

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Μεταβολωμική ανάλυση μεταλλαγμάτων για
μεταφορείς μονοσακχαριτών του ψυχανθούς
Medicago truncatula

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Ορφανός Σταύρος

Η ανάθεση της παρούσας Μεταπτυχιακής Διατριβής έγινε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης (20^η /5-7-2011) του τομέα του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας κατά την οποία εγκρίθηκαν το θέμα και η τριμελής συμβουλευτική και εξεταστική επιτροπή της μελέτης.

ΤΑ ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ :

- Φλεμετάκης Εμμανουήλ, Επ. Καθηγητής (Επιβλέπων)
- Κατινάκης Παναγιώτης, Καθηγητής (Μέλος)
- Λάμπρου Νικόλαος, Αν. Καθηγητής (Μέλος)

Πρόλογος-Ευχαριστίες

Η παρούσα Μεταπτυχιακή Διατριβή έλαβε χώρο στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την άμεση επίβλεψη του Επίκουρου καθηγητή Φλεμετάκη Εμμανουήλ στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών του τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή Φλεμετάκη Εμμανουήλ για την αμέριστη συμπαράστασή του και την καθοδήγησή του στη διάρκεια της πειραματικής μελέτης, όπως επίσης και στη βοήθεια κατανόησης του θεωρητικού μέρους της μεταπτυχιακής διατριβής.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Ευαγγελία Δ. Κουρή, για τη συμμετοχή της, τις συμβουλές και τη βοήθειά της και την υποψήφια διδάκτορα Καλονιάτη Χρυσάνθη. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου μοριακής βιολογίας.

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1	Τα ψυχανθή και η αζωτοδέσμευση	7
1.1.1	Οργανογένεση φυματίων	9
1.1.2	Καθορισμένη και μη καθορισμένη δομή φυματίων	13
1.1.3	Η αντίληψη του παράγοντα Nod	14
1.1.4	Η κλιμάκωση της σηματοδότησης του παράγοντα Nod	16
1.1.5	Επιδερμικές και φλοιώδης αποκρίσεις κατά τα πρώτα στάδια σχηματισμού φυματίων	19
1.1.6	Η διαδικασία αυτορύθμισης των φυματίων	22
1.2	Διαδικασία Μεταφοράς Οργανικών Ουσιών	28
1.2.1	Κατηγορίες Μεταφορέων Σακχάρων	29
1.2.2	Η οικογένεια που κωδικοποιεί για μεταφορείς σουκρόζης. Γονίδια AtSUT (Sucrose Transporters)	30
1.2.3	Η οικογένεια γονιδίων που κωδικοποιούν για μεταφορείς μονοσακχαριτών (MST-like family) στο <i>Arabidopsis thaliana</i>	30
1.2.3.1	Γονίδια AtTMT (Tonoplast Monosaccharide Transporter)	31
1.2.3.2	Γονίδια AtERD6-like	32
1.2.3.3	Γονίδια AtVGT (Vacuolar Glucose Transporter)-like	32
1.2.3.4	Γονίδια AtPLT (Polyol Transporter)	32
1.2.3.5	Γονίδια AtINT (Inositol Transporter)	32
1.2.3.6	AtpGlcT (Plastidic Glucose Transporter) γονίδια/AtSGB1	33
1.2.3.7	Γονίδια AtSTP (Sugar Transporters)	33
1.2.3.7.1	Μεταφορείς Μονοσακχαριτών-Εξοζών	33
1.2.3.7.1.1	Γενικά	33
1.2.3.7.2	Γονίδια μεταφορέων μονοσακχαριτών στο <i>A. thaliana</i>	35
1.2.3.7.2.1	AtSTP1	35
1.2.3.7.2.2	AtSTP2	36
1.2.3.7.2.3	AtSTP3	36
1.2.3.7.2.4	AtSTP4	36
1.2.3.7.2.5	AtSTP6	36
1.2.3.7.2.6	AtSTP13	36
1.2.3.7.2.7	AtSTP14	37
1.3	Μεταθετά στοιχεία	37
1.3.1	Κατηγορίες	38
1.3.2	Αποτελέσματα μεταλλαξιγένεσης με το Tnt1 μετά από διάφορες μελέτες	40
1.4	Το βακτήριο <i>Sinorhizobium meliloti</i>	40
1.5	Η <i>Medicago truncatula</i> σαν φυτό-μοντέλο	42
1.5.1	Γενικά	42
2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	44
2.1	Προβλάστηση σπόρων <i>M. truncatula</i>	44

2.2	Προετοιμασία ριζόβιων για εμβολιασμό των φυτών.....	44
2.3	Μεταφορά σπόρων και ανάπτυξη φυτών.....	44
2.4	Απομόνωση γενωματικού DNA από φυτικούς οργανισμούς.	45
2.5	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	45
2.6	Μεταβολωμική	50
2.6.1	Γενικά.....	50
2.6.2	Ο συνδυασμός χρωματογραφίας φασματογραφίας.....	50
2.6.3	Αέρια χρωματογραφία	51
2.6.4	Τετραπολικός φασματογράφος μάζας	51
2.6.5	Εκχύλιση μεταβολιτών.....	52
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α.....		53
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β.....		54
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ		55
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	56
3.1	Σκοπός της μελέτης	56
3.2	Ανάπτυξη φυτών.....	56
3.3	Γονοτύπιση φυτών	56
3.4	Φαινοτυπικές παρατηρήσεις	58
3.4.1	Μακροσκοπικές	58
3.4.2	Στερεοσκοπικές παρατηρήσεις.....	61
3.5	Μεταβολωμική ανάλυση	63
4	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	69
5	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	71

Περίληψη

Τον ρόλο του μεταφορέα μονοσακχαριτών MtSTP13 σε μεταβολικό και φαινοτυπικό επίπεδο στην συμβιωτική σχέση μεταξύ του φυτού-ξενιστού *Medicago truncatula* και του αζωτοδεσμευτικού βακτηρίου *Sinorhizobium meliloti* 1021 προσπαθήσαμε να διερευνήσουμε στην παρούσα μελέτη. Για τον λόγο αυτό αναπτύξαμε φυτά των μεταλλαγμένων με το μεταθετό στοιχείο Tnt1 σειρών NF3151B και NF3948 και κάναμε φαινοτυπικές παρατηρήσεις τόσο μακροσκοπικά όσο και με την βοήθεια στερεοσκοπίου στις ρίζες καθώς και μεταβολωμική ανάλυση με GC\MS στα φυμάτια των φυτών και τα κατηγοριοποιήσαμε ανάλογα με τον γονότυπο τους για το υπό εξέταση γονίδιο. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα ομοζυγωτά για την ένθεση φυτά είχαν μειωμένη ανάπτυξη δεν παρήγαγαν σπόρους και είχαν πιο σφαιρικά φυμάτια. Ενώ, μεταξύ όλων των φυτών βρέθηκαν εννέα μεταβολίτες, σάκχαρα ή αζωτούχες ενώσεις, που παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους.

Abstract

The role of the carrier monosaccharides MtSTP13 in metabolic and phenotypic level in symbiotic relationship between the host plant *Medicago truncatula* and nitrogen fixing bacterium *Sinorhizobium meliloti* 1021 tried to elucidate the present study. For this reason we have grown plants of the mutant, with the transposable element Tnt1 of the series NF3151B and NF3948 and made phenotypic observations both macroscopically and with the aid of a stereoscope on roots and metabolomics analysis by GC\MS in nodules of plants and categorized them depending on the genotype for the gene in question. The results showed that for the insertion homozygous plants had reduced growth and produced no seed and they had more spherical nodules. While, among all plants we found nine metabolites, sugars or nitrogen compounds, which showed a statistically significant difference between them.

1 Εισαγωγή

Το άζωτο είναι αναμφισβήτητα το πιο σημαντικό θρεπτικό συστατικό που χρειάζονται τα φυτά, όντας ένα σημαντικό συστατικό όλων των αμινοξέων και των νουκλεϊνικών οξέων. Παρόλα αυτά η διαθεσιμότητα του αζώτου είναι περιορισμένη σε πολλά εδάφη και παρότι η ατμόσφαιρα αποτελείται από 78,1% αέριο άζωτο (N_2), τα φυτά δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν αυτή την μορφή αζώτου. Για να αντισταθμίσει αυτό η σύγχρονη γεωργία βασίζεται κυρίως στην χρήση βιομηχανικών αζωτούχων λιπασμάτων για να επιτύχει μέγιστη καλλιεργητική παραγωγή. Παρόλα αυτά, μια μεγάλη ποσότητα ορυκτών καυσίμων απαιτείται για την παραγωγή και μεταφορά των αζωτούχων λιπασμάτων. Όντως, η βιομηχανική παραγωγή αζωτούχων λιπασμάτων από μόνη της υπολογίζεται ότι χρησιμοποιεί το 50% των ορυκτών καυσίμων στη γεωργία. Αυτό μπορεί να είναι υπερβολικά ακριβό. Κατά τα τελευταία χρόνια η τιμή των χημικών λιπασμάτων έχει αυξηθεί δραματικά εξαιτίας του αυξανόμενου κόστους των ορυκτών καυσίμων. Επιπλέον, το διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) το οποίο απελευθερώνεται κατά την διάρκεια της καύσης των ορυκτών καυσίμων συμβάλλει στο φαινόμενο του θερμοκηπίου, όπως επίσης η αποσύνθεση των αζωτούχων λιπασμάτων, η οποία απελευθερώνει οξείδια του αζώτου (NO_x), το ίδιο 292 φορές πιο ενεργό ως αέριο του θερμοκηπίου από το διοξείδιο του άνθρακα (Crutzen et al. 2007). Επιπλέον η εφαρμογή χημικών λιπασμάτων είναι σε μεγάλο βαθμό αναποτελεσματική διαδικασία επειδή το 30-50% του εφαρμοσμένου λιπάσματος χάνεται λόγω έκπλυσης, έχοντας ως αποτέλεσμα σημαντικά περιβαλλοντικά προβλήματα όπως ο ευτροφισμός των υπόγειων υδάτων (Graham and Vance 2003). Έτσι, υπάρχει μια έντονη ανάγκη να μειώσουμε την εξάρτησή μας από τα χημικά αζωτούχα λιπάσματα και εν αντιθέσει να βελτιστοποιήσουμε εναλλακτικές εισροές αζώτου.

1.1 Τα ψυχανθή και η αζωτοδέσμευση

Η βιολογική αζωτοδέσμευση είναι μια εναλλακτική στα αζωτούχα λιπάσματα. Διεξάγεται από προκαρυώτες χρησιμοποιώντας ένα σύμπλεγμα ενζυμικό που αναφέρεται ως νιτρογενάση και έχει ως αποτέλεσμα το ατμοσφαιρικό άζωτο N_2 να ανάγεται σε μορφές αζώτου που τα φυτά μπορούν να χρησιμοποιήσουν, όπως η αμμωνία. Μια οικογένεια φυτών τα ψυχανθή, έχουν εξελίξει μια συμβιωτική σχέση με συγκεκριμένα εδαφόβια βακτήρια, που ονομάζονται ριζόβια (περιλαμβάνοντας τα γένη

Azorhizobium, Allorhizobium, Bradyrhizobium, Mesorhizobium, Rhizobium και Sinorhizobium). Μόλις η συμβίωση εγκατασταθεί, τα ριζόβια δεσμεύουν ατμοσφαιρικό άζωτο και το παρέχουν στα ψυχανθή φυτά-ξενιστές. Επειδή, το άζωτο είναι ένας περιοριστικός παράγοντας κλειδί για την ανάπτυξη των φυτών, η ικανότητα των ψυχανθών να εισέρχονται σε μία συμβίωση με αζωτοδεσμευτικά ριζόβια παρέχει σε αυτά ένα συγκριτικό πλεονέκτημα έναντι των άλλων φυτών.

Τα ψυχανθή περιλαμβάνουν σημαντικά είδη καλλιεργειών τροφής και εκτροφής, όπως η σόγια, τα μπιζέλια, το τριφύλλι, τα ρεβίθια, η μηδική και τα φασόλια. Αντιπροσωπεύουν την τρίτη μεγαλύτερη ομάδα αγγειοσπέρμων και είναι η δεύτερη μεγαλύτερη ομάδα καλλιεργειών τροφής και εκτροφής παγκόσμια. Πράγματι, καλλιεργούνται στο 12-15% της διαθέσιμης καλλιεργήσιμης γης και αντιπροσωπεύουν περισσότερο από 25% της παγκόσμιας πρωτογενούς παραγωγής με 247 εκατομμύρια τόνους όσπρια να παράγονται ετησίως (European Association for Grain Legume Research 2007). Επιπλέον, στις καλλιέργειες τροφής και εκτροφής, τα ψυχανθή όπως η σόγια και η *Pongamia pinnata* (επίσης λέγεται και *Milletia pinnata*) έχουν συγκέντρωση μεγάλο μέρος της προσοχής σαν μελλοντικά βιώσιμη πηγή βιοκαυσίμων εξαιτίας της μεγάλης περιεκτικότητας λαδιού στους σπόρους (Scott et al. 2008).

Τα ριζόβια εισβάλουν στις ρίζες συμβατών ψυχανθών φυτών, οδηγώντας στην ανάπτυξη μιας εξειδικευμένης ριζικής κατασκευής που ονομάζεται φυμάτιο. Στα φυμάτια, τα βακτήρια διαφοροποιούνται σε βακτηριοειδή και καταλύουν την αναγωγή του μοριακού αζώτου σε αμμωνία χρησιμοποιώντας το ενζυμικό σύμπλεγμα της νιτρογενάσης, μια διαδικασία που αναφέρεται σαν «συμβιωτική αζωτοδέσμευση». Η συμβίωση ψυχανθών-ριζοβίων είναι η πιο σημαντική σχέση στην βιολογική αζωτοδέσμευση παράγοντας περίπου 200 εκατομμύρια τόνους αζώτου ετησίως (Graham and Vance 2003; Peoples et al. 2009). Μία συνηθισμένη καλλιεργητική πρακτική είναι η εναλλαγή καλλιεργητικών ειδών με το ένα να είναι ένα ψυχανθές όπως το τριφύλλι ή η μηδική. Έτσι, αυτά τα είδη αναφέρονται συχνά σαν «χλωρή λίπανση». Συχνά, ολόκληρο το φυτό οργώνεται μέσα στο χωράφι, βελτιώνοντας έτσι δραματικά το οργανικό περιεχόμενο και τον όγκο του εδάφους.

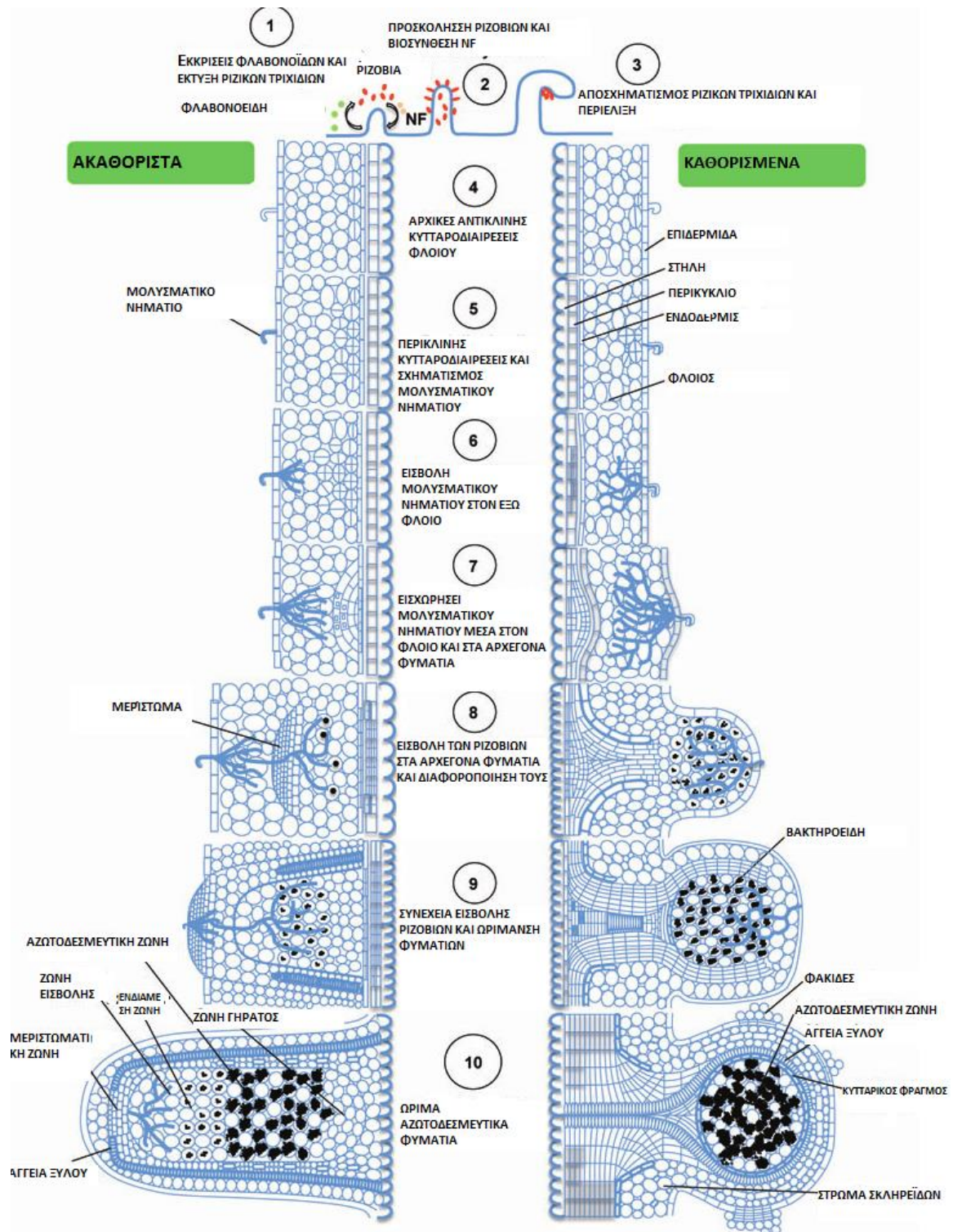
1.1.1 Οργανογένεση φυματίων

Η δημιουργία φυματίων ξεκινά με την έκκριση από το φυτό ξενιστή φαινολικών φλαβονοειδών συστατικών στην ριζόσφαιρα (Redmond et al. 1986). Το εξίδρωμα μερικώς καθορίζει την εξειδίκευση της συμβιωτικής σχέσης επειδή κάθε ριζόβιο είδος αποκρίνεται σε συγκεκριμένα φλαβονοειδή. Τα περισσότερα ριζόβια είδη αλληλεπιδρούν μόνο με συγκεκριμένα ψυχανθή, αλλά κάποια έχει δείχτεί ότι έχουν ένα ευρύ φάσμα ξενιστών (Puerpke and Broughton 1999).

Η αντίληψη των φλαβονοειδών ελκύει τα βακτήρια στην ρίζα και ενεργοποιεί την έκφραση των γονιδίων *nod*, οδηγώντας στην παραγωγή εκκριμάτων στέλεχο-εξειδικευμένων λιπο-χιτο-ολιγοσακχαριτών, γνωστά ως *nod* παράγοντες (NF) (Caetano-Anollés and Gresshoff 1991; Dénarié et al. 1996; Spraink 2000). Οι εξαιρέσεις είναι κάποια πρόσφατα: Αναγνωρισμένα φωτοσυνθετικά στελέχη *Bradyrhizobium* που μπορούν να επάγουν ανάπτυξη φυματίων παρότι δεν έχουν τα κρίσιμα γονίδια *nodABC* που απαιτούνται για την βιοσύνθεση του NF (Giraud et al. 2007). Οι NF έχουν μια ραχοκοκαλιά από μέρη της *N*-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνης με μία ομάδα λιπαρού ακυλίου ενωμένο με το μη-αναγωγικό σάκχαρο. Ένας σημαντικά καθοριστικός παράγοντας στην εξειδίκευση της συμβίωσης με τον ξενιστή αποδίδεται στα διαφορετικά υποκατάστατα του NF που ενώνονται με την ραχοκοκαλιά του ολιγοσακχαρίτη (Lerougé et al. 1990; Dénarié et al. 1996).

Η παρουσία συμβατών ριζόβιων ειδών και των αντίστοιχων NF είναι γενικά αρκετό για να πυροδοτήσει την ανάπτυξη φυματίων. Η άκρη των αναδυόμενων ριζικών τριχιδίων είναι ο πρωταρχικός στόχος για μόλυνση με ριζόβια, πιθανότατα εξαιτίας του λεπτότερου και λιγότερου διακλαδισμένου κυτταρικού τους τοιχώματος επιτρέπουν την αναδιευθέτηση των βαθύτερων μικροσωλινίσκων, αλλάζοντας την διακίνηση των κυστιδίων στην υπό ανάπτυξη άκρη και έτσι επιτρέποντας καλύτερη επακόλουθη διείσδυση από τα ριζόβια. Επικόλληση των ριζοβίων στα ριζικά τριχίδια διεγείρει την παραμόρφωση αυτών μέσα σε 6-8 ώρες (Yao and Vincent 1969; Bhuvaneshwari et al. 1981; Bhuvaneshwari and Solheim 1985) και επίσης προωθεί την διαίρεση των κυττάρων του φλοιού (Calvert et al. 1984; Mathews et al. 1989).

Τα ριζόβια έχουν δύο κυρίως τρόπους να εισέρχονται στην ρίζα του φυτού: μέσω των ριζικών τριχιδίων ή μέσα από ρωγμές στον επιδερμικό ιστό της ρίζας (reviewed in Oldroyd and Downie 2008). Η μόλυνση μέσω των ριζικών τριχιδίων είναι η πιο συνηθισμένη και περιλαμβάνει τον σχηματισμό μολυσματικών νηματίων, τα οποία είναι σωληνοειδής κατασκευές που συνθέτονται από φυτικά κυτταρικά συστατικά τοιχώματος τα οποία λειτουργούν σαν πέρασμα για τα βακτήρια μέσα στα κύτταρα του φλοιού του φυτού (reviewed by Gage 2004). Τα ριζόβια εισέρχονται μέσα από τις παραμορφωμένες άκρες των ριζικών τριχιδίων, τα οποία ενθυλακώνει ένα μικρό μέρος των διαιρούμενων βακτηρίων (Callaham and Torrey 1981; Turgeon and Bauer 1985). Η εγκλωβισμένη μικροαποικία πιθανώς έχει μια εμπλουτισμένη συγκέντρωση NF καθώς επίσης και αποικοδομητικά ένζυμα κυτταρικών τοιχωμάτων. Η διείσδυση του κυτταρικού τοιχώματος του ξενιστή, αλλά όχι της κυτταρικής μεμβράνης, ακολουθείται από επανασύνθεση και πέψη. Αυτός ο επαναλαμβανόμενος κύκλος σε συνδυασμό με ιξώδες εξωκυτταρική μήτρα που ενσωματώνεται στην μικροαποικία και η συνεχόμενη βακτηριακή αύξηση παράγουν μια πίεση προς τα «εμπρός» που χρειάζεται για να «σπρώξει» έναντι της πίεσης της σπαργής των ριζικών τριχιδίων. Η δυναμική αυτής της διαδικασίας έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό του μολυσματικού νηματίου που προέρχεται από τα φυτικά κυτταρικά τοιχώματα το οποίο γεμίζει με πολλαπλασιαζόμενα βακτήρια που ενσωματώνονται στην διαρκώς σκληρουμένη εξωκυτταρική μήτρα (Gage 2004).



Εικόνα 1 Αναπτυξιακά στάδια καθορισμένων και ακαθόριστων φυματίων

Στην σόγια η μόλυνση των ριζικών τριχιδίων λαμβάνει χώρα 12 ώρες μετά την επαφή με τα ριζόβια (Turgeon and Bauer 1982, 1985).

Είναι πιθανόν ότι τα εισερχόμενα ριζόβια, ακόμα ικανά για την παραγωγή NF όπως αποδεικνύεται με σύντηξη έκφρασης των NodC::LacZ, διεγείρει η ακόμα αυξανόμενη παραγωγή NF την μιτωτική ενεργοποίηση των κυτταρών του φλοιού της ρίζας. Αυτό οδηγεί επακόλουθα στην ανάπτυξη του αρχικού φυματίου. Η ακτινοειδής θέση των κυτταροδιαίρεσεων, έτσι και του φυματίου, καθορίζεται από τη χωρική διαβάθμιση ορμονών όπως το αιθυλένιο (Heidstra et al. 1997; Lohar et al. 2009). Σύμφωνα με αυτά, τα περισσότερα φυμάτια αναπτύσσονται κοντά στα αγγεία του ξύλου κύτταρα ακτινοειδώς, μακριά από τον ηθμό. Το μολυσματικό νηματίο μεγαλώνει διερχόμενο μέσα από τα ριζικά τριχίδια καταλήγοντας στον φλοιό της ρίζας και νέο επαγόμενα διαιρούμενα κύτταρα. Τα βακτήρια απελευθερώνονται από την άκρη του μολυσματικού νηματίου μέσα σε μία «μολυσματική σταγόνα» κυτταροπλάσματος στα κύτταρα του ξενιστή. Μέσα από μια διαδικασία που μοιάζει με ενδοκύτωση, τα βακτήρια περιβάλλονται από μία φυτικής προέλευσης μεμβράνη, που ονομάζεται περιβακτηροειδή μεμβράνη, η οποία σχηματίζει αυτό που είναι γνωστό σαν συμβίωση (Udvardi and Day 1997).

Τα περιβαλλόμενα με μεμβράνη βακτήρια συνεχίζουν να αναπτύσσονται μέσα στα κύτταρα ξενιστές πριν διαφοροποιηθούν σε βακτηριοειδή και αρχίσουν να αζωτοδεσμεύουν. Το ατμοσφαιρικό άζωτο N_2 μετατρέπεται σε αμμωνία από τα βακτηριοειδή και στην συνέχεια αφομοιώνεται από τα φυτά αφού ακολουθήσει η μετατροπή του σε γλουταμίνη από την γλουταμινική συνθάση. Η γλουταμίνη περαιτέρω μετατρέπεται σε γλουταμινικό από την συνθάση του γλουταμινικού. Η γρήγορη μετατροπή της αμμωνίας δημιουργεί μια διαφορετική διαβάθμιση η οποία πιστεύεται ότι οδηγεί στην έξοδο του από το βακτηριοειδές (Udvardi and Day 1997). Ο αγγειακός ιστός όπως και ο κεντρικός ιστός συνθέτονται από κύτταρα προσβεβλημένα και μη προσβεβλημένα τα οποία περιέχονται στον φλοιό (Newcomb et al. 1979; Calvert et al. 1984). Μεταξύ του εσωτερικού του φυματίου και των γειτονικών φυτικών κυττάρων το φυτό και τα βακτηριοειδή ανταλλάσσουν σημαντικά θρεπτικά συστατικά. Παθητική μεταφορά που οδηγείται από το δυναμικό της μεμβράνης που σχηματίζεται κατά μήκος της περιβακτηροειδής μεμβράνης διευκολύνει την πρόσληψη θρεπτικών μέσα στο συμβίωση (Udvardi and Day 1997). Αυτοί οι μηχανισμοί επιτρέπουν την αφομοίωση φωτοσυνθετικών προϊόντων (όπως δικαρβοξυλικά οξέα για παράδειγμα

μηλικό) μέσα στο φυμάτιο για τα βακτηροειδή, και την εξαγωγή ποικίλων συστατικών, περιλαμβανομένου του δεσμευμένου αζώτου (παράδειγμα η γλουταμίνη) μέσα στην ρίζα.

1.1.2 Καθορισμένη και μη καθορισμένη δομή φυματίων

Δύο κύριες μορφολογικές κατηγορίες φυματίων υπάρχουν στα ψυχανθή: «καθορισμένα» και «μη καθορισμένα». Το είδος του φυματίου καθορίζεται από το φυτό ξενιστή. Διαφορές μεταξύ των δύο ειδών φυματίων είναι το μέρος της πρώτης εσωτερικής κυτταρικής διαίρεσης, η διατήρηση μιας μερισματικής περιοχής και η μορφή των ώριμων φυματίων (Newcomb et al. 1979; Gresshoff and Delves 1986; Rolf and Gresshoff 1988). Για τα ακαθόριστα φυμάτια η πρώτη κυτταρική διαίρεση συμβαίνει αντικλινικώς στο εσωτερικό του φλοιού, ακολουθούμενο από περικλινικές διαιρέσεις στην ενδοδερμίδα και στο περικύκλιο. Συγκεντρωτικά αυτές οι διαιρέσεις οδηγούν στον σχηματισμό του αρχέγονου φυματίου. Τα μη καθορισμένα φυμάτια έχουν ένα πιο επίμονο μερίστωμα, το οποίο οδηγεί σε φυμάτια κυλινδρικού σχήματος, όπως φαίνεται και στα φυμάτια της μηδικής (*Medicago sativa*) του τριφυλλιού (*Trifolium repens*), του μπιζελιού (*Pisum sativum*) και της *Medicago truncatula* (Bond 1948; Libbenga and Harkes 1973; Newcomb 1976; Newcomb et al. 1979). Το κεντρικό μερίστωμα συνεχίζει να παράγει νέα κύτταρα που μολύνονται με βακτήρια. Στην ωριμότητα, τα μη καθορισμένα φυμάτια περιέχουν έναν ετερογενή πληθυσμό από αζωτοδεσμευτικά εξαιτίας της συνεχούς κυτταρικής διαίρεσης, δημιουργώντας μια κατάσταση διαβαθμισμένης ανάπτυξης επειδή το φυμάτιο συνεχίζει να επιμηκύνεται. Αυτά τα φυμάτια έχουν επίσης ένα διαφορετικό λιγότερο διακλαδισμένο αγγειακό σύστημα από ότι τα καθορισμένα φυμάτια.

