομάτας

Η τομάτα (*Solanum lycopersicum*) ανήκει στην οικογένεια των Σολανωδών (Solanaceae), η οποία περιλαμβάνει αρκετά από τα ευρέως καλλιεργούμενα φυτά. Κατάγεται από το Περού, όπου βρέθηκαν πλήθους αγγεία διακοσμημένα με εικόνες από την καλλιέργεια της (Μπλέτσος, 2010). Αρχικά στην Ευρώπη μεταφέρθηκε στην Ισπανία, κατόπιν στην Ιταλία και στις υπόλοιπες χώρες. Η Ιταλία ήταν η πρώτη ευρωπαϊκή χώρα στην οποία άρχισαν να καταναλώνουν τους καρπούς της τομάτας γύρω στο 1550, αλλά σε μικρές δόσεις ως άρτυμα, καθώς ήταν διαιτηώς επιφυλακτικοί στη χρήση του νέου αυτού καρπού στη μαγειρική της εποχής. Αντιθέτως, στην Γαλλία, ο κόσμος ήταν περισσότερο καχύποπτος για τον συγκεκριμένο καρπό, έτσι χρειάστηκε να περάσουν σχεδόν δύο αιώνες μέχρι οι κάτοικοι της νότιας Γαλλίας να αρχίσουν σταδιακά να χρησιμοποιούν τις τομάτες στην κουζίνα τους ως άρτυμα (Polese Jean-Marie, 2005). Στην Ελλάδα η καλλιέργεια της ξεκίνησε το 1818 και γρήγορα διαδόθηκε σε όλη τη χώρα ως κηπευτική (Μπλέτσος, 2010).



Βοτανικά η τομάτα είναι ένα ποώδες λαχανικό, πολυετές όταν καλλιεργείται στις περιοχές που αυτοφύεται, ενώ στα ηπειρωτικά και εύκρατα κλίματα

καλλιεργείται ως ετήσιο. Το ύψος της ποικίλλει ανάλογα με το γονότυπο και την ποικιλία. Στα φυτά με τύπο απεριόριστης ανάπτυξης ο κεντρικός βλαστός αναπτύσσεται φτάνοντας σε μήκος έως και τα 10 ή/και περισσότερα μέτρα. Οι γονότυποι αυτοί προτιμούνται για καλλιέργεια σε θερμοκήπιο, όπου τα φυτά δέχονται υποστήλωση και αναπτύσσονται καθ' ύψος, αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για υπαίθρια καλλιέργεια με την κατάλληλη υποστήλωση και κλαδέματα. Για υπαίθρια καλλιέργεια προτιμούνται αυτοκλαδεύόμενοι ή νάνοι γονότυποι, των οποίων η ανάπτυξη καθ' ύψος σταματά μετά την εμφάνιση 4-6 ταξιανθών, οπότε ξεκινά η έκπτυξη των παράπλευρων οφθαλμών στη βάση τού φυτού, με αποτέλεσμα αυτό να παίρνει θαμνώδη μορφή (Χα Ιμπραχίμ-Αβραάμ και Πετρόπουλος Σ., 2014).

Τα φύλλα φύονται στους βλαστούς εναλλάξ, είναι σύνθετα και αποτελούνται συνήθως από 7, 9 ή και 11 φυλλάκια (Δημητρακάκης Κ. Γ., 1998). Η επάνω επιφάνεια του ελάσματος έχει χρώμα λαμπερό, βαθύ πράσινο, ενώ η κάτω ελαιώδες, ανοικτό πράσινο. Ο αριθμός των φυλλαρίων μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με τη θέση του φύλλου πάνω στο βλαστό και το γονότυπο, ενώ το μέγεθος των φύλλων επηρεάζεται επίσης τόσο από το γονότυπο όσο και από τις συνθήκες καλλιέργειας. Το μέγεθος των φύλλων πρέπει να λαμβάνεται υπόψη για τον καθορισμό των αποστάσεων φύτευσης ώστε να αποφεύγονται φαινόμενα σκίασης, γνωρίζοντας ότι οι μεγαλόκαρπες ποικιλίες έχουν γενικά μακρύτερα και πλατύτερα φύλλα σε σχέση με τις μικρόκαρπες (Χα Ιμπραχίμ-Αβραάμ και Πετρόπουλος Σ., 2014). Στην επιφάνεια τους όπως και στους βλαστούς υπάρχουν αδενώδεις τρίχες, οι οποίες θραυόμενες αναδίδουν την χαρακτηριστική οσμή του φυτού (Δημητρακάκης Κ. Γ. , 1998).



Τα άνθη είναι ερμαφρόδιτα, αυτογονιμοποιούμενα, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να υπάρξει σταυρογονιμοποίηση (Χα Ιμπραχίμ-Αβραάμ και Πετρόπουλος Σ., 2014). Είναι κίτρινα και έχουν συνήθως 6 σέπαλα, 6 πέταλα και πολύχωρη ωοθήκη και 2-7 στήμονες. Οι στήμονες έχουν κοντό νήμα και μεγάλους ανθήρες οι οποίοι ενώνονται και σχηματίζουν κοίλο κώνο από το εσωτερικό του οποίου διέρχεται ο στύλος του οποίου το κιτρινοπράσινο στίγμα προεξέχει του κώνου των ανθέρων, βρίσκεται στο ίδιο επίπεδο ή μέσα στον κώνο. Αυτή η κατασκευή του άνθους διευκολύνει την αυτο-επικονίαση, γιατί η γύρη πέφτει στο στίγμα με μικρής ταχύτητας άνεμο ή με ελαφρύ τίναγμα (Φώτιος Α. Μπλέτσος-2012). Η άνθηση αρχίζει τις πρωινές ώρες και συνεχίζεται καθ' όλη την ημέρα. Με το άνοιγμα της στεφάνης γίνεται η ωρίμαση του στίγματος και μόνο μετά από 24-48 ώρες αρχίζει η διάρρηξη των ανθέρων και η διάχυση της γύρης (υστερανδρία) (Δημητρακάκης Κ. Γ. -1998).

Οι ανώριμοι καρποί είναι ομοιόχρωμοι ή έχουν έντονο πράσινο χρώμα γύρω από τον ποδίσκο (πράσινοι ώμοι). Ωριμάζουν σε 40-60 ημέρες μετά την καρπόδεση. Οι ώριμοι καρποί είναι κόκκινοι και το χρώμα τους οφείλεται στις χρωστικές λυκοπίνη και καροτίνη. Ωστόσο, αν οι θερμοκρασίες είναι μικρότερες από 10°C, οι καρποί παραμένουν πράσινοι γιατί δεν συντίθεται καμία από τις δύο χρωστικές (Φώτιος Α. Μπλέτσος-2012). Έχει χονδρό περικάρπιο, λεπτή επιδερμίδα, χωρίς στομάτια και κηρώδη εφυμενίδα άρα ουσιαστικά πρόκειται για ένα σφραγισμένο

καρπό. Οι σπόροι της τομάτας μπορεί να είναι ωοειδείς, πεπλατυσμένοι και έχουν χρώμα κίτρινο-καφέ χρυσαφί, ενώ το μέγεθος τους είναι μικρό με διάμετρο 3-5 χιλ. Η επιφάνεια τους συνήθως καλύπτεται από το τριχοειδείς αποφύσεις προσδίδοντας τους μεταξένια υφή. Ένα γραμμάριο σπόρων έχει περίπου 450-600 σπέρματα.

Η τομάτα είναι ένα λαχανικό στο οποίο, κατόπιν των πολλών προσπαθειών γενετικής βελτίωσης, έχουν δημιουργηθεί ποικιλίες και υβρίδια που επιτρέπουν την καλλιέργεια του σχεδόν σε όλα τα μήκη και τα πλάτη του πλανήτη, από την τροπική ζώνη ως και μερικές μοίρες από τον αρκτικό κύκλο. Όσον αφορά τις κλιματικές απαιτήσεις του φυτού απαιτούνται θερμοκρασίες μεταξύ 21°C και 25°C την ημέρα και 13°C-16°C τη νύχτα. Το ελάχιστο βιολογικό όριο του φυτού είναι οι 2°C, ενώ σε θερμοκρασίες άνω των 30°C καθυστερεί η ανάπτυξη του φυτού και πάνω από τους 35°C το φυτό σταματά την ανάπτυξη του και παρατηρούνται προβλήματα αναφορικά με την καρπόδεση. Άριστες θεωρούνται μέρες θερμοκρασίες της τάξης των 18°C. Μπορεί να καλλιεργηθεί σε ποικιλία εδαφών. Ωστόσο, αποδίδει καλύτερα σε εδάφη με σταθερή δομή, υψηλό βαθμό υδατοϊκανότητας, καλή στράγγιση και υψηλή περιεκτικότητα σε οργανική ουσία. Καταλληλότερα θεωρούνται τα αμμοπηλώδη και πηλοαμμώδη εδάφη (Χα Ιμπραχίμ-Αβραάμ και Πετρόπουλος Σ., 2014).

