



Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών  
Τμήμα Βιοτεχνολογίας  
Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας

Διδακτορική διατριβή

***Αναπρογραμματισμός του μεταβολισμού του *Lotus japonicus*  
σε μεταγραφικό, βιοχημικό και μεταβολομικό επίπεδο  
κατά τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση***

**Χρυσάνθη Π. Καλλονιάτη**

Επιβλέπων Καθηγητής: Εμμανουήλ Φλεμετάκης



Αθήνα, 2016

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
& ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ



AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS  
SCHOOL OF FOOD, BIOTECHNOLOGY  
& DEVELOPMENT

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY  
LABORATORY OF MOLECULAR BIOLOGY

---

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Αναπρογραμματισμός του μεταβολισμού του *Lotus japonicus* σε  
μεταγραφικό, βιοχημικό και μεταβολομικό επίπεδο κατά τη συμ-  
βιωτική αζωτοδέσμευση**

**ΧΡΥΣΑΝΘΗ Π. ΚΑΛΛΟΝΙΑΤΗ**

Επιβλέπων καθηγητής  
**Εμμανουήλ Φλεμετάκης**

ΑΘΗΝΑ, 2016

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Αναπρογραμματισμός του μεταβολισμού του *Lotus japonicus* σε μεταγραφικό, βιοχημικό και μεταβολομικό επίπεδο κατά τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση**

**ΧΡΥΣΑΝΘΗ Π. ΚΑΛΛΟΝΙΑΤΗ**

**Επιβλέπων καθηγητής:**

Φλεμετάκης Εμμανουήλ, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

**Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή:**

Φλεμετάκης Εμμανουήλ, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων)

Χατζόπουλος Πολυδεύκης, Καθηγητής ΓΠΑ (Μέλος)

Χατζηπαυλίδης Ιορδάνης, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ (Μέλος)

**Επταμελής εξεταστική επιτροπή:**

Φλεμετάκης Εμμανουήλ, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων καθηγητής)

Χατζόπουλος Πολυδεύκης, Καθηγητής ΓΠΑ (Μέλος)

Χατζηπαυλίδης Ιορδάνης, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ (Μέλος)

Ηλιόπουλος Ηλίας, Καθηγητής ΓΠΑ (Μέλος)

Μηλιώνη Δήμητρα, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ (Μέλος)

Ρήγας Σταμάτης, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ (Μέλος)

Κοτζάμπασης Κυριάκος, Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης (Μέλος)

# Περίληψη

Η συμβιωτική αζωτοδέσμευση στα ψυχανθή λαμβάνει χώρα σε εξειδικευμένα όργανα που ονομάζονται φυμάτια, τα οποία αποτελούν την κύρια πηγή αφομοιωμένου αζώτου για ολόκληρο το φυτό. Η διαδικασία της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης απαιτεί απόλυτη ενσωμάτωση και στενή αλληλεπίδραση του φυτικού και του ριζοβιακού μεταβολισμού και περιλαμβάνει σημαντικές αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση και τη συσσώρευση μεταβολιτών τόσο στο ριζόβιο όσο και στο φυτό. Με σκοπό τη μελέτη των μεταβολικών αλλαγών σε επίπεδο φυτού, οι οποίες προκαλούνται από τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια της αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών. τα επίπεδα μεταβολιτών σε φυμάτια και μη συμβιωτικά όργανα φυτών *Lotus japonicus* που είτε δεν εμβολιάστηκαν είτε εμβολιάστηκαν με το *M. loti* άγριου τύπου, ή τα *fix*<sup>-</sup> στελέχη *ΔnifA* και *ΔnifH*. Επιπρόσθετα, μεταγραφομικές και βιοχημικές προσεγγίσεις συνδυάστηκαν για να μελετηθεί ο μεταβολισμός του θείου στα φυμάτια, η σύνδεσή του με τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση και η επίδραση των φυματίων στην κατανομή και το μεταβολισμό του θείου σε ολόκληρο το φυτό. Είναι καλά τεκμηριωμένο ότι ο μεταβολισμός του θείου και του αζώτου είναι άρρηκτα συνδεδεμένοι και ότι το θείο είναι απαραίτητο για τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση, ωστόσο, λίγα είναι γνωστά για τους μοριακούς και βιοχημικούς μηχανισμούς που διέπουν την πρόσληψη και την αφομοίωση του θείου κατά τη διαδικασία αυτή. Η μελέτη του μεταγραφικού προτύπου συνδυάστηκε με τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της αναγωγής του APS, καθώς και των επιπέδων μεταβολιτών που περιέχουν θείο σε φυμάτια και μη συμβιωτικά όργανα φυτών που είτε δεν εμβολιάστηκαν είτε εμβολιάστηκαν με το *M. loti* άγριου τύπου, ή τα *fix*<sup>-</sup> στελέχη *ΔnifA* και *ΔnifH*. Επιπλέον, αναλύθηκε η πρόσληψη και η κατανομή των θειικών στα διάφορα φυτικά όργανα και παρακολουθήθηκε η <sup>35</sup>S-ροή στις διαφορετικές S-δεξαμενές. Το μεταβολομικό πρότυπο αποκάλυψε ότι η εγκαθίδρυση της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης έχει ως αποτέλεσμα τη δραματική διαφοροποίηση πολλών πτυχών του πρωτογενούς και δευτερογενούς μεταβολισμού στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε ολικό αναπρογραμματισμό του μεταβολισμού του ψυχανθούς-μοντέλου *Lotus japonicus* σε επίπεδο ολόκληρου του φυτού. Επιπλέον, τα αποτελέσματα αποκάλυψαν ότι τα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια αντιπροσωπεύουν ένα πλούσιο σε θειόλες όργανο. Η υψηλή δραστηριότητα της αναγωγής του APS και η υψηλή <sup>35</sup>S-ροή προς την κυστεΐνη και τους μεταβολίτες της σε συνδυασμό με τη μεταγραφική επαγωγή πολλών γονιδίων που εμπλέκονται στην αφομοίωση του θείου αναδεικνύουν τη λειτουργία των φυματίων ως μια νέα θέση αφομοίωσης θείου. Η υψηλότερη συγκέντρωση θειολών

που παρατηρήθηκε στα μη-συμβιωτικά όργανα των αζωτοδεσμευτικών φυτών σε σύγκριση με αυτά των μη εμβολιασμένων φυτών δεν μπορεί να αποδοθεί στην τοπική βιοσύνθεσή τους υποδεικνύοντας ότι τα φυμάτια αποτελούν μία νέα πηγή ανηγμένου θείου για το φυτό, γεγονός που προκαλεί τον αναπρογραμματισμό του μεταβολισμού του θείου σε επίπεδο ολόκληρου του φυτού. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι οι αλλαγές του μεταβολομικού προτύπου και η αυξημένη βιοσύνθεση θειολών στα φυμάτια, καθώς και η επίδρασή τους στην οικονομία του θείου, του άνθρακα και του αζώτου ολόκληρου του φυτού δεν παρατηρήθηκαν στα *fix* φυτά, τα οποία στις περισσότερες περιπτώσεις μοιάζουν μεταβολικά με τα μη εμβολιασμένα φυτά, υποδεικνύοντας μια ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης και του μεταβολισμού του θείου και του άνθρακα.

**Λέξεις κλειδιά:** Συμβιωτική αζωτοδέσμευση; μεταβολισμός του θείου; μεταβολισμός του αζώτου; μεταβολισμός του άνθρακα; μεταβολομική ανάλυση; *Mesorhizobium loti*; βιοσύνθεση κυστεΐνης; βιοσύνθεση γλουταθειόνης; βιοσύνθεση ομογλουταθειόνης.

# Title

**Transcriptional, biochemical and metabolic reprogramming of *Lotus japonicus* metabolism during symbiotic nitrogen fixation.**

## Abstract

Symbiotic nitrogen fixation in legumes takes place in specialized organs called nodules, which become the main source of assimilated nitrogen for the whole plant. Symbiotic nitrogen fixation requires exquisite integration of plant and bacterial metabolism and involves global changes in gene expression and metabolite accumulation in both rhizobia and the host plant. In order to study the metabolic changes mediated by symbiotic nitrogen fixation on a whole-plant level, metabolite levels were profiled by gas chromatography–mass spectrometry in nodules and non-symbiotic organs of *Lotus japonicus* plants uninoculated or inoculated with *M. loti* wt,  $\Delta nifA$  or  $\Delta nifH$   $fix^-$  strains. Furthermore, transcriptomic and biochemical approaches were combined to study sulfur metabolism in nodules, its link to symbiotic nitrogen fixation, and the effect of nodules on whole-plant sulfur partitioning and metabolism. It is well established that nitrogen and sulfur (S) metabolism are tightly entwined and sulfur is required for symbiotic nitrogen fixation, however, little is known about the molecular and biochemical mechanisms governing sulfur uptake and assimilation during symbiotic nitrogen fixation. Transcript profiling in *Lotus japonicus* was combined with quantification of S-metabolite contents and APR activity in nodules and in non-symbiotic organs of plants uninoculated or inoculated with *M. loti* wt,  $\Delta nifA$  or  $\Delta nifH$   $fix^-$  strains. Moreover, sulfate uptake and its distribution into different plant organs were analyzed and  $^{35}\text{S}$ -flux into different S-pools was monitored. Metabolite profiling revealed that symbiotic nitrogen fixation results in dramatic changes of many aspects of primary and secondary metabolism in nodules which leads to global reprogramming of metabolism of the model legume on a whole-plant level. Moreover, our data revealed that nitrogen fixing nodules represent a thiol-rich organ. Their high APR activity and  $^{35}\text{S}$ -flux into cysteine and its metabolites in combination with the transcriptional up-regulation of several genes involved in sulfur assimilation highlight the function of nodules as a new site of sulfur assimilation. The higher thiol content observed in non-symbiotic organs of nitrogen fixing plants in comparison to uninoculated plants cannot be attributed to local biosynthesis, indicating that nodules could serve as a novel source of reduced sulfur for the plant, which triggers whole-plant reprogramming of sulfur metabolism. Interestingly, the changes in metabolite profiling and the

enhanced thiol biosynthesis in nodules and their impact on the whole-plant sulfur, carbon and nitrogen economy are dampened in *fix<sup>-</sup>* plants, which in most respects metabolically resembled uninoculated plants, indicating a strong interaction between nitrogen fixation and sulfur and carbon metabolism.

**Keywords:** Symbiotic nitrogen fixation; sulfur metabolism; nitrogen metabolism; carbon metabolism; metabolomic analysis; *Mesorhizobium loti*; cysteine biosynthesis; glutathione biosynthesis; homoglutathione biosynthesis.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται σε αυτή τη διδακτορική διατριβή περιλαμβάνονται στις παρακάτω επιστημονικές δημοσιεύσεις και ανακοινώσεις σε συνέδρια:

#### Δημοσιεύσεις:

**Kalloniati, C., Krompas, P., Karalias, G., Udvardi, M.K., Rennenberg, H., Herschbach, C., and Flemetakis, E.** (2015). Nitrogen-Fixing Nodules Are an Important Source of Reduced Sulfur, Which Triggers Global Changes in Sulfur Metabolism in *Lotus japonicus*. *Plant Cell* 9: 2384–2400.

**Kalloniati, C., Herschbach, C., Rennenberg, H., and Flemetakis, E.** Changes on nodule sulfate metabolism triggered upon carbon starvation induced by prolonged darkness. *In preparation*.

**Kalloniati, C., Rennenberg, H., and Flemetakis, E.** Global metabolome changes induced by symbiotic nitrogen fixation in the module legume *Lotus japonicus*. *In preparation*.

#### Συνέδρια:

**Kalloniati, C., Herschbach, C., Rennenberg, H. and Flemetakis E.** (2011). Reprogramming of sulphur metabolism in *Lotus japonicus* during symbiotic nitrogen fixation. 3<sup>rd</sup> Sulphyton meeting on Plant Sulfur Research, Cogneliano, Padova, Italy. p. 38.

**Kalloniati, C., Krompas, P., Karalias, G., Herschbach, C., Rennenberg, H. and Flemetakis E.** (2011). Transcriptional reprogramming of bacterial and plant sulphur uptake and metabolism during symbiotic nitrogen fixation. 3<sup>rd</sup> Sulphyton meeting on Plant Sulfur Research, Cogneliano, Padova, Italy. p. 70.

**Kalloniati, C., Krompas, P., Karalias, G., Herschbach, C., Rennenberg, H. and Flemetakis E.** (2012). Symbiotic Nitrogen Fixation triggers global changes in bacterial and plant sulphur metabolism. 15<sup>th</sup> International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions, Kyoto, Japan.

**Kalloniati C., Rennenberg H. and Flemetakis E.** (2014). Changes in metabolite profile in *Lotus japonicus* during symbiotic nitrogen fixation. 16<sup>th</sup> International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions. Rhodes, Greece. P 106.



# Αντί προλόγου

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του τμήματος Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και χρηματοδοτήθηκε μερικώς από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).

Φτάνοντας στο τέλος της μακρόχρονης και επίπονης αυτής προσπάθειας, θα ήθελα καταρχήν να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στον επιβλέποντα Επίκουρο Καθηγητή κ. Εμμανουήλ Φλεμετάκη για την αμέριστη υποστήριξη, την πολύτιμη και ουσιαστική επιστημονική καθοδήγηση, η συμβολή της οποίας ήταν καθοριστική για την πραγματοποίηση αυτής της διατριβής, καθώς και για τις γνώσεις που μου προσέφερε. Ευχαριστώ, επίσης, τα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, κ. Π. Χατζόπουλο Καθηγητή ΓΠΑ και κ. Ι. Χατζηπαυλίδη Επίκουρο Καθηγητή ΓΠΑ, καθώς και τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής για την κριτική ανάγνωση του κειμένου.

Οφείλω, επίσης, να ευχαριστήσω τον καθηγητή Heinz Rennenberg που με εμπιστέφτηκε και μου έδωσε την ευκαιρία να πραγματοποιήσω μεγάλο μέρος των πειραμάτων στο ινστιτούτο Tree physiology, University of Freiburg, καθώς και την Επίκουρο Καθηγήτρια Cornelia Herschbach για τις πολύτιμες συμβουλές της για τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν εκεί.

Νιώθω το χρέος να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας ΓΠΑ και ιδιαίτερα τη Λία Κουρή, το Δημήτρη Σκληρό και το Γιώργο Καραλία, καθώς και τα μέλη του ινστιτούτου Tree physiology, University of Freiburg που ο καθένας χωριστά συνέβαλε με το δικό του τρόπο στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής. Τους ευχαριστώ όλους θερμά, για το ευχάριστο εργασιακό περιβάλλον που μου προσέφεραν, που υπήρξαν πολύτιμοι συνεργάτες και πολύ καλοί φίλοι.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τους γονείς μου, την αδελφή μου και το Μάνο Μαρσέλλο, που με στήριξαν τόσο πολύ και μου προσέφεραν απλόχερα οποιαδήποτε βοήθεια χρειάστηκα όλα αυτά τα χρόνια. Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στο Νίκο Χατζηγιαννάκη που πραγματικά με βοήθησε σε όλα τα επίπεδα και υπήρξε καταλύτης για την ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής.