Τα καθορισμένα φυμάτια, από την άλλη, είναι συνήθως σφαιρικά, τους λείπει ένα συνεχές μερίστωμα, και δεν εμφανίζουν μια προφανής αναπτυξιακή διαβάθμιση (Newcomb et al. 1979; Turgeon and Bauer 1982; Calvert et al. 1984; Mathews et al. 1989). Το πρώτο γεγονός κυτταροδιαίρεσης ενός καθορισμένου φυματίου συμβαίνει υποδερμικά του εξωτερικού φλοιού. Εξαιρέσεις υπάρχουν, όπως τα φυμάτια του *Lotus japonicus*, τα οποία δεν εμφανίζουν αρχική υποδερμική κυτταροδιαίρεση. (Wopereiset al. 2000). Στην ωρίμανση τα καθορισμένα φυμάτια περιέχουν ένα σχετικά ομοιογενή πληθυσμό από αζωτοδεσμευτικά βακτηροειδή, επειδή η διαφοροποίηση των

μολυσμένων κυττάρων συμβαίνει συγχρονισμένα, ακολουθούμενη από γήρανση. Αυτά τα φυμάτια έχουν έναν κύκλο ζωής μερικών εβδομάδων. Όταν τα παλιά φυμάτια γερνάνε, νέα φυμάτια σχηματίζονται σε πρόσφατα αναπτυγμένα τμήματα της ρίζας (Rolfe and Gresshoff 1988).

Θα ήταν ενδιαφέρον να αναγνωρισθεί ο ρόλος του γονιδίου *cochleata* στα λιγότερο μεριστωματικά καθορισμένα φυμάτια, στις ιδιότητες του μεριστώματος των ακαθόριστων φυματίων, προκαλώντας έναν ομοιοτικό φαινότυπο και ριζο-φυματικές υβριδικές κατασκευές στο μπιζέλι (Ferguson and Reid 2005). Τα καθορισμένα επίσης φυμάτια σχηματίζουν φακίδες οι οποίες είναι κατασκευές που επιτρέπουν την ευκολότερη ανταλλαγή αερίων. Τα ψυχανθή που σχηματίζουν καθορισμένα φυμάτια είναι κυρίως τροπικά και υποτροπικά, περιλαμβάνοντας την σόγια (*Glycine max*), την *Pongamia* (*Pongamia pinnata*) και το φασόλι (*Phaseolus vulgaris*), αλλά επίσης και άλλα πιο εύκρατα είδη όπως το *L. japonicus*.

1.1.3 Η αντίληψη του παράγοντα Nod

Μια προσέγγιση κυρίως γενετική έχει χρησιμοποιηθεί για να αποκαλυφθεί ο μηχανισμός που υποκρύπτεται για την αντίληψη του παράγοντα Nod. Το παρών μοντέλο προβλέπει δύο κινάσες που μοιάζουν με υποδοχείς (receptor-like kinase, RLK) που εντοπίζονται στα επιδερμικά κύτταρα τα οποία εμπλέκονται στην πρόσδεση του παράγοντα Nod: στο *L. japonicus* τα LjNFR1 και LjNFR5, στο *P. sativum* τα PsSYM2A και PsSYM10, στην *M. truncatula* MtLYK3/MtLYK4 και MtNFP, και στην σόγια GmNFR1α/β και GmNFR5α/β (Limpens et al. 2003; Madsen et al. 2003; Radutoiu et al. 2003; Arrighi et al. 2006; Indrasumunar 2007; Indrasumunar et al. 2009). Αυτοί οι υποδοχείς του NF αποτελούνται από έναν ενδοκυτταρικό τομέα κινάσης, έναν διαμεμβρανικό τομέα και ένα εξωκυτταρικό τμήμα που έχει LysM τομείς. Οι τομείς LysM είναι συνήθως στα βακτηριακά κύτταρα στα ένζυμα αποδόμησης κυτταρικών τοιχωμάτων και πιστεύεται ότι προσδένονται σε πεπτιδογλυκάνες οι οποίες μοιάζουν με τον παράγοντα Nod, αφού περιέχουν κατάλοιπα ακετυλογλυκοζαμίνης (Steen et al. 2003). Παρότι, πράγματι υπάρχουν στους ευκαριώτες δεν είναι πολύ συνηθισμένη τέτοιοι τομείς. Η παρουσία όμως αυτών των τομέων σε συνδυασμό με διαμεμβρανικούς και κινάσης τομείς υπάρχουν αποκλειστικά στα φυτά (Gough 2003). Έχει ενδιαφέρον ότι τα LjNFR1/PsSYM2A/MtLYK3/MtLYK4/GmNFR1α/β έχουν έναν τυπικό σερίνης/θρεονίνης

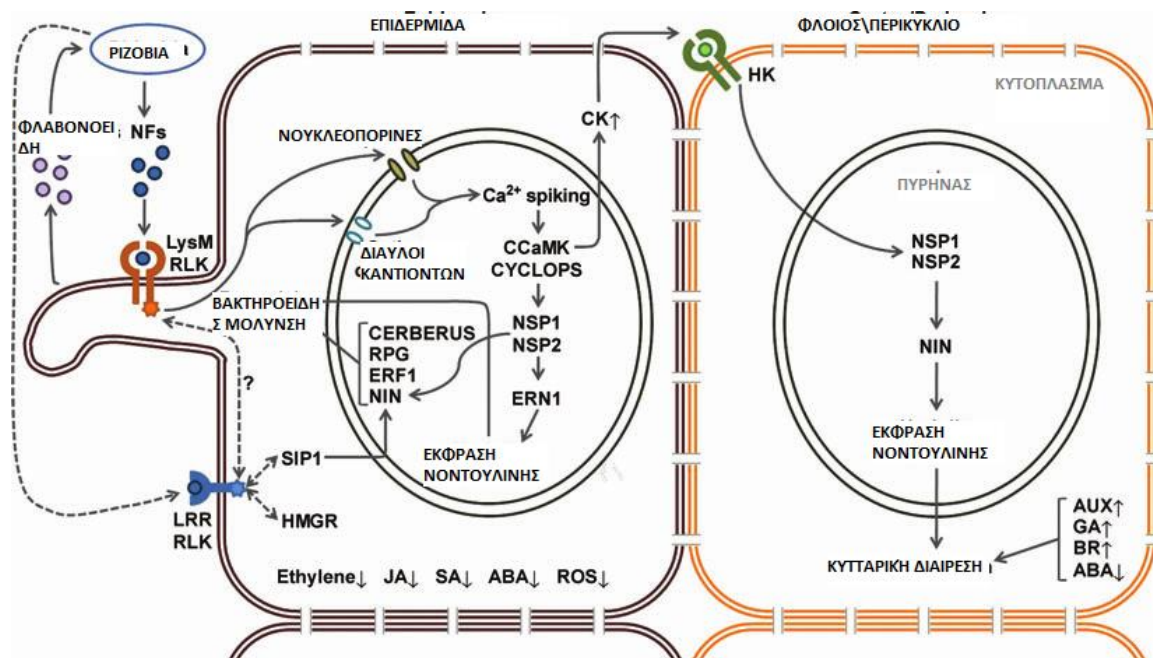
τομέα κινάσης, ενώ τα LjNFR5/PsSYM10/MtNFP/GmNFR5α/β δεν έχουν τον βρόγχο ενεργοποίησης όπου η θέση φωσφορυλίωσης βρίσκεται στους περισσότερες ευκαρυωτικές πρωτεΐνες κινάσης (Huse and Kuriyan 2002). Η απουσία βρόγχου ενεργοποίησης σε έναν από τους τομείς κινάσης υποδηλώνοντας ότι οι δύο LysM RLK ίσως ενώνονται σε έναν ετεροδιμερή-υποδοχέα, με τον ενεργό τομέα κινάσης να λειτουργεί σε μια καθοδική μεταγωγή σήματος (Limpens et al. 2003; Madsen et al. 2003; Radutoiu et al. 2003). Παρόλα αυτά οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο RLK και τα υπόλοιπα στοιχεία μεταγωγής σήματος πρέπει να διευκρινιστούν.

Ένας άλλος RLK που περιλαμβάνεται στην σηματοδότηση έχει περιοχές πλούσιες σε λευκίνη (leukine rich repeat, LRR) και τομείς κινάσης σερίνης/θρεονίνης και κωδικοποιούνται από το φυτό *M. sativa* NORK/ PsSYM19/ LjSYMRK/ MtDMI2/ GmNORK (Endre et al. 2002; Stracke et al. 2002; Mitra et al. 2004; Capoeanetal. 2005; Indrasumunar 2007).

Εντοπίζεται στην μεμβράνη του πλάσματος και στην μεμβράνη του μολυσματικού νηματίου (Limpens et al. 2005), και φαίνεται να λειτουργεί και στην αντίληψη του σήματος από τον παράγοντα Nod και στην καθοδική μεταγωγή του σήματος επειδή χρειάζεται για τις πρώιμα ανιχνεύσιμες αποκρίσεις των ριζικών τριχιδίων (Endre et al. 2002; Stracke et al. 2002). Η ενεργοποίηση των LysM RLK φαίνεται να είναι μια προϋπόθεση για την ενεργοποίηση των LRR RLK. Όντως και οι δύο υποδοχείς ίσως περιλαμβάνονται στην αντίληψη μικροβιακών σημάτων, αλλά δεν είναι ακόμα ξεκάθαρο πώς οι LRR RLK ενσωματώνονται στην μετάδοση βακτηριακών και μυκητιακών σημάτων. Αν αυτό συμβαίνει άμεσα μέσα από την δημιουργία ετεροσυμπλεγμάτων, ή έμμεσα μέσω δευτερογενών σημάτων, μένει να αποδειχθεί. Βασισμένοι στην καθοδική απόκριση, οι LysM RLKs μπορεί να έχουν έναν συγκεκριμένο ρόλο στη μετάδοση του σήματος ενώ οι LRR RLK ίσως λειτουργούν στα αρχικά γεγονότα της μόλυνσης.

1.1.4 Η κλιμάκωση της σηματοδότησης του παράγοντα Nod

Η αντίληψη του παράγοντα Nod ξεκινά μία καθοδική μετάδοση σήματος. Αυτή περιλαμβάνει ιοντικού διάυλους καλίου που εντοπίζονται στην πυρηνική μεμβράνη και κωδικοποιούνται από τα γονίδια *MtDMI1*, *LjCASTOR* και *LjPOLLUX* (Ané et al. 2004; Imaizumi-Anraku et al. 2005; Riely et al. 2007), δύο νουκλεοπορίνες που κωδικοποιούνται από *LjNur133* και *LjNur85* (Kanamori et al. 2006; Saito et al. 2007), και μία ασβέστιο καλμοδουλίνο-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση (CCaMK) που κωδικοποιείται από τα γονίδια *MtDMI3/PsSYM9* (Levy et al. 2004; Mitra et al. 2004).



Εικόνα 2 Μοριακά γεγονότα που σχετίζονται με τα πρώιμα στάδια σχηματισμού φυματίων.

Οι ρίζες των ψυχανθών ξεκινούν τον σχηματισμό φυματίων εκκρίνοντας φλαβονοειδή στην ριζόσφαιρα. Αυτό ελκύει ριζόβια συμβατά με την ρίζα και διεγείρει αυτά στο να παράγουν τον παράγοντα Nod (NF). Ο NF γίνεται αντιληπτός από την επιδερμίδα μέσω μιας κινάσης όμοια με με υποδοχέα (leucine-rich repeat receptor-like kinase, LRR RLK) η οποία πυροδοτεί έναν αριθμό επακόλουθων γεγονότων που περιλαμβάνονται στην βακτηριακή μόλυνση. Συνακόλουθα ο NF γίνεται αντιληπτός από δύο LysM RLK οι οποίοι οδηγούν την σηματοδότηση του NF σε κυτταροδιαιρέσεις του φλοιού και σε γεγονότα βακτηριακής μόλυνσης. Ένα μεταφερόμενο σήμα ίσως η κυτοκίνη μεταφέρει το σήμα από την επιδερμίδα στον φλοιό για να ξεκινήσουν οι κυτταροδιαιρέσεις και ο σχηματισμός των αρχέγονων φυματίων.

Μετά από ένα λεπτό από την εφαρμογή του παράγοντα Nod παρατηρούνται γρήγορες εισροές και εκροές ιόντων ασβεστίου Ca^{2+} ακολουθούμενη από εκπόλωση και εκροή ιόντων Cl^- και K^+ που συμβαίνουν στην ρίζα (Felle et al. 1999). Ταλάντωση της συγκέντρωσης του κυτταροπλασματικού Ca^{2+} , ακολούθως επάγεται μερικά λεπτά στα ίδια κύτταρα μετά τις ροές Ca^{2+} (περίπου δέκα λεπτά μετά την εφαρμογή του παράγοντα Nod) (Wais et al. 2000; Walker et al. 2000). Οι πρωτεϊνικοί ιοντικοί διάλυλοι και οι νουκλεοπορίνες χρειάζονται για τις «ταλαντώσεις» ασβεστίου και δομικές μελέτες υποδεικνύουν ότι η CCaMK ίσως ενεργεί στην αντίληψη του σήματος της ταλάντωσης των ιόντων του ασβεστίου (reviewed in Oldroyd and Downie 2004). Παρόμοιες διακυμάνσεις έχουν και πρωτίτερα δειχθεί να υπάρχουν για την μεταγωγή σημάτων ως ακόλουθο μιας πρόσδεσης (Dolmetsch et al. 1998; Li et al. 1998; Allen et al. 2001), υποδηλώνοντας ένα παρόμοιο γεγονός μπορεί να ακολουθεί την «αντίληψη» του παράγοντα Nod. Η αντίληψη του παράγοντα Nod επίσης οδηγεί στην παραμόρφωση των ριζικών τριχιδίων και σε αλλαγές στον κυτταροσκελετό ακτίνης που απαιτείται για την συστροφή των ριζικών τριχιδίων και την εισβολή των ριζοβίων (Cardenas et al. 1998; de Ruijter et al. 1998).

Μεταλλαγές στα γονίδια που κωδικοποιούν για τον παράγοντα Nod τα LRR και RLK, τους ιοντικούς διαύλους ή της νουκλεοπορίνες καταργούν την ταλάντωση ασβεστίου και ακολούθως την ανάπτυξη φυματίων, παρόλα αυτά οι ροές Ca^{2+} και παραμόρφωση των ριζικών τριχιδίων παραμένει (Ané et al. 2004; Imaizumi-Anraku et al. 2005; Kanamori et al. 2006; Miwa et al. 2006; Saito et al. 2007). Εν αντιθέσει μεταλλάξεις στην CCaMK δεν επηρεάζουν τις ροές ούτε και ταλάντωση των ιόντων Ca^{2+} , παρόλα αυτά η ανάπτυξη φυματίων μπλοκάρεται (Lévy et al. 2004; Miwa et al. 2006). Αυτό υποδεικνύει ότι οι LRR RLK, τα ιοντικά κανάλια και οι νουκλεοπορίνες δρουν μετά από την αντίληψη του παράγοντα Nod αλλά πριν από την ταλάντωση του ασβεστίου, ενώ η CCaMK δρα μετά την ταλάντωση του ασβεστίου. Πολλοί μεταγραφικοί παράγοντες ενεργοποιούνται μετά την CCaMK περιλαμβανομένου του μονοπατιού σηματοδότησης 1 : NSP1, NSP2, καταστολέα Ets2(ERF) και της πρωτεΐνης έναρξης των φυματίων (nodule inception, NIN). Μεταλλαγές σταγονίδια *nsp1* και *nsp2* έδειξαν κανονικές αποκρίσεις ασβεστίου όταν έγιναν χειρισμοί με παράγοντες Nod, παρόλα αυτά ήταν ανίκανοι να ξεκινήσουν μεταγραφές των πρώιμων γονιδίων για

φυμάτια(early nodulation genes,*ENOD*) στην επιδερμίδα (Catoira et al. 2000; Oldroyd and Long 2003). Στα επιδερμικά κύτταρα οι πρωτεΐνες NSP1 και NSP2 πιστεύεται ότι εντοπίζονται κοντά με την CCaMK στον πυρήνα (Smit et al. 2005; Oldroyd and Downie 2008). Αυτό υποδηλώνει ότι τα *NSP1* και *NSP2* πιθανώς ενεργοποιούνται μετά την ταλάντωση ασβεστίου πιθανώς αμέσως μετά από την CCaMK. Επιπλέον οι πρωτεΐνες ERN1 και NSP1 έχει δειχθεί ότι προσδένονται στον προαγωγέα *ENOD11* έναν καλά χαρακτηρισμένο *ENOD* που εκφράζεται στα επιδερμικά κύτταρα, όπου η πρόσδεση του NSP1 στον ENOD χρειάζεται την NSP2 (Andriankaja et al. 2007; Hirsch et al. 2009). Επιπλέον μελέτες έχουν δείξει ότι η πρόσδεση του NSP1 στον προαγωγέα των *ERN1* και *NIN* είναι σημαντικό για την έκφρασή τους. Αυτό υποδηλώνει ότι τα *NSP1*, *NSP2*, *ERN1* και *NIN* όλα μαζί λειτουργούν σε συνεργασία για να ρυθμίσουν την έκφραση των *ENODs* στην επιδερμίδα.

Γενετικές μελέτες και αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης με πρωτεΐνη αναγνώρισαν επίσης πρωτεϊνικά στοιχεία που αλληλεπιδρούν με την CCaMK και χρειάζονται για την σηματοδότηση του παράγοντα Nod και την ανάπτυξη των φυματίων, ονομάζονται αλληλεπιδρώντες πρωτεΐνες των DMI3 (MtIPD3) και LjCYCLOPS (Messinese et al. 2007; Yano et al. 2008). Αυτές οι πρωτεΐνες προβλέφθηκε να αλληλεπιδρούν μέσω ενός C-τελικού υπερελισσόμενης-σπείρας τομέα και προτάθηκε ότι μεταγουν το σήμα της ταλάντωσης ασβεστίου και ρυθμίζουν την έκφραση της NSP1 (Smit et al. 2005).

Λειτουργώντας παράλληλα με την σηματοδότηση του παράγοντα Nod υπάρχουν στοιχεία σηματοδότησης που χρειάζονται για την βακτηριακή μόλυνση και πυροδοτούνται από την ενεργοποίηση των LRR RLK. Ένα τέτοιο στοιχείο είναι η ρεδουκτάση του 3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρικό συνένζυμο A στο *M. truncatula* (MtHMGR), το οποίο εμπλέκεται στην βιοσύνθεση των παράγωγων ισοπρενοϊδών φυτορμονών όπως οι κυτοκινίνες και τα brassinosteroids (Kevei et al. 2007). Παρόλα, αυτά ο ακριβής ρόλος των HMGR στην ανάπτυξη των φυματίων μένει να προσδιορισθεί. Οι πρωτεΐνες LjSIP1 (SymRK-interacting protein of *L. Japonicus*) και MtRPG (*Rhizobium*-directed polar growth of *M. truncatula*) έχει επίσης δειχθεί ότι αλληλεπιδρούν με τον LRR RLK. Ο LjSIP1 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που μπορεί να προσδένεται στον προαγωγέα του NIN για να ρυθμίζει τα γεγονότα της βακτηριακής μόλυνσης (Zhu et al. 2008). Η MtRPG είναι μια υπερελλικομένη

σπειροειδής πρωτεΐνη που έχει δειχθεί ότι εντοπίζεται στον πυρήνα και επίσης έχει αναφερθεί ότι χρειάζεται για την βακτηριακή μόλυνση έχοντας έναν ρόλο στην καθοδήγηση της πολικής ανάπτυξης της άκρης των μολυσματικών νηματίων (Arrighi et al. 2009). Παρόλα αυτά, όπως και για το MtHMGR έτσι και για τα LjSIP1 και MtRPG έχουμε ακόμα πολλά να μάθουμε για την λειτουργία τους μέσα στο φυτό.

Άλλοι παράγοντες που έχουν έναν ρόλο στην ανάπτυξη φυματίων περιλαμβάνουν τους LjCERBERUS, LjERF1(ethylene response factor 1) και MtEFD(ethylene response factor required for nodule differentiation) (Asamizu et al. 2008; Vernie et al. 2008; Yano et al. 2009). Οι LjERF1 και MtEFD είναι μεταγραφικοί παράγοντες, ενώ ο LjCERBERUS είναι μια πρωτεΐνη U-box. Όλες εντοπίζονται στον πυρήνα και έχουν έναν ρόλο στα γεγονότα της βακτηριακής μόλυνσης. Παρόλα αυτά, όπως και στα MtHMGR, LjSIP1 και MtRPG ο ακριβής τους ρόλος στην οργανογένεση των φυματίων μένει ακόμα να εξακριβωθεί πλήρως.

1.1.5 Επιδερμικές και φλοιώδης αποκρίσεις κατά τα πρώτα στάδια σχηματισμού φυματίων

Πολλαπλάειδη και στρώματα κυττάρων πρέπει να συγχρονίσουν την ανάπτυξη τους για να επιτευχθεί η οργανογένεση των φυματίων. Όντως, ακολουθώντας την «αντίληψη» του παράγοντα Nod στην επιδερμίδα γρήγορη απόκριση ανιχνεύεται στο εσωτερικό της ρίζας. Κυτταροσκελετικές ανακατατάξεις έχουν αναφερθεί στα κύτταρα του περικυκλίου στην *M. truncatula* μέσα στις επόμενες 16 ώρες με επώαση με ριζόβια (Timmers et al. 1999) και έκφραση του ENOD40 στα κύτταρα του φλοιού έχει αναφερθεί μέσα στις επόμενες 24 ώρες στο λευκό τριφύλλι μετά από επώαση με ριζόβια βακτήρια (Mathesius et al. 2000). Για να επιτευχθεί τόσο γρήγορη απόκριση στο εσωτερικό της ρίζας μετά από έκθεση στο εξωτερικό της ρίζας στον παράγοντα Nod των ριζοβίων κάποιο είδος σηματοδότησης επικοινωνίας φαίνεται επιτακτικό.

Ένας υποδοχέας κυτοκίνης λειτουργεί στον φλοιό της ρίζας και είναι αναγκαίος για τα γεγονότα των κυτταρικών διαιρέσεων. Αυτός ο υποδοχέας έχει έναν τομέα κινάσης ιστιδίνης και κωδικοποιείται από τα MtCRE1/LjLHK1 (Gonzalez-Rizzo et al. 2006; Tirichine et al. 2007). Επανάκτηση της λειτουργικότητας του LjLHK1 μετά από μετάλλαξη έχει ως αποτέλεσμα την άμεση φαινοτύπου δημιουργίας φυματίων εξαιτίας των ελεγχόμενων κυτταρικών διαιρέσεων στον φλοιό της ρίζας. Επιπλέον μελέτες έχουν

δείξει ότι αρνητική ρύθμιση, ή έλλειψη λειτουργικότητας αυτού του υποδοχέα κυτοκινίνης έχει ως αποτέλεσμα την δραματική μείωση του αριθμού των φυματίων που προκαλείται από την ανικανότητα του φυτού να σχηματίσει «πρωτογενή» φυμάτια (Gonzalez-Rizzo et al. 2006; Murray et al. 2007). Η ριζοβιακή μόλυνση ακόμα λαμβάνει χώρα αλλά τα μολυσματικά νημάτια χάνουν την κατευθυντικότητα και εξαπλώνονται πλαγίως και όχι προς το κέντρο του φλοιού (Murray et al. 2007). Αυτό δηλώνει ότι τα γεγονότα της αρχική βακτηριακής μόλυνσης δεν χρειάζονται τον σχηματισμό «πρωτογενών» φυματίων ή του υποδοχέα της κυτοκινίνης, αλλά ότι και δύο ακολούθως χρειάζονται για να καθοδηγήσουν την ανάπτυξη των μολυσματικών νημάτων.

Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα οι μεταλλάξεις στις οποίες χάνεται η λειτουργικότητα του *Mtdmi3* εμφανίζει έναν φαινότυπο μη δημιουργίας φυματίων επειδή χρειάζεται η δράση της CCaMK στην επιδερμίδα. Παρόλα αυτά, όπως και με τον υποδοχέα της κινάσης μεταλλάξης με τις οποίες επανακτάται η λειτουργικότητα της CCaMK έχουν ως αποτέλεσμα την άμεση δημιουργία φυματίων εξαιτίας των ελεγχόμενων κυτταροδιαρρέσεων που συμβαίνουν στον φλοιό (Gleason et al. 2006; Tirichine et al. 2006). Αυτή η μετάλλαξη επίσης επάγει και την επιδερμική έκφραση του ENOD11 (Journet et al. 2001) σε ένα μοτίβο όμοιο με αυτό που παρατηρείται στα φυτά που επώαστηκαν με συμβατά ριζόβια βακτήρια (Gleason et al. 2006). Έτσι η CCaMK φαίνεται να χρειάζεται σε γεγονότα που συμβαίνουν και στην επιδερμίδα και στον φλοιό, παρόλο που συμμετέχει σε εντελώς διαφορετικά μονοπάτια.

Τα NSP1 και NSP2, τα οποία δρουν μετά από την CCaMK στην επιδερμίδα σαν μέρος του μονοπατιού σηματοδότησης του NF, χρειάζονται επίσης για κυτταρικές διαρρέσεις που συμβαίνουν στον φλοιό της ρίζας (Heckmann et al. 2006). Μελέτες που χρησιμοποίησαν μεταλλάγματα που επανέκτησαν την λειτουργικότητα τους για την CCaMK και τον υποδοχέα της κυτοκινίνης έδειξαν ότι ο φαινότυπος της άμεσης δημιουργίας φυματίων χάνεται αν δεν υπάρχουν λειτουργικά αντίγραφα των *NSP1* ή *NSP2* (Gleason et al. 2006; Tirichine et al. 2007). Έτσι όχι μόνο τα NSP1 και NSP2 δρουν μετά την από την CCaMK στην επιδερμίδα αλλά δρουν και μετά από την CCaMK και τον υποδοχέα κυτοκινίνης στον φλοιό.

Άλλος μεταγραφικός παράγοντας, ο NIN, επίσης φαίνεται να έχει έναν ρόλο και στα επιδερμικά και στ κύτταρα του φλοιού (Schauser et al. 1999; Borisov et al. 2003; Marsh et al. 2007). Μεταλλαγμένα φυτά για το *nin* εμφάνισε ριζικά τριχίδια με υπερβολικές περιελίξεις και εμπόδισε την ριζοβιακή μόλυνση στην επιδερμίδα (Schauser et al. 1999). στον φλοιό τα μεταλλαγμένα φυτά για το *nin* δεν μπορούσαν να ξεκινήσουν τις κυτταρικές διαιρέσεις και ακολούθως τον σχηματισμό «πρωτογενών» φυματίων (Schauser et al. 1999; Borisov et al. 2003). Επίσης η δράση της NIN είναι σημαντική για την ανάπτυξη φυματίων να συμβεί σε μεταλλάγματα των CCaMK και του υποδοχέα της κινάσης που εμφανίζουν άμεση δημιουργία φυματίων και για αυτό έχει προταθεί ότι η NIN ενεργοποιείται ακολουθώντας την ενεργοποίηση της CCaMK και του υποδοχέα της κυτοκινάσης (Tirichine et al. 2006, 2007; Marsh et al. 2007). Αυτά τα χαρακτηριστικά είναι παρόμοια με ότι παρατηρήθηκε στα μεταλλάγματα *nsr*. Παρόλα αυτά αντιθέτως με τα μεταλλάγματα για το *nsr* τα μεταλλάγματα για *nin* έδειξαν υπερβολική έκφραση της ENOD11 καταμήκος της ριζικής επιδερμίδας, υποδηλώνοντας ότι η NIN δεν είναι σημαντική για το επαγόμενο από τον Nod παράγοντα ENOD11. Ίσως λοιπόν ο NIN να δρα σαν αρνητικός ρυθμιστής της σηματοδότησης του παράγοντα Nod για να ρυθμίζει τοπικά την έκφραση του ENOD11 στην επιδερμίδα της ρίζας (Marsh et al. 2007). Περαιτέρω, η έκφραση του NIN επάγεται από κυτοκινίνη ή εφαρμογή παράγοντα Nod, υποστηρίζοντας την ιδέα ότι ο NIN ρυθμίζει θετικά της κυτταροδιαιρέσεις του φλοιού. Παρόλα αυτά η ακριβής λειτουργία το NIN σε μοριακό επίπεδο μένει να διευκρινιστεί.

Το ότι ένας υποδοχέας κυτοκινίνης είναι σημαντικός για την ανάπτυξη φυματίων τονίζει το γεγονός ότι μια ορμόνη του φυτού, η κυτοκίνη είναι ένα συστατικό κλειδί για την οργανογένεση του φυματίου. Πράγματι. Φαίνεται πιθανό ότι η κυτοκινίνη είναι το κινητό σήμα που κοινώνει η επιδερμική αντίληψη το παράγοντα Nod με το εσωτερικό της ρίζας. Άλλη φυτική ορμόνη, το αμπισικό οξύ έχει επίσης προταθεί σαν υποψήφιο για την μετάδοση του σήματος (Ding and Oldroyd 2009). Το αμπισικό οξύ θεωρείται τυπικά ένας αρνητικός ρυθμιστής στην ανάπτυξη φυματίων και φαίνεται να έχει ένα ρόλο και στην επιδερμίδα και στον φλοιό (Ding et al. 2008; Biswas et al. 2009; reviewed by Ding and Oldroyd 2009). Άλλες φυτικές ορμόνες έχουν επίσης αναφερθεί να έχουν κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη φυματίων, περιλαμβανομένης της αυξίνης σαν

θετικό ρυθμιστή τα brassinosteroids και της γιββερελίνες και σαν αρνητικούς ρυθμιστές τις ενεργές ρίζες οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS), το γιασμονικό οξύ και το αιθυλένιο (Ferguson and Mathesius 2003; Ferguson et al. 2005a; Sun et al. 2006; Kinkema and Gresshoff 2008; Mathesius 2008). Παρόλα αυτά για πολλά από αυτά τα σήματα ο ακριβής ρόλος πρέπει ακόμα να διαπιστωθεί και η λειτουργία τους ίσως βασίζεται περισσότερο σε έμμεσες διαδικασίες όπως η κυτταρική διαίρεση η διαφοροποίηση και η διατήρηση.