1.2 ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΙΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ, ΤΡΙΤΕΡΠΕΝΟΕΙΔΗ ΚΑΙ ΣΤΕΡΟΛΕΣ

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες ή δευτερογενή φυτικά προϊόντα είναι οι ουσίες, που βιοσυντίθενται κατά τις μεταβολικές διαδικασίες των υδατανθράκων, των λιπών και των αμινοξέων (Καραταγλής Σ. Σ. , 1999). Διαφέρουν σημαντικά από τους πρωτογενείς μεταβολίτες (Αμινοξέα, νουκλεοτίδια, σάκχαρα, λιπίδια κα) τόσο στο ότι δεν είναι απαραίτητοι για την διατήρηση των βιολογικών διεργασιών, όσο και λόγω της περιορισμένης εξάπλωσης τους σε μερικές φυτικές οικογένειες ή και είδη (L. Taiz, E. Zeiger, 2002). Πράγματι, συγκεκριμένοι δευτερογενής μεταβολίτες μπορεί να βιοσυντίθενται μόνο σε ένα φυτικό είδος ή σε μια ταξινομικά συγγενική ομάδα φυτικών ειδών. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες κατατάσσονται στις παρακάτω ομάδες ανάλογα με το πρόδρομο μόριο του πρωτογενούς μεταβολισμού από το οποίο προέρχονται και τον περαιτέρω μεταβολισμό του:

1. Ενώσεις που περιέχουν άζωτο (N): Αυτές οι ενώσεις προέρχονται από αμινοξέα και είναι αλκαλοειδή, μεταλαΐνες, αμίνες, κυανογόνα γλυκοζίδια, θειογλυκοζίτες, αμυντικές πρωτεΐνες και αμίνες.
2. Φαινυλπροπανοειδή: Συντίθενται από το αρωματικό αμινοξύ φαινυλαλανίνη το οποίο προέρχεται από το μονοπάτι του σισκεμικού. Η φαινυλαλανίνη μεταβολίζεται αρχικά σε κινναμικό οξύ και στη συνέχεια παράγονται τα φαινυλπροπανοειδή.
3. Βενζενοειδή: Παράγονται από την φαινυλαλανίνη με αφαίρεση δύο ατόμων άνθρακα (Orliva I et al., 2006).
4. Φλαβονοειδή: Παράγονται από την φαινυλαλανίνη και από το μηλονυλο-CoA (Μιχάηλ Ηλ., 2007).
5. Τερπένια: Παράγονται ύστερα από σταδιακή συμύκνωση μορίων ακετυλο-CoA μέσω της οδού βιοσύνθεσης του μεβαλονικού

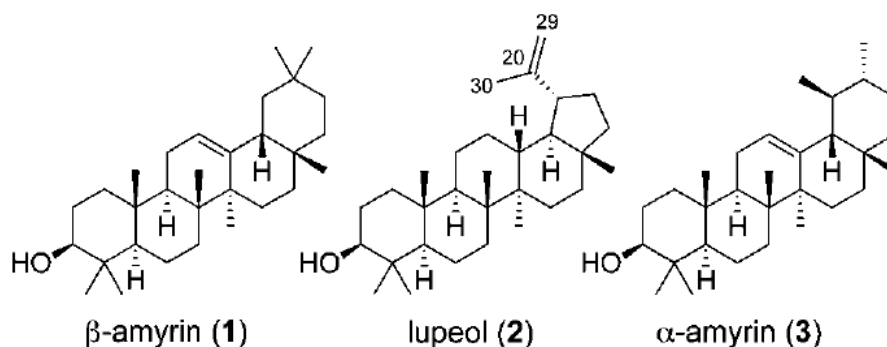
Τα τερπένια είναι η πιο πολυάριθμη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών, αριθμώντας πάνω από 20.000 μέλη (Auria J. and Gershenzon J., 2005). Όλα τα τερπενοειδή προκύπτουν ως πολυμερή του ισοπρενίου (2-μέθυλο-1,3-βουταδιένιο), ενώ στον τελικό ανθρακικό σκελετό τους μπορεί να προστεθούν διάφορες λειτουργικές ομάδες ή σάκχαρα (σαπωνίνες) (McGarvey D. J. and Croteau R., 1995). Μια υποκατηγορία των τερπενίων, τα τριτερπένια, (ο σκελετός τους αποτελείται από 30 άτομα C) προκύπτει από τη βιοσυνθετική οδό του μεβαλονικού οξέως με συμύκνωση δυο μορίων IPP σε σκουαλένιο, το οποίο με δράση εποξειδάσης μετατρέπεται σε 2,3-οξειδοσκουαλένιο. Αυτό το μόριο αποτελεί σημείο διακλάδωσης του πρωτογενούς και του δευτερογενούς μεταβολισμού, καθώς μπορεί να κυκλοποιηθεί προς ενώσεις με στερολικό σκελετό ή σε τριτερπένια με τη δράση ενζύμων της οικογένειας OSC (Abe, I., Rohmer, M. and Prestwich, G.D., 1993). Ένας αριθμός γονιδίων και ενζύμων για τη σύνθεση τριτερπενίου έχουν χαρακτηριστεί από φυτά (Osbourn 2010;. Augustin et al., 2011; Sawai & Saito, 2011). Είναι ενδιαφέρον, τα γονίδια για ορισμένα τριτερπένια βιοσυνθετικής οδού υπάρχουν ως μεταβολικές συστάδες γονιδίων σε βρώμη (*Avena strigosa*) και τα φυτά του *Arabidopsis thaliana* (Papadopoulou et al, 1999;. Qi et al, 2004, 2006;. Osbourn 2010;. Chu et al, 2011). Κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών, η μεταβολική συστάδες γονιδίων για την σύνθεση των άλλων τάξεων των δευτερογενών μεταβολιτών έχουν επίσης ταυτοποιηθεί από διαφορετικά είδη φυτών. Αυτά περιλαμβάνουν: διτερπένια και

τριτερπένια στο ρύζι (Wilderman et al, 2004; Shimura et al, 2007; Swaminathan et al, 2009), κυανιογόνοι γλυκοζίτες στο *Lotus japonicus*, μανιόκα (*Manihot esculenta*) και το σόργο (*Sorghum bicolor*) (Τάκος et al, 2011).; και, πρόσφατα, η νοσκαπίνη αλκαλοειδές σε παπαρούνας (Winzer et al., 2012). Είναι σαφές ότι η εμφάνιση των συστάδων γονιδίων σε φυτά είναι ένα επαναλαμβανόμενο φαινόμενο και, ως εκ τούτου, συνεπάγεται κάποια λειτουργική σημασία για αυτή τη μορφή της γενετικής οργάνωσης.

Ο ρόλος των τριτερπενίων φαίνεται να είναι κυρίως η φυτοπροστασία, αφού εκδηλώνουν ισχυρές αντιμικροβιακές ιδιότητες (Osbourne A. E., 1996, Osbourne A. E. Et al., 2003). Η δράση τους αυτή εκδηλώνεται κυρίως από τις γλυκοζυλιωμένες τους μορφές, τις σαπωνίνες που 6 αποκαλούνται έτσι λόγω τις ιδιότητας απορρυπαντικού που αποκτούν με αυτή την τροποποίηση (Papadopoulou K. et al., 1999; Price K. et al., 1987). Ωστόσο έχει δειχθεί ότι μερικά τριτερπένια μπορεί να συμμετέχουν σε διαδικασίες της ανάπτυξης και αύξησης ακόμη και στη μη γλυκοζυλιωμένη μορφή τους (στην οποία καλούνται αγλυκόνες) (Baisted D.J., 1971). Επίσης, υπάρχουν πειραματικά ευρήματα που υποδηλώνουν συμμετοχή των αγλυκόνων αυτών στη μεμβρανική λειτουργία και στο σχηματισμό ριζοβιακών-μυκκορριζικών συμβιώσεων (Hernandez L.E. and Cooke D.T., 1996, Confalonieri M. et al., 2009; Delis et al., 2011).