# Περιεχόμενα

<b>1</b>	<b>Εισαγωγή</b>	<b>23</b>
1.1	Συμβιωτική αζωτοδέσμευση	23
1.1.1	Γενικά	23
1.1.2	Συμβιωτική σχέση ριζοβίου-ψυχανθούς	25
1.1.3	Εγκαθίδρυση συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης	30
1.1.4	Φυσιολογία και βιοχημεία του φυματίου	36
1.2	Μεταβολισμός του άνθρακα	45
1.2.1	Γενικά	45
1.2.2	Ο μεταβολισμός του άνθρακα στα φυμάτια	46
1.2.3	Τα ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό του άνθρακα	51
1.2.4	Ο ρόλος του άνθρακα στην αζωτοδέσμευση	56
1.3	Μεταβολισμός του θείου	59
1.3.1	Γενικά	59
1.3.2	Μεταβολισμός του θείου και αλληλιπίδρασή του με το μεταβολισμό του αζώτου και του άνθρακα	62
1.3.3	Πρόσληψη θειικών	64
1.3.4	Αναγωγή και αφομοίωση θειικών	68
1.3.5	Βιοσύνθεση της γλουταθειόνης και της ομογλουταθειόνης	74
1.3.6	Μεταβολισμός του θείου και συμβιωτική αζωτοδέσμευση	76
<b>2</b>	<b>Υλικά και μέθοδοι</b>	<b>83</b>
2.1	Φυτικό υλικό, βακτηρίαση στελέχη και συνθήκες ανάπτυξης	83
2.1.1	Το ψυχανθές <i>L. japonicus</i> ως φυτικό μοντέλο και το ριζόβιο <i>M. loti</i>	83
2.1.2	Βλάστηση σπερμάτων και καλλιέργεια φυτών <i>A. thaliana</i>	84
2.1.3	Ανάπτυξη βακτηρίων <i>E. coli</i>	84
2.2	Απομόνωση γενωματικού DNA	84
2.3	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα <i>E. coli</i>	85
2.3.1	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο Βρασμού	85
2.3.2	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA υψηλής καθαρότητας	86
2.4	Απομόνωση ολικού RNA από φυτικούς ιστούς	86
2.4.1	Μέθοδος Brusslan and Tobin	86
2.4.2	Απομόνωση ολικού RNA από “δύστροπους” φυτικούς ιστούς	86
2.5	Απομάκρυνση DNA από δείγματα RNA	87

2.6	Ανάλυση νουκλεϊκών οξέων .....	88
2.6.1	Καθαρισμός νουκλεϊκών οξέων με PIC .....	88
2.6.2	Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊκών οξέων .....	89
2.6.3	Ανάλυση δεσοξυριβοζονουκλεϊνικών οξέων (DNA) σε πηκτή αγαρόζης ..	89
2.6.4	Πέψη δεσοξυριβοζονουκλεϊνικών οξέων (DNA) με ενδονουκλεάσες περιορισμού .....	90
2.6.5	Ανάκτηση κλάσματος DNA από πηκτή αγαρόζης .....	90
2.6.6	Ενοποίηση άκρων DNA με τη χρήση της DNA λιγάσης .....	91
2.7	Μετασχηματισμός <i>E. coli</i> .....	91
2.7.1	Προετοιμασία ικανών προς μετασχηματισμό κυττάρων <i>E. coli</i> .....	91
2.7.2	Προετοιμασία κυττάρων <i>E. coli</i> “υψηλής ικανότητας“ .....	91
2.7.3	Μετασχηματισμός ικανών κυττάρων <i>E. coli</i> .....	92
2.8	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) .....	93
2.8.1	Ενίσχυση ακολουθιών DNA με την χρήση της τεχνικής PCR .....	93
2.8.2	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR) .....	94
2.8.3	ΠΟΣΟΤΙΚΗ PCR ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (QUANTITATIVE REAL TIME PCR -qrt PCR) .....	95
2.9	<i>In situ</i> υβριδισμός .....	96
2.9.1	Προετοιμασία λεπτών φυτικών τομών .....	97
2.9.2	Προετοιμασία του μη ραδιενεργά σημασμένου RNA ανιχνευτή .....	99
2.9.3	Διαδικασία <i>in situ</i> RNA-RNA υβριδισμού .....	100
2.10	Υποκυτταρικός εντοπισμός πρωτεϊνών .....	103
2.10.1	Προετοιμασία των μικροσωματιδίων χρυσού και κατακρήμνηση του DNA .....	103
2.10.2	Μετασχηματισμός φύλλων με τη μέθοδο του βομβαρδισμού .....	103
2.11	Προσδιορισμός συγκέντρωσης θειικών ιόντων .....	104
2.11.1	Προετοιμασία δειγμάτων για τον προσδιορισμό συγκέντρωσης θειικών ιόντων .....	105
2.11.2	Ιοντική χρωματογραφία (IC) .....	105
2.11.3	Ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση θειικών ιόντων .....	106
2.12	Προσδιορισμός περιεκτικότητας θειολών .....	106
2.12.1	Προετοιμασία δειγμάτων για τον προσδιορισμό περιεκτικότητας θειολών .....	106
2.12.2	Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) .....	106
2.12.3	Ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση θειολών .....	107
2.13	Μέτρηση ενζυμικής δραστηριότητας της αναγωγάσης του APS .....	108

2.14	Προσδιορισμός ρυθμού πρόσληψης θειικών και της κατανομής τους στα διάφορα όργανα φυτών <i>L. japonicus</i> .....	108
2.14.1	Πρόσληψη ραδιενεργά σημασμένων θειικών.....	108
2.14.2	Προσδιορισμός περιεκτικότητας <sup>35</sup> S .....	109
2.15	Προσδιορισμός του ρυθμού πρόσληψης θειικών από διάφορα φυτικά όργανα και της ροής τους στις δεξαμενές θείου .....	109
2.15.1	Πρόσληψη ραδιενεργά σημασμένων θειικών.....	109
2.15.2	Προσδιορισμός περιεκτικότητας <sup>35</sup> S .....	109
2.15.3	Προσδιορισμός ροής του <sup>35</sup> S στο εσωτερικό απόθεμα θειικών .....	110
2.15.4	Προσδιορισμός ροής του <sup>35</sup> S στα αποθέματα θειολών .....	110
2.15.5	Προσδιορισμός ροής του <sup>35</sup> S στα αποθέματα πρωτεϊνών .....	110
2.16	Ανάλυση μεταβολιτών με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS) .....	111
2.16.1	Εκχύλιση μεταβολιτών .....	111
2.16.2	Παραγωγοποίηση (derivatization).....	111
2.16.3	Αέριος χρωματογραφία-Φασματομετρία μάζας (GC-MS).....	112
2.17	Στατιστική ανάλυση .....	113
2.18	Σύνθεση ρυθμιστικών διαλυμάτων και θρεπτικών μέσων .....	114
2.18.1	Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης βακτηρίων .....	114
2.18.2	Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης φυτικού υλικού .....	114
2.18.3	Παρασκευή και συγκεντρώσεις αντιβιοτικών.....	115
2.18.4	Διαλύματα απομόνωσης πλασμιδιακού DNA .....	115
2.18.5	Διαλύματα απομόνωσης γενωματικού DNA .....	115
2.18.6	Διαλύματα απομόνωσης ολικού RNA .....	115
2.18.7	Διαλύματα ανάλυσης νουκλεϊνικών οξέων .....	116
2.18.8	Διαλύματα μετασχηματισμού κυτάρων <i>E. coli</i> .....	117
2.18.9	Διαλύματα αντιδράσεως PCR .....	117
2.18.10	Διαλύματα <i>in situ</i> υβριδισμού .....	117
2.18.11	Διαλύματα για τον προσδιορισμό θειολών.....	119
2.18.12	Διαλύματα για τη μέτρηση ενζυμικής δραστηριότητας της αναγωγάσης του APS (APR).....	119
2.18.13	Διαλύματα απομόνωσης πρωτεϊνών.....	120
2.18.14	Διαλύματα εκχύλισης και παραγωγοποίησης μεταβολιτών.....	120
2.19	Γονότυποι στελεχών <i>E. coli</i> .....	120

<b>3</b>	<b>Αποτελέσματα .....</b>	<b>123</b>
3.1	Επίδραση της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης στη συγκέντρωση θειικών ιόντων .	123
3.2	Μελέτη της ενζυμικής δραστικότητας της αναγωγάσης του APS (APR).....	125
3.3	Επίδραση συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης στη συγκέντρωση θειολών .....	127
3.4	Μελέτη της πρόσληψης θειικών και της κατανομής τους στο <i>L. japonicus</i> .....	130
3.5	Μελέτη του ρυθμού πρόσληψης θειικών και της ροής τους στις διάφορες δεξαμενές θείου .....	132
3.6	Μελέτη του μεταγραφικού προτύπου έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του θείου στο <i>L. japonicus</i> .....	135
3.6.1	<i>In silico</i> διερεύνηση και ανάλυση γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του θείου στο <i>L. japonicus</i> .....	135
3.6.2	Μελέτη του μεταγραφικού προτύπου έκφρασης γονιδίων του <i>L. japonicus</i> που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του θείου κατά τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση .....	137
3.6.3	Μελέτη του μεταγραφικού προτύπου έκφρασης γονιδίων του <i>L. japonicus</i> που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του θείου σε <i>fix</i> φυμάτια που σχηματίστηκαν από τα μεταλλαγμένα στελέχη <i>ΔnifA</i> και <i>ΔnifH</i> . .....	139
3.6.4	Η συμβιωτική αζωτοδέσμευση επιφέρει μεταγραφικές αλλαγές στο μεταβολισμό του θείου σε επίπεδο ολόκληρου φυτού .....	142
3.7	Μεταβολισμός του θείου στα φυμάτια κατά την έλλειψη άνθρακα .....	150
3.7.1	Επίδραση της έλλειψης άνθρακα στη συγκέντρωση μεταβολιτών που περιέχουν θείο και στη δραστικότητα της αναγωγάσης του APS.....	150
3.7.2	Μελέτη του μεταγραφικού προτύπου έκφρασης γονιδίων του <i>L. japonicus</i> που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του θείου στα φυμάτια κατά την έλλειψη άνθρακα .....	152
3.8	Υποκυτταρικός εντοπισμός της αναγωγάσης του APS, <i>Apr1</i> .....	155
3.9	<i>In situ</i> εντοπισμός των μεταγραφημάτων των ισοτύπων αναγωγάσης του APS, <i>Apr1</i> και <i>Apr2</i> , σε φυμάτια του <i>L. japonicus</i> .....	156
3.10	Συγκριτική ανάλυση μεταβολομικού προτύπου κατά τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση .....	159
3.10.1	Συγκριτική ανάλυση μεταβολομικού προτύπου αζωτοδεσμευτικών και <i>fix</i> φυματίων.....	159
3.10.2	Συγκριτική ανάλυση μεταβολομικού προτύπου ριζών <i>L. japonicus</i> κατά τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση.....	167
3.10.3	Συγκριτική ανάλυση μεταβολομικού προτύπου βλαστών <i>L. japonicus</i> κατά τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση.....	173
3.10.4	Συγκριτική ανάλυση μεταβολομικού προτύπου φύλλων <i>L. japonicus</i> κατά τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση.....	180

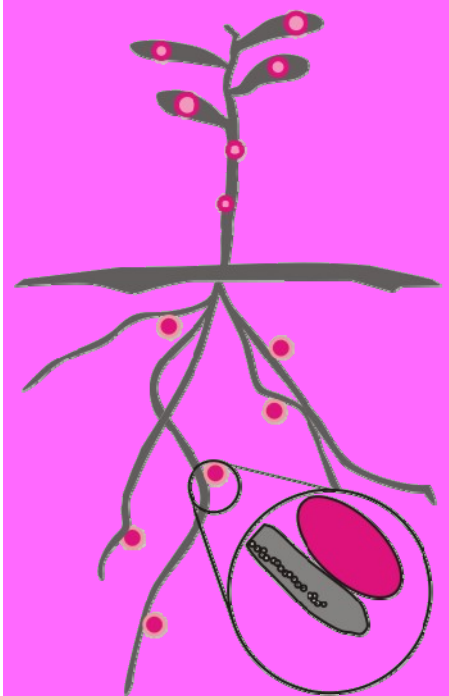
---

<b>4 Συζήτηση</b> .....	<b>191</b>
4.1 Ο μεταβολισμός του θείου κατά τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση .....	191
4.1.1 Τα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια αντιπροσωπεύουν μία νέα ισχυρή πηγή αφομοιωμένου θείου .....	192
4.1.2 Η αφομοίωση του θείου στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια επηρεάζει το μεταβολισμό και τη κατανομή του θείου σε όλοκληρο το φυτό .....	198
4.1.3 Η αφομοίωση του θείου στα φυμάτια εξαρτάται από την παροχή φωτοσυνθετικού άνθρακα .....	201
4.2 Η συμβιωτική αζωτοδέσμευση επιφέρει σημαντικές αλλαγές στο μεταβόλωμα του <i>L. japonicus</i> .....	205
4.3 Συμπεράσματα .....	209
<b>Επιπρόσθετα αποτελέσματα (Παράρτημα Α)</b> .....	<b>211</b>
<b>Στατιστική ανάλυση (Παράρτημα Β)</b> .....	<b>255</b>
<b>Βιβλιογραφία</b> .....	<b>275</b>

# 1

Κεφάλαιο

Εισαγωγή



## 1 Εισαγωγή

### 1.1 Συμβιωτική αζωτοδέσμευση

#### 1.1.1 Γενικά

Το άζωτο συμμετέχει ως συστατικό σε ένα μεγάλο αριθμό βιομορίων μεγάλης σπουδαιότητας για τη διατήρηση της ζωής στον πλανήτη μας, όπως οι πρωτεΐνες, τα νουκλεϊκά οξέα και μερικά συνένζυμα, τα οποία είναι η βάση όλων των μορφών ζωής (Hubbell and Kidder, 2003). Έτσι, το άζωτο, μετά το υδρογόνο, τον άνθρακα και το οξυγόνο, είναι το θρεπτικό στοιχείο που απαιτείται στις μεγαλύτερες ποσότητες για την κανονική διατροφή των φυτών (Δροσόπουλος, 1998). Την κύρια πηγή προέλευσης του οργανικού αζώτου αποτελεί η ατμόσφαιρα της γης, όπου το στοιχείο αυτό απαντάται στη μοριακή του μορφή ( $N_2$ ), σε ποσοστό 78%. Παρ' όλα αυτά, το άζωτο σε αυτή τη μορφή χαρακτηρίζεται από χαμηλή χημική δραστηριότητα (αδρανές αέριο), λόγω της ύπαρξης του τριπλού δεσμού, η αναγωγή του οποίου απαιτεί την καταβολή μεγάλων ποσοτήτων ενέργειας, καθώς και την ύπαρξη εξειδικευμένου ενζυμικού μηχανισμού. Έτσι, το ατμοσφαιρικό άζωτο δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας από την πλειοψηφία των οργανισμών για την δημιουργία των απαραίτητων χημικών ενώσεων, γι' αυτό χρειάζεται να αναχθεί σε αμμωνία ( $NH_3$ ). Αυτή η διαδικασία αναγωγής του ατμοσφαιρικού  $N_2$  ονομάζεται αζωτοδέσμευση, και μπορεί να πραγματοποιηθεί με βιολογικές, φυσικές αλλά και ανθρωπογενείς διεργασίες (Hubbell and Kidder, 2003; Δροσόπουλος, 1992).