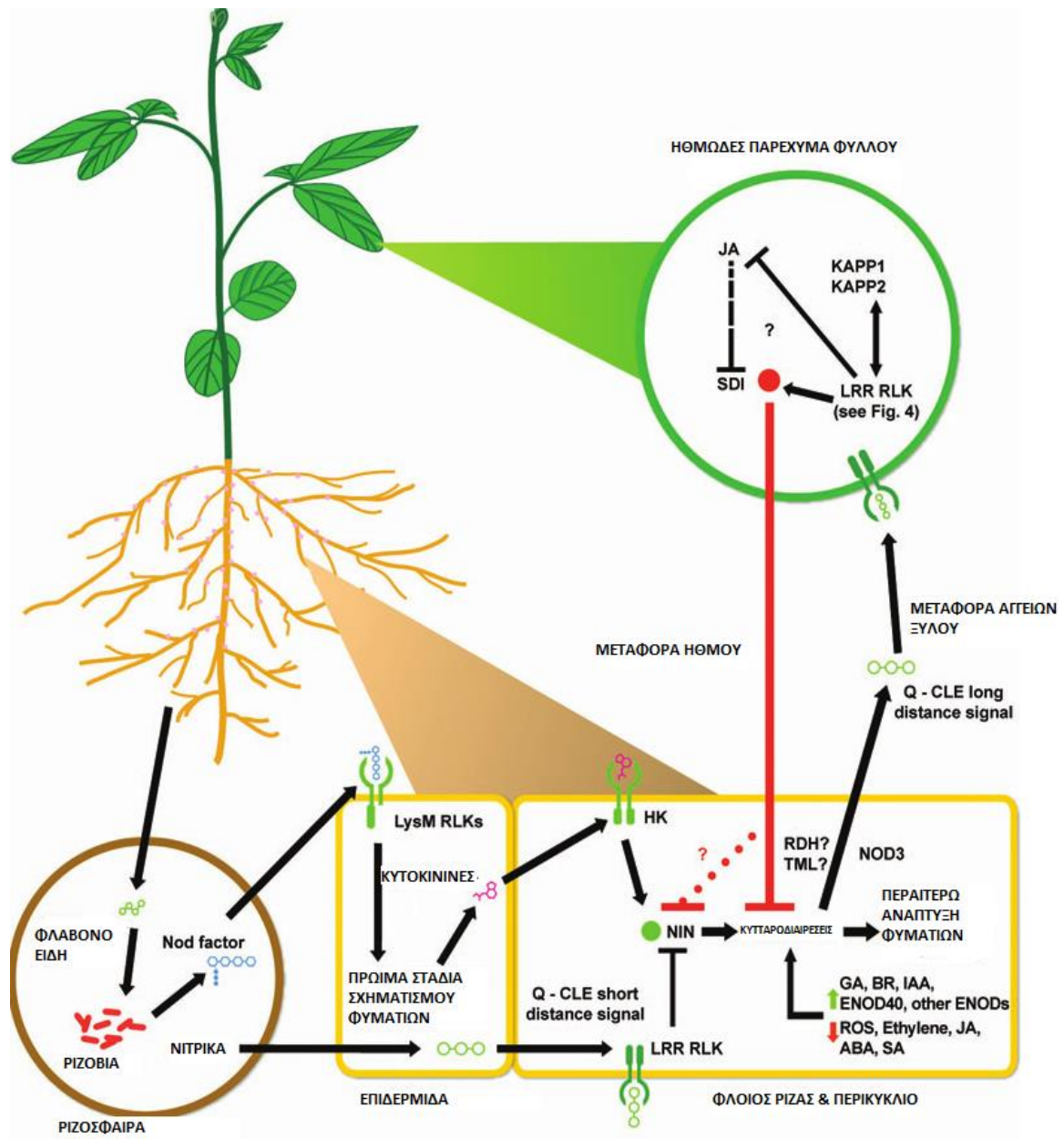
1.1.6 Η διαδικασία αυτορύθμισης των φυματίων

Υπάρχουν πολλοί επιπρόσθετοι εξωτερικοί και εσωτερικοί παράγοντες που δρουν σαν αρνητικοί ρυθμιστές στην δημιουργία φυματίων. Μεταλλάγματα που δεν μπορούν να συνθέσουν ή να «αντιληφθούν» αυτούς του παράγοντες έχουν μεγάλο αριθμό φυματίων. Πολλές από τις λειτουργίες αυτών των παραγόντων στο μονοπάτι της αυτορύθμισης των φυματίων (autoregulation of nodulation, AON) περιλαμβάνουν μακράς απόστασης σηματοδότηση μεταξύ βλαστού-ρίζας. Η αυτορύθμιση ξεκινά κατά την διάρκεια της ανάπτυξης των φυματίων με την σύνθεση ενός σήματος παραγώγου της ρίζας που ονομάζεται “Q”. Πρόσφατη εργασία έδειξε ότι το Q μοιάζει με ένα πεπτίδιο CLE (CLAVATA3/ESR) (Okamoto et al. 2009; D Reid, B Ferguson and P Gresshoff, unpubl. data, 2009). Διεξάγοντας πειράματα εδείχθη ότι το Q ταξιδεύει στον βλαστό μετά από επώαση με ριζόβια όπου αυτό ή ένα προϊόν αυτής της δράσης λαμβάνεται από έναν AON LRR RLK ο οποίος έχει έναν τομέα κινάσης σερίνης/ θρεονίνης που ονομάζεται GmNARK/LjHAR1/MtSUNN (Krusell et al. 2002; Nishimura et al. 2002a; Searle et al. 2003; Schnabel et al. 2005). Αυτός υποδοχέας (AON LRR RLK) είναι όμοιος με πολλούς άλλους πρωτεϊνικούς υποδοχής-κινάσες που βρίσκονται στα φυτά και στα ζώα και εκφράζονται συγκεκριμένα στον ηθμό (Nontachaiyaaroom et al. 2007). Δεν είναι ακόμα γνωστό αν ο υποδοχέας λειτουργεί ανεξάρτητα ή σαν ένα μέρος ομοδιμερούς ή ετεροδιμερούς με άλλον υποδοχέα- κινάση ή άλλο υποδοχέα για να συλλάβει το Q σήμα.

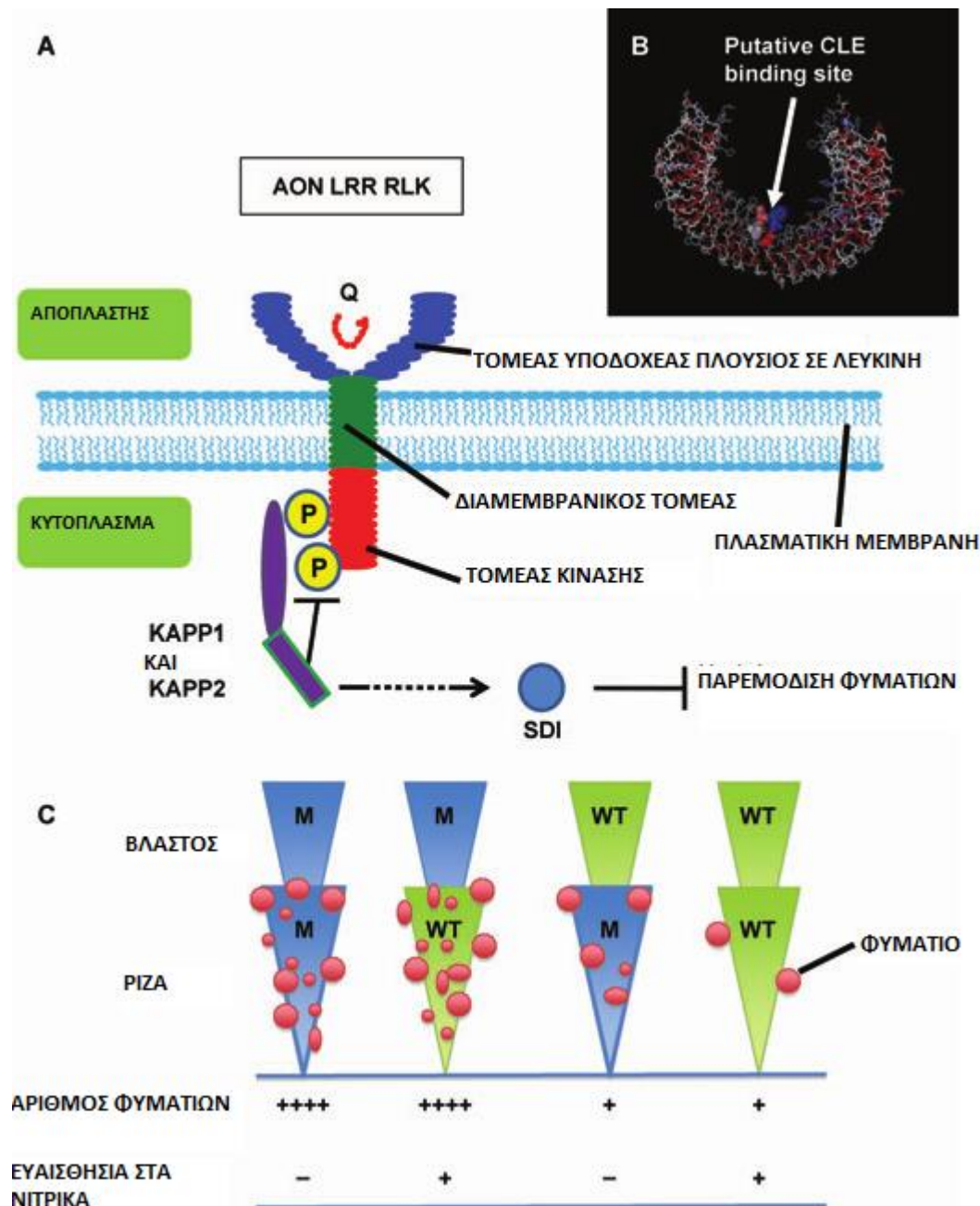
Πρόσφατη εργασία στην σόγια απεκάλυψε καινούργια συστατικά που μπορούν να αλληλεπιδρούν άμεσα με τον υποδοχέα (AON LRR RLK) ή λειτουργούν μετά την δράση του στην αυτορύθμιση. Αυτά περιλαμβάνουν γονίδια που κωδικοποιούν για κινάσες και φωσφατάσες, GmKAPP1 και GmKAPP2 (Miyahara et al. 2008). Αυτά τα

γονίδια μπορούν να δρουν για να μεταφραστή άμεσα το GmNARK σαν μέρος του μονοπατιού της μετάδοσης σήματος του GmNARK. Μπορούν να φωσφορυλιωθούν από τον τομέα κινάσης της GmNARK και στην συνέχεια να αποφωσφορυλιωθεί ο υποδοχέας του GmNARK. Αυτό το σήμα που προκύπτει από αυτήν την αλληλεπίδραση μπορεί να ενεργεί σε πολλούς ύστερους ενεργοποιητές.

Η λήψη του σήματος Q από τον υποδοχέα AON LRR RLK στο φύλλο έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενός καινούργιου από τον βλαστό παραγόμενο παρεμποδιστή που ονομάζεται "SDI". Ο παρεμποδιστής φαίνεται να εισέρχεται στον ηθμό και να μεταφέρεται στην ρίζα όπου δρα παρεμποδίζοντας την περαιτέρω δημιουργία φυματίων (Gresshoff and Delves 1986; Lin et al. 2009). Πρόσφατη εργασία απέδειξε ότι ο SDI είναι μικρό (<1kDa), θερμοσταθερό, εξαρτώμενο από τον παράγοντα Nod, χρειάζεται την δράση του GmNARK για την βιοσύνθεσή του και είναι απίθανο να είναι RNA ή πρωτεΐνη (Lin et al. 2009).



Εικόνα 3 Ριζοβιακή- και νιτρική-ρύθμιση του σχηματισμού φυματίων μέσω της αυτορύθμισης (autoregulation of nodulation, AON).



Εικόνα 4 Η LRR RLK (leucine-rich repeat receptor like kinase) περιλαμβάνεται στην ρύθμιση του αριθμού των φυματίων των ψυχανθών. (A) Προτεινόμενος μοριακός μηχανισμός της αυτορύθμισης των φυματίων και της μεταγωγής σήματος. Συστατικά διέγερσης προτείνονται να είναι το CLAVAT3/ESR σχετικό με CLE-πεπτίδιο συντίθενται στην ρίζα ύστερα από επώαση με ριζόβια ή χειρισμό με νιτρικά. Ο LRR RLK αντιλαμβάνεται τον διεργέτη πυροδοτώντας επακόλουθα γεγονότα στο κυτόπλασμα. Η αντίληψη του διεργέτη επιτρέπει την φωσφορυλίωση του τομέα της κινάσης του LRR RLK. Τα KAPP1 και KAPP2 μεταφωσφορυλιώνονται και στην συνέχεια αποφωσφορυλιώνουν το τομέα κινάσης του LRR RLK. Το προκύπτων σήμα υπόκειται σε πολλούς άλλους άγνωστους παράγοντες. Η ενεργοποίηση του LRR RLK πυροδοτεί επίσης την παραγωγή ενός βλαστο-παραγόμενου παράγοντα που παρεμποδίζει τον σχηματισμό φυματίων. (B) Η φερόμενη προτεινόμενη δομή του LRR από την σόγια. (C) κλασικές μελέτες εμβολιασμού χρησιμοποιώντας αγρίου τύπου και μεταλλάγματα δημιουργίας υπεράριθμων φυματίων έδειξαν την λειτουργία του LRR RLK στον βλαστό να ελέγχει τον αριθμό των φυματίων. Πρόσφατα ένας λιγότερο προφανής ρόλος για τον LRR RLK βρέθηκε με χειρισμούς σε εμβολισμένα φυτά με υψηλά επίπεδα αζώτου.

Πρόσφατες αναλύσεις με μικροσυστοιχίες και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) σε φύλλα από φυτά εμβολιασμένα και μη εμβολιασμένα με ριζόβια βακτήρια διαφέροντας στην λειτουργία του GmNARK απεκάλυψε μια καινούργια ρύθμιση από μέλη του μονοπατιού των οκταδεκανοϊδών (Kinkema and Gresshoff 2008). Αυτό υποδεικνύει την συμμετοχή του γιασμονκού οξέος, μιας καινούργιας φυτικής ορμόνης στην αυτορρύθμιση του σχηματισμού φυματίων. Επίσης αυτά τα γονίδια αντιπροσωπεύουν υποψήφιους τροποποιητές της δραστηριότητας του GmNARK. Εργαλεία της λειτουργικής αντίστροφης γενετικής όπως η ιο-επαγόμενη αποσιώπηση γονιδίων (virus-induced gene silencing, VIGS) θα ήταν πολύ χρήσιμη στην πιστοποίηση αν αυτοί οι παράγοντες και το πιο πάνω αναφερθέν GmKAPPs είναι όντως κρίσιμα συστατικά για την σηματοδότηση του κύκλου της αυτορρύθμισης του σχηματισμού φυματίων (AON).

Ριζο-εξειδικευμένα γονίδια έχουν αναγνωρισθεί στο μπιζέλι *PsNOD3* (Postma et al. 1988) και στο *L. Jaronicus* (*LjRDH1*, Ishikawa et al. 2008; *LjTML*, Magori et al. 2009) τα οποία ίσως περιλαμβάνονται στην βιοσύνθεση ή την μεταφορά του Q ή την αντίληψη του SDI, στην ρίζα. Πρόσφατη εργασία που έγινε χρησιμοποιώντας εμβολιαστικές τεχνικές απέδειξαν ότι το *PsNOD3* πιθανώς λειτουργεί στην ρίζα πριν την ενεργοποίηση του υποδοχέα AON LRR RLK στα φύλλα. Έτσι το *PsNOD3* ίσως έχει έναν ρόλο στην παραγωγή ή μεταφορά του Q στην ρίζα (Li et al. 2009).

Ένας αριθμός άλλων γονιδίων έχει επίσης αναγνωρισθεί σαν ρυθμιστές του αριθμού των φυματίων. Μελέτες με εμβολιασμούς έχουν δείξει ότι το γονίδιο *LjKLAVIER* έχει έναν βλαστο-εξειδικευμένο ρόλο στην ρύθμιση του αριθμού των φυματίων (Oka-Kira et al. 2005). Παρόλα αυτά, ο τρόπος δράσης του παραμένει άγνωστος. Απώλεια της λειτουργίας του μεταγραφικού παράγοντα ERF, *MtEFD*, επίσης έχει ως αποτέλεσμα αυξημένο αριθμό φυματίων πιθανώς αλλάζοντας την σηματοδότηση κυτοκίνης (Vernié et al. 2008). Ενδιαφέρον παρουσιάζει, ότι το γονίδιο *LjASTRAY*, το οποίο κωδικοποιεί για έναν bZIP μεταγραφικός παράγοντας με ένα μοτίβο RING-finger, ρυθμίζει φωτεινά και φωτορμονικά σήματα, αλλά επίσης ρυθμίζει και την διαδικασία σχηματισμού φυματίων, σαν νη λειτουργική μεταλλαγή εμφανίζει

αυξημένο αριθμό φυματίων (Nishimura et al. 2002b). Αν αυτές οι λειτουργίες των γονιδίων επηρεάζουν άμεσα ή έμμεσα την αυτορρύθμιση μένει να καθορισθεί.

Άλλοι παράγοντες που μειώνουν τον αριθμό των φυματίων περιλαμβάνουν το αιθυλένιο και τα νιτρικά. Το αιθυλένιο επάγεται ισχυρά από καταπονήσεις και φαίνεται πιθανό ότι ένας μηχανισμός έχει εξελιχθεί για να αποτρέπει πολύτιμα φωτοσυνθετικά προϊόντα από το να χρησιμοποιηθούν για ανάπτυξη φυματίων όταν το φυτό βρίσκεται υπό «πίεση». Παρόμοια, επειδή το άωτο είναι το κύριο συστατικό που το φυτό αποκτά από αυτήν τη συμβίωση μεταξύ ψυχανθών και ριζοβίων, φαίνεται αρκετά πιθανό ότι ένας μηχανισμός έχει εξελιχθεί να αποτρέπει το φυτό από το να σχηματίζει φυμάτια όταν τα επίπεδα του αζώτου στην ριζόσφαιρα είναι ήδη επαρκεί.

Μεταλλάξεις που διαταράσσουν την ικανότητα του φυτού να αντιλαμβάνεται το αιθυλένιο ή τα επίπεδα αζώτου αμβλύνουν την παρεμποδιστική φύση αυτών των παραγόντων, έχοντας ως αποτέλεσμα τον αυξημένο αριθμό φυματίων. Αυτό περιλαμβάνει γονίδια που χρειάζονται για την ευαισθησία στο αιθυλένιο και την απόκριση, όπως *LjETR1* και *LjEIN2/MtEIN2* (Penmetsa et al. 2008; Lohar et al. 2009). Επιπλέον μεταλλάγματα ανθεκτικά στα νιτρικά (nitrate-tolerant symbiosis ,nts) τα οποία σχηματίζουν πολλά φυμάτια υπό την παρουσία παρεμποδιστικών επιπέδων νιτρικών έχουν απομονωθεί στην σόγια και στο μπιζέλι, αλλά γονίδια *nts*, που δεν περιλαμβάνονται στην αυτορρύθμιση του σχηματισμού των φυματίων, μένει να κλωνοποιηθούν.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει, πρόσφατη εργασία που κατέδειξε ότι η παρεμπόδιση του σχηματισμού φυματίων από νιτρικά από νιτρικά ίσως λειτουργεί μέσω μιας θετικής ρύθμισης στην έκφραση ενός επαγόμενου από νιτρικά CLE-πεπτιδίου στην ρίζα (Okamoto et al. 2009; D Reid, B Ferguson and P Gresshoff, unpubl. data, 2009; Gresshoff et al. 2009). Αυτό το επαγόμενο από νιτρικά CLE-πεπτίδιο είναι αρκετά όμοιο με το επαγόμενο από τα ριζόβια Q CLE πεπτίδιο. Και τα δύο CLE-πεπτίδια φαίνεται να γίνονται αντιληπτά από τον ίδιο υποδοχέα AON LRR RLK που κωδικοποιείται από τα γονίδια *GmNARK/LjHAR1/MtSUNN*, μόνο που το νιτρικά επαγόμενο πεπτίδιο επιδεικνύει μικρή ή καθόλου κινητικότητα και γίνεται αντιληπτό στην ρίζα ενώ το άλλο από τα ριζόβια επαγόμενο πεπτίδιο διανύει μεγάλη απόσταση και μεταφέρεται στον

βλαστό όπου γίνεται αντιληπτό. Το γεγονός ότι ο ίδιος υποδοχέας χρειάζεται για να γίνουν αντιληπτά και τα δύο πεπτίδια ίσως εξηγεί γιατί όλα τα μεταλλάγματα στην σόγια και στο μπιζέλι για *nts* μεταλλάξεις είναι ταυτόχρονα ανθεκτικά στα νιτρικά (για την συμβίωση) και ελαττωματικά στην αυτορρύθμιση του σχηματισμού φυματίων.

1.2 Διαδικασία Μεταφοράς Οργανικών Ουσιών

Κάθε οργανισμός είναι απαραίτητο να εφοδιάζεται με θρεπτικά συστατικά και θρεπτικές ουσίες. Οι οργανικές ενώσεις αποτελούν ένα σημαντικό κομμάτι αυτών των ουσιών και ένα μεγάλο μέρος αυτών αποτελούν τα σάκχαρα που περιέχουν τον άνθρακα που προορίζεται για αφομοίωση από τα κύτταρα. Έτσι και στα ανώτερα φυτά, όπως τα ψυχανθή, τα σάκχαρα (σουκρόζη, μονοσακχαρίτες, πολυόλες) παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο και αποτελούν όχι μόνο μεταβολίτες των φυτών και θρεπτικά στοιχεία αυτών, αλλά και οσμωτικούς διαλύτες και τέλος μόρια σημάτων. Σε πολυάριθμα είδη φυτών τα σάκχαρα που παράγονται από τα φωτοσυνθετικά όργανα (*source tissues*) μεταφέρονται μέσω του ηθμού σε μακρινές αποστάσεις σε ετεροτροφικά όργανα (*sink tissues*), τα οποία εξαρτιούνται από μια συνεχή τροφοδότηση υδατανθράκων. Ενώ γενικά τα φυτά θεωρούνται αυτότροφοι οργανισμοί είναι σημαντικό σε αυτό το σημείο να τονίσουμε ότι αποτελούνται από ένα οργανωμένο σύστημα κυττάρων από τα οποία δε θεωρούνται όλα αυτότροφα, αλλά κάποια είναι ετερότροφα κύτταρα. Ο ηθμός είναι ένα αγγειακό δίκτυο που χρησιμοποιούν τα φυτά για να μεταφέρουν οργανικές ουσίες κατά μήκος σε όλο το φυτό και έχει δημιουργηθεί μέσω εξελικτικών μηχανισμών. Στον ηθμό μεταφέρεται ο προς αφομοίωση άνθρακας με τη μορφή σακχάρων όχι μόνο στα ετερότροφα όργανα του φυτού, αλλά και στα προς ανάπτυξη μέρη του, όπως οι ρίζες, τα φύλλα, τα άνθη. Για τους παραπάνω λόγους ο ηθμός θεωρείται ως ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες ανάπτυξης των φυτών.

Η πιο ευρέως διαδεδομένη ένωση στον χυμό του ηθμού στην πλειοψηφία των φυτών, είναι ο δισακχαρίτης σακχαρόζη (Zimmermann and Ziegler, 1975). Πρόκειται για έναν δισακχαρίτη που αποτελείται από ένα μόριο φρουκτόζης και ένα μόριο γλυκόζης. Οι δύο αυτοί μονοσακχαρίτες ανήκουν στην οικογένεια των εξοζών.

Σήμερα γνωρίζουμε ότι πολλές εξόζες βρίσκονται σε διάφορα οργανίδια των φυτικών κυττάρων, όπως οι χλωροπλάστες (Weber A. et al. 2000) και το σύστημα Golgi (Wang XH et al. 2006). Για αυτό και είναι αποδεκτό ότι το φλοιώμα από μόνο του δεν είναι δυνατόν να μεταφέρει όλες τις εξόζες, αλλά υπάρχουν και εξειδικευμένες πρωτεΐνες σακχαρομεταφορείς που αναλαμβάνουν τον καταμερισμό μονοσακχαριτών, αλλά και συγκεκριμένα των εξοζών στα οργανίδια των φυτικών κυττάρων (Kuhn C et al. 2010).

Η σακχαρόζη είναι μη αναγόμενη και θεωρείται μορφή μεταφοράς λιγότερο προσβάσιμη στον κυτταρικό μεταβολισμό από τη γλυκόζη. Η είσοδος της σακχαρόζης στα λειτουργικά κύτταρα (που επίσης ονομάζεται και φόρτωμα φλοιώματος, phloem loading) αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό ρυθμιστικό σημείο για την ανάπτυξη των φυτών (Lalonde et al., 1999). Η είσοδος της σακχαρόζης μπορεί να γίνει είτε συμπλασμικά μέσω πλασμοδεσμάτων ή αποπλασμικά κατά μήκος της πλασματικής μεμβράνης. Σε ύστερη περίπτωση, η σακχαρόζη μπορεί να ληφθεί από τα κύτταρα 'καταβόθρες' (sink tissues), είτε άθικτη μέσω ειδικών μεταφορέων σακχαρόζης/ H^+ (μεταφορείς δισακχαριτών, Disaccharide transporters: DTSs), είτε μετά την εξοκυτταρική υδρόλυση από τις ιμπερτάσες των κυτταρικών τοιχωμάτων, σε γλυκόζη και φρουκτόζη, μέσω μεταφορέων μονοσακχαριτών/ H^+ (MSTs) (Williams et al., 2000). Παρόλο που και η συμπλασμική και η αποπλασμική μεταφορά μπορεί να συμμετέχει στην παροχή σακχάρων στα φρούτα, το αποπλασμικό μονοπάτι, συμπεριλαμβανομένων μεταφορέων πρωτεϊνών, μπορεί να συμβεί στα τελευταία στάδια της ωρίμανσης των καρπών.

1.2.1 Κατηγορίες Μεταφορέων Σακχάρων.

Από την κλωνοποίηση του πρώτου μεταφορέα μονοσακχαριτών στην *Chlorella* (Sauer et al., 1989), τον πρώτο μεταφορέα σακχαρόζης στην *Spinacia oleracea* (Riesmeier et al., 1992) και τον πρώτο μεταφορέα πολυολών στην *Arabidopsis thaliana* (Noiraud et al., 2001), πολλά γονίδια που ανήκουν σε αυτές τις οικογένειες έχουν απομονωθεί από ποικίλα είδη. Η αρχική εντύπωση ότι ένα φυτό έχει έναν μεταφορέα μονοσακχαριτών, έναν μεταφορέα σακχαρόζης και έναν μεταφορέα πλασματικής μεμβράνης H^+ /ATPase έχει καταρριφθεί.

Γενικά στα ανώτερα φυτά, η κατάσταση είναι περίπλοκη. Υπάρχουν οικογένειες μεταφορέων που αποτελούνται από τουλάχιστον οκτώ μέλη (*Ricinus communis*) ή και επτά μέλη (*Chenopodium rubrum*).

1.2.2 Η οικογένεια που κωδικοποιεί για μεταφορείς σουκρόζης. Γονίδια AtSUT (Sucrose Transporters).

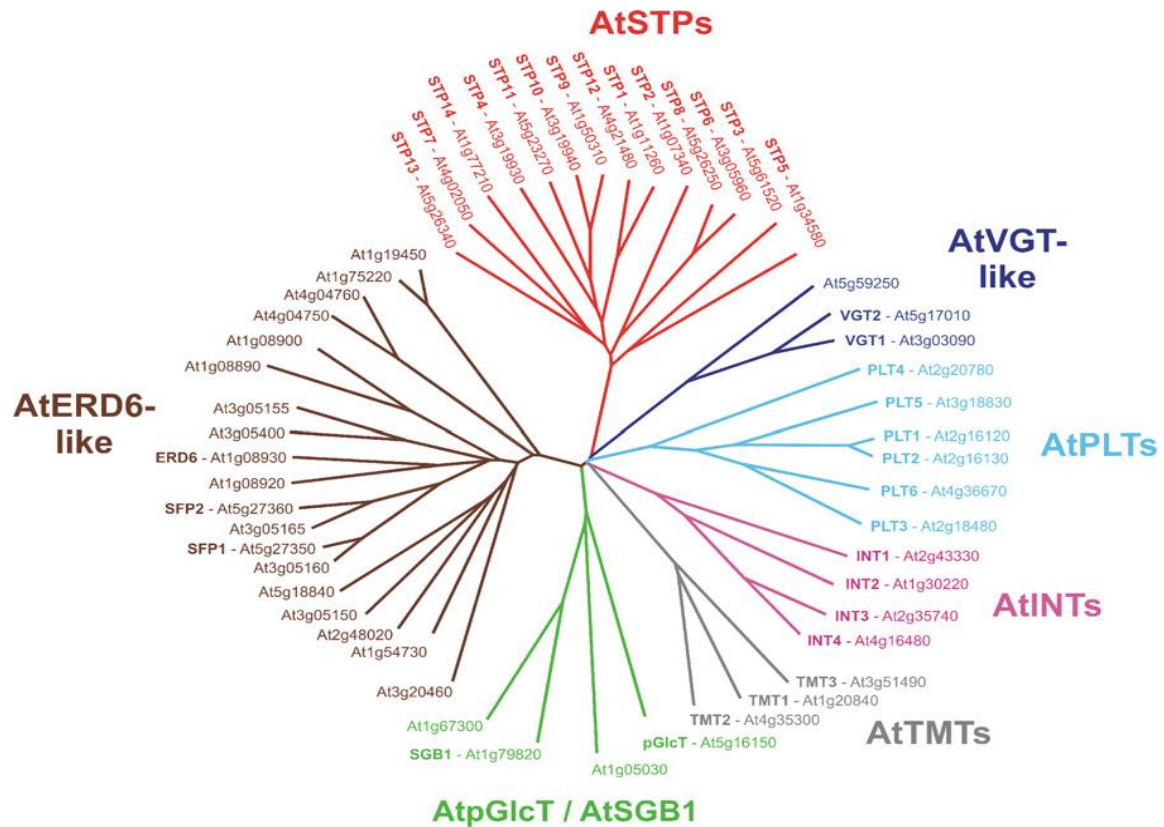
Πρόκειται για μια από τις λίγες οικογένειες γονιδίων που έχουν μελετηθεί όχι μόνο στο *Arabidopsis thaliana* αλλά και σε άλλα φυτικά είδη, όπως η πατάτα και το ρύζι. (Riesmeier et al., 1993; Harms et al., 1994) Η σημασία αυτή της οικογένειας είναι πολύ μεγάλη, καθώς εξειδικεύεται στη μεταφορά του δισακχαρίτη σουκρόζης, της πιο σημαντικής πηγής άνθρακα του φυτού. Μελέτες μας έχουν δείξει ότι υπάρχουν μεγάλες διαφορές ανάμεσα στις πρωτεΐνες αυτής της οικογένειας, όπως ότι σε αντίθεση με την SUT1, η SUT εκφράζεται σε μεγαλύτερο επίπεδο στο αρτηριακό σύστημα των φωτοσυνθετικών φύλλων της πατάτας, όπου η μεγάλη ανάγκη για μεταφορείς σακχαρόζης χρειάζεται για να εισαχθεί στο φλοίωμα (Andreas et al., 2000).