Προσφάτως, οι σαπωνίνες κατηγοριοποιήθηκαν σύμφωνα με τον ανθρακικό τους σκελετό, όπως αυτός προκύπτει από τα μονοπάτια βιοσύνθεσης τους. Με βάση αυτή την κατηγοριοποίηση υπάρχουν 11 βασικές κατηγορίες σαπωνίνων διαδεδομένες στο φυτικό βασίλειο χωρίς να περιορίζονται σε ορισμένες κλάσεις ή τάξεις φυτών. Ο πιο διαδεδομένος τύπος σκελετού στις περισσότερες τάξεις φυτών φαίνεται πως είναι ο τύπος των ολεανινών (oleanane). Ο σκελετός αυτός μπορεί να δεχθεί διάφορους υποκαταστάτες όπως υδροξυλομάδες (-OH), καρβονυλομάδες (=O) αλλά και αλυσίδες σακχάρων από 1-8 υποκατάστατα (Vincken JP, et al., 2007). Για το σχηματισμό του βασικού σκελετού των ολεανινών απαιτούνται τουλάχιστον τέσσερις διακριτές αλλαγές στο μόριο του 2,3-οξειδοσκουαλενίου ενώ από το μόριο του ολεανικού καρβοκατιόντος μπορεί να προκύψει πληθώρα μορίων με διαφορές στους τύπους υποκαταστατών ή τη θέση τους στον ανθρακικό σκελετό ανάλογα με το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση κυκλοποίησης και τα ένζυμα που δρουν

καθοδικά του. Ένα συχνά απαντώμενο παράγωγο του ολεανικού καρβοκατιόντος είναι η β-αμυρίνη (beta-amyrin) (Kushiro T. Et al., 1998a).



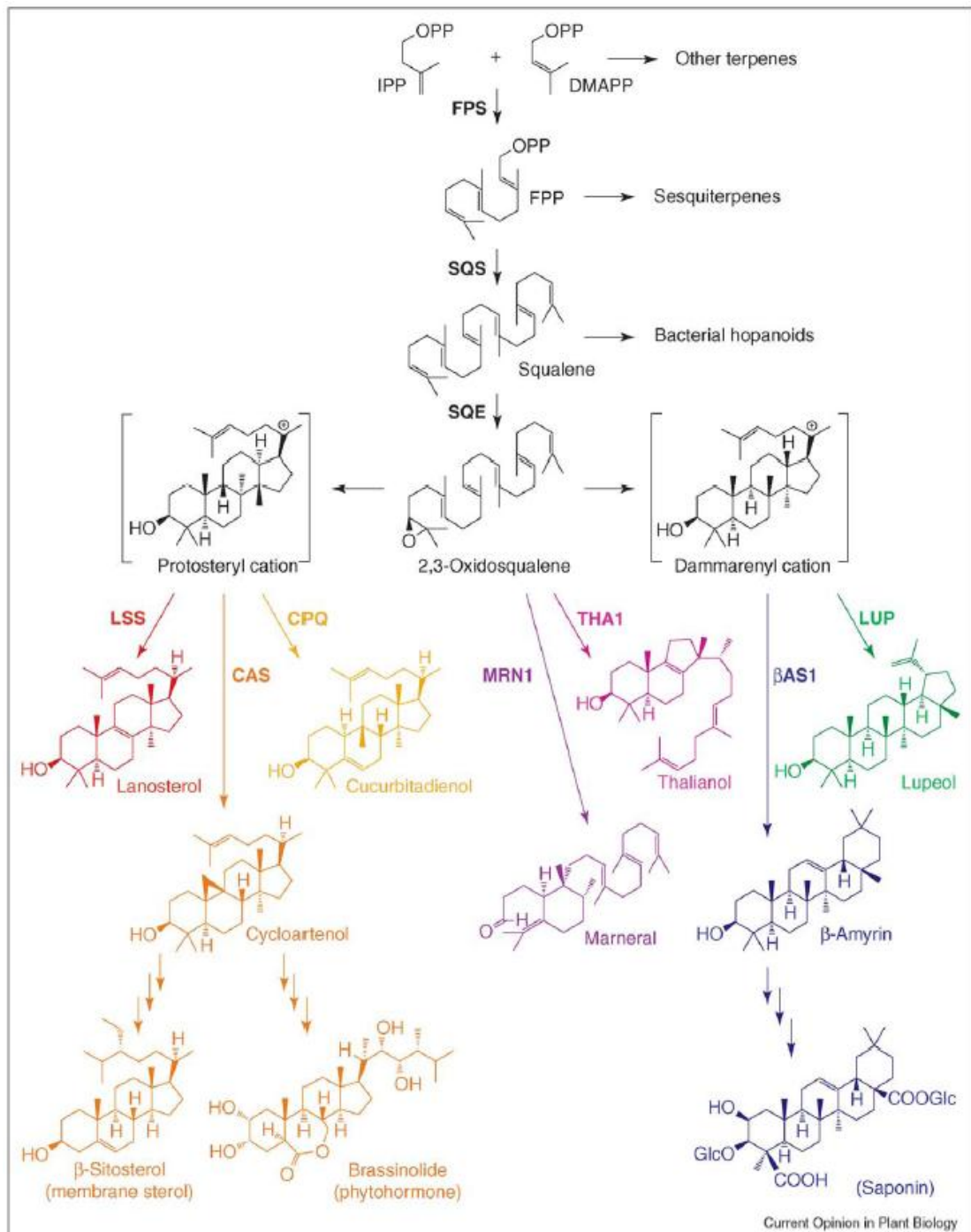
Εικόνα : Η β-αμυρίνη, η λουπεόλη και η α-αμυρίνη είναι σαπωνίνες (Vincken et al., 2006).

Η παραγωγή της β-αμυρίνης καταλύεται από ένζυμα: συνθάσες της β-αμυρίνης τα οποία ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των OSCs (E.C. 5.4.99). Λόγω των πολύπλοκων αντιδράσεων που καταλύουν τα συγκεκριμένα ένζυμα, της σημασίας που έχουν στο μεταβολικό δίκτυο των φυτών, ενδεχομένως δρώντας ρυθμιστικά σε μια διακλάδωση μεταξύ πρωτογενούς και δευτερογενούς μεταβολισμού αλλά και λόγω του γενικότερου ενδιαφέροντος για το μεταβολισμό των τριτερπενίων, έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες κλωνοποίησης και χαρακτηρισμού των γονιδίων που τα κωδικοποιούν σε αρκετά φυτικά είδη (Phillips D. R. et al, 2006, Osbourn A. et al, 2003, Kushiro T. et al, 1998a, Kushiro T. et al, 1998b, Morita et al, 2000, Iturbe-Ormaetxe I et al, 2003).

Η πλήρης κατανόηση αυτών των μεταβολικών οδών, εκτός από το άμεσο επιστημονικό ενδιαφέρον, μπορεί να επιτρέψει την τροποποίηση και ρύθμιση της περιεκτικότητας φυτικών οργανισμών σε μεταβολίτες της κατηγορίας των τριτερπενίων. Έτσι μπορεί να επηρεαστεί η συσσώρευση επιθυμητών ουσιών σε ορισμένα φυτά και να βελτιωθούν οι φαρμακευτικές και κοσμητικές τους χρήσεις. Εναλλακτικά μπορεί η επίδραση στον μεταβολισμό να τροποποιήσει τα αγρονομικά χαρακτηριστικά παραγωγικών φυτών ενισχύοντας την ανθεκτικότητα σε προσβολή από παθογόνους μικροοργανισμούς ή την αζωτοδεύσμευσης ενεργοποιώντας το

σχηματισμό ριζοβιακών σχέσεων που συμβάλουν σ' αυτήν (Confalonieri M. et al, 2009).