Στις ανθρωπογενείς διεργασίες, περιλαμβάνεται η μετατροπή του μοριακού αζώτου σε αφομοιώσιμες μορφές ( $NH_3$ ,  $NO_3^-$ ,  $CN_2^{--}$ ) και ο εμπλουτισμός του εδάφους με αυτές, με τη μορφή χημικών λιπασμάτων (Δροσόπουλος, 1992). Η παραγωγή χημικών λιπασμάτων απαιτεί συνθήκες υψηλής πίεσης και θερμοκρασίας.

Στις φυσικές διεργασίες περιλαμβάνεται η αφομοίωση του μοριακού αζώτου μέσω οξειδίων του ( $NO_2^-$ ,  $NO_3^-$ ) που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια ατμοσφαιρικών ηλεκτρικών εκκενώσεων, τα οποία στη συνέχεια φτάνουν στο έδαφος με τη βοήθεια των ατμοσφαιρικών κατακρημνισμάτων (Δροσόπουλος, 1992). Η συνεισφορά, όμως, των διεργασιών αυτών είναι πολύ μικρή για να στηρίξει τις ανάγκες των οικοσυστημάτων σε αφομοιώσιμο άζωτο.

Η βιολογική αζωτοδέσμευση καταλύεται κυρίως από προκαρυωτικούς οργανισμούς που ανήκουν στα ευβακτήρια και στα αρχαιοβακτήρια (Widmer et al., 1999; Zehr et al., 2003). Όλοι οι αζωτοδεσμευτικοί οργανισμοί διαθέτουν το ενζυμικό σύστημα της νιτρογενάσης. Οι μικροοργανισμοί αυτοί, ανάλογα με τον τρόπο διαβίωσης τους κατά τη διεργασία δέσμευ-



σης του ατμοσφαιρικού αζώτου, διακρίνονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι ελεύθερα διαβιούντες μικροοργανισμοί, οι οποίοι είναι είτε αναερόβιοι (π.χ. *Clostridium pasteurianum*), είτε προαιρετικά αναερόβιοι (π.χ. *Klebsiella*), είτε τέλος αερόβιοι (π.χ. *Azotobacter*, *Azospirillum*). Η συνεισφορά όλων των παραπάνω μικροοργανισμών στη δέσμευση του αζώτου είναι πολύ μικρή και υπολογίζεται σε λιγότερο από 1 Kg N/ha ετησίως κατά μέσο όρο (Bothe et al., 1983). Η κατάσταση διαφοροποιείται στην περίπτωση των αυτότροφων φωτοσυνθετικών κυανοπράσινων αλγών (οικ. Nostocaceae), τα οποία λόγω του ότι είναι ανεξάρτητα από την ύπαρξη οργανικού άνθρακα στο περιβάλλον τους ως πηγή ενέργειας, συμβάλλουν σημαντικά στον εμπλουτισμό του εδάφους σε αφομοιώσιμο άζωτο, σε βαθμό που φτάνει τα 38 Kg N/ha ετησίως (Witty et al., 1979). Τέλος, έχουν αναφερθεί περιπτώσεις ελεύθερα διαβιούντων ευκαρυωτικών μικροοργανισμών, που ανήκουν στους μύκητες, οι οποίοι έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν μοριακό άζωτο, η σημασία των οποίων, όμως, είναι πολύ περιορισμένη. Μία άλλη ομάδα αζωτοδεσμευτικών μικροοργανισμών είναι αυτοί που δημιουργούν συνεργιστικές σχέσεις με ανώτερα φυτά, διαβιώντας είτε σε στενή επαφή με τη ριζόσφαιρα είτε ακόμη και μέσα στους μεσοκυττάριους χώρους. Χαρακτηριστική, είναι η περίπτωση αζωτοδεσμευτικών μικροοργανισμών που ζουν και πολλαπλασιάζονται στο αγωγό σύστημα της ρίζας και του βλαστού διαφόρων ειδών σιτηρών (De-Polli et al., 1982). Σε αυτούς περιλαμβάνονται τα γένη βακτηρίων *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* και *Pseudomonas* (Boddey and Döbereiner, 1988).

Η πλέον σημαντική κατηγορία αζωτοδεσμευτικών μικροοργανισμών είναι αυτή που δημιουργεί συμβιωτικές σχέσεις με ανώτερα φυτά (Mylona et al., 1995). Στους μικροοργανισμούς αυτούς περιλαμβάνονται βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* και *Allorhizobium*, τα οποία αναφέρονται συνολικά ως ριζόβια, καθώς και στο γένος *Frankia*. Τα ριζόβια ανήκουν στην α-πρωτεοβακτηριακή οικογένεια Rhizobiaceae και επάγουν το σχηματισμό φυματίων σε φυτά της οικογένειας των ψυχανθών (Fabaceae ή Leguminosae), με εξαίρεση το γένος *Parasponia* των Ulmaceae. Το *Frankia* είναι ένας νηματοειδής Gram θετικός ακτινομύκητας που επάγει το σχηματισμό φυματίων σε ξυλώδη φυτά που ανήκουν στις οικογένειες Betulaceae, Casuarinaceae, Myricaceae, Elaeagnaceae, Rhamnaceae, Rosaceae, Coriariaceae και Datisticaceae (Benson and Clawson, 2000; Benson and Silvester, 1993). Ενδιαφέρον προκαλεί η πρόσφατη ανακάλυψη ότι και άλλα βακτήρια εκτός των ριζοβίων προκαλούν το σχηματισμό φυματίων σε ψυχανθή. Για παράδειγμα, ένα στέλεχος του α-πρωτεοβακτηρίου *Methylobacterium* σχηματίζει φυμάτια στο *Crotalaria* και β-πρωτεοβακτήρια συγγενικά του *Burkholderia* στα

φυτά *Machaerium lunatum* και *Aspalathus carnosa*. Πιθανότατα αυτοί οι μικροοργανισμοί έχουν αποκτήσει γονίδια που είναι απαραίτητα για το σχηματισμό φυματίων και την αζωτοδέσμευση με οριζόντια μεταφορά (Moulin et al., 2001; Sy et al., 2001).

### 1.1.2 Συμβιωτική σχέση ριζοβίου-ψυχανθούς

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η πλέον σημαντική συμβιωτική σχέση δέσμευσης του μοριακού αζώτου είναι αυτή μεταξύ ριζοβίου και ψυχανθούς, ενώ η διαδικασία ονομάζεται συμβιωτική αζωτοδέσμευση. Κατά την ανάπτυξη της συμβιωτικής αυτής σχέσης σχηματίζεται ένα νέο φυτικό όργανο με ιδιαίτερα μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά, το οποίο όπως αναφέρθηκε, ονομάζεται φυμάτιο. Εντός του φυματίου, οι διαφοροποιημένες μορφές των ριζοβίων, που ονομάζονται πλέον βακτηριοειδή, βρίσκουν το κατάλληλο περιβάλλον για να φέρουν σε πέρας τη βιοχημική μετατροπή του μοριακού αζώτου σε αμμωνία. Η παραπάνω σχέση αποβαίνει αμοιβαία επωφελής και για τους δύο συμβιώτες, αφού το φυτό παρέχει στα ριζόβια ένα περιβάλλον πλούσιο σε πηγές φωτοσυνθετικού οργανικού άνθρακα και απαλλαγμένο από τον ανταγωνισμό άλλων μικροοργανισμών, ενώ με τη σειρά τους τα ριζόβια καλύπτουν το μεγαλύτερο μέρος των αναγκών του φυτού σε αφομοιώσιμο άζωτο (Udvardi and Poole, 2013; Udvardi and Day, 1997; White et al., 2007).

Τα ριζόβια έχουν τη δυνατότητα να εισβάλλουν στο φυτικό κύτταρο της ρίζας με διάφορους τρόπους. Μπορούν να εισβάλλουν μέσω πληγών που έχουν δημιουργηθεί στην επιφάνεια των φυτικών ριζών είτε λόγω εξωτερικών παραγόντων (ακόμα και από επέμβαση του ανθρώπου), είτε ως αποτέλεσμα καταστροφής του ιστού κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής ανάπτυξης του φυτού (όπως σπάσιμο των πλευρικών ριζών). Ακόμα πιο εντυπωσιακός όμως είναι ο τρόπος εισβολής των ριζοβίων σε κύτταρα της ρίζας τα οποία δεν έχουν υποστεί καμία φθορά, δηλαδή σε κύτταρα των αναπτυσσόμενων ριζικών τριχιδίων και κύτταρα του φλοιού της ρίζας. Ορισμένα ριζόβια έχουν την ικανότητα να εισβάλλουν στις ρίζες ακόμα και στον ενδιάμεσο χώρο μεταξύ των επιδερμικών κυττάρων (Matthysse and Kijne, 1998). Η διαδικασία αυτή περιγράφεται λεπτομερέστερα στη συνέχεια στην παράγραφο 1.1.3.

Για την προσαρμογή των ριζοβίων στο νέο τους ρόλο ως μικροσυμβιώτες απαιτείται η ενεργοποίηση ενός περιορισμένου συνόλου μεταβολικών μονοπατιών και η καταστολή κάποιων άλλων. Σε αυτή τη διαφοροποίηση έχουν μεγάλη σημασία οι φυσιολογικές και βιοχημικές συνθήκες που επιβάλλονται από το φυτό. Και το ίδιο το φυτό όμως υφίσταται κάποια διαφοροποίηση στο μεταβολισμό του κατά τη διαδικασία δημιουργίας των φυματίων (Kahn et al., 1998).

Η ύπαρξη στενών ρυθμιστικών αλληλεπιδράσεων οι οποίες ευθύνονται για τη συντονισμένη έκφραση των γονιδίων των συμβιωτών επιτρέπει να θεωρηθεί η συμβίωση ριζοβίου-ψυχανθούς ως μια εκδήλωση της ενοποίησης των γενετικών συστημάτων ευκαρυωτών (ψυχανθή) και προκαρυωτών (ριζόβια) (Pronogon and Vorob'ev, 2000). Επιπλέον, η θετική ρύθμιση των φυτικών γονιδίων που εμπλέκονται στη γλυκόλυση, τη δέσμευση του άνθρακα και τη βιοσύνθεση αμινοξέων τονίζει τη σημασία αυτών των διαδικασιών στην παροχή του άνθρακα για την αζωτοδέσμευση από τα βακτηριοειδή και την αφομοίωση αμμωνίου από το φυτό (Oldroyd et al., 2005).

Παρόλο που η διαδικασία της αζωτοδέσμευσης είναι ωφέλιμη για το φυτό-ξενιστή, είναι πολύ ασυνήθιστο για κάποιον οργανισμό να αντέχει τη συνεχή παρουσία μικροβίων και μάλιστα σε τόσο μεγάλη συγκέντρωση (Maunoury et al., 2008). Για τον άνθρωπο, η συμβιωτική αυτή σχέση μεταξύ ψυχανθούς και ριζοβίου έχει ιδιαίτερη σημασία για τη σταθερότητα των φυσικών και τεχνητών οικοσυστημάτων, και για την παραγωγικότητα των γεωργικών φυτών και ζώων (Pronogon and Vorob'ev, 2000).

#### **1.1.2.1 Ειδοεξειδίκευση ριζοβίων-ψυχανθών**

Απαραίτητη προϋπόθεση για το σχηματισμό φυματίου είναι το ριζόβιο να είναι συμβατό με το φυτό. Με άλλα λόγια υπάρχει εξειδίκευση στη συμβιωτική σχέση μικροβίου-φυτού. Τα ριζόβια μολύνουν τις ρίζες των φυτών σε μια αντίδραση που είναι εξειδικευμένη ως προς τον ξενιστή. Συγκεκριμένα περιορίζονται μόνο στις ρίζες των ψυχανθών (Fabaceae), αν και υπάρχει η εξαίρεση ορισμένων ειδών του γένους *Parasponia*, για τα οποία είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρούν με βακτήρια από τα γένη *Rhizobium* και *Bradyrhizobium*, παρόλο που το γένος αυτό ανήκει στην οικογένεια Ulmaceae (Trinick, 1979; Becking, 1992). Επίσης, επειδή έχουν αναφερθεί πολλά παραδείγματα δημιουργίας φυματίων σε διαφορετικούς ξενιστές μέσω διαφορετικών οδών από το ίδιο στέλεχος ριζοβίου, θεωρείται ότι τα χαρακτηριστικά της μόλυνσης και της μορφογένεσης του φυματίου καθορίζονται σχεδόν πλήρως από το φυτό-ξενιστή (Kijne, 1992). Έτσι, ορισμένα ριζόβια έχουν την ικανότητα να συμβιώνουν με ένα ευρύ φάσμα φυτών, ενώ άλλα με ένα πιο στενό, ενώ στην περίπτωση ασυμβατότητας είτε δε σχηματίζεται φυμάτιο είτε το φυμάτιο είναι μη λειτουργικό. Στον πίνακα 1.1 παρουσιάζονται τα κυριότερα είδη βακτηρίων και τα αντίστοιχα φυτά με τα οποία μπορούν να αναπτύξουν συμβιωτική σχέση.

**Πίνακας 1.1:** Ενδεικτικές σχέσεις ειδοξειδίκευσης μεταξύ βακτηριακού ριζοβιακού είδους και φυτού ξενιστή. (Τροποποίηση από Hadri et al., 1998).

Ριζόβιο	Φυτά-ξενιστές
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i>
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. viciae bv. trifolii bv. phaseoli	<i>Pisum, Vicia, Lathyrus, Lens</i> spp. <i>Trifolium</i> spp. <i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Mesorhizobium loti</i>	<i>Lotus</i> spp., <i>Anthyllis, Lupinus</i>
<i>Rhizobium etli</i>	<i>Phaseolus</i>
<i>Rhizobium huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>
<i>Rhizobium ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>
<i>Sinorhizobium</i> sp. Strain NGR234	ψυχανθή τροπικών περιοχών, <i>Parasponia</i> spp.
<i>Rhizobium galagae</i>	<i>Galega officinalis, G. orientalis</i>
<i>Sinorhizobium fredii</i>	<i>Glycine max, G. soya, Vigna</i>
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Glycine max, G. soya, Vigna, Macroptilium</i>
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Glycine, Vigna, Macroptilium</i>
<i>Rhizobium</i> sp. BR816 NGR234, MPIK1030	<i>Leucana, Phaseolus, Parasponia</i> Μεγάλο εύρος ξενιστών και επίσης το μη ψυχανθές <i>Parasponia</i>
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Sesbania</i> spp.

### 1.1.2.2 Το *Lotus japonicus-Mesorhizobium loti* ως σύστημα μοντέλο για τη μελέτη της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης.