1.2.3 Η οικογένεια γονιδίων που κωδικοποιούν για μεταφορείς μονοσακχαριτών (MST-like family) στο *Arabidopsis thaliana*

Η αποκωδικοποίηση ολόκληρου του γονιδιώματος του *A.thaliana* μας έχει δείξει ότι περιέχει 9 μεταφορείς σακχαρόζης (Sauer et al. 2007) και μια οικογένεια μεταφορέων μονοσακχαριτών που περιέχει 53 διαφορετικές πρωτεΐνες που κατατάσσονται σε 7 υποοικογένειες (Buttner et al., 2007). Τέλος, η εξελικτική ανάλυση των φυτικών μεταφορέων μονοσακχαριτών απεκάλυψε ότι αυτές οι 7 υποοικογένειες εμφανίζονται από αρχαιοτάτων χρόνων στα φυτά εδάφους (Johnson et al., 2006).

Οι μεταφορείς μονοσακχαριτών μοιράζονται ισχυρές ομοιότητες στην τοπολογία της μεμβράνης τους, με δώδεκα συνδεδεμένες έλικες που διατρέχουν περιοχές της μεμβράνης. Στις υπό-οικογένειες, οι ομολογίες είναι αρκετά υψηλές, από 42% έως 96% ομοιότητα. Όταν οι υπό-οικογένειες συγκρίνονται μεταξύ τους, ο βαθμός ομολογίας πέφτει σημαντικά υποστηρίζοντας της ομαδοποίηση αυτών των γονιδίων σε ξεχωριστές ομάδες. Παρόλο που σε ορισμένες περιπτώσεις η συνολική ομολογία με τους ήδη χαρακτηρισμένους μεταφορείς σακχάρων είναι σχετικά χαμηλή, όλες αυτές οι

πρωτεΐνες δείχνουν διατηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα συμπεριλαμβανομένων των δύο γνωστών σημάτων των μεταφορέων σακχάρων, τα οποία χαρακτηρίζουν την λειτουργία αυτών των πρωτεϊνών ως μεταφορείς σακχάρων (Buttner, 2007).



Εικόνα 5 Φυλογενετικό δένδρο της οικογένειας των MST γονιδίων των μεταφορέων στο φυτό *A.thaliana* (Buttner, 2007).

Οι οικογένειες που έχουν ομαδοποιηθεί τα γονίδια της οικογένειας των MSTs στην *A.thaliana* είναι οι παρακάτω:

1.2.3.1 Γονίδια *AtTMT* (*Tonoplast Monosaccharide Transporter*).

Η υπό-οικογένεια γονιδίων μεταφορέων μονοσακχαριτών στον τονοπλάστη, στο *A.thaliana* αποτελείται από τρία MST ομόλογα με έναν εκτεταμένο μεσαίο βρόγχο ανάμεσα στις φέρουσες διαμεμβρανικές έλικες έξι και επτά (Frommer et al., 2000). Υπό συνθήκες στρες έχει δειχθεί ότι επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *AtTMT1* και *AtTMT2* αυξάνονται σημαντικά. Η ξηρασία, η αλατότητα και η χαμηλή θερμοκρασία επάγουν την έκφρασή τους και διαμέσου των σακχάρων δείχνουν ότι τα *AtTMTs* παίζουν κάποιο ρόλο στην μεταφορά εξοζών στο χυμοτόπιο, κυρίως υπό συνθήκες στρες (Neuhaeus et al., 2006).

1.2.3.2 Γονίδια *AtERD6-like*.

Η λιγότερο μελετημένη υπο-οικογένεια είναι τα 19 γονίδια *AtERD6-like* που έχουν μεταξύ τους ομολογία 48%-95%. Τα *AtERD6*-ομόλογα ονομάσθηκαν από το γονίδιο *ERD6* (early-responsive to dehydration ή γρήγορη αντίδραση αφυδάτωσης), το οποίο κωδικοποιεί για έναν μεταφορέα σακχάρων (Shinozaki et al., 1998).

1.2.3.3 Γονίδια *AtVGT (Vacuolar Glucose Transporter)-like*.

Το *AtVGT1* (*At3g03090*) και *AtVGT2* (*At5g17010*) έδειξαν να βρίσκονται στην μεμβράνη του χυμοτοπίου. Πρόκειται για δύο γονίδια αυτής της υπο-οικογένειας, όπου για το πρώτο βρέθηκε ενεργής μεταφορά γλυκόζης, αλλά όχι ξυλόζης ύστερα από έκφρασή του σε ζύμη και σε κάποιες άλλες μελέτες σε απομονωμένα χυμοτόπια ζύμης. Φαίνεται ότι κατά τη βλάστηση των σπόρων και την άνθηση το συγκεκριμένο γονίδιο έχει σημαντικό ρόλο. Στον αντίποδα το γονιδιακό προϊόν του *At5g5925*, που αποτελεί το τρίτο μέλος αυτής της υπο-ομάδας, φαίνεται να βρίσκεται στην μεμβράνη του χλωροπλάστη (Buttner, 2007).

1.2.3.4 Γονίδια *AtPLT (Polyol Transporter)*.

Ελάχιστα είναι γνωστά όσον αφορά τη μεταφορά των πολυολών στα φυτά που συνθέτουν πολυόλες. Οι πρωτεΐνες *PLT* (*Polyol transporters*, μεταφορείς πολυολών) είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες που παρουσιάζουν δώδεκα μεμβρανικά συνδεδεμένες περιοχές, όπως όλα τα μέλη της υπέρ-οικογένειας *MFS*. Οι αλληλουχίες των μεταφορέων πολυολών παρουσιάζουν σημαντική ομολογία με εκείνες των μεταφορέων σακχάρων. Εντούτοις, ο ρόλος των πολυολών φαίνεται να είναι αρκετά όμοιος με αυτόν της σακχαρόζης, καθώς οι πολυόλες συνθέτονται κυρίως στους ιστούς 'πηγές', στους οποίους τα ένζυμα που συμμετέχουν στη σύνθεση έχουν εντοπιστεί, και χρησιμοποιούνται στους ιστούς 'καταβόθρες' (Loescher and Everard., 1996).

1.2.3.5 Γονίδια *AtINT (Inositol Transporter)*.

Τα τέσσερα μέλη της οικογένειας *MST(-like)* στο *A.thaliana* παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία στους μεταφορείς μυο-ινοσιτόλης στη ζύμη και στον άνθρωπο και με τους μεταφορείς μυο-ινοσιτόλης *MITR1* και *MITR2* στο *Mesembryanthemum crystallinum* (Bohnert et al., 2000). Σε αντίθεση με τους *MITR1* και *MITR2*, οι οποίοι θεωρούνται ότι καταλύουν τη συμμεταφορά Na^+ /μυο-ινοσιτόλης και βρίσκονται στον τονοπλάστη, στο

A.thaliana ο AtINT4 είναι υψηλώς εξειδικευμένος μεταφορέας μυο-ινοσιτόλης/πρωτονίου και βρέθηκε στην πλασματική μεμβράνη (Sauer et al., 2006).

1.2.3.6 *AtpGlcT (Plastidic Glucose Transporter) γονίδια/AtSGB1*

Λίγα πράγματα είναι γνωστά και για τη συγκεκριμένη υπο-οικογένεια. Αν και στο παρελθόν έχει προταθεί ότι η λειτουργία τους ευθύνεται για την εξαγωγή της γλυκόζης, που προέρχεται από αποτυχημένη διάσπαση του μεταφερόμενου αμύλου (Flugge et al., 2000), παρόλα αυτά απουσιάζει σχετική μελέτη ανάλυσης μεταλλαγμάτων που να το αποδεικνύει. Πρόσφατα προτάθηκε ότι η εκροή πλαστιδιακής γλυκόζης είναι μία ενεργή διαδικασία μαζί με την μεταφορά ενός πρωτονίου (Geiger et al., 2002).

1.2.3.7 *Γονίδια AtSTP (Sugar Transporters)*

Η συγκεκριμένη υποοικογένεια μεταφορέων μονοσακχαριτών εξειδικεύεται στη μεταφορά εξοζών και είναι η καλύτερα μελετημένη υποοικογένεια γονιδίων της οικογένειας AtMST γονιδίων.

1.2.3.7.1 Μεταφορείς Μονοσακχαριτων-Εξοζών

1.2.3.7.1.1 Γενικά

Όπως προαναφέραμε ο ρόλος των σακχάρων στα φυτά είναι πολύ σημαντικός, και ένας δισακχαρίτης που παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία των φυτών είναι η σουκρόζη, που αποτελείται από 2 εξόζες, την φρουκτόζη και την γλυκόζη. Για αυτό το λόγο μεγάλο μέρος της επιστημονικής κοινότητας έχει αφοσιωθεί στο να μελετάει τη λειτουργία και το ρόλο των σακχαρομεταφορέων που ευθύνονται για τη μεταφορά των εξοζών στα φυτικά κύτταρα. Η υποοικογένεια των γονιδίων AtSTP που ευθύνονται για τη κωδικοποίηση μεταφορέων εξοζών στο *A.thaliana*, έχει μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό.

Η υδρόλυση της σακχαρόζης από της ιμπερτάσες (cwINV) που βρίσκονται στο κυτταρικό τοίχωμα και η ακολουθούμενη εισαγωγή των εξοζών μέσα στα κύτταρα, φαίνεται να είναι κρίσιμη για τον βασικό μεταβολισμό, την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση στα φυτά. Οι εξόζες συνεχίζουν να κινούνται από τον αποπλάστη, όπου καταλύονται, από τις πρωτεΐνες μεταφορείς εξοζών (STPs), οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να "αισθάνονται" τα σάκχαρα. Η λήψη εξοζών, μπορεί να παράγει σήματα για να αρχίσει μια συντονισμένη κινητοποίηση του κυττάρου, ή να ξεκινήσουν μεταβολικά μονοπάτια από τα κύτταρα που δεν είχαν εφοδιαστεί μέχρι τότε με

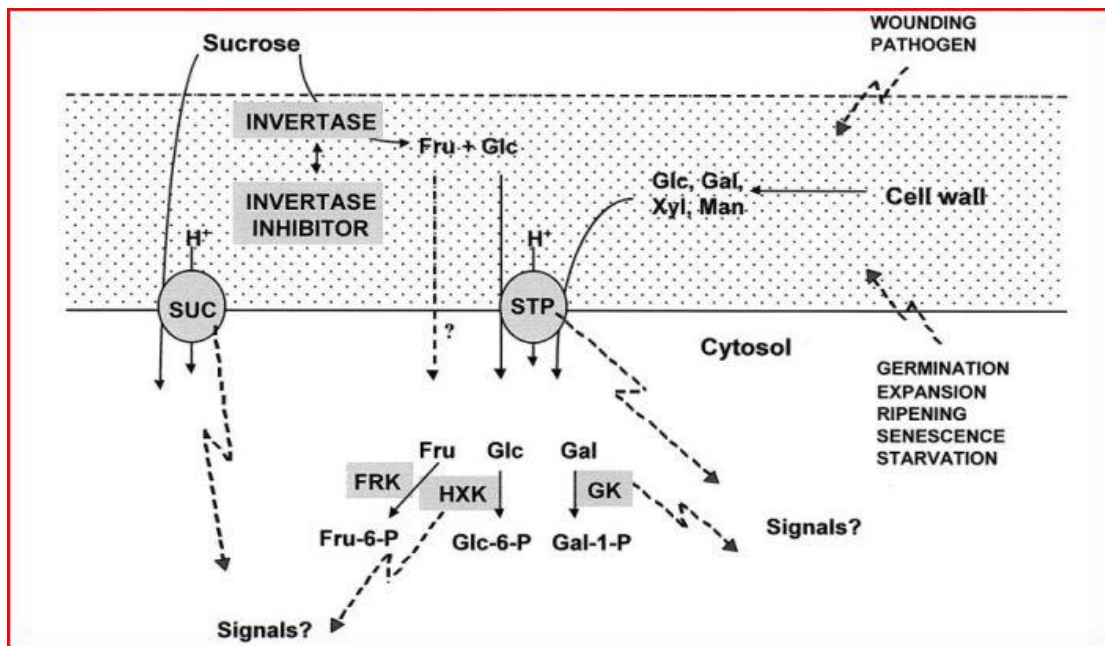
σάκχαρα. Έχει υπολογιστεί ότι το *A.thaliana* έχει τουλάχιστον 6 cwINV και 14 AtSTP γονίδια. Αυτά τα γονίδια παρουσιάζουν πολλά διαφορετικά μοτίβα έκφρασης και πολλά μεταλλάγματα με knock-out γονίδια, έχουν απομονωθεί για ανάλυση. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το AtSTP1 γονίδιο μεταφέρει γλυκόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη και μαννόζη, αλλά όχι φρουκτόζη. Φαίνεται να έχει τον κύριο λόγο στη μεταφορά μονοσακχαριτών στα αναπαραγωγικά όργανα του φυτού και η έκφρασή του πέφτει ελάχιστα κατά τη διάρκεια χειρισμών με εξωγενή σουκρόζη. Τα γονίδια AtSTP1, επίσης εκφράζονται στους αναπτυσσόμενους σπόρους, όπου μπορεί να είναι υπεύθυνα για την παροχή γλυκόζης από την εξωγενή σουκρόζη που έχει υδρολυθεί. Ο μεγάλος αριθμός των γονιδίων AtcwINV και AtSTP και οι ποικίλοι τρόποι έκφρασης αυτών μαζί, αλλά και χωριστά, όπως επίσης και η ύπαρξη της περίπτωσης ότι μπορεί κάθε πρωτεΐνη να έχει πάνω από έναν λειτουργικό ρόλο, παρέχει στο φυτό πιθανά πολύπλοκα μηχανισμούς χρησιμοποίησης των μονοσακχαριτών για την απευθείας ανάπτυξή του ή και την έγκαιρη και αποτελεσματική αντίδραση σε κλιματικές αλλαγές και εξωγενή παράγοντες (Sherson et al., 2002).

Τέσσερις διαφορετικές πρωτεΐνες, μεταφορείς μονοσακχαριτών, έχουν εκφραστεί με ετερόλογα σε κύτταρα ζύμης και *Xenopus* και δείχνουν ότι καταλύουν την εξωγενή μεταφορά σακχάρων (Buttner and Sauer, 2000). Ακόμα μια knock-out μεταλλαγή στο AtSTP1 γονίδιο έδειξε ότι υπάρχει μείωση στην απορρόφηση των εξογενών μονοσακχαριτών από τα σπορόφυτα του *A.thaliana* (Sherson et al., 2000). Αυτές οι παρατηρήσεις συμφωνούν στο ότι η λειτουργικότητα των AtSTPs στην πλασματική μεμβράνη είναι να εισάγουν μονοσακχαρίτες από τον αποπλάστη. Παραμένει όμως να διευκρινιστεί εάν και οι 14 πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα AtSTPs γονίδια μεταφέρουν μονοσακχαρίτες και ποιές άλλες σχετικές λειτουργίες έχουν. Επομένως, η συνολικές φυσιολογικές λειτουργίες των AtSTPs είναι αδιευκρίνιστες (Buttner and Sauer, 2000).

1.2.3.7.2 Γονίδια μεταφορέων μονοσακχαριτών στο *A. thaliana*.

1.2.3.7.2.1 *AtSTP1*

Η πρωτεΐνη που εκφράζει το γονίδιο *AtSTP1* εδράζεται στο αποδεδειγμένα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Εκφράζεται ισχυρά στα φύλλα, στις ρίζες, στα άνθη, στο βλαστό, στα σπορόφυτα και τα σπέρματα. Το γονίδιο είναι ενεργό κατά τη διάρκεια της βλάστησης των σπόρων και υπολογίζεται ότι για το 60% της γλυκόζης που απαιτούν τα σπορόφυτα ευθύνεται η πρωτεΐνη αυτή. Παρόλα αυτά τα knock-out μεταλλάγματα για αυτό το γονίδιο, φαίνεται να βλαστάνουν και να αναπτύσσονται κανονικά (Sherson et al., 2000). Ακόμα η συγκεκριμένη πρωτεΐνη εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στα κύτταρα καταφρακτικά κύτταρα της επιδερμίδα του φύλλου προκειμένου να βοηθήσει τη μεταφορά και μετέπειτα αφομοίωση της σακχαρόζης εκεί. Έχει παρατηρηθεί ότι υπάρχει διαφορά έκφρασης ανάλογα με τη φωτοπερίοδο πράγμα που συνάγει και με τη διαδικασία αφομοίωσης της σακχαρόζης από τα κύτταρα “φύλακες” (Ruth Stadler et al., 2003).



Εικόνα 6 Μεταβολισμός και μεταφορά σακχαρόζης. Τα διακεκομένα βέλη παρουσιάζουν πιθανά σήματα. Η αβέβαιη διαδρομή της σακχαρόζης φαίνεται με τα διακεκομένα βέλη με τα ερωτηματικά. Λέξεις κλειδιά: SUC, σουκρόζη, STP, πρωτεΐνη μεταφοράς μονοσακχαριτών, FRK, φρουκτοκινάσες, HXK, εξοκινάσες, GK, γαλακτοκινάσες (Sarah M. Et al., 2003).

1.2.3.7.2.2 *AtSTP2*

Το γονίδιο *AtSTP2* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη μεταφορέα, όπου όμως εκφραζέται συγκεκριμένα στην αναπτυσσόμενη γύρη. Θεωρείται υπεύθυνη για τη μεταφορά της γλυκόζης, όταν αυτή προέρχεται από τη διάσπαση της καλλόζης κατά τη διάρκεια ωρίμανσης της γύρης (Truernit et al., 1999).

1.2.3.7.2.3 *AtSTP3*

Σε αντίθεση με την πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *AtSTP2*, η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το *AtSTP3* εκφράζεται στους πράσινους ιστούς του φυτού, ενώ η έκφρασή του επάγεται συνήθως μετά από τραυματισμό του ιστού (Buttner et al., 2000).

1.2.3.7.2.4 *AtSTP4*

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *AtSTP4*, εκφράζεται στις άκρες των ριζών, στους γυρεοσωλήνες και στα φύλλα. Έχει παρατηρηθεί ότι τα επίπεδα μεταγραφημάτων του γονιδίου αυξάνονται σημαντικά μετά από τραυματισμό των φυτικών ιστών ή μετά από αντίδραση που προκαλείται από την επίθεση παθογόνου (Truernit et al., 1996).

1.2.3.7.2.5 *AtSTP6*

Το γονίδιο *AtSTP6* διακόπτεται από δύο ιντρόνια και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 507 αμινοξέων που περιέχει 12 διαμεμβρανικές έλικες. Ετερόλογη έκφραση του γονιδίου σε κύτταρα ζύμης δείχνουν ότι η *AtSTP6* πρωτεΐνη είναι ευρέους φάσματος και εύκολα διασπασίμος μεταφορέας μονοσακχαριτών που στοχεύει στην πλασματική μεμβράνη. Ύστερα από *in situ* υβριδισμό και άλλες έρευνες εντοπίστηκε έκφραση μόνο κατά τη διάρκεια των τελευταίων σταδίων της ανάπτυξης της γύρης. Τέλος δημιουργήθηκαν φυτά *A.thaliana* με παρεμβολή μεταθετού στοιχείου ανάμεσα στο γονίδιο και τα ομοζυγωτά φυτά αναλύθηκαν για την ζωτικότητα της γύρης, την ανάπτυξή της, τη λειτουργικότητά της και την ικανότητα παραγωγής σπόρων. Όμως διαφορές ανάμεσα στα μεταλλάγματα και τα wild-type αγρίου τύπου φυτά δεν παρατηρήθηκαν (Joachim et al., 2003).

1.2.3.7.2.6 *AtSTP13*

Για τη μελέτη της *AtSTP13* έχουν δημιουργηθεί μεταλλάγματα με υπερέκφραση του γονιδίου αυτού. Τα μεταλλάγματα φαίνεται ότι αυξάνουν την απορρόφηση της

γλυκόζη, παράγουν σε μεγαλύτερο επίπεδο ενδογενή σακχαρόζη. Η υπερέκφραση του γονιδίου αυτού οδηγεί σε αύξηση της αφομοίωσης κατά 90% του αζώτου (N) κατά το στάδιο των σποροφύτων και είχαν υψηλότερη έκφραση των μεταφορέων νιτρικών *NTR2.2*. Επίσης στα μεταλλάγματα τα σπορόφυτα ήταν μεγαλύτερα και είχαν μεγαλύτερη βιομάζα από του αγρίου τύπου φυτά όταν μεγάλωναν κάτω από ανεπάρκεια αζώτου. Επιπροσθέτως, από πειράματα που έγιναν με μεταλλάγματα για γονίδια κρίσιμα στην άνθηση φαίνεται το γονίδιο της *AtSTP13* να είναι σημαντικό στην ανάπτυξη του άνθους καθώς η ρύθμιση του αλλάζει σε σχέση με άλλους ιστούς όπως τα φύλλα ενώ φαίνεται να παίζει κάποιο ρόλο στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο των ιστών του φύλλου. Τέλος, φάνηκε με διαγονιδιακά φυτά ότι η *AtSTP13* συγκεντρώνεται στην πλασματική μεμβράνη κυττάρων του μεσόφυλλου, αλλά και στο αγγειακό σύστημα των φυτών (Schofield et al., 2009) καθώς και στο αγγειακό σύστημα των πετάλων αλλά και στους ανθήρες σε όψιμο στάδιο ανάπτυξης

1.2.3.7.2.7 *AtSTP14*

Η ανάλυση και ο χαρακτηρισμός του γονιδίου *AtSTP14* έχει δείξει ότι έχει υψηλά επίπεδα έκφρασης στον σπόρο, το ενδοσπέρμιο και τις κοτυλιδόνες, όπως επίσης και στα πράσινα φύλλα του φυτού. Αντίθετα με άλλα γονίδια της ίδιας υποοικογένειας το *AtSTP14* εκφράζεται και στα κύτταρα πηγές (source tissue), αλλά και στα κύτταρα καταβόθρες (sink tissue) και αντιπροσωπεύει τον πρώτο μεταφορέα μονοσακχαριτών στα θηλυκά γαμετόφυτα. Ετερόλογη έκφραση του σε κύτταρα ζύμης αποκάλυψε ότι το *AtSTP14* δε μεταφέρει γλυκόζη ή φρουκτόζη, αλλά είναι ο πρώτος εξειδικευμένος μεταφορέας μονοσακχαριτών για γαλακτόζη. Τέλος, ενδιαφέρον είναι ότι η έκφρασή του γονιδίου εξαρτάται ανάλογα από παράγοντες που επηρεάζουν τη καταστροφή του κυτταρικού τοιχώματος, όπως το παρατεταμένο σκοτάδι ή η παρουσία σακχαρόζης σε υψηλά επίπεδα. (Gernot et al., 2010).

1.3 Μεταθετά στοιχεία

Η πλειοψηφία των ψυχανθών διαθέτει μεγάλο και περίπλοκο γονιδίωμα και παρουσιάζει δυσκολία στη γενετική και μοριακή μελέτη της. Παρόλαυτα, ο όγκος των μεγαλύτερων γονιδιωμάτων έχει συντεθεί από μεταθετά στοιχεία και μη-κωδικοποιημένα DNAs, προτείνοντας μια συσχέτιση των πλούσια γονιδιακά περιοχών ανάμεσα στα μικρότερα και τα μεγαλύτερα γονιδιώματα των ψυχανθών (Taddege et al.,

2005). Τα μεταθετά στοιχεία παρουσιάζουν μια ελκυστική εναλλακτική λύση για την παραγωγή μεγάλου αριθμού μεταλλαγμάτων απο ένθεση διότι ο αριθμός των διαγονιδιακών σειρών που πρέπει να παραχθούν δεν είναι περιοριστικός παράγοντας. Ο μεγάλος κλίμακας μετασχηματισμός με διήθηση κενού (vacuum infiltration) δεν είναι ακόμη εφικτός στην *M. truncatula*, επίσης η T-DNA μεταλλαξιγένεση δεν είναι κατάλληλη για την κατασκευή μεγάλης ποσότητας μεταλλαγμένων οργανισμών (D'Erfurth et al., 2003). Εξαιτίας όλων των παραπάνω χρησιμοποιήθηκαν τα μεταθετά στοιχεία για την μεταλλαξιγένεση της *M. truncatula*.

1.3.1 Κατηγορίες

Έχουν χρησιμοποιηθεί δύο κλάσεις μεταθετών στοιχείων για μεταλλαξιγένεση ένθεσης. Η πρώτη κλάση στοιχείων I, που επίσης ονομάζονται retrotransposons, μεταφέρονται μέσω ενός RNA ενδιάμεσου (RNA intermediate), το οποίο αντιγράφεται ανάστροφα σε ένα γραμμικό διπλής έλικας DNA πριν από την ενσωμάτωσή του στο γονιδίωμα του ξενιστή. Τα στοιχεία της δεύτερης κλάσης II, που επίσης ονομάζονται και μεταθετά DNA (DNA transposons), μεταφέρονται μέσω ενός DNA ενδιάμεσου (μηχανισμός αποκοπή και επικόλληση) (D'Erfurth et al., 2003).

Η μεταλλαξιγένεση χρησιμοποιώντας μεταθετά DNA έχει πολλαπλά πλεονεκτήματα. Οι σειρές που περιέχουν το ενεργό μεταθετό στοιχείο μπορούν να πολλαπλασιασθούν για να ετοιμάσουν μεταλλαγμένους πληθυσμούς σε μεγάλη κλίμακα. Επιπροσθέτως, είναι πιθανό να παρουσιασθεί γενετική σύνδεση μεταξύ του μεταθετού που έχει εισαχθεί και του μεταλλαγμένου φαινοτύπου με επανάκτηση του αγρίου τύπου μετά από την αφαίρεση του μεταθετού στοιχείου. Εντούτοις, τα μεταθετά DNA γενικά μεταφέρονται κοντά στην αρχική τους θέση ενσωμάτωσης έτσι ώστε η μετάλλαξη του γονιδιώματος να μη γίνεται απολύτως τυχαία, εκτός εάν αρχίσει με ανεξάρτητα φυτά που φέρουν μεταθετά σε διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματος (D'Erfurth et al., 2003).

Διάφορα retrotransposons (κλάση πρώτη II) χρησιμοποιήθηκαν ως μεταλλαξιγόνα σε φυτά. Τα retrotransposons είναι διαχωρισμένα σε δύο υποκλάσεις: τα LTR retrotransposons που φέρουν μεγάλες τελικές επαναλήψεις (δύο ευθείες επαναλήψεις

και στα δύο άκρα) και τα non-LTR transposons που δεν φέρουν αυτές τις επαναλήψεις. Τα LTR retrotransposons σχετίζονται με τους ρετροϊούς αφού έχουν την ίδια δομή DNA και οι κύκλοι ζωής τους έχουν πολλά κοινά. Τα αυτόνομα LTR retrotransposons κωδικοποιούν λειτουργίες που απαιτούνται για τον πολλαπλασιασμό τους και την μεταφορά τους, η πρωτεΐνη του καψιδίου (gag protein), μια πρωτεάση (PR), μια ιντεγκράση (IN) και την αντίστροφη μεταγραφάση-RNaseH (RT). Σαν μέλη αυτής της κλάσης των στοιχείων μεταφέρονται διαμέσου ενός μηχανισμού αποκοπής και επικόλλησης, και είναι ικανά να εισβάλουν σε διάφορα γονιδιώματα ξενιστή. Η μεταφορά μερικών εκ αυτών των στοιχείων ενεργοποιείται από βιοτικά ή αβιοτικά ερεθίσματα (stress), και από την ιστοκαλλιέργεια. Επομένως, διαφορετικά retrotransposons έχουν χρησιμοποιηθεί για μεγάλης κλίμακας μεταλλαξιγένεση ένθεσης σε διάφορα φυτά μοντέλα, χρησιμοποιώντας την ικανότητά τους να μεταφέρονται κατά την διάρκεια ιστοκαλλιέργειας. Έρευνες έδειξαν ότι τα retrotransposons μεταφέρονται αποτελεσματικά μέσα στα γονίδια των ετερόλογων ξενιστών και ότι ακολουθίες που στοχεύουν σε συγκεκριμένη περιοχή παρουσιάζουν μέτρια ή καθόλου ομολογία. Επιπλέον, δεν μεταφέρονται σε περιοχές που γειτνιάζουν με την αρχική τοποθεσία ένθεσης, αλλά είναι περισσότερο διασκορπισμένα στο γονιδίωμα σαν αποτέλεσμα του τρόπου της μετάθεσης που απαιτεί κυτοπλασμική φάση.