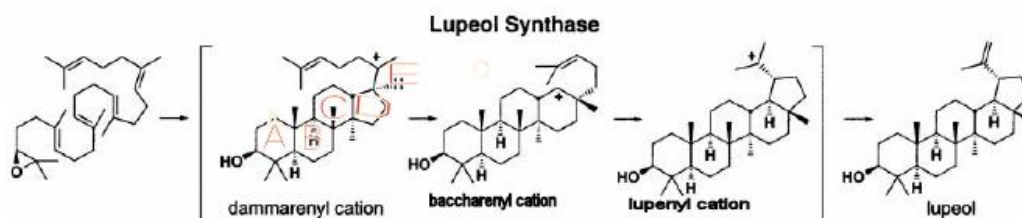
Ως αναφορά την πορεία της βιοσύνθεσης τριτερπενοειδών μετά τον σχηματισμό του κατιόντος του προτεστερυλίου τα ένζυμα που συμμετέχουν σε αυτή την πορεία παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία μεταξύ τους. Η *συνθάση της κυκλοαρτενόλης (CAS)* είναι το κυριότερο ένζυμο αυτής της ομάδας OSCs το οποίο μετατρέπει το κατιόν του προτεστερυλίου σε κυκλοαρτενόλη. Η κυκλοαρτενόλη είναι πρόδρομη ένωση για την παραγωγή μεμβρανικών στερολών και φυτοορμονών. Ομόλογες συνθάσες της CAS των φυτών έχουν βρεθεί σε βακτήρια και στην αμοιβάδα. Η *συνθάση της λανοστερόλης (LSS)* μοιάζει πολύ με την CAS και καταλύει τον σχηματισμό της λανοστερόλης από το κατιόν του προτεστερυλίου. Η LSS απαντάται σε αρκετά γένη φυτών, αλλά όχι τόσο συχνά όσο η CAS, και το προϊόν της, δηλαδή η λανοστερόλη, έχει βρεθεί εκτός των φυτών σε ζώα, μύκητες και στην οικογένεια των *trypanosomatids*. Ακόμα, υπάρχουν αρκετά ένζυμα τα οποία έχουν προκύψει κατά την εξέλιξη με διπλασιασμό και διαφοροποίηση του γονιδίου που κωδικοποιεί για την CAS. Ένα τέτοιο ένζυμο είναι και η *συνθάση της κουρκουβιταδιενόλης (CPQ)*. Η εξελικτική απόκλιση των φυτικών συνθασών LSS και CPQ από την αρχική CAS είναι μικρή.



Εικόνα : Βιοσύνθεση τριτερπενοειδών(Phillips et al., 2006)

Έχει αποδειχθεί ότι η απλή λουπεόλη τριτερπενίου εμπλέκεται στην αρνητική ρύθμιση της πρόωρης διεργασίας σχηματισμού όζων στο *L. japonicus* (Delis et al., 2011). Μεταξύ αυτών, AMY1 / OSC1 και AMY2 / OSC8 έχουν προηγουμένως χαρακτηριστεί ως ετερόλογη έκφραση σε ζύμη. AMY1 δείχθηκε να είναι η συνθάση β-αμυρίνη, ενώ AMY2 αναφέρθηκε ότι είναι ένας OSC μικτής λειτουργίας ικανός να συνθέσει τόσο β-αμυρίνη όσο και λουπεόλη (Iturbe-Ormaetxe et al., 2003). Έτσι, η

LUS μπορεί να έχει μια λειτουργία στη διαφοροποίηση. Έχουνε πραγματοποιηθεί πειράματα για να εξεταστεί ο ρόλος των LUS όσο και των προϊόντων της, λουπεόλη, στην ανάπτυξη ριζών και κονδύλων των *L. japonicus*. (Delis et al., 2010).



Εικόνα: Μηχανισμός σχηματισμού της λουπεόλης (Herrera et al., 1998)

Ως αναφορά την πορεία της βιοσύνθεσης τριτερπενοειδών μετά τον σχηματισμό του κατιόντος του προτεστερυλίου τα ένζυμα που συμμετέχουν σε αυτή την πορεία παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία μεταξύ τους. Η *συνθάση της κυκλοαρτενόλης* (CAS) είναι το κυριότερο ένζυμο αυτής της ομάδας OSCs το οποίο μετατρέπει το κατιόν του προτεστερυλίου σε κυκλοαρτενόλη. Η κυκλοαρτενόλη είναι πρόδρομη ένωση για την παραγωγή μεμβρανικών στερολών και φυτοορμονών. Η *συνθάση της λανοστερόλης* (LSS) μοιάζει πολύ με την CAS και καταλύει τον σχηματισμό της λανοστερόλης από το κατιόν του προτεστερυλίου. Η LSS απαντάται σε αρκετά γένη φυτών, αλλά όχι τόσο συχνά όσο η CAS, και το προϊόν της, δηλαδή η λανοστερόλη, έχει βρεθεί εκτός των φυτών σε ζώα, μύκητες και στην οικογένεια των *trypanosomatids*. Οι στερόλες έχουν μελετηθεί εκτενώς και λειτουργούν ως δομικά συστατικά των μεμβρανών και ως πρόδρομοι των στεροειδών ορμονών στα δύο φυτά και ζώα, και επίσης έχουν σημαντικές λειτουργίες σηματοδότησης (Lindsey et al., 2003). Στο μπιζέλι και στο σόργο, η παραγωγή β-αμυρίνης είναι κυρίαρχη κατά την διάρκεια της πρώιμης ανάπτυξης της ρίζας, με το ανταγωνιστικό μονοπάτι βιοσύνθεση στερόλης όλο και πιο ενεργό αρκετές ημέρες αργότερα (Palmer and Bowden, 1977; Abe et al., 1988). Αυτό υποδηλώνει μια αντίστροφη ρύθμιση ροής μέσω του μονοπατιού ισοπρενοειδή που οδηγεί σε στερόλες ή τριτερπένια, στις οποίες εμπλέκονται οι OSCs που καταλύουν την σύνθεση αυτών των μορίων (Haralampidis et al., 2001). Περαιτέρω στοιχεία που να δείχνουν ότι οι πορείες των στερολών και triterpene είναι αντιστρόφως ρυθμίζεται στο επίπεδο της μεταγραφής έχει προκύψει από την ανάλυση

των μοντέλων χωρικής έκφρασης της βρώμης CS και τα γονίδια β-AS στις άκρες της ρίζας από την υβριδοποίηση mRNA situ (Wegel et al., 2009)

1.3 ΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ (G-clusters)

Το 1997 οι Frey et al. ανέφεραν το πρώτο παράδειγμα της φυσικής ομαδοποίησης των γονιδίων για ένα φυτό που ειδικεύεται στο μονοπάτι μεταβολίτη - για τη σύνθεση της άμυνας ενώσεων στον αραβόσιτο (*Zea mays*) (M. Frey et al., 1997). Η συστάδα γονιδίων του αραβοσίτου είχε αρχικά οριστεί ως μια ομάδα πέντε γειτονικών γονιδίων (BX1-BX5) που κωδικοποιούν ένζυμα για τις διαδοχικές βαθμίδες στη βιοσύνθεση του κυκλικού υδροξυαμικού οξέος 2,4-διυδροξυ-1,4-βενζοξαζιν-3-όνη (DIBOA). Περαιτέρω έρευνες αποκάλυψαν τέσσερα περισσότερο βιοσυνθετικά γονίδια (Bx6-Bx9) που απαιτούνται για τη μετατροπή του DIBOA σε 2,4-διυδροξυ-7-μεθοξυ-1,4-βενζοξαζιν-3-όνη (DIMBOA) και επακόλουθη γλυκοζυλίωση, τρία εκ των οποίων (Bx6-8) είναι είτε εντός είτε γενετικά συνδέεται με το σύμπλεγμα (U. von Rad et al., 2001; M. Frey et al. 2003; R. Jonczyk et al., 2008). Επτά χρόνια αργότερα, δύο περαιτέρω συστάδες γονιδίων βιοσύνθεσης περιγράφηκαν, η avenacin συμπλέγματος σε βρώμη (*Avena spp.*) και το σύμπλεγμα phytocassane στο ρύζι (*Oryza sativa*) (X. Qi et al., 2004; P.R. Wilderman et al., 2004). Μέχρι τις αρχές του 2012, ο αριθμός των ταυτοποιημένων φυτών συστάδες γονιδίων δευτερογενής μεταβολίτες είχε αυξηθεί σε εννέα (B. Field et al., 2011; B. Field and A.E. Osbourn, 2008; K. Shimura et al., 2007; A.M. Takos et al., 2011), και κατά το τελευταίο έτος τέσσερις επιπλέον συστάδες έχουν αναφερθεί (T. Winzer et al., 2012; Y. Matsuba et al., 2013; A. Krokida et al., 2013; M. Itkin et al., 2013). Αυτές οι βιοσυνθετικές συστάδες γονιδίων έχουν βρεθεί σε διάφορα είδη φυτών, συμπεριλαμβανομένων τα μονοκοτυλήδονα και δικοτυλήδονα, όπου απαιτούνται για τη σύνθεση των διαφόρων κατηγοριών των μορίων, συμπεριλαμβανομένων των τερπενίων, αλκαλοειδή και κυανογόνοι γλυκοζίτες.