Στη φύση υπάρχουν περίπου 700 γένη με πάνω από 18.000 είδη ψυχανθών με διαφορετικά χαρακτηριστικά, πολλά από τα οποία έχουν μεγάλη σημασία για τη γεωπονία (Sato and Tabata, 2006). Τα ψυχανθή, από ταξινομικής πλευράς αποτελούν την οικογένεια Fabaceae (Leguminosae). Τα μέλη της οικογένειας των Fabaceae διαθέτουν ένα μοναδικό χαρακτηριστικό, τη δημιουργία φυματίων στις ρίζες τους ως απόκριση στη μόλυνση από βακτήρια που ανήκουν στη οικογένεια Rhizobiaceae.

Στο παρελθόν, για τη μελέτη τη συμβιωτικής σχέσης μεταξύ φυτών και ριζοβίων είχαν χρησιμοποιηθεί πολλά από τα γνωστά ψυχανθή, όμως πλέον η έρευνα έχει εστιάσει σε δύο συγκεκριμένα ζεύγη συμβιωτών. Πρόκειται για το *Medicago truncatula-Sinorhizobium meliloti* και για το *Lotus japonicus-Mesorhizobium loti*. Το πρώτο ζεύγος χρησιμοποιείται ως σύστημα αναφοράς στην περίπτωση δημιουργίας μη καθορισμένων φυματίων, ενώ το δεύτερο στην περίπτωση των καθορισμένων φυματίων (Van den Bosch and Stacey, 2003). Όσον αφορά και στα δύο βακτήρια που προαναφέρθηκαν, οι συμβιωτικές τους λειτουργίες είναι καλά χαρακτηρισμένες και είναι διαθέσιμες οι αλληλουχίες των γονιδιωμάτων τους (Kaneko et al., 2000; Galibert, 2001).



**Εικόνα 1.1:** Άνθη και χέδρωπες του ενήλικων φυτών *L. jaronicus*.

Το *L. jaronicus* έχει επιλεγεί ως ένα ιδανικό φυτό για τη μελέτη των ψυχανθών σε μοριακό επίπεδο (Εικόνα 1.1). Ορισμένα από τα χαρακτηριστικά που παρουσιάζει, όπως είναι ο μικρός κύκλος ζωής (2-3 μήνες), η αυτογονιμότητα, η διπλοειδία ( $n=6$ ) και το μικρό μέγεθος του γονιδιώματός του (472.1 Mb) (Sato and Tabata, 2006), το καθιστούν ιδιαίτερα χρήσιμο για την έρευνα στη γενωματική. Το 67% (315.1 Mb) του γονιδιώματος του *L. jaronicus* έχει καθοριστεί (Sato et al., 2008). Στις περιοχές του γονιδιώματος που έχουν αλληλουχηθεί, η γονιδιακή πυκνότητα είναι ένα γονίδιο ανά 10,7 kbp, και το μέσο μήκος ιντρονίου σε γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες είναι 379 bp (Sato and Tabata, 2006). Συνολικά, έχουν εντοπιστεί 10951 ολόκληρα γονίδια και 19848 τμήματα γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες καλύπτοντας έτσι το 91.3% των γονιδιακών περιοχών. Το 63% από τα γονίδια αυτά παρουσιάζει ομολογία με γονίδια γνωστής λειτουργίας, το 22% με γονίδια πιθανής λειτουργίας ενώ το υπόλοιπο 15% δεν παρουσιάζει καμιά ομοιότητα με αλληλουχίες γονιδίων που είναι κατατεθειμένες στις βιολογικές βάσεις δεδομένων. Παράλληλα το 4 % των γονιδίων του εντοπίζεται μόνο σε ψυχανθή. Εκτός του γονιδιώματος είναι διαθέσιμος και μεγάλος αριθμός ESTs (Expressed Sequence Tags) που προέρχονται από διάφορα όργανα του φυτού. Με την αποκρυπτογράφηση του μεγαλύτερου μέρους του γονιδιώματος

του έχουν καταρτιστεί και συγκριτικοί γενετικοί χάρτες περιοχών που φέρουν γονίδια που εμπλέκονται στη συμβίωση (Sandal et al., 2006). Από φυλογενετικής άποψης, παρόλο που το *L. jaronicus* ανήκει στα ψυχανθή των εύκρατων περιοχών, δημιουργεί καθορισμένα φυμάτια, ένα γεγονός που είναι χαρακτηριστικό των ψυχανθών τροπικών περιοχών, όπως είναι η σόγια *Glycine max* και το κοινό φασόλι.

Όσον αφορά τη λειτουργία διάφορων γονιδίων σημαντικές πληροφορίες μπορούμε να αντλήσουμε και από τα δεδομένα DNA μικροσυστοιχιών. Για παράδειγμα από τη σύγκριση των δεδομένων μικροσυστοιχιών που κατασκευάστηκαν από ρίζες χωρίς φυμάτια και από ρίζες με φυμάτια προέκυψε σημαντικός αριθμός γονιδίων που συμμετέχουν στη λειτουργία των φυματίων (Colebatch et al., 2002). Ένα άλλο εργαλείο που έχουν διαθέσιμο οι ερευνητές για τη μελέτη της λειτουργίας διαφόρων γονιδίων είναι η τεχνική TILLING με την οποία είναι δυνατό να ανιχνεύσουμε φυτά με σημειακές μεταλλάξεις γονιδίων που μας ενδιαφέρουν μέσα από έναν πληθυσμό φυτών (περίπου 5000) που έχει μεταλλαχθεί με EMS (Ethyl MethaneSulfonate) (Perry et al., 2003). Εκτός αυτού είναι πλέον διαθέσιμος στην επιστημονική κοινότητα μεγάλος αριθμός μετασηματισμένων φυτών με το μεταθετό στοιχείο LORE1 (Fukai et al., 2012; Urbanski et al., 2012).

Το *M. loti* είναι ένα Gram αρνητικό βακτήριο της ριζόσφαιρας του εδάφους και ανήκει στο γένος *Mesorhizobium* της οικογένειας Phyllobacteriaceae. Το *M. loti* μπορεί και υιοθετεί δύο διαφορετικούς τρόπους διαβίωσης. Αρχικά, μπορεί να αναπτυχθεί ελεύθερα στο έδαφος αλλά όταν δεν υπάρχει άφθονο διαθέσιμο άζωτο μπορεί και αποικίζει στις ρίζες του *L. jaronicus* σχηματίζοντας φυμάτια μέσω των οποίων γίνεται η αζωτοδέσμευση. Ενώ στα γένη *Rhizobium* και *Sinorhizobium* τα γονίδια που εμπλέκονται στη συμβιωτική αζωτοδέσμευση εντοπίζονται τόσο στο χρωμόσωμα όσο και σε πλασμίδια που αποκαλούνται συμβιωτικά πλασμίδια (pSym), στα γένη *Mesorhizobium* και *Bradyrhizobium* η πλειοψηφία των γονιδίων της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης φαίνεται να εδράζει στα χρωμοσώματα. Η περιοχή αυτή είναι ένα τμήμα μεγέθους 500 Kb και ονομάζεται «συμβιωτική νησίδα». Ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι όταν η νησίδα αυτή μεταφερθεί σε μη-συμβιωτικά είδη του *Mesorhizobium*, αυτά αποκτούν την δυνατότητα σχηματισμού φυματίων (Sullivan and Ronson, 1998). Το γενετικό υλικό του *M. loti* οργανώνεται σε τρία κυκλικά μόρια: ένα χρωμόσωμα των 7.036.071 βάσεων και δύο πλασμίδια, τα pMLa (351.911bp) και pMLb (208.315bp), ολόκληρη η νουκλεοτιδική αλληλουχία του στελέχους MAFF303099 του *M. loti* (Kaneko et al., 2000) και της συμβιωτικής νησίδας του στελέχους R7A του *M. loti* (Sullivan et al., 2002) έχουν πλήρως καθοριστεί. Το χρωμόσωμα περιλαμβάνει 6.752 πιθανά γονίδια που κωδικοποιούν

πρωτεΐνες ενώ από τα πλασμίδια pMLa και pMLb κωδικοποιούν για 320 και 209 πρωτεΐνες αντίστοιχα. Κατά μέσο όρο το μέγεθος κάθε γονιδίου είναι 1.042bp και ανάλογο με αυτό των βακτηριακών ειδών που έχουν εξεταστεί μέχρι σήμερα. Το 54% των γονιδίων του χρωμοσώματος παρουσιάζουν ομολογία με γονίδια γνωστής λειτουργίας, το 21% έχει ομοιότητα με γονίδια των οποίων η λειτουργία είναι υποθετική, ενώ το υπόλοιπο 25% δεν παρουσίασε ομοιότητα με κανένα γνωστό γονίδιο. Στα πλασμίδια pMLa και pMLb ο αριθμός των γονιδίων άγνωστης λειτουργίας είναι 50% και 64%, αντίστοιχα (Kaneko et al., 2000).

Όλα τα παραπάνω κάνουν το σύστημα *L. japonicus*-*M. loti* ένα σημαντικό εργαλείο στα χέρια των ερευνητών που μαζί με πληροφορίες από άλλα ψυχρανθή έχουν δώσει ώθηση στην κατανόηση της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης.

### **1.1.3 Εγκαθίδρυση συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης**

Για την εδραίωση της αζωτοδεσμευτικής συμβίωσης είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν τρία βασικά γεγονότα. Αυτά είναι η ενδοκυτταρική μόλυνση των κυττάρων του ξενιστή από τον μικροσυμβιώτη, η οργανογένεση του φυματίου και η διαδικασία της αζωτοδέσμευσης. Γενικά, κατά το σχηματισμό του φυματίου, η μόλυνση και η οργανογένεση συμβαίνουν ταυτόχρονα, ενώ αζωτοδέσμευση πραγματοποιείται μόνο αφού ολοκληρωθεί η οργανογένεση, υπό την προϋπόθεση ότι η βακτηριακή μόλυνση είναι επιτυχής (Maunoury et al., 2008).

#### **1.1.3.1 Πρωτογενής μετάδοση σημάτων**

Οι συμβιωτικές αλληλεπιδράσεις περιλαμβάνουν τη μοριακή επικοινωνία μεταξύ του φυτού-ξενιστή και του μικροσυμβιώτη στη ριζόσφαιρα (Oldroyd et al., 2005). Κατά τη διαδικασία έναρξης της μόλυνσης, τα φυτά εκκρίνουν από τις ρίζες τους φαινολικά μόρια-σήματα, και κυρίως ειδικές φλαβονοειδείς ενώσεις, οι οποίες γίνονται αντιληπτές από ορισμένους υποδοχείς των ριζοβίων που υπάρχουν στη ριζόσφαιρα. Οι υποδοχείς αυτοί ονομάζονται πρωτεΐνες NodD, και είναι μεταγραφικοί ενεργοποιητές των οπερονίων που ευθύνονται για τη δημιουργία των φυματίων (γονίδια *nod*, *nol* ή *noe*) και βρίσκονται στο γενετικό υλικό των ριζοβίων. Η θέση τους είναι είτε μέσα σε κάποιο πλασμίδιο, είτε στο ίδιο το χρωμόσωμα των βακτηρίων. Τα γονίδια αυτών των οπερονίων κωδικοποιούν για ένζυμα που εμπλέκονται στη σύνθεση εξειδικευμένων μορίων-σημάτων από τα ριζόβια. Αυτά τα μόρια-σήματα δεν είναι άλλα από τους λιποχιτινικούς ολιγοσακχαρίτες (LCOs) (Lerouge et al., 1990; Spaink et al., 1991), οι οποίοι ονομάζονται παράγοντες Nod. Αυτά τα μόρια-σήματα ενεργοποιούν τα ριζικά κύτταρα του ξενιστή (Matthysse and Kijne, 1998).

Οι παράγοντες Nod είναι κρίσιμοι κατά τα πρώτα στάδια της αλληλεπίδρασης, αλλά και κατά την ανάπτυξη του μολυσματικού νηματίου, και πιστεύεται ότι παίζουν κάποιο ρόλο στην απελευθέρωση των βακτηρίων (Ardourel et al., 1994; Downie and Walker, 1999) και στην εξειδικευμένη πρόσδεση στο φυτό-ξενιστή (Dazzo et al., 1988). Πράγματι, ο προσδιορισμός και η σύγκριση των παραγόντων Nod από διαφορετικά ριζοβιακά είδη επισημαίνει το γεγονός ότι όντως υπάρχει μια συσχέτιση μεταξύ του ριζοβιακού εύρους ξενιστών και της δομής των παραγόντων Nod (Dénarié et al., 1996). Είναι γεγονός ότι η φύση του σήματος των φλαβονοειδών και της δομής του παράγοντα Nod είναι βασική για τη διατήρηση της εξειδίκευσης σε αυτή την αλληλεπίδραση, διασφαλίζοντας ότι το φυτό θα «φιλοξενήσει» μόνο ένα συμβατό προς αυτό ριζοβιακό στέλεχος (Oldroyd et al., 2005). Η βιολογική δραστηριότητα των LCOs καθορίζεται από το μήκος του σκελετού της χιτίνης, από τη δομή του λιπιδίου και ένα σύνολο άλλων αντικαταστάσεων πάνω στον ολιγοσακχαριδικό σκελετό (Stougaard, 2000).

Γενικότερα, για τη δημιουργία ενός νέου οργάνου είναι απαραίτητο να ρυθμιστεί χρονικά και χωρικά η δραστηριότητα των γονιδίων και των προϊόντων τους που συμμετέχουν στην οργανογενετική διαδικασία. Έτσι, η ανάπτυξη λειτουργικών φυματίων στις ρίζες εξαρτάται από τη συγχρονισμένη ενεργοποίηση συγκεκριμένων ομάδων γονιδίων και στους δύο συμβιώτες (Stougaard, 2000). Αν και το κάθε βακτηριακό είδος ριζοβίου διαθέτει ένα ξεχωριστό σύνολο γονιδίων που εμπλέκονται στη δημιουργία του φυματίου, υπάρχουν πέντε από αυτά τα γονίδια, τα οποία είναι κοινά για όλα τα είδη των ριζοβίων. Αυτά είναι τα γονίδια *nodABC*, τα οποία συνθέτουν τον κύριο σκελετό των λιποχιτινικών ολιγοσακχαριτών, και τα *nodIJ*, τα οποία εμπλέκονται στην έκκριση των λιποχιτινικών ολιγοσακχαριτών. Από την πλευρά τους τα φυτά διαθέτουν τα γονίδια των νοντουλινών που είναι εξειδικευμένα ως προς τα φυμάτια (Van Kammen, 1984) και διαιρούνται σε δύο κατηγορίες: σε εκείνα που εκφράζονται κατά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης (*ENOD*) και σε εκείνα που εκφράζονται χρονικά κοντά στην έναρξη της αζωτοδέσμευσης (*NOD*) (Nap and Bisseling, 1990).