Εικόνα 7: Η γενική δομή του *Tnt1* μεταθετού στοιχείου του καπνού είναι η παραπάνω. Η LTR περιοχή αντιπροσωπεύεται από τα κόκκινα βέλη και η περιοχή της αντίστροφης μεταγραφάσης αντιπροσωπεύεται από το μπλε χρώμα. Είναι αξιοσημείωτο ότι τα δύο LTR είναι πανομοιότυπα στην ακολουθία.

Χρησιμοποιώντας ένα πολύ αποτελεσματικό πρωτόκολλο μετασχηματισμού-αναγέννησης για την *M. truncatula*, ξεκίνησε η μεταλλαξιγένεση ένθεσης στην R108 σειρά της *M. truncatula* χρησιμοποιώντας το LTR retrotransposon *Tnt1* του καπνού. Το *Tnt1* απομονώθηκε πρώτη φορά μετά από την μεταφορά του μέσα στο *NiaD* γονίδιο του καπνού. Είναι ένα αυτόνομο 5,3 kb μεγάλου μήκους αντιγραφής LTR στοιχείο που

δημιουργεί μια 5 hr επανάληψη πάνω στην ένθεση. Η Tnt1 μεταφορά επάχθηκε σε καλλιέργειες πρωτοπλαστών καπνού και κατά την διάρκεια του *in vitro* μετασχηματισμού του *A.thaliana*. Η ενσωμάτωσή του φαίνεται να είναι τυχαία καθώς δεν παρατηρήθηκε καμία εμφανής ιδιαιτερότητα τόπου και τα γονίδια ήταν συχνά στόχος. Οι ενθέσεις είναι σταθερές και στην πλειοψηφία των περιπτώσεων ασύνδετες ως αποτέλεσμα του κύκλου πολλαπλασιασμού των LTR retrotransposons. Ο αριθμός των Tnt1 ενθέσεων ποικίλει ανάμεσα σε τέσσερα και πάνω από 30 ανά διπλοειδές γονιδίωμα της *M.truncatula*. Το Tnt1 αντιγράφεται σε διαφορετικά επίπεδα σε διαφορετικά όργανα της *M.truncatula* (άνθη, φύλλα και ρίζες). Το επίπεδο αντιγραφής είναι υψηλότερο στις ρίζες από τα ώριμα φύλλα και χαμηλότερο στα νεαρά φύλλα και τα άνθη. Αυτά τα δεδομένα συσχετίζονται με την έκφραση του Tnt1 που παρατηρήθηκε στον αυθεντικό του ξενιστή τον καπνό ή σε ετερόλογους ξενιστές όπως το *Araridopsis* και η τομάτα. Όλα αυτά τα χαρακτηριστικά κάνουν το Tnt1 έναν καλό ανταγωνιστή για μεταλλαξιγέννεση ένθεσης σε άλλα φυτά (D'Erfurth et al., 2003).

1.3.2 Αποτελέσματα μεταλλαξιγέννεσης με το Tnt1 μετά από διάφορες μελέτες.

Από διάφορες μελέτες με το μεταθετό στοιχείο, έχουν εξαχθεί τα παρακάτω στοιχεία:

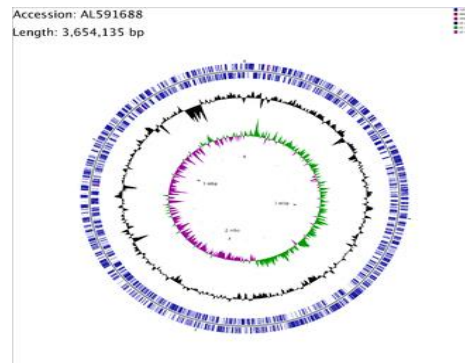
(D'Erfurth et al., 2003)

- Το Tnt1 μεταφέρεται νωρίς κατά τη διάρκεια του *in vitro* μετασχηματισμού της *M.truncatula*.
- Στα αναγεννημένα φυτά της *M.truncatula*, το Tnt1 εκφράζεται αλλά δεν μεταφέρεται πια.
- Το Tnt1 μεταφέρεται αποτελεσματικά σε κωδικοποιούσες περιοχές.
- Οι Tnt1 ενθέσεις είναι γενετικά ανεξάρτητες και ακολουθούν τον μενδελιανό διαχωρισμό.
- Η μεταφορά του Tnt1 μπορεί να επαναενεργοποιηθεί με *in vitro* καλλιέργεια.
- Το Tnt1 εκφράζεται στην σειρά της *M.truncatula* Jemalong J5.

1.4 Το βακτήριο *Sinorhizobium meliloti*

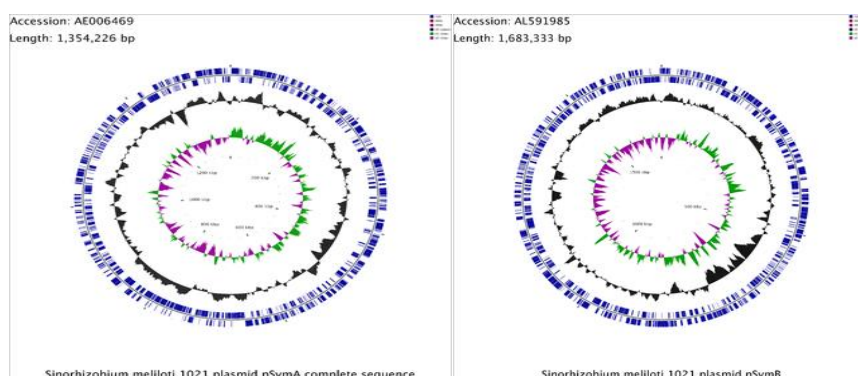
Πρόκειται για το βακτήριο που χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία συμβιωτικής σχέσης με το φυτό *M.truncatula*. Συγκεκριμένα :

- Γένος → *Sinorhizobium*
- Είδος → *Sinorhizobium meliloti*
- Στέλεχος → 1021



Εικόνα 8: Το Χρωμόσωμα του *S.meliloti* 1021

Το *S.meliloti* είναι ένα κοινό βακτήριο του εδάφους που ζει συμβιωτικά στις ρίζες των φυτών. Το *S.meliloti*, παλαιότερα γνωστό ως *Rhizobium meliloti*, είναι αρνητικά κατά Gram βακτήριο εδάφους και ριζόσφαιρας. Μελετάται αρκετά εξαιτίας της σημαντικής ικανότητας του, που είναι η αζωτοδέσμευση, πράγμα το οποίο επιτυγχάνεται λόγω του σχηματισμού των φυματίων στο ριζικό σύστημα των φυτών *Medicago*, *Melilotus* και *Trigonella*, συμπεριλαμβανομένων του φυτού-μοντέλου *M.truncatula*. Το γονιδίωμα του περιέχει τρία ρεπλικόνια: ένα χρωμόσωμα (3,65 Mb) και δύο μέγα πλασμίδια, *pSymA* (1.35Mb) και *pSymB* (1,68Mb). Το συγκεκριμένο στέλεχος έχει μεταλλαχθεί ώστε να εκφράζει το γονίδιο *lacZ* της β-γαλακτοσιδάσης.

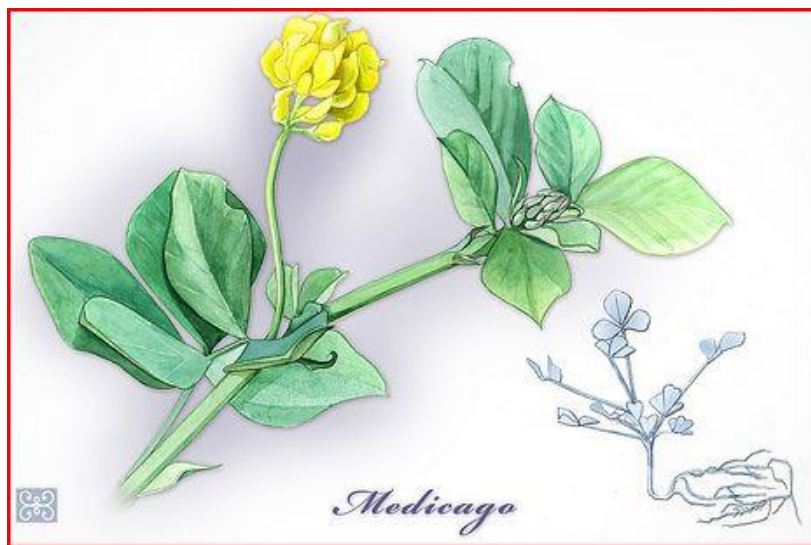


Εικόνα 9: Α. Πλασμίδιο *pSymA* του *S.meliloti* 1021, Β. Πλασμίδιο *pSymB* του *S.meliloti* 1021

1.5 Η *Medicago truncatula* σαν φυτό-μοντέλο.

1.5.1 Γενικά

Βασίλειο:	Plantae
Διαίρεση:	Magnoliophyta
Κλάση:	Magnoliopsida
Σειρά:	Fabales
Οικογένεια:	Fabaceae
Υποοικογένεια:	Faboideae
Φύλλο:	Trifolieae
Γένος:	<i>Medicago</i>
Είδος:	<i>M. truncatula</i>



Το *M. truncatula* είναι ένα ψυχανθές, άμεσα συσχετιζόμενο με τη *M. sativa* (Alfalfa, ΑΑ). Η καταγωγή του είναι από τη Μεσογειακή λεκάνη και τώρα καλλιεργείται σε ετήσια βάση, κυρίως στην Αυστραλία. Λόγω του ότι είναι ψυχανθές χειμερινής περιόδου, σχετίζεται με σημαντικές καλλιέργειες όπως είναι ο λευκό και το κόκκινο τριφύλλι (*Trifolium pratense* και *T. repens* αντίστοιχα), ο αρακάς (*Pisum sativum*), το ρεβίθι (*C. Arietinum*), η φακή (*Lens culinaris*), και το ευρέως διαδεδομένο φασόλι-φάβα (*V. Faba*). Επίσης, η *M. truncatula* είναι φυλογενετικά κοντά με το *Lotus*

japonicus καθώς και με τη σόγια (*Glycine max*) και με το κοινό φασόλι (*Phaseolus vulgaris*). Το έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον ως προς το *M. truncatula* ξεκίνησε με την μελέτη για τις συμβιωτικές σχέσεις που αναπτύσσει με το *Sinorhizobium meliloti* στις αρχές του 1990.

Ο στόχος της έρευνας για το *M. truncatula* αργότερα επεκτάθηκε στην μελέτη της μυκκοριζικής συμβίωσης, της ριζικής ανάπτυξης, του δευτερογενούς μεταβολισμού, της ανθεκτικότητας στις ασθένειες, και τελευταία στην γενωμική, τρανσκριπτιωμική, πρωτεωμική και μεταβολωμική. Ανάμεσα στους πολλούς λόγους για τους οποίους η *M. truncatula* επιλέχθηκε σαν ψυχανθές μοντέλο είναι το μέτριου μεγέθους γονιδίωμα της των 500-550 εκατομμυρίων ζευγών βάσεων (Mbs), το γεγονός ότι είναι διπλοειδές φυτό, το ότι μεσολαβεί μικρό χρονικό διάστημα από τη μια σποριογένεση ως την επόμενη, το ότι γίνεται εύκολα ανασυνδυασμός καθώς και οι μεταλλαγμένοι πληθυσμοί και η ποικιλότητα των οικοτόπων που αναπτύσσεται (Young and Udvardi et al., 2009).

2 Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Προβλάστηση σπόρων *M. truncatula*.

1. Αφαίρεση των σπόρων από τους χέδρωπες (rods).
2. Προσθήκη 5ml θειικού οξέως (H_2SO_4) για 10min. Το στάδιο αυτό πραγματοποιείται για την διάρρηξη του εξωτερικού τοιχώματος των σπόρων έτσι ώστε να διευκολυνθεί η βλάστηση.
3. Αφαίρεση του H_2SO_4 και ξέπλυμα των σπόρων με κρύο νερό πέντε φορές.
4. Προσθήκη διαλύματος χλωρίνης 3% για 1,5-2min.
5. Ξέπλυμα της χλωρίνης με κρύο νερό δέκα φορές.
6. Τοποθέτηση των σπόρων σε τρυβλία με άγαρ 0,8% w/v
7. Τοποθέτηση των τρυβλίων με τους σπόρους ανάποδα στους 4°C για περίπου 18 ώρες.
8. Μεταφορά των τρυβλίων στους 20°C σε σκοτεινό περιβάλλον.

2.2 Προετοιμασία ριζόβιων για εμβολιασμό των φυτών.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το *S.meliloti* 1021 lacZ. Το στέλεχος αυτό έχει μεταλλαχθεί ώστε να εκφράζει το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης. Τα ριζόβια αναπτύσσονται σε θρεπτικό ΥΜΒ με 8.5 μ gr/ml τετρακυκλίνης, στους 30°C για 2 μέρες

2.3 Μεταφορά σπόρων και ανάπτυξη φυτών.

1. Μεταφορά των σπόρων που έχουν βλαστήσει σε αποστειρωμένη και βρεγμένη άμμο και περλίτη, τοποθετώντας το ριζίδιο προς τα κάτω.
2. Εμβολιασμός των φυτών με 1ml καλλιέργειας SM1021, οπτικής πυκνότητας 0.1
3. Κάλυψη σπόρων.
4. Μεταφορά σε θάλαμο με 18 ώρες φώς, 6 ώρες σκοτάδι και θερμοκρασία 22°C. Για την άνθηση, και κατά συνέπεια για την σποριογένεση, ήταν απαραίτητο να προστεθεί και το κόκκινο φώς έτσι ώστε να ωθηθεί η διαδικασία

5. Πότισμα ανά 2-3 μέρες με διάλυμα B&D Low nitrogen(ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β) και dH₂O εναλλάξ.
6. Μετά από τέσσερις εβδομάδες γίνεται μεταφύτευση σε χώμα. Πότισμα με dH₂O και με διάλυμα B&D Full nitrogen(ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β).

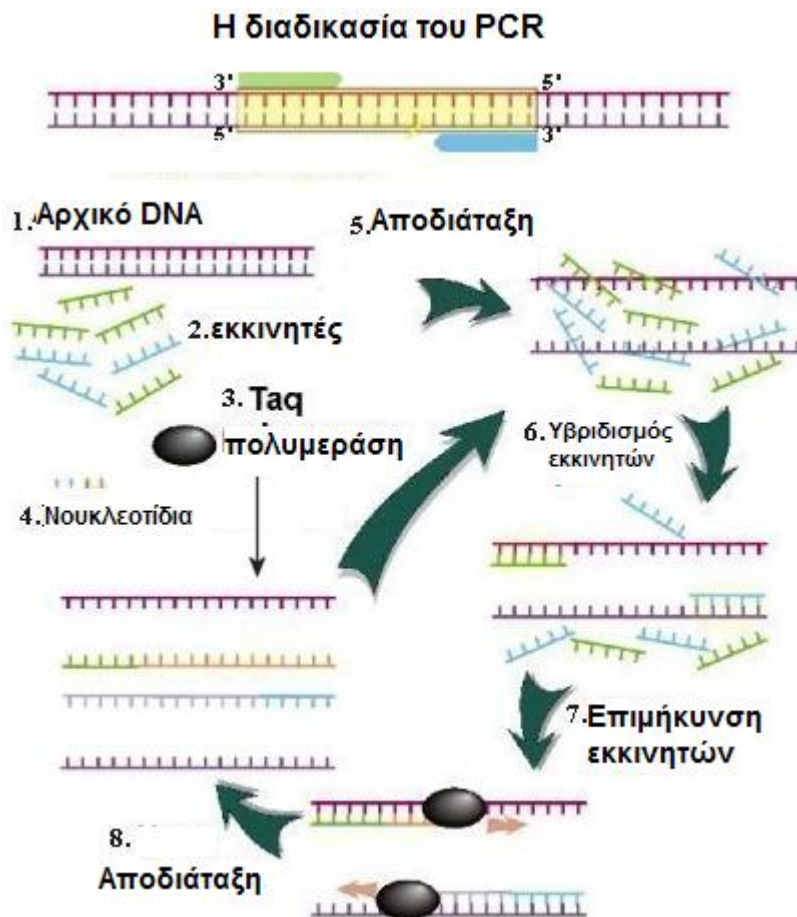
2.4 Απομόνωση γενωματικού DNA από φυτικούς οργανισμούς.

1. Συλλέγουμε ένα φύλλο από κάθε φυτό σε erpendorf
2. Προσθέτουμε 250μl Homogenization Buffer(H.B)
3. Λειοτριβούμε και προσθέτουμε άλλα 250μl H.B και ομογενοποιούμε
4. Αφήνουμε τα δείγματα στους 65⁰C σε υδατόλουτρο για 5 λεπτά
5. Προσθέτουμε 500 μl χλωροφόρμιο ανακατεύουμε με vortex
6. Φυγοκεντρούμε τα δείγματα για 7 λεπτά στις 13.000 στρ/λεπτό
7. Συλλέγουμε 400μl από το υπερκείμενο σε νέο erpendorf και προσθέτουμε 300μl ισοπροπανόλη
8. Ανακινούμε και το αφήνουμε για 10 λεπτά στους -20⁰C
9. Φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά στις 13000στρ/λεπτο στους 4⁰C
10. Πετάμε το υπερκείμενο και ξεπλένουμε το ίζημα με 300μl 75% αιθανόλη
11. Φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά στις 13000στρ/λεπτο στους 4⁰C
12. Πετάμε το υπερκείμενο και αφήνουμε να στεγνώσουν τα δείγματα
13. Επαναδιαλύουμε σε 25 μl TE.

2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η τεχνική αυτή (Mullis, K. et al., 1986 , Mullis, K. and Faloona, F., 1987) αποτελεί την πλέον εξειδικευμένη και ευαίσθητη μέθοδο ενίσχυσης ακολουθιών DNA και RNA, *in vitro* ή και *in situ*. Η βασική αρχή της PCR βασίζεται σε συγκεκριμένα χαρακτηριστικά της αντιγραφής του DNA: Το εκμαγείο του DNA αρχικά αποδιατάσσεται σε θερμοκρασία 94⁰C σε δύο μονόκλωνες αλυσίδες. Δύο μονόκλωνα ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές), τα οποία καθορίζουν τα σημεία έναρξης της αντιγραφής, υβριδίζονται με το εκμαγείο, ένα με κάθε αλυσίδα. Ακολούθως, μια DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί ως μήτρα το μονόκλωνο DNA για τη σύνθεση μιας καινούργιας συμπληρωματικής αλυσίδας κατά την κατεύθυνση 5'-3', ξεκινώντας από το τμήμα του μορίου που είναι δίκλωνο. Για τη σύνθεση αυτή απαραίτητη είναι η παρουσία μίγματος νουκλεοτιδίων και ιόντων Mg⁺². Χρησιμοποιείται μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση. Στη συνέχεια, οι αρχικές αλυσίδες, καθώς και οι νεοσυντιθέμενες, αφού πρώτα

αποδιαταχθούν με θέρμανση στους 94°C , μπορούν να χρησιμεύσουν ξανά ως μήτρες αντιγραφής όπου θα υβριδιστούν οι εκκινητές. Εάν αυτός ο κύκλος επαναληφθεί n φορές, τότε το τελικό αποτέλεσμα θα είναι η σύνθεση $2n$ δίκλωνων μορίων DNA που αποτελούν αντίγραφα της αλληλουχίας ανάμεσα από τους εκκινητές και περιέχουν τις αλληλουχίες των εκκινητών στα άκρα τους. Η εκθετική αυτή συσσώρευση των προϊόντων της αντίδρασης πραγματοποιείται εφ' όσον δεν υφίστανται περιοριστικοί παράγοντες, όπως η έλλειψη νουκλεοτιδίων και εκκινητών και η παραγωγή παρεμποδιστών της πολυμεράσης. Η εξειδίκευση του προϊόντος εξαρτάται κυρίως από τη θερμοκρασία υβριδισμού των και από τη εξειδίκευση των θέσεων υβριδισμού των συγκεκριμένων εκκινητών στη μήτρα του DNA.



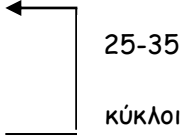
Εικόνα 9 Σχηματική απεικόνιση των βημάτων της διαδικασίας του PCR.

Οι ακριβείς συνθήκες πραγματοποίησεως μιας τυπικής αντίδρασης PCR προσαρμόζονται κάθε φορά στις απαιτήσεις του συγκεκριμένου πειράματος. Συγκεκριμένα, η ποσότητα της μήτρας DNA, που προστίθεται κάθε φορά, εξαρτάται από το είδος του. Έτσι, στην περίπτωση γενωματικού DNA χρησιμοποιείται ποσότητα ίση με 1μg, ενώ για πλασμιδιακό DNA αρκούν 10-100 ng. Επίσης, η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών εξαρτάται κάθε φορά από τη θερμοκρασία τήξεώς τους (T_m). Η αντίδραση PCR πραγματοποιείται ως εξής:

Σε ειδικό σωλήνα erpendorf (500 ή 100 μl) προστίθενται:

μήτρα DNA	1 μl
εκκινητής ευθείας κατεύθυνσης Forward (10 μM)	1,5 μl
εκκινητής αντίστροφης κατεύθυνσης Reverse (10 μM)	1,5 μl
μίγμα dNTPs (10 mM το καθένα)	1 μl
10X PCR ρυθμιστικό διάλυμα	5 μl
Taq DNA πολυμεράση (2 μονάδες/μl)	0,5 μl
ddH ₂ O	έως τελικό όγκο 50 μl

Οι συνθήκες πραγματοποίησης της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης είναι:

Αρχική αποδιάταξη	94 ⁰ C για 2-4 λεπτά	
Αποδιάταξη	94 ⁰ C για 1 λεπτό	
Υβριδισμός εκκινητών	45-65 ⁰ C για 1 λεπτό	
Επιμήκυνση	72 ⁰ C για 1 λεπτό/1.3-15kb αναμενόμενου προϊόντος	
Τελική επιμήκυνση	72 ⁰ C για 5-10 λεπτά	

1.1 Ανάλυση Νουκλεϊκών Οξέων

1.1.1 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων

Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των νουκλεϊνικών οξέων σε υδατικό διάλυμα τους γίνεται φωτομετρικά.

Ποσότητα από το δείγμα (συνήθως 1μl) μεταφέρεται σε σωλήνα erpendorf όπου αραιώνεται με νερό σε αναλογία 1:100.

Η αραιώση τοποθετείται σε ειδική κυβέτα χαλαζία και προσδιορίζεται η οπτική πυκνότητα του δείγματος σε μήκη κύματος 240, 260 και 280nm.

Σε υδατικά διαλύματα νουκλεϊνικών οξέων χωρίς την παρουσία άλλων προσμίξεων, όπως πρωτεΐνες και πολυσακχαρίδια, η συγκέντρωση των νουκλεϊνικών οξέων δίνεται από την εξίσωση:

$$D \times OD_{260} \times \text{συντελεστής αραιώσης}$$

όπου OD_{260} η οπτική πυκνότητα του δείγματος στα 260 nm.

Το D αποτελεί τη σταθερά που εξαρτάται από το είδος του νουκλεϊνικού οξέως που 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 ολιγονουκλεοτιδίων η D ισούται με 30 mg/ml.

Για την εκτίμηση της καθαρότητας ενός δείγματος νουκλεϊνικών οξέων υπολογίζεται ο λόγος OD_{260}/OD_{280} και OD_{240}/OD_{260} . Όταν οι τιμές τους είναι 1,8-2,0 και 0,5 αντίστοιχα τότε το μίγμα θεωρείται ικανοποιητικής καθαρότητας.

1.1.2 Ανάλυση δεσοξυριβοζονουκλεϊνικών οξέων (DNA) σε πηκτή αγαρόζης

Ο διαχωρισμός των δεσοξυριβονουκλεϊνικών οξέων γίνεται με βάση το μέγεθος και τη διαμόρφωσή τους με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Στην

περίπτωση διαχωρισμού γραμμικών μορίων DNA, ο διαχωρισμός είναι ανάλογος του μεγέθους τους. Το εύρος μεγεθών που μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτή αγαρόζης εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης και κυμαίνεται από 0,1 έως 100Kb. Στον πίνακα 3 αναφέρονται οι τυπικές συγκεντρώσεις αγαρόζης ανάλογα με το επιθυμητό εύρος διαχωρισμού.

Τα μόρια του DNA γίνονται ορατά με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός. Η προετοιμασία της πηκτής αγαρόζης γίνεται ως εξής:

- Κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης αναμειγνύεται σε κωνική φιάλη με ορισμένο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης 1xTAE και θερμαίνεται σταδιακά σε φούρνο μικροκυμάτων έως ότου η αγαρόζη διαλυθεί εντελώς.
- Η θερμοκρασία του διαλύματος αφήνεται να πέσει έως τους 60⁰C και αφού προστεθεί διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου 0,001% v/v, αφήνεται να στερεοποιηθεί σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης. Στην συσκευή προσαρμόζεται η κατάλληλη "χτένα" έτσι ώστε να σχηματιστούν στην πηκτή τα βοηθία φόρτωσης.
- Η "χτένα" απομακρύνεται από την πηκτή. Η συσκευή γεμίζεται με διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1xTAE10έτσι ώστε η πηκτή να παραμένει βυθισμένη 1-2 mm από την επιφάνεια του.
- Τα δείγματα των νουκλεοξέων, αφού αναμιχθούν με ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης τοποθετούνται στις εγκοπές της πηκτής.
- Τα δείγματα αναλύονται σε ηλεκτρικό πεδίο εντάσεως που δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 5 V/cm⁻¹.

Αγαρόζη (%)	Εύρος διαχωρισμού γραμμικών μορίων DNA (Kb)
0,3	1,0-70
0,5	0,7-45
0,8	0,4-20
1,0	0,3-10
1,2	0,2-8
1,5	0,2-6
2,0	0,1-5

Συγκέντρωση αγαρόζης ανάλογα με το επιθυμητό εύρος διαχωρισμού.

2.6 Μεταβολωμική

2.6.1 Γενικά

Μεταβολωμική ορίζεται ως η μεγάλης κλίμακας ποιοτική και ποσοτική μελέτη ενός δοθέντος βιολογικού συστήματος. Αντίθετα με τα μεταγραφήματα και της πρωτεΐνες, η μοριακή ταυτότητα δεν μπορεί να συναχθεί από γενωμικές πληροφορίες. Έτσι η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση πρέπει να βασιστεί σε εξελιγμένα όργανα όπως η φασματογραφία μάζας (mass spectrometry, MS), ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (nuclear magnetic resonance, NMR) και ανίχνευση επαγόμενου από laser φθορισμού (laser induced fluorescence, LIF). Κάθε μια από αυτές της τεχνολογίες έχει τα δικά της πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Η βέλτιστη επιλογή μιας συγκεκριμένης τεχνολογίας εξαρτάται από τον στόχο μιας μελέτης και είναι συνήθως ένας συμβιβασμός μεταξύ ευαισθησίας, επιλεκτικότητας και ταχύτητας.

Το NMR είναι πολύ επιλεκτικό, μη καταστρεπτικό και γενικά αποδεκτό ως το χρυσό πρότυπο για την αποσαφήνιση των μεταβολικών δομών, αλλά παρουσιάζει χαμηλή ευαισθησία. Το LIF είναι μια από τις πιο ευαίσθητες τεχνικές, αλλά στερείται χημική ευαισθησία το οποίο είναι κρίσιμο στην δομική ταυτοποίηση. Εν αντιθέσει, η φασματογραφία μάζας προσφέρει έναν καλό συνδυασμό μεταξύ ευαισθησίας και επιλεκτικότητας. Τα πρόσφατα MS προσφέρουν υψηλά εξειδικευμένες χημικές πληροφορίες που σχετίζονται άμεσα με την χημική δομή όπως ακριβή μάζα, πρότυπο κατανομής ισοτόπων για καθορισμό χημικού τύπου και χαρακτηριστικά ιοντικά θραύσματα για δομική αναγνώριση.

2.6.2 Ο συνδυασμός χρωματογραφίας φασματογραφίας

Ο συνδυασμός χρωματογραφίας και φασματογραφίας μάζας προσφέρει μια εξαιρετική λύση για αναλύσεις σύνθετων μιγμάτων και έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα στην μεταβολωμική. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των μεταβολιτών πριν την φασματογραφική ανάλυση έχει πολλά πλεονεκτήματα: μείωση της επίδρασης της μήτρας και της ιοντικής καταστολής (matrix effects),

διαχωρισμός ισομέρων, προσφορά επιπλέον πληροφοριών και «ορθογώνιων» δεδομένων και επιτρέπει πιο ακριβή ποσοτικοποίηση ξεχωριστών μεταβολιτών. Επί του παρόντος τρεις κυρίαρχες χρωματογραφικές τεχνικές έχουν ενσωματωθεί, βασισμένες στην φασματογραφία μάζας, στην μεταβολωμική, και αυτές είναι: η αέρια χρωματογραφία (GC), η υγρή χρωματογραφία (LC) και η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (CE).