Η ανακάλυψη των συστάδων γονιδίων για τη σύνθεση εξειδικευμένων μεταβολιτών σε φυτά θυμίζει προηγούμενα ευρήματα σε βακτηρίδια και μύκητες (H.Y. Chu et al., 2011). Ένα τυπικό χαρακτηριστικό των βακτηριακών γονιδιωμάτων είναι η οργάνωση των γονιδίων για πολλαπλό-βήμα με διαδικασίες σε οπερόνια και συστάδες. Η έλευση των τεχνικών προσιτών αλληλουχίας του γονιδιώματος επέτρεψε μικροβιακά γονιδιώματα να εξορυχθούν για πλήρες συμπλήρωμα των συστάδων

γονιδίων υποψήφια βιοσυνθετικής (J.M. Winter et al., 2011), επιτρέποντας έτσι την ανακάλυψη νέων μονοπατιών και νέων μεταβολιτών στο παρελθόν σε αναξιοποίητα μικρόβια (T. Lincke et al., 2010; Z. Feng et al., 2011; J. Franke et al., 2012; T.S. Young and C.T. Walsh, 2011). Οι περισσότερες από τις συστάδες γονιδίων των φυτών μεταβολισμού που έχουν ανακαλυφθεί μέχρι στιγμής είναι για τη σύνθεση των ενώσεων που εμπλέκονται στην έμφυτη και επαγόμενη αντίσταση στις ασθένειες, αντοχή σε έντομα, αβιοτικές ανοχή του στρες και / ή αλληλοπάθειας (Chu et al, 2011; Kliebenstein and Osbourn, 2012).

Τα μέλη αυτών των ευκαρυωτικών συστάδων γονιδίων συμβάλλουν σε μια κοινή λειτουργία αλλά συνήθως δεν μοιράζονται ομοιότητα αλληλουχίας. Συνεπώς, αυτές οι συστάδες γονιδίων αντιπροσωπεύουν λειτουργικά οργανισμούς γονίδιο με οπερόνιο-όπως χαρακτηριστικά (φυσικά ομαδοποίηση και από κοινού ρύθμισης), αν και τα γονίδια συνήθως δεν μεταγράφονται ως ένα ενιαίο mRNA όπως συμβαίνει σε προκαρυωτικά (Osbourn A. E. and Ben Field, 2009). Η Βιοσύνθεση των Τριτερπενοειδών στα φυτά οργανώνεται σε συστοιχίες γονιδίων. Τα γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών οργανώνονται στις ίδιες χρωμοσωμικές περιοχές σχηματίζοντας τύπου οπερονίου δομές (Osbourn, 2010). Φυτά στα οποία έχουν προσδιοριστεί τέτοιες περιοχές είναι η Βρώμη (Qi et al., 2004; Qi et al., 2006; Mugford et al., 2009; Mylona et al., 2008), το *Arabidopsis thaliana* (Field and Osbourn, 2008; Field et al., 2011) και το *Lotus japonicus* (Krokida et al., 2013). Οι δομές αυτές παίζουν σημαντικό ρόλο συν-ρύθμισης των γονιδίων και έχουν δημιουργηθεί *de novo* στο γονιδίωμα των φυτών (Wegel et al., 2009; Krokida et al., 2013).

Πρόσφατες γενετικές και βιοχημικές μελέτες έχουν επισημάνει μια ενδιαφέρουσα πτυχή της δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών, δηλαδή τη φυσική ομαδοποίηση των γονιδίων για εξειδικευμένες μεταβολικές οδούς σε φυτικά γονιδιώματα. Δεν είναι ακόμη σαφές εάν η ομαδοποίηση των γονιδίων για τη δευτερογενή μεταβολικές οδούς κυριαρχεί σε φυτά, όπως συμβαίνει σε μύκητες και βακτήρια, σίγουρα υπάρχουν καλά-χαρακτηριζόμενα παραδείγματα μεταβολικών οδών φυτού (π.χ. ανθοκυανίνες και γλυκοζινολικών) για τις οποίες τα γονίδια δεν συνδέονται (D.J. Kliebenstein and A. Osbourn, 2012). Παρ' όλα αυτά, ο ταχέως αυξανόμενος αριθμός αναφορών των μεταβολικών συστάδων γονιδίων για σύνθεση

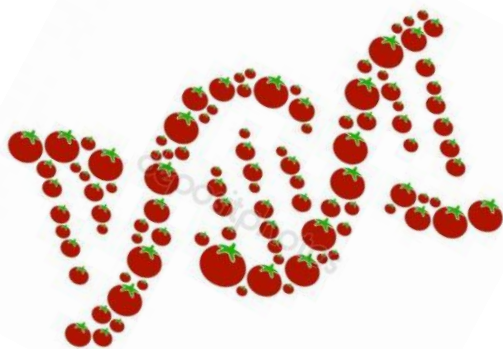
ποικίλων κατηγοριών ενώσεων από διαφορετικά είδη φυτών υποδεικνύει ότι αυτή η μορφή γονιδιωματική οργάνωση είναι κοινή. Σε αντίθεση, ο αριθμός των διόδων για τις οποίες είναι γνωστό τα γονίδια που πρόκειται να διασπαρεί είναι πολύ περιορισμένη. Είναι σημαντικό να θυμόμαστε ότι η συντριπτική πλειοψηφία των φυτών εξειδικευμένων μεταβολικών οδών παραμένουν ακόμη άγνωστα και γονιδιωματική οργάνωση τους είναι άγνωστη (Nutzman Hans-Wilhelm and Osbourn A., 2014).

Συνεπώς με τα προηγούμενα ευρήματα για τη συντονισμένη ρύθμιση της δραστηριότητας του συμπλέγματος (Osbourn & Field, 2009), τα γονίδια συμπλέγματος AMY2 είναι συν-εκφρασμένα συγχρονισμένα ως απάντηση σε αναπτυξιακά και περιβαλλοντικά συνθήματα. Από τα τέσσερα γονίδια που περιλαμβάνουν το σύμπλεγμα του γονιδίου AMY2, τρία συν-εκφράζονται συγχρονισμένα και επάγονται από αβιοτικές πιέσεις και μόλυνση *Rhizobium* ενώ ένα (*LjSDRt*) δεν ήταν. Τα γονίδια για διάφορες άλλες συστάδες γονιδίων φυτών μεταβολικές έχουν επίσης αναφερθεί ότι επάγονται από βιοτική ή αβιοτικών θεραπείες. Για παράδειγμα, ορισμένα (αλλά όχι όλα) τα γονίδια της συστάδας γονιδίων momilactone διτερπενίου του ρυζιού είναι ρυθμισμένη προς τα πάνω σε απόκριση σε θεραπεία με ένα διεγέρτη χιτίνης ολιγοσακχαριτών (Swaminathan et al., 2009). Τα γονίδια συμπλέγματος AMY2 επίσης αναπτυξιακά συν-ρυθμίζονται και η έκφρασή τους είναι που προκαλείται από τις ορμόνες ανάπτυξης των φυτών συν-συγχρονισμένα. Το Meja είναι πολύ γνωστό ως διεγέρτης για την παραγωγή πολλών φυτικών δευτερογενών μεταβολιτών, τυπικά εκδηλώνεται όταν τα φυτά είναι κάτω από περιβαλλοντικές καταπονήσεις (Zhao et al., 2005). Όσον αφορά την επαγωγή της βιοσύνθεσης τριτερπενίου, το Meja επάγει την έκφραση του γονιδίου *M truncatula* BAS (Suzuki et al., 2002).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 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. 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.



2.2 Απομόνωση RNA

Η απομόνωση του ολικού RNA πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους Brusslan and Tobin, (1992).