Εκτός όμως από τους λιποχιτινικούς ολιγοσακχαρίτες των ριζοβίων, πιστεύεται ότι για τη διαδικασία μόλυνσης της ρίζας απαιτούνται και διάφορα άλλα συστατικά που βρίσκονται στην επιφάνεια των ριζοβίων, όπως είναι οι επονομαζόμενες αδεσίνες, δηλαδή ορισμένες ουσίες που βοηθούν στη διαδικασία της πρόσδεσης. Αυτά είναι οι εξωκυτταρικοί πολυσακχαρίτες, οι καψιδιακοί πολυσακχαρίτες, οι λιποπολυσακχαρίτες και κάποιες επιφανειακές πρωτεΐνες (Matthysse and Kijne, 1998). Τα κύτταρα του ξενιστή διαθέτουν με τη σειρά τους πολυσακχαρίτες που βρίσκονται στην επιφάνεια των ριζών (Leigh and Walker,



1994), αλλά και εξειδικευμένους φυτικούς υποδοχείς (κινάσες) που θα αναγνωρίσουν τους παράγοντες Nod του κατάλληλου ριζοβιακού στελέχους που είναι συμβατό και φιλικό προς αυτόν, γεγονός που αποτελεί ένα σύστημα που διασφαλίζει τη σχέση ειδοεξειδίκευσης μεταξύ ψυχανθούς και ριζοβίου.

Τέλος, περιβαλλοντικοί παράγοντες που ενδέχεται να επηρεάζουν τη ριζοβιακή μόλυνση είναι ορισμένα κατιόντα, αλλά και η φάση ανάπτυξης των ριζοβίων. Συγκεκριμένα, έρευνες προβάλλουν το ρόλο του ασβεστίου στη ριζοβιακή πρόσδεση (Caetano-Anolles et al., 1989; Lodeiro et al., 1995; Wisniewski and Delmotte, 1996), και πιστεύεται ότι μαζί με το μαγνήσιο παίζουν σημαντικό ρόλο στην σταθεροποίηση των αδεσινών στη βακτηριακή επιφάνεια (Swart, 1994) ή στη ρύθμιση του επιφανειακού φορτίου των φυτικών και βακτηριακών κυττάρων. Αυτά τα φαινόμενα εξαρτώνται από το pH και τονίζουν τη σημασία των φυσικοχημικών αλληλεπιδράσεων κατά την πρόσδεση (Matthysse and Kijne, 1998). Επίσης, το αναπτυξιακό στάδιο των ριζοβίων θεωρείται ότι επηρεάζει την ικανότητα πρόσδεσης τους.

#### **1.1.3.2 Δευτερογενής μετάδοση σημάτων μέσω φυτορμονών**

Υπό την επίδραση βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων, οι μεταβολές στις σχετικές συγκεντρώσεις των ορμονών επηρεάζουν ισχυρά την αναπτυξιακή πορεία κυττάρων και οργάνων (Stougaard, 2000). Έτσι λοιπόν, στις ουσίες που επηρεάζουν τη φυματιογένεση, οι οποίες προαναφέρθηκαν, μπορούν να προστεθούν και διάφορες φυτορμόνες, όπως η αυξίνη, οι κυτοκινίνες και το αιθυλένιο.

Η θέση όπου εντοπίζονται οι μέγιστες συγκεντρώσεις της αυξίνης συμπίπτει με τα κέντρα διαίρεσης στην αρχή του πρωτογενούς μεριστώματος του φυματίου στους διαφορετικούς τύπους φυματίων και ίσως να είναι καθοριστική για τις πρώτες διαιρέσεις (Maunoury et al., 2008). Επιπλέον, φαίνεται ότι μετά το αρχικό σήμα των LCOs, ακολουθεί μεταβολή της ορμονικής ισορροπίας, η οποία πιθανώς ευαισθητοποιεί τα κύτταρα ώστε να διαιρεθούν (Stougaard, 2000).

Η εφαρμογή κυτοκινινών στις ρίζες των ψυχανθών έχει αναφερθεί ότι επάγει την έκφραση γονιδίων πρώιμων νοντουλινών, καθώς και διαιρέσεις των κυττάρων του φλοιού με έναν τρόπο παρόμοιο με εκείνον που δρα και η προσθήκη των γνήσιων παραγόντων Nod (Mathesius et al., 2000). Έτσι, πιθανώς οι κυτοκινίνες και οι LCOs να επηρεάζουν τη μεταγωγή του ίδιου σήματος κατά τη φυματιογένεση, ή να αποτελούν μέρος αυτής (Stougaard, 2000).

Μια άλλη ορμόνη η οποία μπορεί να επιδράσει στη φυματιογένεση είναι το αιθυλένιο, το οποίο ανάλογα με τον τύπο του φυματίου και τον τρόπο μόλυνσης επηρεάζει τη διαδικασία αυτή με πολύ διαφορετικούς τρόπους. Ειδικότερα, για τη δημιουργία των μη καθορισμένων φυματίων το αιθυλένιο αποτελεί γενικώς έναν αρνητικό ρυθμιστή (Peters and Crist-Estes, 1989; Zaat et al., 1989; Heidstra et al., 1997; Penmetsa and Cook, 1997), ενώ για εκείνη των καθορισμένων η δράση του ποικίλλει. Για παράδειγμα, το αιθυλένιο επιδρά παρεμποδιστικά στη φυματιογένεση του *L. jaronicus*, ενώ η σόγια και το φασόλι δεν επηρεάζονται από την παρουσία του (Suganuma et al., 1995; Schmidt et al., 1999; Van Spronsen et al., 2001; Nukui et al., 2004). Ένα άλλο χαρακτηριστικό του αιθυλενίου είναι ότι συμμετέχει στον έλεγχο του αριθμού των φυματίων που θα δημιουργηθούν (Hadri et al., 1998).

### **1.1.3.3 Η διαδικασία της ενδοκυτταρικής μόλυνσης των κυττάρων του ξενιστή από το μικροσυμβίωτη**

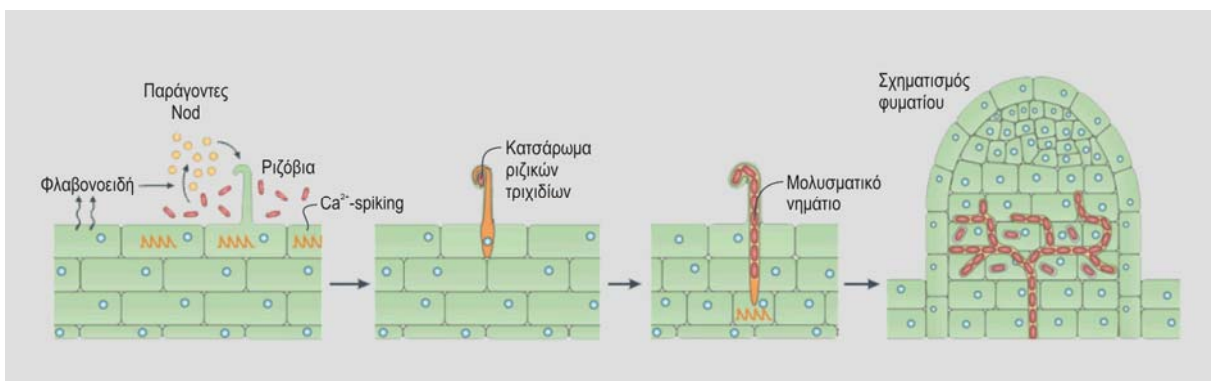
Από τη στιγμή που οι υποδοχείς του φυτού θα αναγνωρίσουν τους παράγοντες Nod του ριζοβίου, μπορεί να ξεκινήσει η ουσιαστική διαδικασία της μόλυνσης. Οι παράγοντες Nod ακινητοποιούνται τοπικά στο κυτταρικό τοίχωμα (Goedhart et al., 2000). Η αναγνώρισή τους εξαρτάται από κάποιες κινάσες και οδηγεί στην ενεργοποίηση καναλιών ιόντων ασβεστίου ( $\text{Ca}^{2+}$ ) που εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο τη συγκέντρωση των ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$  στο κυτταρόπλασμα (Shaw and Long, 2003). Συγκεκριμένα, παρατηρείται μια αρχική ροή  $\text{Ca}^{2+}$  στην άκρη του ριζικού τριχιδίου, και στη συνέχεια επαναλαμβανόμενες κυτταροπλασματικές διακυμάνσεις του  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}$ -spiking), στην περιοχή που περιβάλλει τον πυρήνα (Oldroyd and Downie, 2004). Επίσης, τροποποιείται ο κυτταροσκελετός καθώς εμφανίζονται νέα ινίδια ακτίνης (de Rujiter et al., 1999, Miller et al., 1999) και δημιουργείται ένα δίκτυο μικροσωληνίσκων μεταξύ του πυρήνα και του σημείου όπου είναι αυξημένη η συγκέντρωση του  $\text{Ca}^{2+}$  (Timmers et al., 1999).

Η πρόσδεση των ριζοβίων κοντά στο άκρο του ριζικού τριχιδίου προκαλεί μια αλλαγή στην κατεύθυνση της ανάπτυξής του (Εικόνα 1.2). Σε πολλά ριζοβιακά στελέχη, την πρόσδεση ακολουθεί ένα δεύτερο στάδιο που είναι αυτό της δημιουργίας ινιδίων κυτταρίνης από τα βακτήρια, με σκοπό να συνεισφέρουν στη διαμόρφωση βακτηριακών συσσωματωμάτων πάνω στην επιφάνεια του ριζικού τριχιδίου (Matthysse and Kijne, 1998). Το αποτέλεσμα είναι να αρχίσει να κατσαρώνει το ριζικό τριχίδιο γύρω από τα ριζόβια, ώστε να δημιουργήσει μια κλειστή κοιλότητα και να παγιδεύσει τη ριζοβιακή μικροαποικία. Τα ριζόβια οδηγούνται μέσα στο φυτικό ιστό μέσω ειδικής σωληνοειδούς δομής που ξεκινά

από το σημείο της κοιλότητας και αναπτύσσεται κατά μήκος του στελέχους του ριζικού τριχιδίου. Η δομή αυτή ονομάζεται μολυσματικό νημάτιο και δημιουργείται από το ίδιο το φυτό. Συνεπώς, για να δημιουργηθεί το μολυσματικό νημάτιο είναι απαραίτητη η παρουσία ζωντανών βακτηρίων (Matthysse and Kijne, 1998). Ταυτόχρονα, οι παράγοντες Nod ενεργοποιούν τα κύτταρα του φλοιώδους παρεγχύματος που βρίσκονται απέναντι από το σημείο της μόλυνσης και με αυτό τον τρόπο προκαλούν την αποδιαφοροποίηση και τη διαίρεσή τους, ώστε να σχηματιστεί το πρωτογενές μερίστωμα του φυματίου.

Όταν το γεμάτο από πολλαπλασιαζόμενα ριζόβια μολυσματικό νημάτιο φτάσει στα κύτταρα του πρωτογενούς μεριστώματος, απελευθερώνει ενδοκυτταρικά δομές που ονομάζονται μολυσματικά σταγονίδια, τα οποία δε διαθέτουν κυτταρικό τοίχωμα και η μεμβράνη τους βρίσκεται σε άμεση επαφή με τα βακτήρια. Λόγω της άμεσης επαφής, ακολουθεί πρόσληψη των ριζοβίων με ενδοκύτωση μέσα σε ένα νέο κυτταροπλασματικό διαμέρισμα, το συμβιόσωμα. Στο συμβιόσωμα, μια μεμβράνη που προέρχεται από το πλασμαλήμμα περικλείει ένα ή περισσότερα ριζόβια, αναλόγως με το αν πρόκειται για μη καθορισμένα ή καθορισμένα φυμάτια, αντίστοιχα (Maunoury et al., 2008). Η μεμβράνη αυτή ονομάζεται μεμβράνη του συμβιοσώματος ή περιβακτηριακή μεμβράνη (Kijne, 1992), και ρόλος της είναι να διαχωρίζει τα βακτηριοειδή από το κυτταρόπλασμα του ξενιστή και παράλληλα να ελέγχει την κυκλοφορία των θρεπτικών μεταξύ τους (Oldroyd et al., 2005).

Η μόλυνση συνεχίζεται διακυτταρικά, καθώς όταν το μολυσματικό νημάτιο φτάσει στη βάση του τριχιδίου, αρχίζει να διακλαδίζεται και να εξαπλώνεται από κύτταρο σε κύτταρο, μεταφέροντας με αυτό τον τρόπο τα ριζόβια στο υπό σχηματισμό φυμάτιο. Η διέλευση του μολυσματικού νηματίου από το ένα κύτταρο στο άλλο σημαίνει ότι το κυτταρικό τοίχωμα



**Εικόνα 1.2:** Η διαδικασία της μόλυνσης της ρίζας ενός ψυχανθούς από τα ριζόβια.

Τα ριζόβια ανιχνεύονται από τα ριζικά τριχίδια, τα οποία αρχίζουν να καταρρώνουν και δημιουργούν ένα μολυσματικό νημάτιο. Τα ριζόβια περνούν στο εσωτερικό του ριζικού τριχιδίου μέσω του νεοσχηματισμένου μολυσματικού νηματίου και μολύνουν τα κύτταρα του φλοιού. Μέσα στα μολυσμένα κύτταρα του φλοιού δημιουργούνται τα βακτηριοειδή, τα οποία τελικά οδηγούν στη δημιουργία του φυματίου.

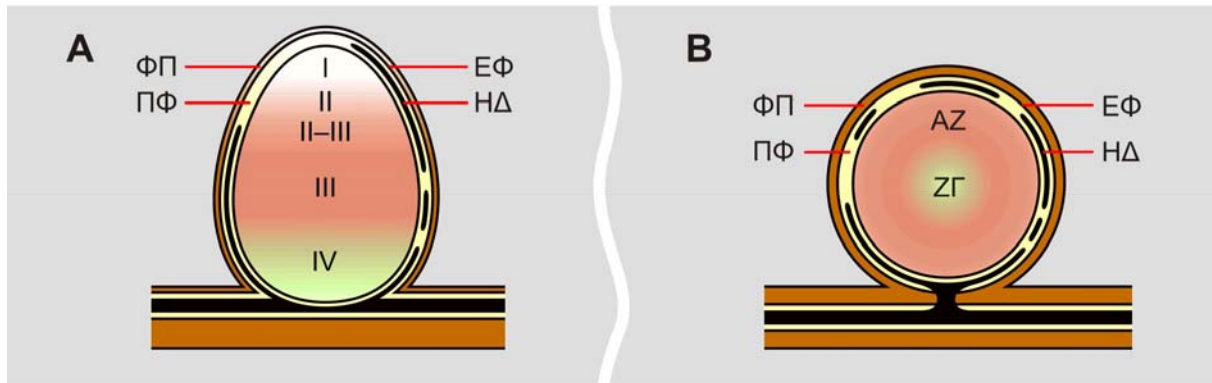
αποδομείται τοπικά, το νημάτιο ενώνεται με το κυτταρικό τοίχωμα και η επιμήκυνση του νηματίου συνεχίζεται στο γειτονικό κύτταρο (Van Spronsen et al., 1994). Τα βακτήρια που βρίσκονται εντός αυτών των κυττάρων ονομάζονται βακτηριοειδή. Τα κύτταρα του ξενιστή που έχουν πλέον μολυνθεί σταματούν να διαιρούνται, όμως αρχίζουν να διαφοροποιούνται σε αζωτοδεσμευτικά συμβιωτικά κύτταρα, σε συνεργασία με το μικροσυμβιώτη τους. Μετά το πέρας της λειτουργικής ζωής του φυματίου ακολουθεί η φάση της γήρανσης και ο θάνατος (Purpo et al., 2005).