2.6.3 Αέρια χρωματογραφία

Η διαδικασία της αέριας χρωματογραφίας περιλαμβάνει την εξάτμιση ενός δείγματος και η σάρωσή του μέσα από μία στήλη με ένα κινούμενο ρεύμα αερίου που είναι η κινούμενη φάση. Το δείγμα εισάγεται στην είσοδο έγχυσης. Το πιο συνηθισμένο είδος ανάλυσης περιλαμβάνει την έγχυση 1 ως 3 μικρολίτρων σε μία θερμαινόμενη είσοδο είτε χειροκίνητα είτε αυτόματα. Η είσοδος έγχυσης είναι διασυνδεδεμένη με τη στήλη όπου γίνεται η πραγματική διαχώριση των συστατικών. Στις περισσότερες περιπτώσεις τριχοειδής στήλες χρησιμοποιούνται για την καλύτερη διαχώριση. Το μειονέκτημα σε τέτοιες στήλες είναι ότι έχουν μειωμένη «χωρητικότητα». Με άλλα λόγια ένα μικρό μέρος του δείγματος διαχωρίζεται κάθε φορά. Έτσι, μία θυρίδα διαχωρισμού (split injection port) χρησιμοποιείται συχνά για να επιτρέπει μόνο ένα κλάσμα του όγκου δείγματος να περνά στην στήλη. Τα τοιχώματα της στήλης είναι επικαλυμμένα με ένα πορώδες υλικό ή με ένα ιξώδες υγρό. Αυτή η εσωτερική επικάλυψη αλληλεπιδρά διαφορετικά με τα διάφορα διαλυμένα μόρια. Έτσι, όποια αλληλεπιδρούν έντονα με την στατική φάση επιβραδύνονται περισσότερο ενώ όποια όχι λιγότερο. Επειδή λοιπόν τα μόρια έχουν διαφορετική κινητικότητα μέσα στην στήλη εξέρχονται από αυτήν σε διαφορετικούς χρόνους (retention time, RT).

Το επόμενο βήμα για την εισαγωγή των μορίων σε έναν φασματογράφο μάζας είναι ο ιονισμός των μορίων που γίνεται συνήθως είτε με βομβαρδισμό ηλεκτρονίων είτε ηπιότερα με τον χημικό ιονισμό των μορίων. (M.J. Van Sant, Prentice Hall, 1997)(Skoog, Holler, Nieman, Saunders College Publishing, 1998)

2.6.4 Τετραπολικός φασματογράφος μάζας

Σε έναν τετραπολικό φασματογράφο μάζας μια ομάδα από τέσσερις ράβδους τοποθετούνται παράλληλα προς την κατεύθυνση της δέσμης ιόντων. Οι ράβδοι πρέπει να είναι υπερβολική, παρότι κυλινδρικοί ράβδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Μια συνεχής τάση ρεύματος και μια ραδιοσυχνότητα (RF) εφαρμόζονται στους ράβδους παράγοντας ένα ταλαντώμενο ηλεκτροστατικό πεδίο στην περιοχή μεταξύ των ράβδων. Εξαρτώμενο από την αναλογία τη ραδιοσυχνότητας και της τάσης του ρεύματος, τα ιόντα αποκτούν μια ταλάντωση σε αυτό το ηλεκτροστατικό πεδίο. Ιόντα με μια ανακριβή αναλογία m/z (πολύ μικρά ή

πού μεγάλα) αποκτούν μία ασταθή ταλάντωση. Το πλάτος της ταλάντωσης συνεχίζει να αυξάνει μέχρι που το σωματίδιο προσκρούει σε μια από τις ράβδους. Ιόντα με την σωστή αναλογία μάζας προς φορτίο αποκτούν μια σταθερή ταλάντωση σταθερού πλάτους και ταξιδεύουν ανάμεσα από τον τετραπολικό άξονα με μια σπειρωειδή τροχιά. Αυτά τα ιόντα δεν προσκρούν στις ράβδους αλλά περνούν μέσα από τον αναλυτή φθάνοντας στον ανιχνευτή. (Introduction to Spectroscopy By Donald L. Pavia)

Για την αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιήθηκε η Agilent Technologies 7890A GC System και για την φασματογραφία μάζας η Agilent Technologies 5975C Inert XL E1/C1.

Τα χρωματογραφήματα αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα AMDIS και οι μεταβολίτες αναγνωρίστηκαν χρησιμοποιώντας τις βάσεις δεδομένων Golm και Feihn.

2.6.5 Εκχύλιση μεταβολιτών

- Λιοτριβούμε τον φυτικό υλικό με υγρό άζωτο
- Σε 20 mg φυτικού υλικού προσθέτουμε 395 μl μεθανολη και 5 μl ριβιτόλη (1mg/ml)
- Επιάζουμε για 15 λεπτά στους 70⁰C με συνεχή ανακίνηση
- Προσθέτουμε 200μl χλωροφόρμιο και κάνουμε vortex
- Το αφήνουμε για 5 λεπτά στους 37⁰C σε συνεχή ανακίνηση
- Προσθέτουμε 400 μl ddH₂O και κάνουμε vortex
- Φυγοκεντρούμε στις 13000στρ/λεπτο για 5 λεπτά
- Παίρνουμε από την υπερκείμενη φάση κλάσματα των 250 μl σε νέα erpendorf
- Τέλος εξατμίζουμε τα δείγματα σε αέριο άζωτο

Παράρτημα Α

Α. Διαλύματα για απομόνωση φυτικού DNA

Homogenization Buffer	TE x 1 (10:1)
100mM Tris HCL pH 8.0	Tris HCL 100mM (pH 7.6)
20mM EDTA	EDTA 10 mM
2% CTAB	
2% PVP-40	
1.42 M NaCl	
0.6% mercaptoethanol	

Β. Διαλύματα ανάλυσης νουκλεϊκών οξέων

50 X TAE	1L	0.5L
Tris Base	242g	121g
Glacial Acetic acid	57.1ml	28.6ml
0.5M EDTA (8.0)	100 ml	50 ml

Παράρτημα Β

ΣΥΝΘΕΣΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΠΟΤΙΣΜΑΤΟΣ

Διάλυμα Β&D

stock διαλύματα	Stock διαλύματα Συγκέντρωση	ml/lt Διαλύματα χρήσης
Microelements	-	1ml
K₂SO₄	0,1 M	0,5ml
KH₂PO₄	1 M	0,5ml
MgSO₄ 7H₂O	1 M	0,25ml
CaCl₂	0,1 M	10ml
Ferric citrate	10 mM	1ml
Low nitrogen		
KNO₃	1 M	0,5ml
Full nitrogen		
KNO₃	1 M	5ml
NH₄NO₃	1 M	1ml

Παράρτημα Γ**ΣΥΝΘΕΣΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΡΙΖΟΒΙΩΝ****Διάλυμα YMB για επίστρωση τρυβλίων**

YMB	200ml
Μαννιτόλη	2gr
K₂HPO₄	0,1gr
MgSO₄ 7H₂O	0,04gr
NaCl	0,02gr
Yeast extract	0,1gr

*Πρόσθεση 1,5% άγαρ.

3 Αποτελέσματα

3.1 Σκοπός της μελέτης

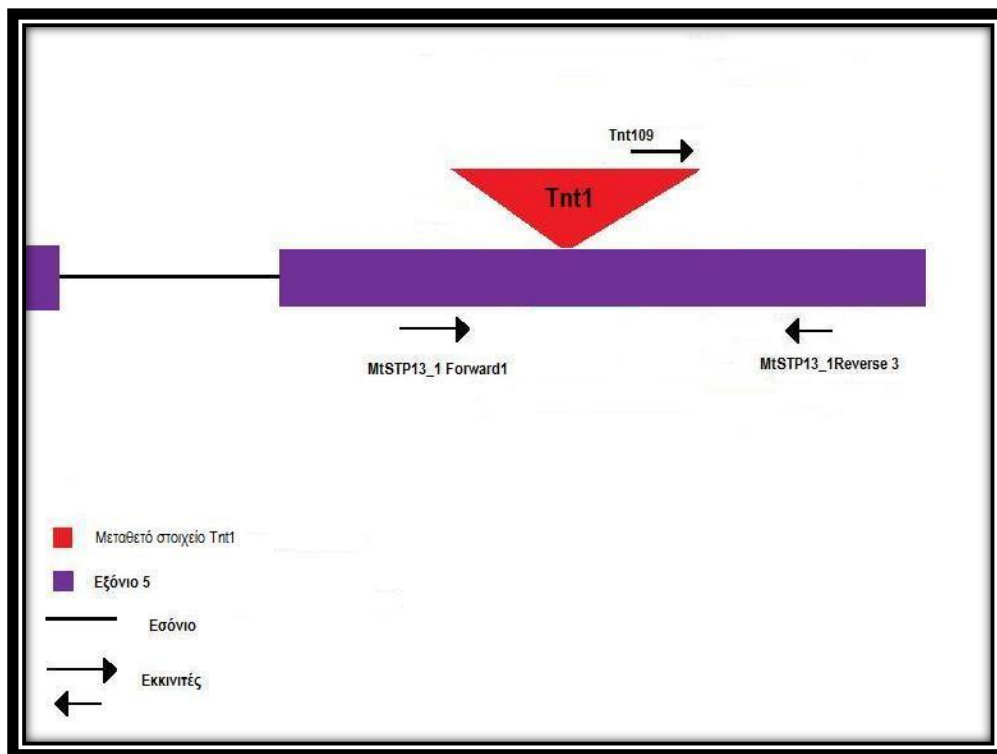
Σκοπός της παρούσης εργασίας είναι η φαινοτυπική και μεταβολωμική μελέτη φυματίων από μεταλλαγμένα φυτά *M. truncantula*, με ένθεση του μεταθετού στοιχείου Tnt1 στο γονίδιο *MtStp13.1* που κωδικοποιεί για μεταφορέα εξοζών, στην αζωτοδεσμευτική τους σχέση με το ριζόβιο βακτήριο *S. meliloti*.

3.2 Ανάπτυξη φυτών

Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν σπόροι οι οποίοι παραλήφθηκαν από το ινστιτούτο The Samuel Roberts Noble Foundation (Ardmore, Oklahoma, USA). Η επιλογή τους έγινε με βάση τις απαιτήσεις του πειράματος. Δηλαδή να εμπεριέχεται στο γονιδίωμα τους ένθεση στο επιθυμητό γονίδιο. Επιλέχθηκαν έτσι δύο σειρές η NF3151B και η NF3948 από τους οποίους πάρθηκαν 30 σπόροι NF3151B πρώτης γενεάς (r1) 100 NF3948 και 7 NF3151B δεύτερης γενεάς (r2). Στους σπόρους αυτούς οι οποίοι ήταν τόσο σπόροι πρώτης γενιάς (σπόροι Noble) όσο και σπόροι δεύτερης γενεάς έγινε προβλάστηση σπόρων και φυτεύτηκαν σε αποστειρωμένο υπόστρωμα από 1:1 αναλογία άμμου περλίτη. Τα φυτά εμβολιάστηκαν με υγρή καλλιέργεια YMB με το ριζόβιο βακτήριο *S. meliloti* την πρώτη και την έβδομη μέρα από την φύτευσή τους. Στην συνέχεια τα φυτά αναπτύχθηκαν για έξι εβδομάδες σε θάλαμο με 18 ώρες φώς και 6 ώρες σκοτάδι στους 22⁰C. Από το σύνολο των φυτών 6 φυτά δεν προβλάστησαν ενώ φυτεύτηκαν και 20 φυτά αγρίου τύπου R108.

3.3 Γονοτύπιση φυτών

Κατά την διάρκεια της ανάπτυξης των φυτών έγινε γονοτύπιση των φυτών για να βρεθεί αν η ένθεση στα φυτά βρίσκεται σε ομοζυγωτία ετεροζυγωτία ή απουσιάζει εντελώς. Για το λόγο αυτό έγινε απομόνωση DNA από φύλλα των φυτών το οποίο χρησιμοποιήθηκε σε αντίδραση PCR με τα εξής ζεύγη εκκινητών: **Forward1xReverse3** και **Reverse3xTnt109**. Το πρώτο ζεύγος εκκινητών υβριδίζει σε αντίθετη κατεύθυνση πριν και μετά από την ένθεση στο γονίδιο έτσι αν δεν υπάρχει η ένθεση θα λάβουμε προϊόν 782bp αν υπάρχει η ένθεση λόγω του μεγέθους της ένθεσης που παρεμβάλλεται ανάμεσα στους εκκινητές και στο πρόγραμμα PCR που επιλέξαμε δεν θα λάβουμε προϊόν, έτσι μπορούμε να ξεχωρίσουμε αν υπάρχουν αντίγραφα του γονιδίου που δεν έχουν την ένθεση. Εν αντιθέσει το δεύτερο ζεύγος εκκινητών υβριδίζει σε αντίθετη κατεύθυνση με το δεξί άκρο της ένθεσης Tnt109 με τον Reverse3 που υβριδίζει πάνω στο γονίδιο. Αν υπάρχει η ένθεση θα λάβουμε προϊόν 760bp ενώ αν δεν υπάρχει η ένθεση εξαιτίας του μη υβριδισμού του Tnt109 εκκινητή δεν θα λάβουμε προϊόν. Έτσι μπορούμε να ξεχωρίσουμε αν υπάρχουν αντίγραφα του γονιδίου που έχουν την ένθεση. Τέλος τα προϊόντα των αντιδράσεων ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζη.

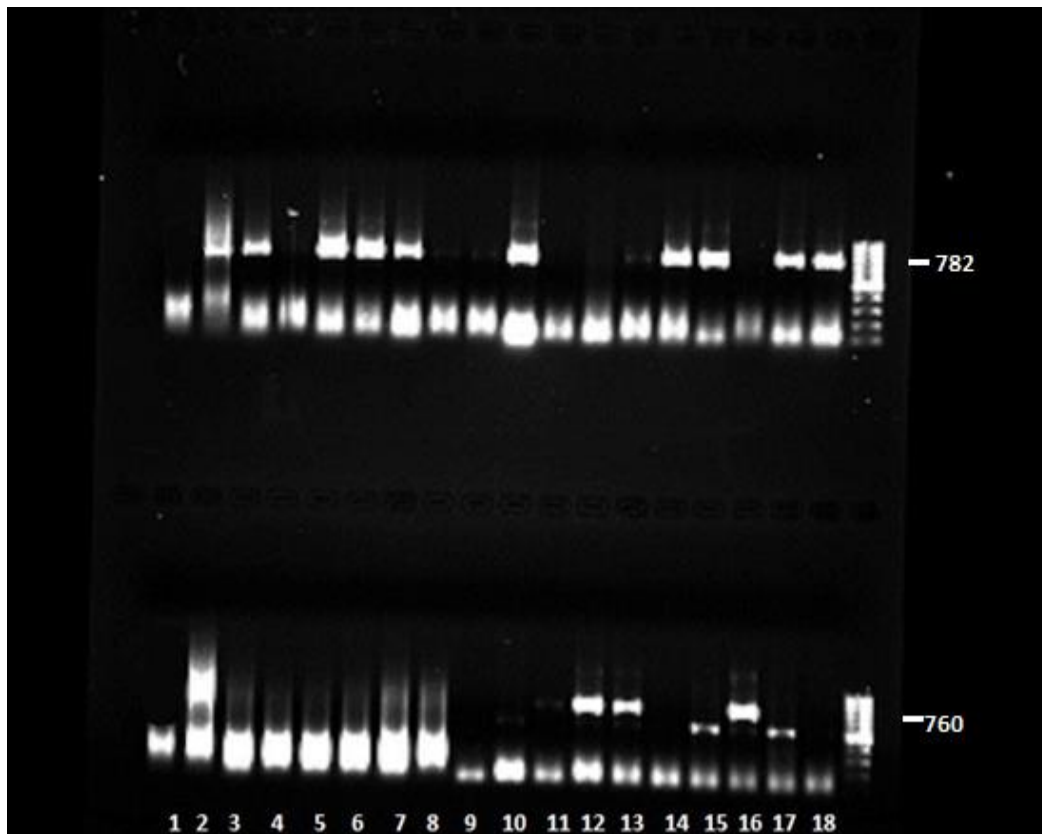


Εικόνα 10 Χάρτης του εξονίου 5 του γονιδίου *MtSTP13_1* και οι θέσεις υβριδισμού των εκκινητών στη σειρά NF3151B.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Αλληλουχία εκκινητών για πού χρησιμοποιήθηκαν για PCR

Forward 1	5'-GCGTTATTGGCTGGAGCCG-3'
Reverse 3	5'-AGCAGTGAAGAGGAAGTTGACAC-3'
Tnt 109	5'-GGTAGCATCGTCTTCTAGTTTGAATGC-3'

Από την παραπάνω διαδικασία προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα. Βρέθηκαν 6 ομοζυγωτά για την ένθεση, 5 ετεροζυγωτά, και 120 χωρίς καθόλου ένθεση στο συγκεκριμένο γονίδιο.



Εικόνα 11 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR από εκκίνητές Rev3xFw1(πάνω) και Tnt109xRev3(κάτω)

Από αυτά επιλέχθηκαν κάποια για φαινοτυπικές παρατηρήσεις των φυματίων και μεταβολωμική αυτών.

3.4 Φαινοτυπικές παρατηρήσεις

Οι φαινοτυπικές παρατηρήσεις που ακολούθησαν περιλαμβάνουν μακροσκοπικές παρατηρήσεις των φυτών τόσο του υπέργειου, όσο και του υπογείου τμήματος τους, με τη χρήση στερεοσκοπίου για την παρατήρηση φυματίων.

3.4.1 Μακροσκοπικές

Τα φυτά που επιλέχθηκαν για φαινοτυπική παρατήρηση από τη σειρά 3151B, ήταν ετεροζυγωτά, ομοζυγωτα ως προς την ένθεση καθώς και φυτά που δε φέρουν την ένθεση στο συγκεκριμένο γενετικό τόπο, όπως επίσης και φυτά αγρίου τύπου (R108), προκειμένου να υπάρχει συγκριτική μελέτη.



Εικόνα 5 NF3151B.15 : Ετεροζυγωτό για την ένθεση (Σύγκριση με R108)

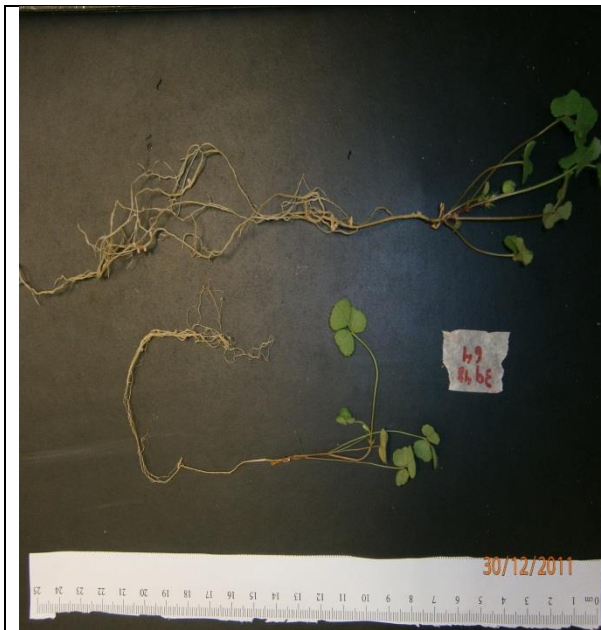
Εικόνα 12 NF3151B.1: Ομοζυγωτό για την ένθεση (Σύγκριση με R108)



Εικόνα 13 NF3151B.7: Ομοζυγωτό για γονότυπο αγρίου τύπου (Σύγκριση με R108)

Δεν υπάρχει καμία διαφορά μεταξύ των μεταλλαγμένων φυτών που δεν φέρουν την ένθεση και αυτών του αγρίου τύπου (R108). Αντίθετα, τα φυτά που φέρουν την ένθεση είτε σε ετεροζυγωτή είτε σε ομοζυγωτή κατάσταση είχαν μικρότερη ρίζα λιγότερα φυμάτια και μικρότερη εν γένει ευρωσσία. Επίσης, πρέπει να σημειωθεί ότι τα φυτά που είχαν την ένθεση σε ομοζυγωτή κατάσταση ανθοφορούσαν αλλά δεν έφταναν στο στάδιο της καρπόδεσης έκτος σπάνιων περιπτώσεων όπου δημιουργούνταν ο χέδρωπας αλλά οι σπόροι ήταν καταστρεμμένοι.

Στην σειρά NF3948 έγιναν φαινοτυπικές παρατηρήσεις σε φυτά που φέρουν την ένθεση σε έτεροζυγωτή κατάσταση καθώς και φυτά που δεν φέρουν την ένθεση. Από την σύγκριση που έγινε δεν φάνηκε κάποια αξιόλογη μεταβολή στα μακροσκοπικά χαρακτηριστικά των φυτών σε σχέση με αυτά του αγρίου τύπου.

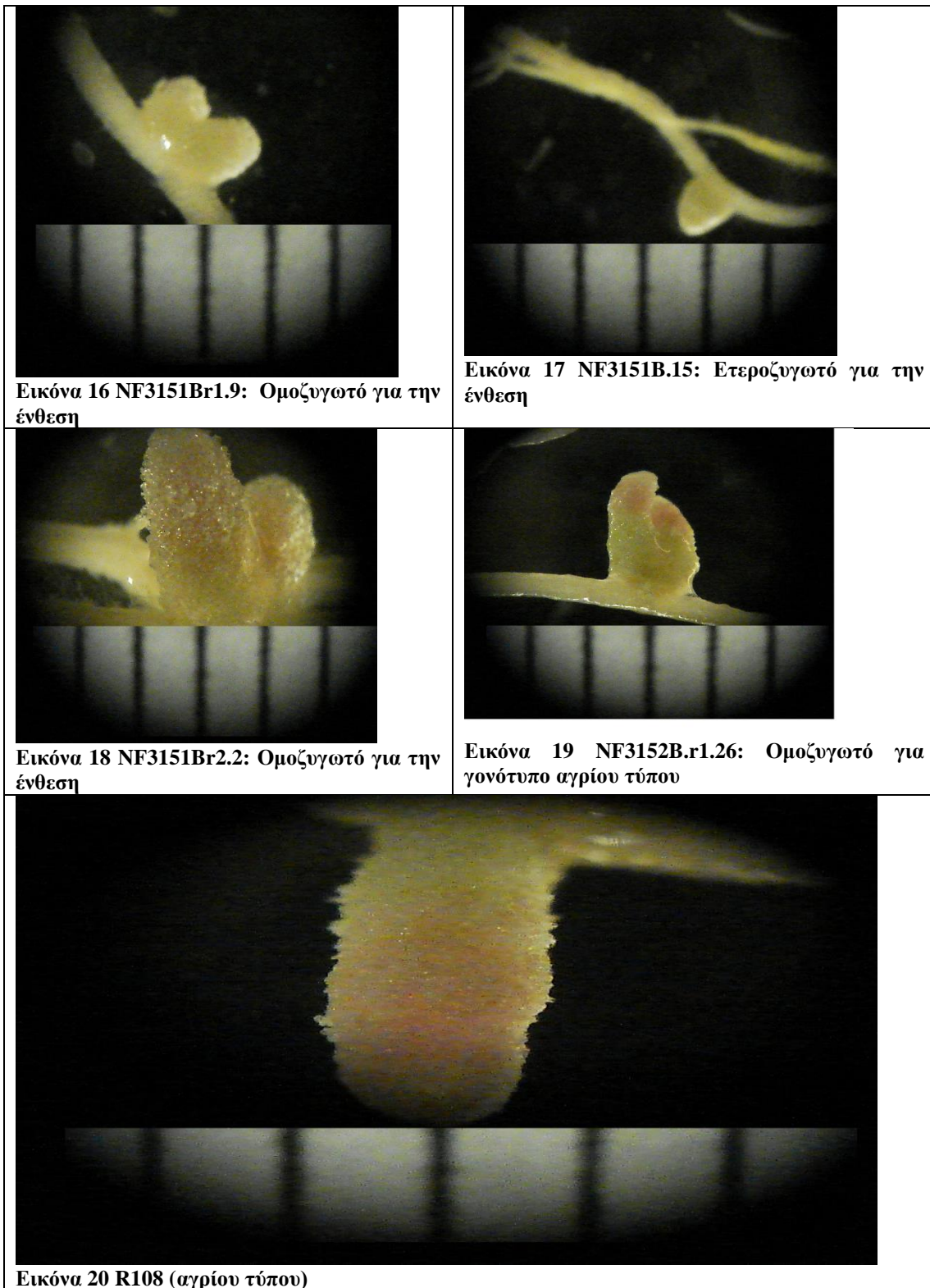


Εικόνα 14 NF3948.64: Ομοζυγωτό για γονότυπο αγρίου τύπου (Σύγκριση με R108)



Εικόνα 15 NF3948.99D: Ετεροζυγωτό για την ένθεση (Σύγκριση με R108)

3.4.2 Στερεοσκοπικές παρατηρήσεις

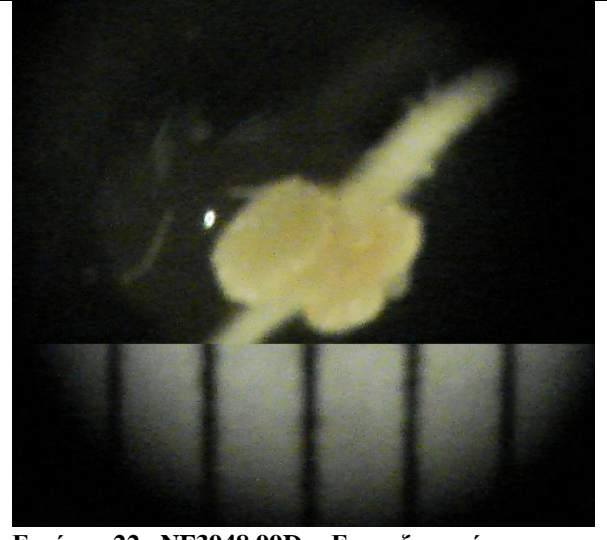


Στις στερεοσκοπικές παρατηρήσεις της σειράς NF3151B τα ομοζυγωτά για τον γονότυπο αγρίου τύπου δεν φάνηκαν να έχουν διαφορά με τα αγρίου τύπου

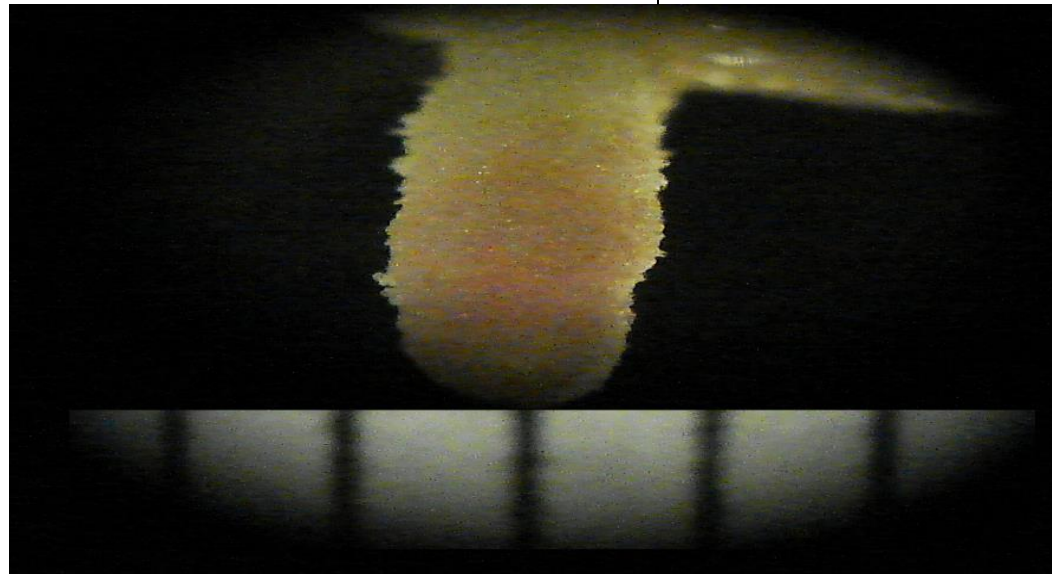
αντίθετα, τα ετεροζυγωτά και τα ομοζυγωτά για την ένθεση εμφάνιζαν μαζί με φυσιολογικά φυμάτια και φυμάτια που δεν ήταν μακρόστενα αλλά σφαιρικά και τους έλλειπε το χαρακτηριστικό κοκκινωπό χρώμα.



Εικόνα 21 NF3948.64: Ομοζυγωτό για γονότυπο αγρίου τύπου



Εικόνα 22 NF3948.99D: Ετεροζυγωτό για την ένθεση



Εικόνα 24 R108 (αγρίου τύπου)

Αντίθετα το φαινόμενο αυτό ήταν λιγότερο έντονο στη σειρά NF3948 στα ετεροζυγωτά φυτά όπου υπήρχε η ένθεση ενώ στα φυτά που δεν υπήρχε η ένθεση τα φυτά έμοιαζαν με τα αγρίου τύπου.

3.5 Μεταβολωμική ανάλυση

Μετά τις φαινοτυπικές παρατηρήσεις των φυτών ακολούθησε η συλλογή φυτικού υλικού για μεταβολωμική ανάλυση αυτών. Πιο συγκεκριμένα απομονώθηκαν φυμάτια από όλες τις κατηγορίες των φυτών, πέντε από κάθε κατηγορία τα οποία καταψύχθηκαν άμεσα σε υγρό άζωτο και φυλάχθηκαν στους -80°C μέχρι την στιγμή της εκχύλισής τους. Στην συνέχεια έγινε εκχύλιση μεταβολιτών σύμφωνα με το πρωτόκολλο εκχύλισης μεταβολιτών (όπως περιγράφεται στο υλικό&μέθοδοι) τέλος τα δείγματα αναλύθηκαν σε GC-MS. Και πήραμε τα ακόλουθα αποτελέσματα.