- 0,2-0,3 gr νωπού φυτικού ιστού ομογενοποιούνται σε γουδί λειοτριβήσεως παρουσίας υγρού αζώτου.
- Το δείγμα μεταφέρθηκε με αποστειρωμένη σπάτουλα σε σωλήνα erppendorf που περιέχει 300ml διαλύματος εκχύλισης RNA(REB) και 300ml μίγματος φαινόλη/χλωροφόρμιο/ 1:1 (PC) pH 8,3.
- Ακολουθεί πολύ καλή ανάδευση σε μηχανικό αναδευτήρα (vortex) για τουλάχιστον 30 sec.
- Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 13.000 στροφές ανά min (rpm) για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Η υδατική φάση (υπερκείμενο) μεταφέρθηκε προσεκτικά σε νέο σωλήνα erppendorf και επαναλαμβάνεται η εκχύλιση με 300ml μίγματος PC.
- Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 15.000 rpm για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Η υδατική φάση (υποκείμενο) μεταφέρθηκε εκ νέου σε σωλήνα erppendorf και τα νουκλεϊκά οξέα κατακρημνίστηκαν με την προσθήκη 1/10 όγκου 3M οξικού νατρίου pH 5,2 και ενός όγκου ισοπροπανόλης.
- Φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm για 15 min στους 4°C.
- Το ίζημα των νουκλεϊκών οξέων επαναδιαλύεται σε 563 ml διαλύματος 10T/10E και το RNA κατακρημνίστηκε εκλεκτικά με την προσθήκη 188 ml διαλύματος 8M LiCl μετά από επώαση στους 4°C για τουλάχιστον 12 h.
- Το ολικό RNA συλλέχθηκε με φυγοκέντρωση στις 15.000 rpm για 15min στους 4°C .
- Το ίζημα ξεπλύθηκε με 70% v/v αιθανόλη.
- Στη συνέχεια αφού αφέθηκε να στεγνώσει, επαναδιαλύθηκε σε κατάλληλο όγκο διαλύματος TE.
 - Διάλυμα εκχύλισης RNA: 50mM Tris-HCl pH 8,3 , 150mM NaCl, 10mM EDTA (Serva), 1% Lauryl sarcosine.
 - Διάλυμα 10T/10E: 10mM Tris-HCl pH 8,3 , 10mM EDTA.
 - Διάλυμα TE: 10mM Tris-HCl pH 8,3 , 1mM EDTA.

2.3 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 φυγοκέντρωση 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 φυγοκέντρωση 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 φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και η μεταφορά της σε νέο σωλήνα φυγοκέντρωσης, 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 φυγοκέντρωση 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.

2.4 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.

2.5 Ανάλυση Δεσοξυριβοζονουκλεϊνικών (DNA) 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) (Χατζόπουλος, 2001).

Τα μόρια του DNA γίνονται ορατά με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και να φθορίζει 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 σημείο βρασμού.

2. Στη λιωμένη αγαρόζη προστέθηκε 0,001% v/v διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου, ενώ στη συνέχεια αφέθηκε να κρυώσει μέχρι περίπου τους 50°C.
3. Η πηκτική τοποθετήθηκε σε κατάλληλο εκμαγείο της συσκευής οριζόντιας ηλεκτροφόρησης και αφέθηκε να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου. Στην πηκτική βυθίζεται ειδική <<χτένα>> που δημιουργεί τις υποδοχές των δειγμάτων.
4. Στα δείγματα του DNA που πρόκειται να αναλυθούν προστέθηκε 1/10 όγκου διαλύματος χρωστικής 10 X DLB.
5. Μόλις στερεοποιήθηκε η πηκτική, απομακρύνθηκε η <<χτένα>> και τοποθετήθηκε στο δοχείο ηλεκτροφόρησης το οποίο συμπληρώθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1 X TAE.
6. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε ηλεκτρικό πεδίο εντάσεως μέχρι 5 Vcm⁻².
 - (a) Διάλυμα ηλεκτροφόρησης 50 X TAE : 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 (USB), 0,25% κυανό του ξυλενίου (USB) και 35% γλυκερόλη (BDH).

2.6 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΑΚΟΛΟΥΘΙΩΝ mRNA ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ PCR (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 καθαρίζονται 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 επιπέδων φθορισμού της χρωστικής Sybergreen, η οποία έχει την ικανότητα να φθορίζει κατά την πρόσδεσή της στα δίκλινα 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 μέθοδο 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. Επώση 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 συσώρευσης 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.

2.7 ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ

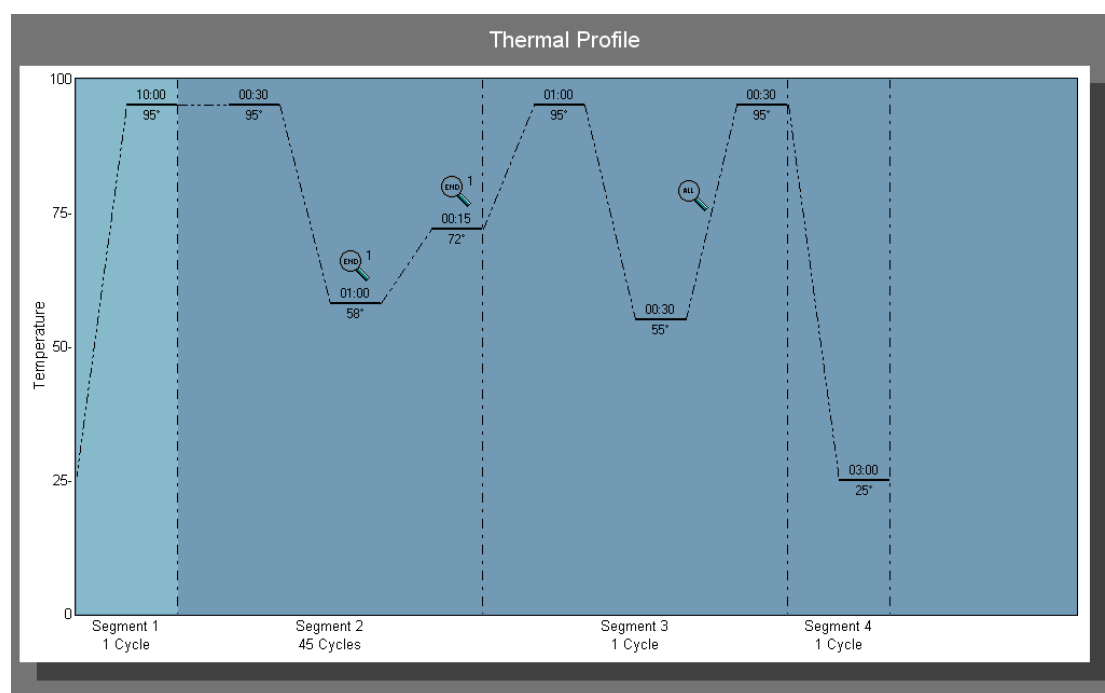
Οι αλληλουχίες γονιδίων που κωδικοποιούσαν για τα ίδια ένζυμα του βιοχημικού μονοπατιού ομοπαράτεθηκαν με τον αλγόριθμο ClustalW. Οι εκκινητές επιλέχθηκαν σε μη συντηρημένες περιοχές των γονιδίων, ώστε να αποφευχθεί ο μη

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

2.8 Αντίδραση της qRT-PCR

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε συσκευή Mx3005P (ABI). Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στην εικόνα 1.



Εικόνα 1. 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 - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

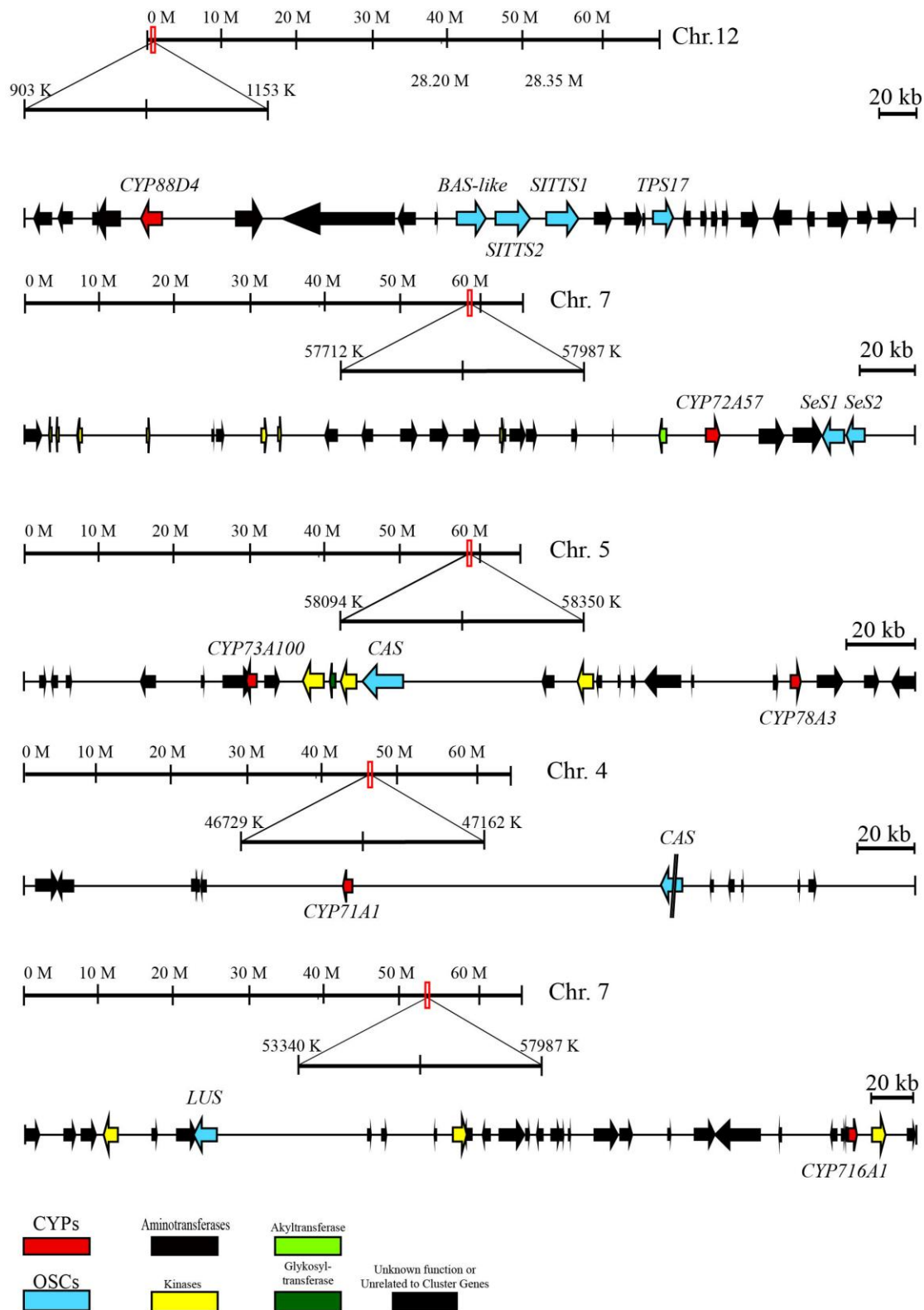
3.1 Η δομή της συστοιχίας των γονιδίων που περιλαμβάνουν την *LUS*