#### **1.1.3.4 Καθορισμένα και μη καθορισμένα φυμάτια**

Τα φυμάτια χωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες, σύμφωνα με μορφολογικά και λειτουργικά κριτήρια. Συγκεκριμένα, στη φύση υπάρχουν τα καθορισμένα και τα μη καθορισμένα φυμάτια.

Στα καθορισμένα φυμάτια (Εικόνα 1.3), το πρωτογενές μερίστωμα (primordium) προέρχεται από το εξωτερικό και το ενδιάμεσο τμήμα του φλοιού. Η κυτταρική διαίρεση στο πρωτογενές μερίστωμα σταματά πολύ γρήγορα και δε σχηματίζεται μόνιμο μερίστωμα. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι ο αριθμός των φυτικών κυττάρων δε μεταβάλλεται. Παρόλα αυτά το μέγεθος του φυματίου αυξάνεται, διότι τα βακτήρια που βρίσκονται μέσα στα κύτταρα του ξενιστή διαιρούνται συνεχώς και γι' αυτό το λόγο τα κύτταρα διογκώνονται ώστε να τα «φιλοξενήσουν». Συνεπώς, το μέγεθος του φυματίου εξαρτάται κυρίως από την αύξηση του μεγέθους των μολυσμένων κυττάρων. Η αζωτοδέσμευση ξεκινά ταυτόχρονα σε όλα τα μολυσμένα κύτταρα, πριν ακόμα ολοκληρωθεί η διόγκωση των κυττάρων. Όταν τελειώσει η διαφοροποίηση του φυματίου, σταματά και η ανάπτυξη του, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός σφαιρικού φυματίου που θα περιέχει μια ομοιογενή ζώνη αζωτοδέσμευσης. Επειδή τα αζωτοδεσμευτικά κύτταρα δεν ανανεώνονται, η φάση της αζωτοδέσμευσης είναι προσωρινή, και γι' αυτό το λόγο το φυμάτιο οδηγείται κάποια στιγμή στη γήρανση. Τελικά, ενώ τα φυτικά κύτταρα αποσυντίθενται, μέρος του πληθυσμού των βακτηριοειδών επιβιώνει μετά την απελευθέρωσή του από ένα γηρασμένο φυμάτιο (Purpo et al., 2005).

Στα μη καθορισμένα φυμάτια (Εικόνα 1.3), το πρωτογενές μερίστωμα προέρχεται από το εσωτερικό τμήμα του φλοιώδους παρεγχύματος της ρίζας. Η κυτταρική διαίρεση συνεχίζεται στην ακραία περιοχή του πρωτογενούς μεριστώματος το οποίο δημιουργεί το ακραίο μερίστωμα που παραμένει ενεργό καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του φυματίου. Αυτά τα φυμάτια αυξάνουν συνεχώς σε μέγεθος λόγω της σταθερής αύξησης του κυτταρικού αριθμού, αλλά και της διόγκωσης των μολυσμένων κυττάρων. Έτσι, αποκτούν ένα επίμηκες



**Εικόνα 1.3:** Μορφολογία μη καθορισμένων (Α) και καθορισμένων φυματίων (Β).

Οι ιστοί από τους οποίους αποτελούνται και οι δύο τύποι φυματίων είναι οι εξής: φλοιώδες παρέγχυμα (ΦΠ), ενδοδερμίδα του φυματίου (ΕΦ), ηθμαγγειώδης δεσμίδα του φυματίου (ΗΔ), παρέγχυμα του φυματίου (ΠΦ). Στα μη καθορισμένα φυμάτια οι διαδοχικές ζώνες του κεντρικού ιστού είναι: μεριστωματική ζώνη (I), ζώνη μόλυνσης (II), ενδιάμεση ζώνη μεταξύ της ζώνης μόλυνσης και της αζωτοδεσμευτικής ζώνης (II-III), αζωτοδεσμευτική ζώνη (III), ζώνη γήρανσης (IV), ενώ στα καθορισμένα φυμάτια είναι: αζωτοδεσμευτική ζώνη (AZ) και ζώνη γήρανσης (ΖΓ).

σχήμα και διαχωρίζονται σε τέσσερις διαφορετικές ζώνες ανάλογα με τη φάση στην οποία βρίσκονται τα κύτταρα. Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται και στο σχήμα διαθέτουν τις ζώνες του ακραίου μεριστώματος, της μόλυνσης και της διαφοροποίησης, της αζωτοδέσμευσης και της γήρανσης. Γίνεται αντιληπτό ότι για να διατηρηθεί αυτή η δομή του μη καθορισμένου φυματίου θα πρέπει να υπάρχει μια απόλυτη ισορροπία μεταξύ του ρυθμού διαίρεσης του μεριστώματος και του ρυθμού μόλυνσης των μετα-μιτωτικών κυττάρων (Maunougy et al., 2008). Όταν ένα φυμάτιο παύσει να είναι ενεργό, τότε μαζί με την αυτόλυση του κυτταροπλάσματος του φυτικού κυττάρου, πεθαίνει και ολόκληρος ο πληθυσμός των βακτηριοειδών (Van de Velde et al., 2006).

Καθορισμένα φυμάτια σχηματίζουν συνήθως τα ψυχανθή τροπικών περιοχών, όπως για παράδειγμα τα *G. max*, *Phaseolus vulgaris*, και *Vigna* sp. Ωστόσο, καθορισμένα φυμάτια σχηματίζει και το *L. japonicus*, παρά το γεγονός ότι ανήκει στα ψυχανθή των εύκρατων περιοχών. Από την άλλη πλευρά, μη καθορισμένα φυμάτια σχηματίζουν συνήθως τα ψυχανθή των εύκρατων περιοχών, όπως για παράδειγμα τα γένη *Medicago*, *Pisum*, *Trifolium*, και *Lupinus*.

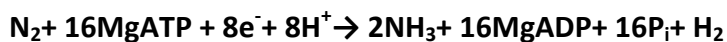
#### 1.1.4 Φυσιολογία και βιοχημεία του φυματίου

##### 1.1.4.1 Το ένζυμο της νιτρογενάσης

Η νιτρογενάση είναι το ένζυμο που ουσιαστικά προσδίδει στα ριζόβια την ικανότητα της αζωτοδέσμευσης, δηλαδή την ικανότητα κατάλυσης της αναγωγής του αερίου  $N_2$  σε  $NH_3$ . Η νιτρογενάση είναι ένα ενζυμικό σύμπλοκο, το οποίο αποτελείται από δύο υπομονάδες (Ει-

κόνα 1.4 A). Η υπομονάδα I (ή δινιτρογενάση ή πρωτεΐνη FeMo) είναι ένα ετεροτετραμερές  $\alpha_2\beta_2$  μεγέθους 220 kDa περίπου, το οποίο περιέχει 4 δομές  $Fe_4S_4$  (τις δομές P) και έναν συμπαράγοντα που αποτελείται από Fe και Mo. Αυτός ο συμπαράγοντας αποτελεί το καταλυτικό κέντρο για την αναγωγή του  $N_2$ . Η υπομονάδα II (ή αναγωγάση δινιτρογενάσης ή πρωτεΐνη Fe) είναι ένα ετεροδιμερές μεγέθους 60 kDa περίπου, το οποίο περιέχει μια μεμονωμένη δομή  $Fe_4S_4$  (Kaminski et al., 1998).

Όπως συμπεραίνεται από τα παραπάνω, η νιτρογενάση των ριζοβίων είναι μια Mo-νιτρογενάση. Παρόλα αυτά, σε ορισμένα στελέχη του εδαφικού βακτηρίου *Azotobacter* έχουν βρεθεί και εναλλακτικοί τύποι νιτρογενασών, όπου στη θέση του Mo βρίσκεται Va- ή Fe, οι οποίοι όμως δεν εντοπίζονται στα ριζόβια. Η Fe πρωτεΐνη ανάγεται *in vivo* από δότες ηλεκτρονίων που έχουν χαμηλό δυναμικό. Στη συνέχεια τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται ένα κάθε φορά στην Fe πρωτεΐνη μέσω μιας διαδικασίας που περιλαμβάνει την υδρόλυση του MgATP (Εικόνα 1.4 B). Αυτή η κυκλική διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρις ότου συγκεντρωθούν αρκετά ηλεκτρόνια για την πλήρη αναγωγή του υποστρώματος. Η αντίδραση που καταλύεται από τη νιτρογενάση είναι η εξής:

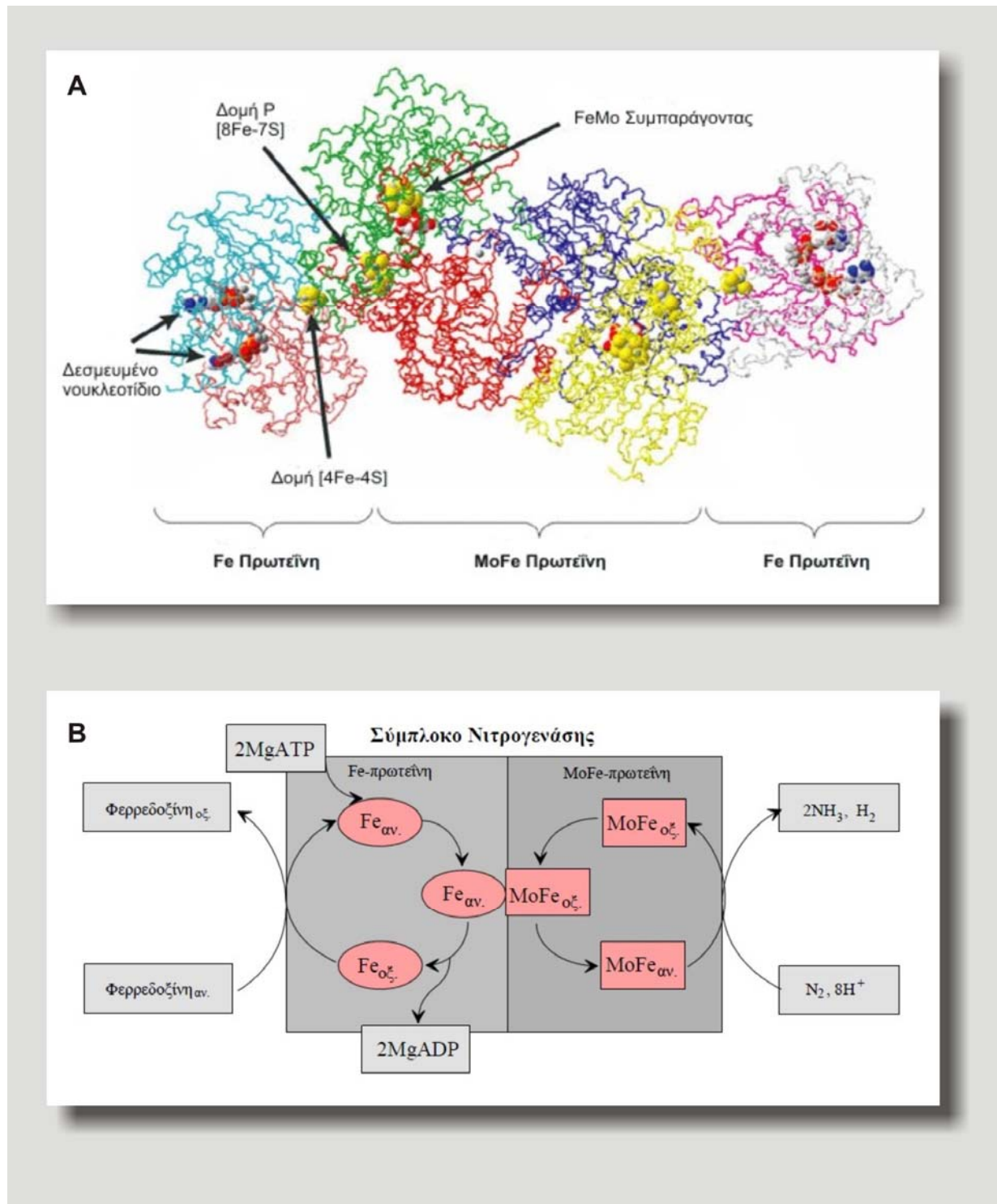


Η παραπάνω εξίσωση αποδεικνύει το υψηλό ενεργειακό κόστος της βιολογικής αζωτοδέσμευσης (Kaminski et al., 1998). Αυτό συμβαίνει διότι τα δύο άτομα αζώτου που σχηματίζουν το μοριακό  $N_2$  συγκρατούνται μεταξύ τους με έναν τριπλό δεσμό, ο οποίος είναι εξαιρετικά σταθερός, και κατά συνέπεια χρειάζεται ικανή ποσότητα ενέργειας ώστε να διασπαστεί.

Ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό της νιτρογενάσης είναι η ευαισθησία που παρουσιάζει στο οξυγόνο, η οποία οφείλεται κυρίως στην υπομονάδα της Fe πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, η νιτρογενάση απαιτεί ένα αυστηρά αναερόβιο περιβάλλον για να δράσει, και, κατά συνέπεια, οι αερόβιοι αζωτοδεσμευτικοί οργανισμοί, όπως είναι τα ριζόβια, πρέπει να προστατεύουν τη νιτρογενάση τους από το οξυγόνο (Hill, 1992).

#### 1.1.4.2 Ο ρόλος του οξυγόνου στη λειτουργία του φυματίου

Η συγκέντρωση του οξυγόνου στο φυμάτιο αποτελεί έναν βασικό, αν όχι τον κυριότερο, ρυθμιστή του μεταβολισμού του φυματίου, αλλά και του φυτού (Kahn et al., 1998). Η λειτουργία του φυματίου συνοδεύεται από μειωμένα επίπεδα ελεύθερου οξυγόνου, γεγονός το οποίο αποτελεί προϋπόθεση για τη δραστικότητα της ευαίσθητης στο οξυγόνο νιτρογενάσης στα ριζόβια (Oldroyd et al., 2005). Τα επίπεδα του οξυγόνου ελέγχουν την



**Εικόνα 1.4:** Το σύμπλοκο της νιτρογενάσης.

(A) Δομή του συμπλόκου της νιτρογενάσης. (B) Μηχανισμός δράσης της νιτρογενάσης. Τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από την φερρεδοξίνη ένα ανά κύκλο. Απαιτούνται οκτώ πλήρεις κύκλοι για την αναγωγή ενός μορίου N<sub>2</sub> και την παραγωγή 2NH<sub>3</sub> και ενός μορίου H<sub>2</sub> που αποτελεί παραπροϊόν της αντίδρασης. (Τροποποίηση από Taiz and Zeiger, 1998)

έκφραση πολλών γονιδίων στα ριζόβια (Batut and Boistard, 1994), και γι' αυτό πιστεύεται ότι τα χαμηλά επίπεδα οξυγόνου αποτελούν ένα σημαντικό έναυσμα για τη διαφοροποίηση των ριζοβίων σε βακτηριοειδή μέσα στα φυμάτια (Oldroyd et al., 2005).