Πίνακας 1 Ανάλυση μεταβολιτών από τέσσερις διαφορετικούς γονοτύπους. Στον πίνακα απεικονίζονται οι χημικές ενώσεις, η αναλογία μάζας προς φορτίο(m/z) των μεταβολιτών ο χρόνος έκλουσής τους (RT) καθώς και ο λόγος της σχετικής απόκρισης των ετεροζυγών, ομοζυγών για ένθεση και ομοζυγών χωρίς ένθεση ως προς την σχετική απόκριση των αγρίου τύπου. Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση Anpova και με bold απεικονίζονται οι ενώσεις που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά.

Row Labels	m/z	RT	Ετεροζυγώ τό για ένθεση/wt	Ομοζυγώ τό για ένθεση/w t	Ομοζυγώ τό χωρίς ένθεση/w t	p- value
Αμινοξέα						
L-lysine 2	317	26,290	6,473	6,980	2,518	0,284
DL-isoleucine 2	158	11,966	1,470	1,494	0,883	0,292
Tryptophan (2TMS)	202	31,380	1,083	8,581	0,507	0,431
Phenylalanine (2TMS)	192	19,970	2,605	32,514	1,400	0,448
Proline (2TMS)	142	11,987	2,162	29,482	2,027	0,455
L-valine 2	144	10,008	1,046	1,378	0,781	0,461
L-serine 2	204	13,754	1,080	1,553	1,189	0,470
Asparagine (4TMS) MP	188	19,764	0,412	5,599	0,530	0,476
Aspartic acid 2	232	17,679	0,587	0,843	0,410	0,481
Asparagine [-H ₂ O] (2TMS)	243	17,006	0,673	6,670	0,567	0,482
Asparagine [+CO ₂] (4TMS)	232	27,035	0,137	5,831	0,559	0,500
Glycine	174	12,253	0,793	1,214	0,939	0,560
L-threonine 2 [11.464]	218	14,444	0,996	1,410	1,048	0,601
L-glutamic acid 2	246	19,951	0,498	0,808	1,353	0,653
L-methionine 2	176	17,501	1,006	1,515	0,522	0,684
L-asparagine 2	231	21,107	1,029	1,097	0,618	0,696
L-alanine 1	116	7,332	0,848	1,269	1,137	0,919
Αζωτούχες ενώσεις						
trans-4-hydroxy-L-proline 2	230	17,783	1,094	3,536	0,120	0,003
Propane-1,2-diol, 3-amino (4TMS)	174	15,661	nd.	nd.	0,073	0,018
Adenine 1	264	25,055	1,080	4,190	0,782	0,029
Guanosine 2	324	40,603	sp.	sp.	sp.	0,064
Urea	147	10,525	0,724	1,678	2,161	0,086
Lumazine	308	22,482	nd.	nd.	nd.	0,112
N-acetyl-D-mannosamine 1	205	29,655	8,697	7,632	3,272	0,123
trans-3-hydroxy-L-proline 2	230	17,784	1,336	2,320	1,121	0,128

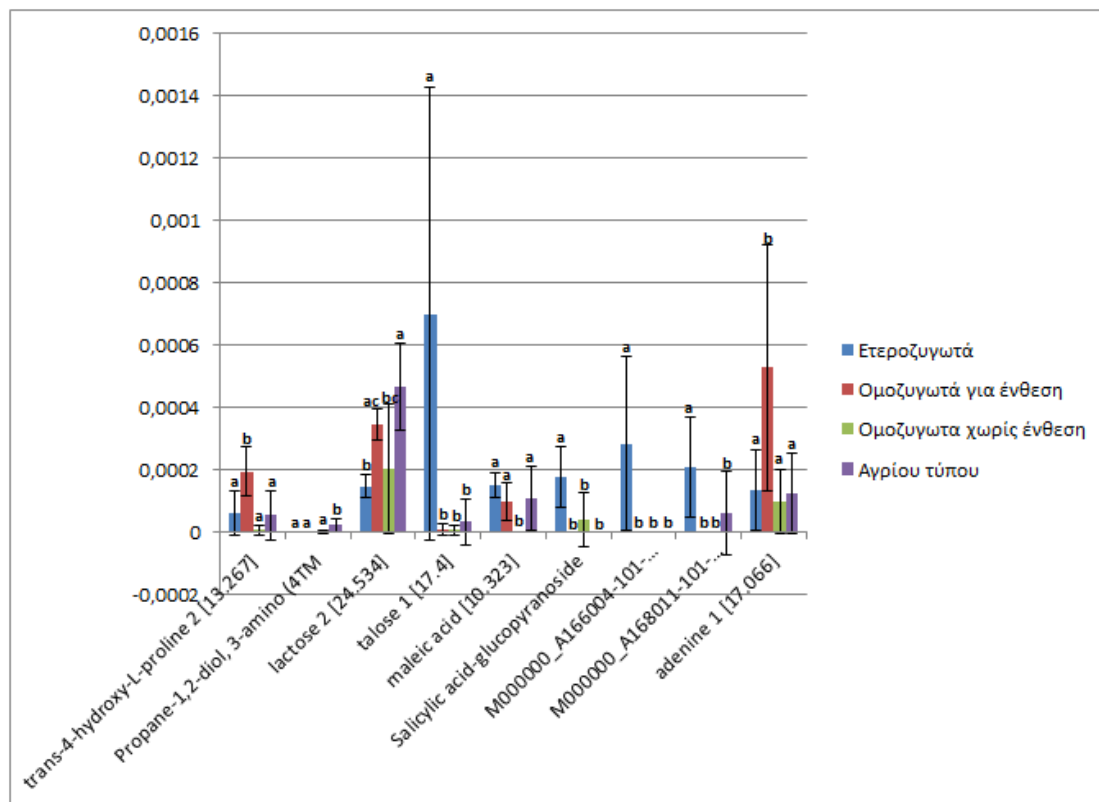
D-sphingosine 3	204	35,866	0,710	2,591	0,458	0,146
Uracil	241	13,081	0,348	1,114	0,692	0,257
Adenosine	236	38,466	1,270	0,482	0,278	0,260
Acetyl-L-serine 2	174	15,953	nd.	1,326	nd.	0,265
L-norleucine 2	158	11,420	1,432	1,723	0,878	0,284
O-phosphocolamine	299	23,580	0,181	0,888	nd.	0,298
Uridine (3TMS)	217	35,544	sp.	sp.	nd.	0,316
Urea (2TMS)	147	10,490	0,851	2,494	2,200	0,326
Indole-3-acetamide 3	202	31,378	1,319	2,408	nd.	0,416
Ethanolamine (3TMS)	174	11,250	0,499	5,311	0,854	0,417
Pyroglutamic acid (2TMS)	156	17,551	0,673	10,768	0,624	0,430
Triethanolamine (3TMS)	262	20,115	1,667	42,591	3,959	0,452
Tryptophan, 5-hydroxy- (3TMS)	218	19,962	12,761	206,046	8,853	0,462
N-acetyl-D-glucosamine 1	319	30,794	0,436	0,670	0,340	0,468
Beta-cyano-L-alanine	141	13,956	0,630	0,679	0,526	0,553
Lysine, 5-hydroxy- (4TMS)	174	17,027	0,666	0,087	0,086	0,555
Hydroxylamine (3TMS)	133	7,564	0,103	2,368	1,225	0,569
4-aminophenol 1	166	9,581	0,594	1,226	0,670	0,569
Phenylethylamine	174	15,841	0,243	0,443	1,251	0,582
L-ornithine 2	174	24,233	3,565	2,632	5,235	0,617
Putrescine	174	22,409	0,295	0,740	2,858	0,663
D-lyxosylamine 1	103	21,596	1,130	1,605	1,674	0,948
Πολυόλες						
Diethylenglycol (2TMS)	117	10,671	nd.	nd.	sp.	0,115
Glycerol	147	11,575	0,354	0,829	1,465	0,191
Ribitol - Xylitol	217	21,954	4,409	4,044	nd.	0,215
Pinitol, D- (5TMS)	260	24,834	0,146	4,759	0,358	0,370
Sorbitol (6TMS)	319	26,981	nd.	52,723	1,328	0,381
Ononitol (5TMS)	217	27,238	0,697	10,873	0,922	0,401
Mannitol (6TMS)	319	26,987	0,680	40,499	11,415	0,513
Galactinol 2	204	45,715	1,582	2,335	12,725	0,515
D-mannitol	319	26,844	0,695	3,466	12,850	0,524
Allo-inositol	318	29,766	0,879	1,025	1,455	0,559
Σάκχαρα						
Lactose 2	204	37,751	0,316	0,738	0,437	0,009
Talose 1	319	26,205	21,427	0,241	0,218	0,017
D-allose 1	319	26,170	0,471	4,063	1,143	0,127
Sophorose 1	319	38,541	nd.	2,468	0,119	0,250
Maltose 1	361	40,515	0,050	2,134	0,681	0,291
D (+)altrose 1	319	26,232	nd.	sp.	nd.	0,337
Sorbose (1MEOX) (5TMS) BP	73	25,728	0,708	0,226	0,952	0,402
D-lyxose 1	217	21,595	0,955	1,784	1,037	0,433
Galactose (1MEOX) (5TMS) MP	319	26,230	0,415	10,577	0,542	0,462
Trehalose, alpha,alpha'-, D- (8	276	40,493	nd.	sp.	sp.	0,466

Kestose, 6- (11TMS)	361	49,098	0,083	1483,249	93,471	0,469
Arabinose (1MEOX) (4TMS) MP	307	21,266	nd.	0,286	3,631	0,470
Isomaltose 2	361	42,371	0,803	0,205	0,614	0,521
Maltose (1MEOX) (8TMS) MP	160	40,526	nd.	0,347	nd.	0,532
D-(+) trehalose	361	40,509	0,565	2,407	2,617	0,556
Galactose (1MEOX) (5TMS) BP	319	26,563	0,471	0,559	0,335	0,586
Glucose (1MEOX) (5TMS) BP	319	26,563	nd.	0,489	0,962	0,678
Tagatose 2	217	25,941	2,252	1,834	1,860	0,724
Sedoheptulose anhydride monohydrate	204	21,945	1,211	0,543	1,802	0,746
Sucrose	361	39,049	0,653	0,877	0,794	0,753
Melibiose 1	361	40,963	0,977	0,918	0,724	0,883
Fructose (1MEOX) (5TMS) BP	103	25,940	1,066	1,466	1,676	0,934
Fructose 1	307	25,726	1,115	1,260	0,968	0,952
Φωσφορικές ενώσεις						
Glycerophosphoglycerol (5TMS)	357	31,744	6,441	0,672	2,062	0,084
Inositol-2-phosphate, myo- (7T)	318	35,432	1,596	11,256	1,388	0,473
Phosphoric acid monomethyl est	241	9,125	2,391	9,445	1,920	0,526
Phosphoric acid	299	11,528	1,430	1,243	1,780	0,619
Glycerol 1-phosphate	357	23,315	1,602	1,854	3,442	0,624
D-glucose-6-phosphate 1	387	34,003	0,655	0,843	0,865	0,832
3-phosphoglycerate	357	24,269	0,701	1,029	0,636	0,840
6-phosphogluconic acid	387	35,688	1,732	1,314	1,840	0,851
3-phosphoglyceric acid	387	24,267	2,087	1,229	1,453	0,853
Οργανικά οξέα						
Maleic acid	147	12,187	1,371	0,901	nd.	0,019
Pyruvic acid (2TMS)	217	35,318	nd.	nd.	0,170	0,065
Phthalic acid	295	21,463	13,769	0,766	0,166	0,130
Arachidic acid	369	35,087	0,789	1,005	2,488	0,143
Myristic acid	285	24,534	0,393	0,706	2,150	0,170
Pentadecanoic acid (1TMS)	299	26,486	0,508	nd.	13,941	0,184
Pyruvic acid	174	6,235	sp.	sp.	sp.	0,216
L-(+) lactic acid	147	6,461	0,460	0,874	1,337	0,221
Capric acid	229	15,855	0,066	0,786	1,239	0,227
Butanoic acid, 4-amino-3-hydro	174	11,011	nd.	nd.	5,758	0,276
Oleic acid	339	31,374	nd.	nd.	9,020	0,281
Benzoic acid, 4-hydroxy- (2TMS)	267	19,903	0,869	61,809	0,994	0,299
Palmitic acid	313	28,341	0,620	0,869	1,779	0,313
Gluconic acid lactone 3	275	26,979	nd.	0,572	0,256	0,368
Lyxonic acid (5TMS)	292	23,482	0,267	7,429	0,164	0,397
Palmitoleic acid	311	27,867	nd.	nd.	7,396	0,397
Galactonic acid (6TMS)	147	28,138	0,284	19,600	0,909	0,411
3-hydroxy-3-methylglutaric acid (dicrotalic acid)	247	19,552	0,679	0,917	2,026	0,418
Succinic acid	148	12,388	0,692	0,998	0,836	0,451

Oxalic acid	147	8,013	0,612	1,170	0,968	0,463
Gluconic acid 2	333	28,220	0,484	1,156	0,583	0,466
Shikimic acid	204	24,220	0,533	1,148	0,352	0,467
[379] caprylic acid [9.81]	201	8,669	0,438	0,615	1,801	0,477
Citric acid, 2-methyl- (4TMS) B	287	26,515	0,970	10,270	1,222	0,479
D-saccharic acid	333	28,447	0,512	1,125	1,333	0,548
Glyoxylic acid (1MEOX) (1TMS)	160	9,853	0,214	0,114	0,974	0,567
Fumaric acid	245	13,213	0,523	0,820	0,758	0,591
Gulonic acid (6TMS)	292	28,142	0,349	0,950	0,644	0,595
Alpha ketoglutaric acid	147	18,966	0,693	1,173	1,691	0,602
4-guanidinobutyric acid 2	174	17,754	1,080	1,573	0,940	0,620
Methylmalonic acid	147	9,978	0,650	1,961	1,912	0,658
Glyceric acid	189	13,008	1,094	1,355	1,914	0,660
4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid	297	22,959	1,883	1,320	0,409	0,680
Nicotinic acid	180	11,794	1,559	1,457	2,826	0,778
Malonic acid 1	147	9,711	0,693	1,027	1,160	0,838
Mucic acid	333	29,355	0,971	1,294	1,010	0,845
Galacturonic acid (1MEOX) (5TM	333	28,787	0,498	1,647	1,287	0,906
Citric acid	347	24,447	1,083	1,162	1,242	0,934
Lauric acid	257	20,385	0,801	0,655	0,897	0,949
D-malic acid	147	16,946	0,863	0,942	0,921	0,967
Άλλα συστατικά						
Salicylic acid-glucopyranoside	361	37,872	sp.	nd.	sp.	0,003
Methyl-beta-D-galactopyranoside	204	26,084	0,294	5,916	0,825	0,279
Glucopyranose, D- (5TMS)	204	27,834	0,301	0,066	1,052	0,460
Glucopyranose [-H2O] (4TMS)	217	23,388	1,410	7,453	3,010	0,506
Glucopyranose, D- (5TMS)	204	27,836	0,340	0,612	0,135	0,530
M000000_A166004-101- xxx_NA_1646.24_PRED_VAR5_AL K_NA	211	13,305	sp.	nd.	nd.	0,010
M000000_A168011-101- xxx_NA_1685.9_PRED_VAR5_ALK _NA	243	21,085	3,395	nd.	nd.	0,028

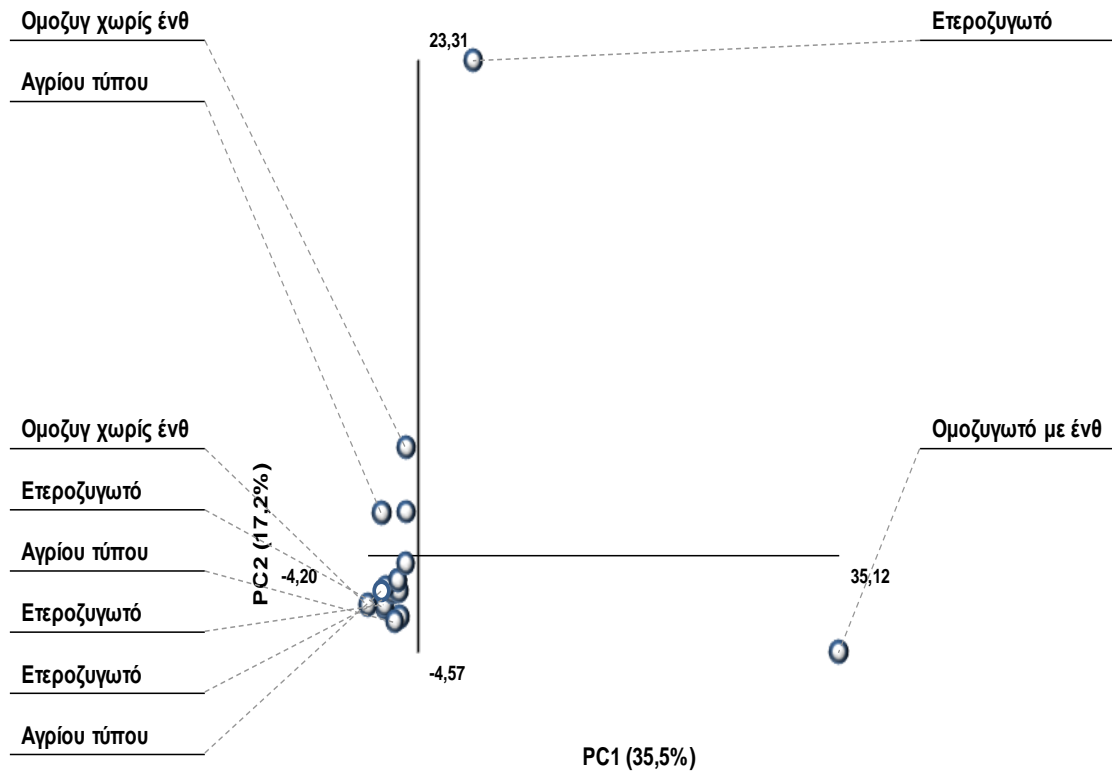
Από τον παραπάνω πίνακα βλέπουμε ότι δεν υπάρχουν μεταβολές στους τέσσερις διαφορετικούς γονοτύπους όσον αφορά τα αμινοξέα, τις φωσφορικές ενώσεις και τις πολυόλες. Ενώ, αντίθετα, βλέπουμε ότι τα ομοζυγωτά για την ένθεση διαφέρουν σημαντικά από τους άλλους γονοτύπους όσον αφορά τους μεταβολίτες, *trans*-4-υδρόξυ-L-προλίνη όπου η συγκέντρωσή του είναι 3,5 φορές περισσότερο από τα control(wild type) και η αδενίνη κατά 4,2 φορές περισσότερο από τα wt, οι οποίοι ανήκουν στις αζωτούχες ενώσεις. Τα ετεροζυγωτά από την άλλη εμφανίζουν υψηλότερες συγκεντρώσεις όσον αφορά την ταλόζη κατά 21 φορές περισσότερο σε σχέση με τα wt ενώ επάγεται και η σύνθεση πυρανοσιδίου-σαλικυλικού οξέος καθώς και άλλων δύο μη αναγνωρισμένων συστατικών. Τα ομοζυγωτά για τον

γονότυπο αγρίου τύπου φαίνεται να μην παράγουν μηλεϊκό οξύ μια ικανότητα που φαίνεται να ανακτούν τα ετεροζυγωτά και τα ομοζυγωτά για την ένθεση. Τέλος τα αγρίου τύπου διαφέρουν ως προς τις υπόλοιπες σειρές στην συγκέντρωση της προπάνιο-1,2-διολ, 3-άμινο και της λακτόζης μία διαφορά που υπάρχει και μεταξύ ετεροζυγωτών και ομοζυγωτών για την ένθεση μιας και τα ομοζυγωτά περιέχουν διπλάσια συγκέντρωση λακτόζης από τα ετεροζυγωτά.



Εικόνα 25 Στο διάγραμμα φαίνεται η σχετική απόκριση (relative response) για όλους τους γονότυπους, για τους μεταβολίτες που έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά.

Επίσης όπως φαίνεται τόσο από το pca(εικόνα 26) ειδικότερα όσο και από τους πίνακες μεταβολιτών γενικότερα η ένθεση στο γονίδιο δεν αλλοιώνει σημαντικά το μεταβολίωμα των φυματίων στους διάφορους γονοτύπους.



Εικόνα 26 Στο διάγραμμα φαίνεται η ανάλυση των principal component για τα μεταβολιώματα των δειγμάτων, παρατηρούμε ότι τα δείγματα είναι σχετικά ομοιογενή και φανερώνει ότι μέσα στους διάφορους γονοτύπους δεν αλλάζει σημαντικά το μεταβολίωμα των φυματίων.

4 Συμπεράσματα

Η μελέτη της μεταβολομικής φυματίων με ένθεση στο γονίδιο *MtStp13.1*, στο φυτό *M. truncantula* ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για μεταφορέα μονοσακχαριτών και οι φαινοτυπικές μεταβολές που προκαλεί ήταν το θέμα της παρούσας μελέτης.

Για το λόγο αυτό μελετηθήκαν στελέχη των σειρών NF3151B και NF3948 που περιείχαν την ένθεση στο συγκεκριμένο σημείο. Από τα αποτελέσματα είδαμε ότι η μετάλλαξη επηρεάζει το φυτό τόσο φαινοτυπικά με το να έχει μικρότερη ανάπτυξη, σφαιρικά φυμάτια και με το να επηρεάζει την άνθιση των ομοζυγωτών για την ένθεση φυτών, όσο και μεταβολικά αφού βρέθηκαν εννέα μεταβολίτες να έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά ανάλογο με τον γονότυπο της ένθεσης.

Πιο συγκεκριμένα παρατηρήθηκε σε φαινοτυπικό επίπεδο ότι τα φυτά που ήταν ομοζυγωτά για την ένθεση είχαν μικρότερη ανάπτυξη κάτι που υποδηλώνει την άμεση σύνδεση του μεταφορέα με την αφομοίωση θρεπτικών συστατικών κάτι που επιβεβαιώνεται και από προηγούμενη έρευνα (Schofield et al., 2009) αλλά και την εμπλοκή στην λειτουργία των φυματίων μιας και αυτά εμφανίζονταν πιο σφαιρικά και λευκά. Παράλληλα, παρατηρήσαμε ότι τα ομοζυγωτά για την ένθεση δεν μπορούσαν να δημιουργήσουν σπόρους και παρέμεναν στο στάδιο της άνθισης, κάτι που πρέπει να συσχετίζεται με την έκφραση του μεταφορέα στα πέταλά και στους ανθήρες (Chloe D. Mara and Vivian F. Irish 2008) και ίσως να παίζει κάποιο ρόλο στην σωστή ανάπτυξη του άνθους του φυτού.

Από την άλλη μελετώντας το μεταβολίωμα των φυματίων του φυτού μπορούμε να παρατηρήσουμε γενικά ότι επηρεάζεται το φυτό σε επίπεδο σακχάρων και αζωτούχων ενώσεων κάτι που υποδηλώνει ότι ο μεταφορέας ίσως επηρεάζει άμεσα την διαδικασία της αζωτοδέσμευσης και της συμβιωτικής σχέσης του φυτού-ξενιστή με το βακτήριο. Πιο συγκεκριμένα παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα *trans*-4-υδροξύ-L-προλίνη στα ομοζυγωτά για την ένθεση φυμάτια ένα συστατικό που στα φυμάτια βρίσκεται κυρίως υπό την μορφή *extensins* μιας κατηγορίας πρωτεϊνών που υπάρχουν στα τοιχώματα του φυματίου και επηρεάζουν τις μηχανικές ιδιότητες αυτού καθώς και την διάχυση των αερίων από και προς το φυμάτιο (Frueauf et al. 2000) και ίσως αυτή να είναι μια παράμετρος που επηρεάζει και το σχήμα των φυματίων τα οποία τείνουν να είναι σφαιρικά. Ενώ παρατηρήθηκαν και αυξημένα επίπεδα αδεΐνης. Στα ετεροζυγωτά από την άλλη έχουμε αύξηση των επιπέδων του πυρανοσιδίου-σαλικυλικού οξέος μία ανενεργή μορφή του σαλικυλικού οξέως το οποίο χρησιμοποιείται στα φυτά κυρίως ως μηχανισμός άμυνας σε προσβολές από παθογόνα ενώ, έχουμε και αύξηση του μονοσακχαρίτη της ταλόζης ένα διαστερεοϊσομερές της γαλακτόζης και ένα συστατικό που χρησιμοποιείται στην δημιουργία λιποπολυσακχαριτών στα συμβιωτικά βακτήρια που χρησιμοποιούνται σαν αναγνώριση από τα φυτά-ξενιστές. Επίσης μπορούμε να παρατηρήσουμε τις υψηλές συγκεντρώσεις στις

ουσίες προπάνιο-1,2-διολ, 3-άμινο και λακτόζης ένας δισακχαρίτης που αποτελείται από γλυκόζη και γαλακτόζη μια διαφορά που φαίνεται να υπάρχει και μεταξύ ομοζυγωτών (υψηλότερα επίπεδα) και ετεροζυγωτών. Τέλος, παρατηρήθηκε απουσία μηλεϊκού οξέος στα ομοζυγωτά φυτά για τον γονότυπο αγρίου τύπου.

5 Βιβλιογραφία

1. **Allen GJ, Chu SP, Harrington CL, Schumacher K, Hoffmann T, Tang YY, Grill E, Schroeder JI (2001)** A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature* 411, 1053–1057.
2. **Andriankaja A, Boisson-Dernier A, Frances L, Sauviac L, Jauneau A, Barker DG, de Carvalho-Niebel F (2007)** AP2-ERF transcription factors mediate nod factor-dependent MtENOD11 activation in root hairs via a novel cis-regulatory motif. *Plant Cell* 19, 2866–2885.
3. **Ané JM, Kiss GB, Riely BK, Penmetsa RV, Oldroyd GE, Ayax C, Lévy J, Debellé F, Baek JM, Kalo P, Rosenberg C, Roe BA, Long SR, Dénarié J, Cook DR (2004)** *Medicago truncatula* DMI1 required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science* 303, 1364–1367.
4. **Arrighi JF, Barre A, Ben Amor B, Bersoult A, Soriano LC, Mirabella R, de Carvalho-Niebel F, Journet EP, Ghérardi M, Huguet T, Geurts R, Dénarié J, Rougé P, Gough C (2006)** The *Medicago truncatula* Lysine motif-receptor-like kinase gene family includes NFP and new nodule-expressed genes. *Plant Physiol.* 142, 265.
5. **Arrighi JF, Godfroy O, de Billy F, Saurat O, Jauneau A, Gough C (2009)** The RPG gene of *Medicago truncatula* controls *Rhizobium*-directed polar growth during infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 9817–9822.
6. **Asamizu E, Shimoda Y, Kouchi H, Tabata S, Sato S (2008)** A positive regulatory role for LjERF1 in the nodulation process is revealed by systematic analysis of nodule-associated transcription factors of *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* 147, 2030–2040.
7. **Bhuvanewari TV, Bhagwat AA, Bauer WD (1981)** Transient susceptibility of root cells in four common legumes to nodulation by rhizobia. *Plant Physiol.* 68, 1144–1149.
8. **Bhuvanewari TV, Solheim B (1985)** Root hair deformation in the white clover/*Rhizobium trifolii* symbiosis. *Physiol. Plant.* 63, 25–34.
9. **Biswas B, Chan PK, Gresshoff PM (2009)** A novel ABA insensitive mutant of *Lotus japonicus* with a wilted phenotype displays unaltered nodulation regulation. *Mol. Plant.* 2, 487–499.
10. **Bond L (1948)** Origin and developmental morphology of root nodules of *Pisum sativum*. *Bot. Gaz.* 109, 411–434.
11. **Borisov AY, Madsen LH, Tsyganov VE, Umehara Y, Voroshilova VA, Batagov AO, Sandal N, Mortensen A, Schausser L, Ellis N, Tikhonovich IA, Stougaard J (2003)** The sym35 gene required for root nodule development in pea is an ortholog of NIN from *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* 131, 1009–1017.

12. **Caetano-Anollés, G, Gresshoff PM** (1991) Plant genetic control of nodulation. *Annu. Rev. Microbiol.* 45, 345–382.
13. **Callaham DA, Torrey JG** (1981) The structural basis for infection of root hairs of *Trifolium repens* by *Rhizobium*. *Can. J. Bot.* 59, 1647–1664.
14. **Calvert HE, Pence MK, Pierce M, Malik NSA, Bauer WD** (1984) Anatomical analysis of the development and distribution of *Rhizobium* infection in soybean roots. *Can. J. Bot.* 62, 2375–2384.
15. **Capoen W, Goormachtig S, De Rycke R, Schroeyers K, Holsters M** (2005) SrSymRK, a plant receptor essential for symbiosome formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 10369–10374.
16. **Cardenas L, Vidali L, Dominguez J, Perez H, Sanchez F, Hepler PK, Quinto C** (1998) Rearrangement of actin microfilaments in plant root hairs responding to *Rhizobium etli* nodulation signals. *Plant Physiol.* 116, 871–877.
17. **Carroll BJ, McNeil DL, Gresshoff PM** (1985a) Isolation and properties of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] mutants that nodulate in the presence of high nitrate concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 4162–4166.
18. **Carroll BJ, McNeil DL, Gresshoff PM** (1985b) A supernodulation and nitrate-tolerant symbiotic (nts) soybean mutant. *Plant Physiol.* 78, 34–40.
19. **Catoira R, Galera C, de Billy F, Penmetsa RV, Journet EP, Maillet F, Rosenberg C, Cook D, Gough C, Dénarié J** (2000) Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a nod factor transduction pathway. *Plant Cell* 12, 1647–1665.
20. **Crutzen P, Mosier AR, Smith KA, Winiwarter W** (2007) N₂O release from agro-fuel production negates global warming reduction by replacing fossil fuels. *Atmos. Chem. Phys. Discussions* 7, 11191–11205.
21. **Delves AC, Mathews A, Day DA, Carter AS, Carroll BJ, Gresshoff PM** (1986) Regulation of the soybean-*Rhizobium* nodule symbiosis by shoot and root factors. *Plant Physiol.* 82, 588–590.
22. **Dénarié J, Debelle F, Promé JC** (1996) *Rhizobium* lipochitooligosaccharide nodulation factors: Signalling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 503–535.
23. **Ding Y, Kalo P, Yendrek C, Sun J, Liang Y, Marsh JF, Harris JM, Oldroyd GE** (2008) Abscisic acid coordinates Nod factor and cytokinin signaling during the regulation of nodulation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* 20, 2681–2695.
24. **Ding YL, Oldroyd GE** (2009) Positioning the nodule, the hormone dictum. *Plant. Signal Behav.* 4, 89–93.
25. **Dolmetsch RE, Xu KL, Lewis RS** (1998) Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* 392, 933–

936.