Στην παρούσα πτυχιακή μελετήθηκε η δομή και η συνέκφραση των γονιδίων που περιλαμβάνονται στη συστοιχία των γονιδίων με κεντρικό γονίδιο την *LUS* (Εικόνα). Η συγκεκριμένη συστοιχία περιλαμβάνει εκτός του γονιδίου της *LUS*, ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για ένα κυτόχρωμα *CYP716A1* και ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για μία κινάση (*KIN*). Η συστοιχία βρίσκεται όπως οι περισσότερες συστοιχίες που έχουν ταυτοποιηθεί σε άλλα φυτά σε περιοχή κοντά στα τελομερή του χρωματοσώματος 7 (Field and Osbourn., 2008; Krokida et al., 2013; Qi et al., 2004). Είναι η πρώτη φορά που εντοπίζεται συστοιχία γονιδίων που το κεντρικό γονίδιο της συστοιχίας είναι η *LUS*, για παράδειγμα αν και στο *Lotus japonicus* έγινε εκτενής

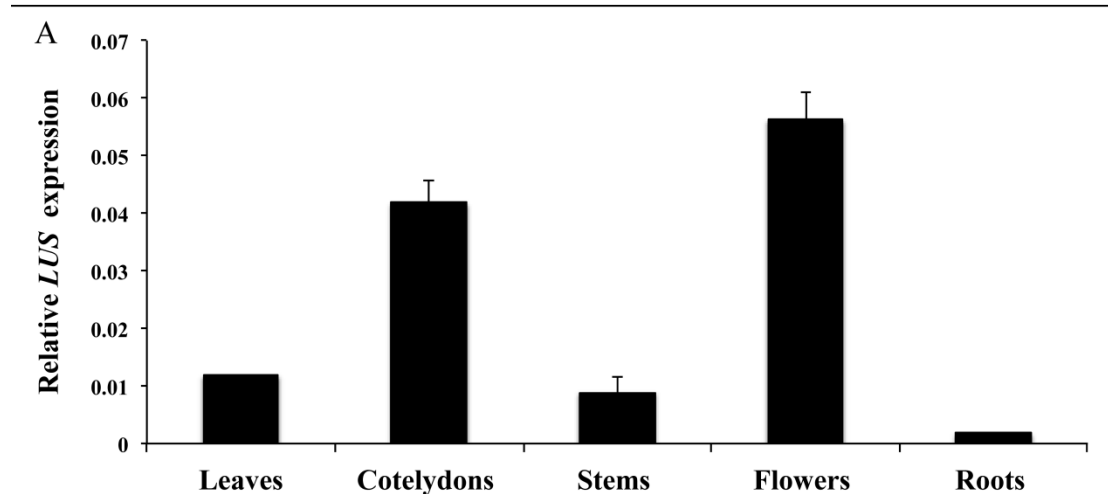
μελέτη της λειτουργίας του γονιδίου, αυτό δεν περιλαμβάνονταν σε συστοιχία (Delis et al., 2011). Το γεγονός αυτό μας δείχνει ότι οι συστοιχίες των γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών δεν αποτελούν ορθόλογα γονίδια, τα οποία σχηματίστηκαν σε κάποιο κοινό πρόγονο, αλλά ότι σχηματίζονται ανεξάρτητα και *de novo* στα γενώματα των φυτών από κάποιο άγνωστο μέχρι σήμερα μηχανισμό.

3.2 Η συνέκφραση των γονιδίων της συστοιχίας που περιλαμβάνει το γονίδιο της *LUS*

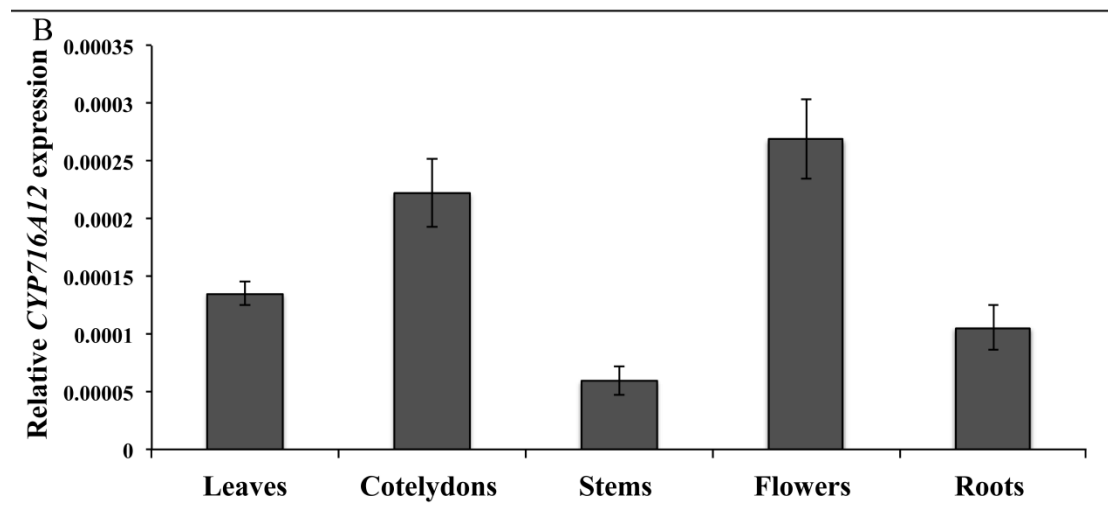
Σε όλα τα φυτά που έχουν εντοπιστεί μέχρι σήμερα συστοιχίες γονιδίων κοινό χαρακτηριστικό αποτελεί η συνέκφρασή τους (Field and Osbourn., 2008; Krokida et al., 2013; Qi et al., 2004). Επιπλέον, στο *L. japonicus* έχει δειχθεί ότι η μεθυλίωση των γειτονικών γονιδίων πιθανά να είναι εκείνη που παίζει ρόλο στη μεταγραφική συνρύθμιση των συστοιχιών (Krokida et al., 2013). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν ληφθεί και για το φυτό της βρώμης όπου η κύτταρο-εξειδικευμένη συμπύκνωση της χρωματίνης αποτελεί τον βασικότερο παράγοντα για τη μεταγραφική ρύθμιση της συστοιχίας της αβενασίνης (Wegel et al., 2009). Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε εκτός των άλλων η έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στη συστοιχία της *LUS* ώστε να διευκρινιστεί εάν και κατά πόσο τα γονίδια συνεκφράζονται και σε ποιους ιστούς. Αρχικά η έκφραση των γονιδίων μελετήθηκε στα διαφορετικά στάδια ανάπτυξης και ωρίμανσης του καρπού της τομάτας. Αυτό έγινε γιατί η οικονομική σημασία του καρπού είναι τέτοια που και η έρευνα στρέφεται σε αυτή την κατεύθυνση. Παρόλα αυτά μεταγραφήματα των συγκεκριμένων γονιδίων δεν εντοπίστηκαν στους καρπούς της τομάτας. Αντίθετα, η μέγιστη έκφραση των γονιδίων εντοπίζεται στις κοτύλες και τα άνθη. Επιπλέον τα γονίδια εκφράζονται σε μικρότερο βαθμό στα φύλλα, στους βλαστούς και τις ρίζες. Τα αποτελέσματα διαφέρουν από εκείνα της έκφρασης του γονιδίου της *LUS* σε φυτά *L. japonicus* όπου η *LUS* εκφράζονταν αποκλειστικά και μόνο σε υπόγεια τμήματα του φυτού (Delis et al., 2011). Το πρότυπο έκφρασης για όλα τα υπό μελέτη γονίδια είναι παρόμοιο και ενισχύει την άποψη ότι γονίδια που συμμετέχουν σε συστοιχίες γονιδίων συνεκφράζονται. Επομένως, είναι δυνατόν να διατυπωθεί η άποψη ότι η συνέκφραση ή μη των γειτονικών γονιδίων αποτελεί κριτήριο για τη συμμετοχή ενός ενζύμου σε συγκεκριμένο βιοσυνθετικό μονοπάτι όπως αυτό των τριτερπενοειδών.