Αναλυτικότερα, η συγκέντρωση του οξυγόνου μέσα στο φυμάτιο, όχι μόνο ελέγχει την έκφραση των γονιδίων *nif* και *fix*, σε ποσοτικό επίπεδο, αλλά επίσης προσδιορίζει πού θα εκφραστούν τα γονίδια. Τα γονίδια *nif* και *fix* μπορούν να οργανώνονται σε πολλαπλές δομές, οι οποίες εντοπίζονται σε διαφορετικό σημείο αναλόγως με το ριζόβιο στο οποίο ανήκουν. Οι λειτουργίες που σχετίζονται με τη συμβίωση (δημιουργία φυματίου και αζωτοδέσμευση) στα ταχέως αναπτυσσόμενα ριζόβια φέρονται σε μεγάλα πλασμίδια (ακόμη και μεγαλύτερα του 1Mb), τα οποία ονομάζονται πλασμίδια *pSym*, ενώ στα αργά αναπτυσσόμενα ριζόβια φέρονται στο χρωμόσωμα (Kamiski et al., 1998). Τα περισσότερα από τα γονίδια *nif* και *fix* είναι κοινά για όλα τα ριζοβιακά είδη. Έτσι, το οξυγόνο κατέχει πρωτεύοντα ρόλο στη συμβίωση, καθώς είναι παράλληλα υπόστρωμα για την αναπνοή, παρεμποδιστής δραστηριότητας της πρωτεΐνης NifA και της νιτρογενάσης, και μόριο-σήμα (Kaminski et al., 1998).

Συγκεκριμένα, λόγω της ύπαρξης μιας επιπλέον περιοχής στην πρωτεΐνη NifA για τη δέσμευση του οξυγόνου, η ενεργοποίηση της σύνθεσης της νιτρογενάσης στα ριζόβια, η οποία εξαρτάται από το *nifA*, είναι ευαίσθητη στο οξυγόνο. Επίσης ως απόκριση στη χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου στα φυμάτια, το ρυθμιστικό σύστημα FixLJ ενεργοποιεί τη μεταγραφή του *nifA*, προϊόντα του οποίου ελέγχουν τη μεταγραφή άλλων *nif* και *fix* γονιδίων που απαιτούνται για την αζωτοδέσμευση. Ακολούθως, η NifA επάγει τη μεταγραφή του οπερονίου *fixABCX*, προϊόντα του οποίου εμπεριέχονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων τα οποία απαιτούνται για την αναγωγή του αζώτου από τη νιτρογενάση (Fischer, 1994).

Συνεπώς, οι χαμηλές συγκεντρώσεις του οξυγόνου στα φυμάτια των ψυχανθών επάγουν την έκφραση των πρωτεϊνών της νιτρογενάσης, καθώς και άλλων πρωτεϊνών που διευκολύνουν την παροχή ATP και ηλεκτρονίων σε αυτό το ένζυμο. Έτσι, το μικροαερόβιο περιβάλλον του φυματίου όχι μόνο επιτρέπει αλλά και προωθεί με τρόπο ανεξάρτητο την αζωτοδέσμευση στα βακτηριοειδή (Kahn et al., 1998).

Και στους δύο τύπους φυματίων, δηλαδή στα καθορισμένα και τα μη καθορισμένα φυμάτια, τα μολυσμένα κύτταρα σχηματίζουν τον κεντρικό ιστό που περιβάλλεται από ένα εξωτερικό στρώμα μη μολυσμένων κυττάρων το οποίο αποτελεί το παρέγχυμα του φυματίου. Το παρέγχυμα του φυματίου είναι πολύ σημαντικό για τη φυσιολογία του



φυματίου, καθώς περιορίζει την εισροή οξυγόνου (και άλλων αερίων) μέσα στη μολυσμένη ζώνη του φυματίου, και περιέχει τις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες μέσω των οποίων γίνεται η ανταλλαγή των θρεπτικών με το φυτό (Brown and Walsh, 1994). Παράλληλα, όμως, ο ρυθμός κατανάλωσης οξυγόνου από τα βακτηριοειδή και τα μιτοχόνδρια μέσα στο φυμάτιο είναι υψηλός (Kahn et al., 1998), καθώς η ροή οξυγόνου που απαιτείται για την αναπνοή του βακτηριοειδούς είναι πολύ υψηλή (White et al., 2007). Κατά συνέπεια, στο εσωτερικό των μολυσμένων κυττάρων του φυματίου πρέπει να επικρατούν μικροαερόβιες συνθήκες, διατηρώντας όμως τη ροή οξυγόνου σε υψηλά επίπεδα.

Γι' αυτό το λόγο, στο κυτταρόπλασμα του φυτού υπάρχει μια πρωτεΐνη που δεσμεύει το οξυγόνο και ονομάζεται ψυχανθοαιμοσφαιρίνη. Η ψυχανθοαιμοσφαιρίνη είναι η κυρίαρχη φυτική πρωτεΐνη στα φυμάτια, καθώς φτάνει μέχρι και το 30% των ολικών διαλυτών πρωτεϊνών, και είναι αυτή η οποία ευθύνεται για το κόκκινο χρώμα των φυματίων (Kaminski et al., 1998). Παρουσιάζει μια εξαιρετικά μεγάλη συγγένεια προς το  $O_2$ , με γρήγορο ρυθμό κινητικής ως προς την πρόσδεση και αργό ως προς την απόσπασή της. Γενικότερα, εντοπίζεται στα μολυσμένα κύτταρα ακριβώς πριν από την εμφάνιση της δραστηριότητας της νιτρογενάσης (Kaminski et al., 1998).

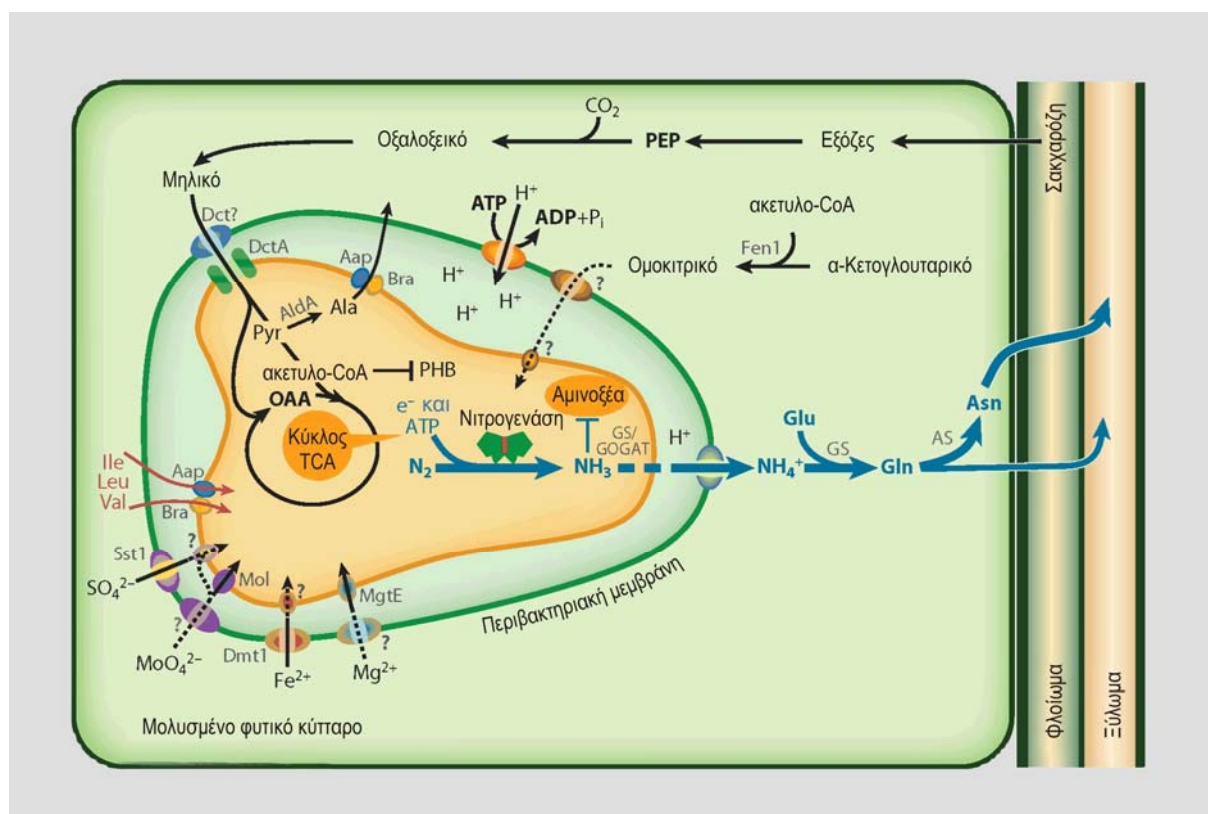
Η ψυχανθοαιμοσφαιρίνη έχει την ιδιότητα να αυξάνει τη μεταφορά του  $O_2$  μέσω του κυτταροπλάσματος, αυξάνοντας την ποσότητα του  $O_2$  μέσα στο κύτταρο χωρίς όμως να αυξάνει την ποσότητα του ελεύθερου  $O_2$ . Επιπλέον, η ψυχανθοαιμοσφαιρίνη αμβλύνει τις μεταβολές που προκαλούνται στη συγκέντρωση του οξυγόνου λόγω μεταβολής του φράγματος διάχυσης ή του ρυθμού αναπνοής (Kahn et al., 1998). Κατά συνέπεια, τα επίπεδα της συγκέντρωσης του  $O_2$  διατηρούνται χαμηλά, γεγονός που είναι πολύ σημαντικό για τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση, λόγω της γνωστής ευαισθησίας της νιτρογενάσης στο οξυγόνο (Kahn et al., 1998). Χαρακτηριστικά, τα φυμάτια των ψυχανθών διατηρούν μια συγκέντρωση οξυγόνου περίπου στα 3 έως 22 nM (Witty, 1991; Hunt and Layzell, 1993) με τη βοήθεια της ψυχανθοαιμοσφαιρίνης σε αντιδιαστολή με τη φυσιολογική συγκέντρωση των 250μM υπό αερόβιες συνθήκες (Kaminski et al., 1998).

#### **1.1.4.3 Η αφομοίωση του αζώτου στα φυμάτια**

Μελέτες σήμανσης στο παρελθόν έδειξαν ότι το αμμώνιο ( $NH_4^+$ ) που προκύπτει από την αναγωγή του αζώτου ( $N_2$ ) μέσω της νιτρογενάσης στα βακτηριοειδή αποβάλλεται άμεσα από το φυτό και αφομοιώνεται από τα αμινοξέα (Lodwig and Poole, 2003) (Εικόνα 1.5). Τα κυριότερα αμινοξέα που διακινούνται μέσα στα φυμάτια των περισσότερων ψυχανθών

είναι η ασπαραγίνη (Asn), η γλουταμίνη (Gln), το ασπαρτικό οξύ (Asp), το γλουταμινικό οξύ (Glu) και η αλανίνη (Ala) (Vance, 2008).

Η αρχική αφομοίωση του δεσμευμένου  $\text{NH}_4^+$  στα φυμάτια γίνεται μέσω της συντονισμένης δράσης τεσσάρων ενζύμων (Cren and Hirel, 1999; Ireland and Lea, 1999; Mifflin and Habash, 2002; Coruzzi, 2003). Από αυτά τα δύο πρώτα είναι η συνθετάση της γλουταμίνης (GS) και η συνθάση του γλουταμινικού (GOGAT), που αναφέρονται από κοινού ως κύκλος GS/GOGAT, και καταλύουν τη σύνθεση της γλουταμίνης και του γλουταμινικού, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, το δεσμευμένο άζωτο μέσω της αμινοτρανσφεράσης του ασπαρτικού (AAT) και της συνθετάσης της ασπαραγίνης (AS) ενσωματώνεται περαιτέρω στο ασπαρτικό και την ασπαραγίνη, αντίστοιχα. Οι σκελετοί άνθρακα που απαιτούνται για την αρχική αφομοίωση



**Εικόνα 1.5:** Μεταφορά και μεταβολισμός ενός μολυσμένου κυττάρου του φυματίου.

Η σακχαρόζη που εισέρχεται από το υπέργειο τμήμα του φυτού στο μολυσμένο κύτταρο του φυματίου μετατρέπεται σε μηλικό από το φυτό και μεταφέρεται μέσω της συμβιωτικής μεμβράνης στα βακτηριοειδή, όπου τροφοδοτεί τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση. Το προϊόν της αζωτοδέσμευσης εξαγεται στη συνέχεια στο φυτό, όπου αφομοιώνεται στην ασπαραγίνη (Asn) για να εξαχθεί στο υπέργειο τμήμα του φυτού (μπλε βέλη). Σε πολλά ψυχανθή, όπως η σόγια, το εξαγόμενο προϊόν της αζωτοδέσμευσης είναι οι ουρεΐδες αντί η ασπαραγίνη. Το φυτό πρέπει να παρέχει στο βακτηριοειδές μέταλλα και ιόντα, παρόλο που μόνο μερικά από τα συστήματα μεταφοράς του συμβιωσώματος και της περιβακτηριακής μεμβράνης έχουν καθοριστεί. Πολλά ριζόβια στερούνται της ικανότητας να συνθέσουν ομοκιτρικό ή μετατρέπονται σε συμβιωτικά αυξότροφα και εξαρτώνται από το φυτό για την παροχή αμινοξέων με διακλαδιζόμενη πλευρική αλυσίδα. (Τροποποίηση από Udvardi and Poole, 2013)

του  $\text{NH}_4^+$  προέρχονται εν μέρει από τη διάσπαση της γλυκόζης μέσω της SS και της γλυκόλυσης που οδηγεί στην πορεία που περιγράφηκε νωρίτερα.

Πιστεύεται ότι στα αζωτοδεσμευτικά βακτηριοειδή η αμμωνία ( $\text{NH}_3$ ) διαχέεται μέσα σε έναν οξινισμένο χώρο του συμβιοσώματος ώστε να προωθηθεί η δημιουργία του  $\text{NH}_4^+$  για να μεταφερθεί μέσω της μεμβράνης του συμβιοσώματος (Tyerman et al., 1995; Day et al., 2001). Η οξίνιση του χώρου μέσα στο συμβιόσωμα θα παράγει ένα δυναμικό που θα ενεργοποιήσει τη μεμβράνη ώστε να επιτρέπει τη μετακίνηση του  $\text{NH}_4^+$  μέσα στο κυτταρόπλασμα (White et al., 2007). Η οξίνιση αυτή διευκολύνεται από κάποια  $\text{H}^+$ -ATPάση που αντλεί πρωτόνια. Μελέτες έδειξαν ότι κατά τη συμβίωση η βασικότερη  $\text{H}^+$ -ATPάση που χρησιμοποιείται είναι μια P-ATPάση (Blumwald et al., 1985; Udvardi and Day, 1989; Szafran and Haaker, 1995). Επίσης, στο *L. jaronicus* και στο μπιζέλι έχει βρεθεί και η ύπαρξη  $\text{H}^+$ -ATPασών V-τύπου (Saalbach et al., 2002; Wienkoop and Saalbach, 2003).