26. **Endre G, Kereszt A, Kevei Z, Mihacea S, Kalo P, Kiss GB** (2002) A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* 417, 962–966.
27. **European Association for Grain Legume Research**(2007) www.grainlegumes.com. Accessed January 2009.
28. **Felle HH, Kondorosi E, Kondorosi A, Schultze M** (1999) Elevation of the cytosolic free [Ca²⁺] is indispensable for the transduction of the nod factor signal in alfalfa. *Plant Physiol.* 121, 273–279.
29. **Ferguson BJ, Mathesius U**(2003) Signaling interactions during nodule development. *J. Plant Growth Regul.* 22, 47–72.
30. **Ferguson BJ, Reid JB** (2005) Cochleata: getting to the root of legume nodules. *Plant Cell Physiol.* 46, 1583–1589.
31. **Ferguson BJ, Ross JJ, Reid JB** (2005a) Nodulation phenotypes of gibberellin and brassinosteroid mutants of pea. *Plant Physiol.* 138, 2396–2405. *Legume Nodule Development and Autoregulation* 73
32. **Ferguson BJ, Wiebe EM, Emery RJN, Guinel FC** (2005b) Cytokinin accumulation and an altered ethylene response mediate the pleiotropic phenotype of the pea nodulation mutant R50 (sym16). *Can. J. Bot.* 83, 989–1000.
33. **Gage DJ** (2004) Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 280–300.
34. **Giraud E, Moulin L, Vallenet D, Barbe V, Cytryn E, Avarre JC, Jaubert M, Simon D, Cartieaux F, Prin Y, Bena G, Hannibal L, Fardoux J, Kojadinovic M, Vuillet L, Lajus A, Cruveiller S, Rouy Z, Mangenot S, Segurens B, Dossat C, Franck WL, Chang WS, Saunders E, Bruce D, Richardson P, Normand P, Dreyfus B, Pignol D, Stacey G, Emerich D, Verméglio A, Médigue C, Sadowsky M** (2007) Legumes symbioses: absence of Nod Genes in photosynthetic badyrhizobia. *Science* 316, 1307–1312.
35. **Gleason C, Chaudhuri S, Yang TB, Munoz A, Poovaiah BW, Oldroyd GED** (2006) Nodulation independent of rhizobia induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition. *Nature* 441, 1149–1152.
36. **Gonzalez-Rizzo S, Crespi M, Frugier F** (2006) The *Medicago truncatula* CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell* 18, 2680–2693.
37. **Gough C** (2003) Rhizobium symbiosis: Insight into nod factor receptors. *Curr. Biol.* 13, R973–R975.

- 38. Graham PH, Vance CP** (2003) Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* 131, 872–877.
- 39. Gresshoff PM, Delves AC** (1986) Plant genetic approaches to symbiotic nodulation and nitrogen fixation in legumes. In: Blonstein AD, King PJ, eds. *Plant Gene Research III. A Genetical Approach to Plant Biochemistry*. Springer Verlag, Wien. pp. 159–206.
- 40. Gresshoff PM, Lohar D, Chan PK, Biswas B, Jiang Q, Reid D, Ferguson B, Stacey G** (2009) Genetic analysis of ethylene regulation of legume nodulation. *Plant Signal Behav.* 4, 818–823.
- 41. Guinel FC, Geil RD** (2002) A model for the development of the rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses in legumes and its use to understand the roles of ethylene in the establishment in these two symbioses. *Can. J. Bot.* 80, 695–720.
- 42. Heckmann AB, Lombardo F, Miwa H, Perry JA, Bunnell S, Parniske M, Wang TL, Downie JA** (2006) Lotus japonicus nodulation requires two GRAS domain regulators, one of which is functionally conserved in a non-legume. *Plant Physiol.* 142, 1739–1750.
- 43. Heidstra R, Yang WC, Yalcin Y, Peck S, Emons AM, van Kammen A, Bisseling T** (1997) Ethylene provides positional information on cortical cell division but is not involved in Nod factor induced root hair tip growth in Rhizobium-legume interaction. *Development* 124, 1781–1787.
- 44. Hirsch S, Kim J, Munoz A, Heckmann AB, Downie JA, Oldroyd GED** (2009) GRAS proteins form a DNA binding complex to induce gene expression during nodulation signaling in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* 21, 545–557.
- 45. Huse M, Kuriyan J** (2002) The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* 109, 275–282.
- 46. Imaizumi-Anraku H, Takeda N, Kawaguchi M, Parniske M, Hayashi M, Kawasaki S** (2005) Host genes involved in activation and perception of calcium spiking. *Plant Cell Physiol.* 46, S5-S5.
- 47. Indrasumunar A** (2007) Molecular cloning and functional characterisation of soybean (*Glycine max* L.) nod factor receptor genes (PhD Thesis, The University of Queensland).
- 48. Indrasumunar A, Kereszt A, Searle I, Miyagi M, Li D, Nguyen CDT et al.** (2009) Inactivation of duplicated Nod-Factor Receptor 5 (NFR5) genes in recessive loss-of-function non-nodulation mutants of allotetraploid soybean (*Glycine max* L. Merr.) *Plant Cell Physiol.* doi:10.1093/pcp/pcp178.

49. **Ishikawa K, Yokota K, Li YY, Wang Y, Liu CT, Suzuki S, Aono T, Oyaizu H** (2008) Isolation of a novel root-determined hypernodulation mutant *rdh1* of *Lotus japonicus*. *Soil Sci. Plant Nutr.* 54, 259–263.
50. **Journet EP, El-Gachtouli N, Vernoud V, de Billy F, Pichon M, Dedieu A, Arnould C, Morandi D, Barker DG, Gianinazzi-Pearson V** (2001) *Medicago truncatula* ENOD11: A novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14, 737–748.
51. **Kaló P, Gleason C, Edwards A, Marsh J, Mitra RM, Hirsch S, Jakab J, Sims S, Long SR, Rogers J, Kiss GB, Downie JA, Oldroyd GE** (2005) Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a MEMBER of the GRAS family of transcriptional regulators. *Science* 308, 1786–1789.
52. **Kanamori N, Madsen LH, Radutoiu S, Frantescu M, Quistgaard EM, Miwa H, Downie JA, James EK, Felle HH, Haaning LL, Jensen TH, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Sandal N, Stougaard J** (2006) A nucleoporin is required for induction of Ca²⁺ spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 359–364.
53. **Kevei Z, Loughon G, Mergaert P, Horváth GV, Kereszt A, Jayaraman D, Zaman N, Marcel F, Regulski K, Kiss GB, Kondorosi A, Endre G, Kondorosi E, Ané JM** (2007) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase 1 interacts with NOR1 and is crucial for nodulation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* 19, 3974–3989.
54. **Kinkema M, Gresshoff PM** (2008) Investigation of downstream signals of the soybean autoregulation of nodulation receptor kinase GmNARK. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21, 1337–1348.
55. **Krusell L, Madsen LH, Sato S, Aubert G, Genua A, Szczyglowski K, Duc G, Kaneko T, Tabata S, de Bruijn F, Pajuelo E, Sandal N, Stougaard J** (2002) Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase. *Nature* 420, 422–426.
56. **Lerouge P, Roche P, Faucher C, Maillet F, Truchet G, Promé JC, Dénarié J** (1990) Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* 344, 781–784.
57. **Lévy J, Bres C, Geurts R, Chalhoub B, Kulikova O, Duc G, Journet EP, Ané JM, Lauber E, Bisseling T, Dénarié J, Rosenberg** *Journal of Integrative Plant Biology* Vol. 52 No. 1 2010 C, **Debellé F** (2004) A putative Ca²⁺ and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science* 303, 1361–1364.

- 58. Li DX, Kinkema M, Gresshoff PM** (2009) Autoregulation of nodulation(AON) in *Pisum sativum* (pea) involves signaling events associated with both nodule primordia development and nitrogen fixation. *J. Plant Physiol.* 166, 955–967.
- 59. Li WH, Llopis J, Whitney M, Zlokarnik G, Tsien RY** (1998) Cell-permeant caged InsP_3 ester shows that Ca^{2+} -spike frequency can optimize gene expression. *Nature* 392, 936–941.
- 60. Libbenga KR, Harkes PAA** (1973) Initial proliferation of cortical cells in the formation of root nodules in *Pisum sativum* L. *Planta* 114, 17–28.
- 61. Limpens E, Franken C, Smit P, Willemsse J, Bisseling T, Geurts R** (2003) LysM domain receptor kinases regulating rhizobial nod factor-induced infection. *Science* 302, 630–633.
- 62. Limpens E, Mirabella R, Fedorova E, Franken C, Franssen H, Bisseling T, Geurts R** (2005) Formation of organelle-like N_2 -fixing symbiosomes in legume root nodules is controlled by DMI2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 10375–10380.
- 63. Lin YH, Ferguson BJ, Kereszt A, Gresshoff PM** (2009) Suppression of hypernodulation in soybean by a leaf-extracted, NARK-and Nod factor-dependent low molecular mass fraction. *New Phytol.* doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03163.x.
- 64. Lohar D, Stiller J, Kam J, Stacey G, Gresshoff PM** (2009) Ethylene insensitivity conferred by a mutated *Arabidopsis* ethylene receptor gene alters nodulation in transgenic *Lotus japonicus*. *Ann. Bot.* 104, 277–285.
- 65. Madsen EB, Madsen LH, Radutoiu S, Olbryt M, Rakwalska M, Szczyglowski K, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Sandal N, Stougaard J** (2003) A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* 425, 637–640.
- 66. Magori S, Oka-Kira E, Shibata S, Umehara Y, Kouchi H, Hase Y, Tanaka A, Sato S, Tabata S, Kawaguchi M** (2009) TOO MUCH LOVE, a root regulator associated with the long-distance control of nodulation in *Lotus japonicus*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22, 259–268.
- 67. Marsh JF, Rakocevic A, Mitra RM, Brocard L, Sun J, Eschstruth A, Long SR, Schultze M, Ratet P, Oldroyd GE** (2007) *Medicago truncatula* NIN is essential for rhizobial-independent nodule organogenesis induced by autoactive calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Plant Physiol.* 144, 324–335.
- 68. Mathesius U** (2008) Auxin: at the root of nodule development? *Funct. Plant Biol.* 35, 651–668.
- 69. Mathesius U, Charon C, Rolfe BG, Kondorosi A, Crespi M** (2000) Temporal and spatial order of events during the induction of cortical cell divisions in

- white clover by *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* inoculation or localized cytokinin addition. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13, 617–628.
- 70. Mathews A, Carroll BJ, Gresshoff PM** (1989) Development of Bradyrhizobium infection in supernodulating and non-nodulating mutants of soybean (*Glycine max* [L.] Merrill). *Protoplasma* 150, 40–47.
- 71. Messinese E, Mun JH, Yeun LH, Jayaraman D, Rougé P, Barre A, Loughon G, Schornack S, Bono JJ, Cook DR, Ané JM** (2007) A novel nuclear protein interacts with the symbiotic DMI3 calcium- and calmodulin-dependent protein kinase of *Medicago truncatula*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20, 912–921.
- 72. Middleton PH, Jakab J, Penmetza RV, Starker CG, Doll J, Kaló P, Prabhu R, Marsh JF, Mitra RM, Kereszt A, Dudas B, Vanden-Bosch K, Long SR, Cook DR, Kiss GB, Oldroyd GE** (2007) An ERF transcription factor in *Medicago truncatula* that is essential for nod factor signal transduction. *Plant Cell* 19, 1221–1234.
- 73. Mitra RM, Gleason CA, Edwards A, Hadfield J, Downie JA, Oldroyd GE, Long SR** (2004) A Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: Gene identification by transcript-based cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 4701–4705.
- 74. Miwa H, Sun J, Oldroyd GED, Downie JA** (2006) Analysis of nod-factor-induced calcium signaling in root hairs of symbiotically defective mutants of *Lotus japonicus*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19, 914–923.
- 75. Miyahara A, Hirani TA, Oakes M, Kereszt A, Kobe B, Djordjevic MA, Gresshoff PM** (2008) Soybean nodule autoregulation receptor Kinase phosphorylates two kinase-associated protein phosphatases in vitro. *J. Biol. Chem.* 283, 25381–25391.
- 76. Murray JD, Karas BJ, Sato S, Tabata S, Amyot L, Szczyglowski K** (2007) A cytokinin perception mutant colonized by *Rhizobium* in the absence of nodule organogenesis. *Science* 315, 101–104.
- 77. Newcomb W** (1976) A correlated light and electron microscopic study of symbiotic growth and differentiation in *Pisum sativum* root nodules. *Can. J. Bot.* 54, 2163–2186.
- 78. Newcomb W, Sippel D, Peterson RL** (1979) The early morphogenesis of *Glycine max* and *Pisum sativum* root nodules. *Can. J. Bot.* 57, 2603–2616.
- 79. Nishimura R, Hayashi M, Wu GJ, Kouchi H, Imaizumi-Anraku H, Murakami Y, Kawasaki S, Akao S, Ohmori M, Nagasawa M, Harada K, Kawaguchi M** (2002a) HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development. *Nature* 420, 426–429.
- 80. Nishimura R, Ohmori M, Fujita H, Kawaguchi M** (2002b) A Lotus basic leucine zipper protein with a RING-finger motif negatively regulates the developmental program of nodulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 15206–15210.

81. **Nontachaiyapoom S, Scott PT, Men AE, Kinkema M, Schenk PM, Gresshoff PM** (2007) Promoters of orthologous *Glycine max* and *Lotus japonicus* nodulation autoregulation genes interchangeably drive phloem-specific expression in transgenic plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20, 769–780.
82. **Oka-Kira E, Tateno K, Miura K, Haga T, Hayashi M, Harada K, Sato S, Tabata S, Shikazono N, Tanaka A, Watanabe Y, Fukuhara I, Nagata T, Kawaguchi M** (2005) *Klavier (klv)*, A novel hyper-nodulation mutant of *Lotus japonicus* affected in vascular tissue organization and floral induction. *Plant J.* 44, 505–515. *Legume Nodule Development and Autoregulation*
83. **Okamoto S, Ohnishi E, Sato S, Takahashi H, Nakazono M, Tabata S, Kawaguchi M** (2009) Nod factor/nitrate-induced CLE genes that drive HAR1-mediated systemic regulation of nodulation. *Plant Cell Physiol.* 50, 67–77.
84. **Oldroyd GED, Downie JA** (2008) Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 519–546.
85. **Oldroyd GED, Downie JA** (2004) Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 566–576.
86. **Oldroyd GED, Long SR** (2003) Identification and characterization of nodulation-signaling pathway 2, a gene of *Medicago truncatula* involved in Nod factor signaling. *Plant Physiol.* 131, 1027–1032.
87. **Penmetza RV, Uribe P, Anderson J, Lichtenzveig J, Gish JC, Nam YW, Engstrom E, Xu K, Sckisel G, Pereira M, Baek JM, Lopez-Meyer M, Long SR, Harrison MJ, Singh KB, Kiss GB, Cook DR** (2008) The *Medicago truncatula* ortholog of the *Arabidopsis* EIN2 gene, *sickle*, is a negative regulator of symbiotic and pathogenic microbial interactions. *Plant J.* 55, 580–595.
88. **Peoples MB, Brockwell J, Herridge DF, Rochester IJ, Alves BJR, Urquiaga S, Boddey RM, Dakora FD, Bhattarai S, Maskey SL, Sampet C, Rerkasem B, Khan DF, Hauggaard-Nielsen H, Jensen ES** (2009) The contributions of nitrogen-fixing crop legumes to the productivity of agricultural systems. *Symbiosis* 48, 1–17.
89. **Postma JG, Jacobsen E, Feenstra WJ** (1988) Three pea mutants with an altered nodulation studied by genetic-analysis and grafting. *J. Plant Physiol.* 132, 424–430.
90. **Pueppke SG, Broughton WJ** (1999) *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12, 293–318.
91. **Radutoiu S, Madsen LH, Madsen EB, Felle HH, Umehara Y, Grønlund M, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Sandal N, Stougaard J** (2003) Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* 425, 585–592. *Redmond JW, Batley M, Djordjevic MA, Innes RW, Kuempel PL,*
92. **Rolfe BG** (1986) Flavones induce expression of nodulation genes in *Rhizobium*. *Nature* 323, 632–635.

- 93. Riely BK, Lougnon G, Ane JM, Cook DR** (2007) The symbiotic ion channel homolog DMI1 is localized in the nuclear membrane of *Medicago truncatula* roots. *Plant J.* 49, 208–216.
- 94. Rolfe BG, Gresshoff PM** (1988) Genetic analysis of legume nodule initiation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39, 297–319.
- 95. Roth LE, Stacey G** (1989a) Bacterium release into host cells of nitrogen-fixing soybean nodules: The symbiosome membrane comes from three sources. *Eur. J. Cell Biol.* 49, 13–23.
- 96. Roth LE, Stacey G** (1989b) Cytoplasmic membrane systems involved in bacterium release into soybean nodule cells as studied with two *Bradyrhizobium japonicum* mutant strains. *Eur. J. Cell Biol.* 49, 24–32.
- 97. de Ruijter N, Rook M, Bisseling T, Emons A** (1998) Lipochitooligosaccharides re-initiate root hair tip growth in *Vicia sativa* with high calcium and spectrin-like antigen at the tip. *Plant J.* 13, 341–350.
- 98. Saito K, Yoshikawa M, Yano K, Miwa H, Uchida H, Asamizu E, Sato S, Tabata S, Imaizumi-Anraku H, Umehara Y, Kouchi H, Murooka Y, Szczyglowski K, Downie JA, Parniske M, Hayashi M, Kawaguchi M** (2007) NUCLEOPORIN85 is required for calcium spiking, fungal and bacterial symbioses, and seed production in *Lotus japonicus*. *Plant Cell* 19, 610–624.
- 99. Schauer L, Roussis A, Stiller J, Stougaard J** (1999) A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature* 402, 191–195.
- 100. Schnabel E, Journet EP, de Carvalho-Niebel F, Duc G, Frugoli J** (2005) The *Medicago truncatula* SUNN gene encodes a CLV1-like leucine-rich repeat receptor kinase that regulates nodule number and root length. *Plant Mol. Biol.* 58, 809–822.
- 101. Scott P, Pregelj L, Chen N, Hadler J, Djordjevic M, Gresshoff P** (2008) *Pongamia pinnata*: An untapped resource for the biofuels industry of the future. *BioEnergy Res.* 1, 2–11.
- 102. Searle IR, Men AE, Laniya TS, Buzas DM, Iturbe-Ormaetxe I, Carroll BJ, Gresshoff PM** (2003) Long-distance signaling in nodulation directed by a CLAVATA1-like receptor kinase. *Science* 299, 109–112.
- 103. Smit P, Raedts J, Portyanko V, Debelle F, Gough C, Bisseling T, Geurts R** (2005) NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science* 308, 1789–1791.
- 104. Spaink HP** (2000) Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 257–288.

- 105. Steen A, Buist G, Leenhouts KJ, El Khattabi M, Grijpstra F, Zomer AL, Venema G, Kuipers OP, Kok J** (2003) Cell wall attachment of a widely distributed peptidoglycan binding domain is hindered by cell wall constituents. *J. Biol. Chem.* 278, 23874–23881.
- 106. Stracke S, Kistner C, Yoshida S, Mulder L, Sato S, Kaneko T, Tabatas, Sandal N, Stougaard J, Szczyglowski K, Parniske M** (2002) A plant receptor-like kinase required for both fungal and bacterial symbiosis. *Nature* 417, 959–962.
- 107. Sun J, Cardoza V, Mitchell D, Bright L, Oldroyd G, Harris J** (2006) Crosstalk between jasmonic acid, ethylene and Nod factor signaling allows integration of diverse inputs for regulation of nodulation. *Plant J.* 46, 961–970.
- 108. Timmers AC, Auriac MC, Truchet G** (1999) Refined analysis of early symbiotic steps of the Rhizobium-Medicago interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Dev.* 126, 3617–3628.
- 109. Tirichine L, Imaizumi-Anraku H, Yoshida S, Murakami Y, Madsen LH, Miwa H, Nakagawa T, Sandal N, Albrechtsen AS, Kawaguchi M, Downie A, Sato S, Tabata S, Kouchi H, Parniske M, Kawasaki S, Stougaard J** (2006) Deregulation of a Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development. *Nature* 441, 1153–1156.
- 110. Tirichine L, Sandal N, Madsen LH, Radutoiu S, Albrechtsen AS, Satos, Asamizu E, Tabata S, Stougaard J** (2007) A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis. *Science* 315, 104–107. *Journal of Integrative Plant Biology* Vol. 52 No. 1 2010
- 111. Turgeon BG, Bauer WD** (1982) Early events in the infection of soybean by Rhizobium japonicum. Time course and cytology of the initial infection process. *Can. J. Bot.* 60, 152–161.
- 112. Turgeon BG, Bauer WD** (1985) Ultrastructure of infection thread development during infection of soybean by Rhizobium japonicum. *Planta* 163, 328–349.
- 113. Udvardi M, Day D** (1997) Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 493–523.
- 114. Vernié T, Moreau S, de Billy F, Plet J, Combier JP, Rogers C et al.** (2008) EFD is an ERF transcription factor involved in the control of nodule number and differentiation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* 20, 2696–2713.

- 115. Wais RJ, Galera C, Oldroyd G, Catoira R, Penmetsa RV, Cook D, Gough C, Denarié J, Long SR** (2000) Genetic analysis of calcium spiking responses in nodulation mutants of *Medicago truncatula*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 13407–13412.
- 116. Walker SA, Viprey V, Downie JA** (2000) Dissection of nodulation signaling using pea mutants defective for calcium spiking induced by Nod factors and chitin oligomers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 13413–13418.
- 117. Wopereis J, Pajuelo E, Dazzo FB, Jiang Q, Gresshoff PM, De Bruijn FJ, Stougaard J, Szczyglowski K** (2000) Shoot root mutant of *Lotus japonicus* with a dramatically altered symbiotic phenotype. *Plant J.* 23, 97–114.
- 118. Yano K, Shibata S, Chen WL, Sato S, Kaneko T, Jurkiewicz A, Sandal N, Banba M, Imaizumi-Anraku H, Kojima T, Ohtomo R, Szczyglowski K, Stougaard J, Tabata S, Hayashi M, Kouchi H, Umehara Y** (2009) CERBERUS, a novel U-box protein containing WD-40 repeats, is required for formation of the infection thread and nodule development in the legume–*Rhizobium* symbiosis. *Plant JDOI: 10.1111/j.1365-3113X.2009.03943.x.*
- 119. Yano K, Yoshida S, Müller J, Singh S, Banba M, Vickers K, Markmann K, White C, Schuller B, Sato S, Asamizu E, Tabata S, Murooka Y, Perry J, Wang TL, Kawaguchi M, Imaizumi-Anraku H, Hayashi M, Parniske M** (2008) CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 20540–20545.
- 120. Yao PJ, Vincent JM** (1969) Host specificity in the root “curling factor” of *Rhizobium* spp. *Aust. J. Biol. Sci.* 22, 413–423.
- 121. Zhu H, Chen T, Zhu M, Fang Q, Kang H, Hong Z, Zhang Z** (2008) A novel ARID DNA-binding protein interacts with SymRK and is expressed during early nodule development in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* 148, 337–347.
- 122. Weber A, Servaites JC, Geiger DR, Kofler H, Hille D, Groner F, Hebbeker U, Flugge UI**, Identification, purification, and molecular cloning of a putative plastidic glucose translocator. *Plant Cell* 2000, 12(5):787-802
- 123. Wang HX, Weerasinghe RR, Perdue TD, Cakmakci NG, Taylor JP, Marzluff WF, Jones AM**: A Golgi-localized hexose transporter is involved in heterotrimeric G protein-mediated early development in *Arabidopsis*. *Mol Biol Cell* 2006, 17(10):4257-4269

- 124.Kuhn C, Grof CP**, Sucrose transporters of higher plants. *Curr Opin Plant Biol* 2010,
- 125.Lalonde S, Boles E, Hellmann H, Barker L, Patrick JW, Frommer WB, Ward JM.**, (1999) The dual function of sugar carriers. Transport and sugar sensing. *Plant Cell*. 11(4):707-26.
- 126.Williams LE, Lemoine R, Sauer N.**, (2000). Sugar transporters in higher plants: a diversity of roles and complex regulation. *Trends Plant Sci* 5: 283–290.
- 127.Sauer N, Tanner W**, The hexose carrier from *Chlorella*. cDNA cloning of a eucaryotic H⁺-cotransporter. *FEBS Lett* 1989, 259(1):43-46
- 128.Riesmeier JW, Willmitzer L, Frommer WB**, Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *Embo J* 1992, 11(13):4705-4713
- 129.Noiraud N, Maurousset L, Lemoine R**, Identification of a mannitol transporter, AgMaT1, in celery phloem. *Plant Cell* 2001, 13(3):695-705.
- 130.Andreas Weise, Laurence Barker, Christina Kühn, Sylvie Lalonde, Henrik Buschmann, Wolf B. Frommer, and John M. Ward**, A New Subfamily of Sucrose Transporters, SUT4, with Low Affinity/High Capacity Localized in Eucleate Sieve Elements of Plants, *Plant Cell*. 2000 August; 12(8): 1345–1356.
- 131.Sauer N**, Molecular physiology of higher plant sucrose transporters.*FEBS Lett* 2007, 581(12):2309-2317.
- 132.Johnson DA, Hill JP, Thomas MA**, The monosaccharide transporter gene family in land plants is ancient and shows differential subfamily expression and expansion across lineages. *BMC Evol Biol* 2006, 6:64
- 133.Aluri, S. and Buttner, M.** (2007). Identification and functional expression of the *Arabidopsis thaliana* vacuolar glucose transporter 1 and its role in seed germination and flowering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 2537–2542.
- 134.Buttner M**, The monosaccharide transporter(-like) gene family in *Arabidopsis*. *FEBS Lett* 2007, 581(12):2318-2324.
- 135.Loescher, W.H., and J.D. Everard.** 1996. Metabolism of carbohydrates in sinks and sources: sugar alcohols. In: E. Zamski and A. Schaffer, eds., *Distribution of photoassimilates in plants and crops: source-sink relationships*. Marcel Dekker, Inc.. New York. pp. 185-207.

- 136. Weber A, Servaites JC, Geiger DR, Kofler H, Hille D, Groner F, Hebbeker U, Flugge UI**, Identification, purification, and molecular cloning of a putative plastidic glucose translocator. *Plant Cell* 2000, 12(5):787-802
- 137. Sarah M. Sherson, Heather L. Alford, Susan M. Forbes, Graham Wallace and Steven M. Smith** Roles of cell-wall invertases and monosaccharide transporters in the growth and development of Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 54, No. 382
- 138. R. A. Schofield, Y.-M. Bi, S. Kant, S. J.** Over-expression of STP13, a hexose transporter, improves plant growth and nitrogen use in Arabidopsis thaliana seedlings. *Plant, Cell & Environment* Volume 32, Issue 3, pages 271–285, March 2009
- 139. Gernot Poschet, Barbara Hannich and Michael Büttner**, Identification and Characterization of AtSTP14, a Novel Galactose Transporter from Arabidopsis. *2010 Plant and Cell Physiology* Volume 51, Issue 9 Pp. 1571-1580
- 140. Tadege M, Ratet P, Mysore KS.,** (2005). Insertional mutagenesis: a Swiss Army knife for functional genomics of *Medicago truncatula*. *Trends Plant Sci.* 10(5):229-35.
- 141. D'Erfurth I, Cosson V, Eschstruth A, Lucas H, Kondorosi A, Ratet P.,** (2003). Efficient transposition of the Tnt1 tobacco retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J.* 34(1):95-106.
- 142. Norholm MH, Nour-Eldin HH, Brodersen P, Mundy J, Halkier BA**(2006) Expression of the Arabidopsis high-affinity hexose transporter STP13 correlates with programmed cell death. *FEBS Lett* 580:2381–2387.
- 143. Chloe D. Mara and Vivian F. Irish** Two GATA Transcription Factors Are Downstream Effectors of Floral Homeotic Gene Action in Arabidopsis. *Plant Physiology*, June 2008, Vol. 147, pp. 707–718
- 144. Introduction to Spectroscopy** By Donald L. Pavia
- 145. "Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry" Frank Settle,** Editor: "Gas Chromatography", **M.J. Van Sant, Prentice Hall**, 1997, pp. 125-146.
- 146. "Principles of Instrumental Analysis",** 5th Edition. **Skoog, Holler, Nieman, Saunders College Publishing**, 1998, pp. 673-724.

- 147. Frueauf, J. B., Dolata, M., Leykam, J. F., Lloyd, E. A., Gonzales, M., VandenBosch, K., and Kieliszewski, M. J.** 2000. Peptides isolated from cell walls of *Medicago truncatula* nodules and uninfected root. *Phyto-chemistry* 55:429-438
- 148. Young ND, Udvardi M., (2009).** Translating *Medicago truncatula* genomics to crop legumes. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(2):193–201.