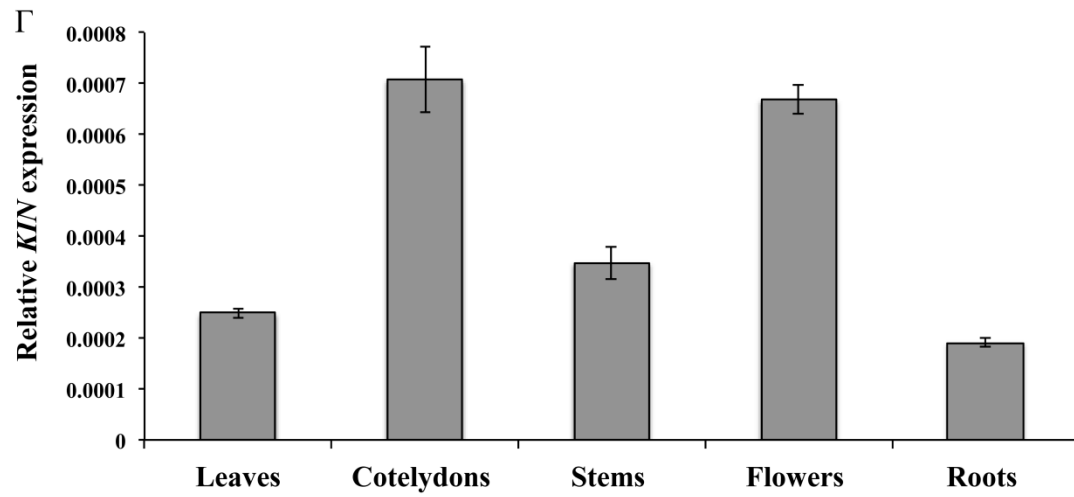
Εικόνα : Η παρουσίαση της οργάνωσης συστοιχιών των γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών σε γενετικούς τόπους των χρωμοσωμάτων της τομάτας. Η συστοιχία γονιδίων όπου μελετήθηκε και διαπιστώθηκαν όλα τα προαναφερόμενα, είναι η τελευταία, η οποία περιλαμβάνει την *LUS*, την *CYP* και την *KIN*.



Εικόνα : Σχετική έκφραση του γονιδίου της LUS σε ιστούς. Μεγαλύτερη έκφραση παρατηρείται στα λουλούδια και στις κοτυληδόνες και μικρότερη στα φύλλα, στους βλαστούς και στις ρίζες.



Εικόνα : Σχετική έκφραση της CYP σε ιστούς. Μεγαλύτερη έκφραση παρατηρείται στα λουλούδια και στις κοτυληδόνες και μικρότερη στα φύλλα, τις ρίζες και τους βλαστούς.



Εικόνα : Σχετική έκφραση της Kinases σε ιστούς. Μεγαλύτερη έκφραση παρατηρείται στις κοτυληδόνες και τα λουλούδια και μικρότερη στους βλαστούς, στα φύλλα και τις ρίζες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Στυλιανός Σ. Καραταγλής 1999
- Jean-Marie Polese 2005, Η καλλιέργεια της τομάτας
- Κ.Γ. Δημητρακάκης Κ. Γ. 1998, Λαχανοκομία
- Μπλέτσος Φώτιος Α. 2012, Πρακτική Λαχανοκομία & Παραδοσιακές Ποικιλίες
- Χα Ιμπραχίμ-Αβραάμ και Πετρόπουλος Σπύρος 2014, Γενική Λαχανοκομία & Υπαίθρια Καλλιέργεια Λαχανικών
- Abe, I., Rohmer, M. and Prestwich, G.D. 1993. Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes. *Chemical Review*. 93: 2189–2206
- McGarvey D. J. and Croteau R. 1995. Terpenoid Metabolism. *The Plant Cell*, 7:1015-1026
- Phillips D. R., Rasbery J. M., Bartel B and Matsuda S.P.T. 2006. Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. *Current Opinion in Plant Biology*. 9:305–314
- Osbourn A. E. 1996. Preformed Antimicrobial Compounds and Plant Defense against Fungal Attack. *The Plant Cell*. 8:1821-1831
- Osbourn A. E. Qi X. Townsend B. and 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. and Osbourn, A.E. 1999. Compromised disease resistance in saponin deficient plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96:12923–12928
- Price K. R. Johnson I. T. Fenwick G. R. Malinow M. R. 1987. The chemistry and biological significance of saponins in foods and feedingstuffs. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 26:27 – 135
- Baisted D.J. 1971. Sterol and triterpene synthesis in the developing and germinating pea seed. *Biochemistry Journal* 124:375–383
- Hernandez L.E. and Cooke D.T. 1996. Lipid composition of symbiosomes from pea root nodules. *Phytochemistry*. 42:341–346
- Confalonieri M., Cammareri M., Biazzi E., Pecchia P., Pedro M., Fevereiro S., Balestrazzi A., Tava A. and Conicella C. 2009. Enhanced triterpene saponin biosynthesis and root nodulation in transgenic barrel medic (*Medicago truncatula* Gaertn.) expressing a novel β -amyrin synthase (*AsOXA1*) gene. *Plant Biotechnology Journal*. 7:172–182
- Vincken JP, Heng L., de Groot A and Gruppen H. 2007. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*. 68:275– 297
- Kushiro T., Shibuya M. and Ebizuka Y. 1998a. Beta-amyrin synthase – Cloning of oxidosqualene cyclase that catalyzes the formation of the

- most popular triterpene among higher plants. *European Journal of Biochemistry* 256:238–244
- Kushiro, T., Shibuya, M. and Ebizuka, Y. 1998b. Molecular cloning of oxidosqualene cyclase cDNA from *Panax ginseng*. The isogene that encodes β -amyrin synthase. *Towards Natural Medicine Research in the 21st Century, Excerpta Medica International Congress Series* 1157:421–427
 - Morita, M., Shibuya, M., Kushiro, T., Masuda, K. and Ebizuka, Y. 2000. Molecular cloning and functional expression of triterpene synthases from pea (*Pisum sativum*) – New alpha-amyrin-producing enzyme is a multifunctional triterpene synthase. *European Journal of Biochemistry* 267: 3453–3460.
 - Iturbe-Ormaetxe I., Haralampidis K., Papadopoulou K., Osbourn A.E. 2003. Molecular cloning and characterization of triterpene synthases from *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant Molecular Biology*. 51:731-743
 - Guenther, A., Karl, T., Harley, P., Wiedinmyer, C., Palmer, P.I., and Geron, C., 2006. Estimates of global terrestrial isoprene emissions using MEGAN (model of emissions of gases and aerosols from nature). *Atmos. Chem. Phys.* 6, 3181–3210, 2006
 - Field, B., & Osbourn, A. E. (2008). Metabolic diversification--independent assembly of operon-like gene clusters in different plants. *Science*, 320(5875), 543-547.
 - Kusari, S., Lamshöft, M., Zühlke, S., Spiteller, M., 2008. An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin. *Journal of Natural Products* 71, 159-162.
 - Zwenger S., Chhandak B., 2008. Plant terpenoids: applications and future potentials. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews* Vol. 3 (1), pp. 001-007
 - Papadopoulou, K., Melton, R.E., Leggett, M., Daniels, M.J., and Osbourn, A.E., 1999
 - 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(21), 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(49), 18848-18853.