Σύμφωνα με τους Prell and Poole (2006) ένα αμινοξύ, όπως είναι το Glu, ή κάποιο παράγωγό του, παρέχεται από το φυτό στο βακτηριοειδές. Το βακτηριοειδές χρησιμοποιεί το αμινοξύ για να τρανσαμινώσει το οξαλοξικό ή το πυροσταφυλικό για να παράγει Asp ή Ala, αντίστοιχα, και το ένα ή και τα δύο αυτά αμινοξέα εξάγονται. Επίσης, είναι πιθανό να εισάγονται και να εξάγονται περισσότερα του ενός αμινοξέα.

Για να λάβει χώρα ο κύκλος των αμινοξέων αυτά πρέπει να διασχίσουν τη μεμβράνη του συμβιοσώματος. Είναι γεγονός ότι μέχρι σήμερα δεν έχει προσδιοριστεί η ταυτότητα και η ποσότητα των αμινοξέων που ανταλλάσσονται μεταξύ φυτού-ξενιστή και βακτηριοειδών. Παρόλα αυτά φαίνεται ότι τα βακτηριοειδή απελευθερώνουν  $\text{NH}_4^+$  σε μεγάλες ποσότητες (Meeks et al., 1978), το οποίο μεταφέρεται διαμέσου του χώρου του συμβιοσώματος (Kaiser et al., 1998) μέσα στο φυτό, όπου λαμβάνει χώρα η αρχική πρόσληψη των αμινοξέων.

Η βαθμίδωση του pH στη μεμβράνη του συμβιοσώματος διευκολύνει την εξαγωγή των αμινοξέων. Πολλοί αμινοξικοί μεταφορείς είναι συνδεδεμένοι με πρωτόνια και λειτουργούν ως συμμεταφορείς. Στο μπιζέλι, το σύστημα εξαγωγής  $\text{H}^+$ /Asp μεταφέρει διαλυτά στοιχεία από το χώρο του συμβιοσώματος στο κυτταρόπλασμα του φυτού (Rudbeck et al., 1999; Rosendahl, 2001). Μέχρι στιγμής δεν έχει ταυτοποιηθεί κάποιο σύστημα μεταφοράς αμινοξέων προς την αντίθετη κατεύθυνση (White et al., 2007).

Πειράματα σήμανσης στο μπιζέλι, τη σόγια και το λούπινο έδειξαν ότι υπό συνθήκες αζωτοδέσμευσης τα βακτηριοειδή εξάγουν αμινοξέα όπως Ala ή Asp (Kretovich et al., 1986; Appels and Haaker, 1991; Rosendahl et al., 1992; Waters et al., 1998; Allaway et al., 2000).

Για παράδειγμα, το *Rhizobium leguminosarum* διαθέτει δύο ATP-συνδεδεμένα συστήματα μεταφοράς, τα οποία έχουν την ικανότητα να μεταφέρουν ενεργά ένα ευρύ φάσμα L-αμινοξέων, αλλά και να συμμετέχουν στην παθητική εκροή αυτών. Αυτά είναι τα συστήματα Aap και Bra (Lodwig et al., 2003), τα οποία πιθανώς απαιτούνται για έναν κύκλο διπλής κατεύθυνσης που παρέχει δότες ηλεκτρονίων για την αζωτοδέσμευση ή για την εξειδικευμένη παροχή ενός αμινοξέος στο βακτηριοειδές το οποίο είναι σημαντικό για τη διατήρηση της συμβίωσης (White et al., 2007). Σε μεταλλάγματα του *R. leguminosarum* όπου τα γονίδια των Aap-Bra δε λειτουργούσαν, η αζωτοδέσμευση μειώθηκε στο 30% του φυσιολογικού παρά το γεγονός ότι η νιτρογενάση διατήρησε τη δραστηριότητά της, αλλά υπήρξαν επιπτώσεις και στο μεταβολισμό του άνθρακα. Επειδή παρεμποδίζεται η μεταφορά των αμινοξέων, συσσωρεύεται το πυροσταφυλικό οξύ, το οποίο προωθείται προς το πολυυδροξυβουτυρικό οξύ (PHB) παρά προς την Ala (Prell and Poole, 2006).

Το γεγονός ότι τα φυτά εξάγουν Ala ή Asp μπορεί να ερμηνευτεί από την πιθανή λειτουργία ενός μηχανισμού (shuttle) μηλικού οξέος-ασπαρτικού κατ' αναλογία με το μηχανισμό που υπάρχει στα μιτοχόνδρια (Kahn et al., 1985). Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση, το μηλικό οξειδώνεται σε οξαλοξικό και μετά δέχεται την αμινομάδα από το Glu για να δημιουργήσει Asp, ενώ παράλληλα απελευθερώνεται 2-κετογλουταρικό. Με αυτό τον τρόπο, αυτός ο μηχανισμός παρέχει δότες ηλεκτρονίων για την αζωτοδέσμευση και επίσης Glu ως πηγή αζώτου.

Σε πείραμα που έγινε για να διερευνηθεί η αναλογία  $\text{NH}_4^+$  και Ala όταν εξάγονται από το φυτό, φυτά μπιζελιού επωάστηκαν σε  $^{15}\text{N}_2$  και βρέθηκε ότι τα φυτά εξήγαγαν κυρίως  $\text{NH}_4^+$ , αλλά παράλληλα και σημαντικές ποσότητες Ala (Allaway et al., 2000). Η αναλογία των δύο μορφών με τις οποίες τα φυτά εξήγαγαν το  $\text{N}_2$  φάνηκε ότι εξαρτάτο από τη συγκέντρωση του  $\text{NH}_4^+$  που υπήρχε αρχικά στο μέσον (White et al., 2007). Συγκεκριμένα, το αμμώνιο πρέπει να έχει συγκέντρωση τάξης μεγέθους mM, καθώς η κύρια οδός παραγωγής Ala στα βακτηριοειδή είναι αυτή της αναγωγικής αμίνωσης του πυροσταφυλικού από την αφυδρογονάση της Ala, η οποία παρουσιάζει σταθερά  $K_m$  5 mM για το αμμώνιο (Allaway et al., 2000).

Ακόμη, έχει προταθεί ότι το  $\text{N}_2$  εκρέει μέσω διάχυσης από το χώρο του συμβιοσώματος στο κυτταρόπλασμα του φυτού λόγω ύπαρξης μεγάλης βαθμίδωσης συγκέντρωσης της  $\text{NH}_3$  (Udvardi and Day, 1990). Παρόλα αυτά, στη μεμβράνη του συμβιοσώματος της σόγιας, του μπιζελιού και του *L. jarrowicus* έχει ταυτοποιηθεί η ύπαρξη ενός μη επιλεκτικού καναλιού κατιόντων το οποίο ελέγχεται από την τάση και είναι ικανό να μεταφέρει  $\text{NH}_4^+$  με κατεύθυνση από το χώρο του συμβιοσώματος στο κυτταρόπλασμα του φυτού (Roberts and

Tyerman, 2002). Από την άλλη πλευρά, έχει αποδειχθεί κινητικά ότι η αέρια  $\text{NH}_3$  μπορεί να διαχέεται μέσω ενός καναλιού που βρίσκεται στην περιβακτηριακή μεμβράνη της σόγιας (Niemiets and Tyerman, 2000).

Είναι σημαντικό το γεγονός ότι στα φυμάτια των ψυχανθών ολόκληρο το ιοντικό περιβάλλον των βακτηριοειδών καθορίζεται από τη μεμβράνη του συμβιοσώματος (White et al., 2007). Έτσι λοιπόν, στη μεμβράνη του συμβιοσώματος στα ψυχανθή έχουν μελετηθεί εξειδικευμένοι μεταφορείς ιόντων. Συγκεκριμένα, στο *L. japonicus* έχει μελετηθεί ο SST1, που είναι ένας μεταφορέας του θειικού οξέος εξειδικευμένος ως προς τη μεμβράνη του συμβιοσώματος και έχει δείχθει ότι είναι σημαντικός για την αζωτοδέσμευση (Krusell et al., 2005). Επίσης, στη μεμβράνη του συμβιοσώματος του *L. japonicus* εντοπίζονται και οι μεταφορείς LjN70 των ανόργανων ιόντων (νιτρικού, νιτρώδους και χλωριούχου) (Szczyglowski et al., 1998).

Στα ψυχανθή εύκρατων περιοχών, που συνήθως σχηματίζουν μη καθορισμένα φυμάτια, τα αρχικά προϊόντα που περιέχουν δεσμευμένο άζωτο και εξάγονται από τα φυμάτια προς το αγγειακό ρεύμα του ξυλώματος είναι τα αμίδια ασπαραγίνη και γλουταμίνη (Ta et al., 1986; Scharff et al., 2003). Για το σκοπό αυτό απαιτείται η συντονισμένη δράση της Gln-εξαρτώμενης συνθετάσης της Asn και της αμινοτρανσφοράσης του Asp (Gregerson et al., 1994; Mett et al., 1996; Shi et al., 1997; White et al., 2007). Αντίθετα, στα ψυχανθή τροπικών περιοχών, τα οποία συνήθως σχηματίζουν καθορισμένα φυμάτια, το δεσμευμένο άζωτο αρχικά ενσωματώνεται στα αμινοξέα Asn, Asp, Gln και Glu, αλλά στη συνέχεια μεταβολίζεται στα φυμάτια στις ουρεΐδες αλλαντοΐνη και αλλαντοϊκό οξύ, τα οποία εξάγονται και μεταφέρονται στο αγγειακό ρεύμα του ξυλώματος (Dart, 1977; Sprent, 1980; Temple et al., 1998; Goggin et al., 2003). Παρόλα αυτά, τα φυμάτια του *L. japonicus*, αν και παρουσιάζουν δομή καθορισμένου φυματίου, συνθέτουν και εξάγουν αμίδια (Vance, 2008).

Πιο συγκεκριμένα, τα ψυχανθή που μεταφέρουν ουρεΐδες έχουν αναπτύξει μια σύνθετη κυτταρική και υποκυτταρική διαμερισματοποίηση για να ρυθμίζουν τη βιοσύνθεση των ουρεΐδων. Η δημιουργία των ουρεΐδων ξεκινά ως *de novo* βιοσύνθεση πουρινών στα πλαστίδια και τα μιτοχόνδρια των μολυσμένων κυττάρων (Smith and Atkins, 2002; Tajima et al., 2004) και το δεσμευμένο άζωτο που απαιτείται γι' αυτό προέρχεται από τη Gln, τη Gly και το Asp. Μετά την *de novo* σύνθεση στα μολυσμένα κύτταρα, η ξανθίνη οξειδώνεται σε ουρικό οξύ, το οποίο μεταφέρεται στα μη μολυσμένα κύτταρα. Στα περοξυσώματα των μη μολυσμένων κυττάρων το ουρικό οξύ μεταβολίζεται περαιτέρω στις ουρεΐδες.

Στα μη καθορισμένα φυμάτια της *Vicia faba* τα περισσότερα από τα μολυσμένα κύτταρα δεν έρχονται σε επαφή με τα μη μολυσμένα. Έτσι, πιστεύεται ότι τα αμινοξέα απελευθερώνονται από τα μολυσμένα κύτταρα στον αποπλάστη, από τον οποίο μπορούν να τα συσσωρεύσουν ενεργά τα μη μολυσμένα κύτταρα και να τα μεταφέρουν συμπλαστικά στο αγγειακό σύστημα (Abd-Alla et al., 2000; Peiter et al., 2004). Από την άλλη πλευρά, στα καθορισμένα φυμάτια της σόγιας φαίνεται ότι όλα τα μολυσμένα κύτταρα έρχονται σε επαφή με τα μη μολυσμένα, τα οποία συνθέτουν ουρεΐδες για να τις εξάγουν στον ιστό του ξυλώματος (Schubert, 1986; Selker, 1988).

## 1.2 Μεταβολισμός του άνθρακα

### 1.2.1 Γενικά

Ο μεταβολισμός του άνθρακα και του αζώτου σε βακτηριοειδή και φυτά καταλήγουν να είναι αμοιβαία εξαρτώμενοι, με τον καθένα από τους συμβιώτες να ανατροφοδοτεί τον άλλο ώστε να τον ελέγχει (Prell and Poole, 2006). Η διαδικασία της αναγωγής του αζώτου είναι στενά συνδεδεμένη με το μεταβολισμό του άνθρακα στα βακτηριοειδή, και με την παροχή ενέργειας μέσω της αναπνοής. Γενικότερα όμως, η εγκαθίδρυση της συμβιωτικής σχέσης βακτηρίου και φυτού ερμηνεύεται από μεγάλες ενεργειακές απαιτήσεις για όλο το σύστημα της συμβίωσης, καθώς μεταφράζεται σε κατανάλωση ενέργειας για την ανάπτυξη και τη διατήρηση του φυματίου, αλλά και για το μεταβολισμό αζώτου και άνθρακα του ίδιου του φυτού. Από το γεγονός αυτό εξηγείται η παρεμπόδιση της δημιουργίας φυματίων υπό την παρουσία δεσμευμένου αζώτου, όπως είναι το νιτρικό οξύ (nitrate) (White et al., 2007).

Τα φυμάτια αποτελούν περίπου το 5% της συνολικής βιομάζας ενός ψυχανθούς. Παρόλα αυτά, καταλύουν την αναγωγή περισσότερων από 100 kg αζώτου ανά εκτάριο ετησίως, και καταναλώνουν 13-28% των συνολικών φωτοσυνθετικών προϊόντων του ψυχανθούς (Vance, 2008). Επίσης, σύμφωνα με μελέτες (Phillips, 1980; Schubert, 1982), τα ψυχανθή καταναλώνουν 6-7 γραμμάρια άνθρακα για κάθε γραμμάριο αζώτου που ανάγουν. Το ποσοστό του άνθρακα που καταναλώνεται από τα φυμάτια με την πρώτη ματιά μπορεί να φανεί υπερβολικό, εξηγείται όμως από το γεγονός ότι ο άνθρακας σε αυτή τη συμβιωτική σχέση χρησιμοποιείται ως πηγή ενέργειας και ως αναγωγικό μέσο (δότης ηλεκτρονίων) για τη δέσμευση του μοριακού αζώτου, ως πηγή σκελετών άνθρακα για την αφομοίωση του δεσμευμένου αζώτου από τα αμινοξέα, καθώς επίσης και για την ανάπτυξη και διατήρηση του βακτηριοειδούς και του φυματίου (Kahn et al., 1998).

Ο μεταβολισμός του βακτηριοειδούς θα πρέπει να θεωρηθεί παρόμοιος με αυτόν κάποιου κυτταρικού οργανιδίου, καθώς δεν είναι πλέον ένα κύτταρο που διαβιεί ελεύθερο, αλλά αντίθετα εξαρτάται από το φυτικό κύτταρο για όλα τα θρεπτικά στοιχεία. Έτσι, όλες οι πηγές άνθρακα και αζώτου, καθώς και τα ιόντα και το οξυγόνο θα πρέπει να διαπεράσουν τις μεμβράνες του συμβιοσώματος και του βακτηριοειδούς, γεγονός που τις καθιστά κρίσιμες για την εγκαθίδρυση και τη διατήρηση της συμβίωσης (White et al., 2007). Επίσης, αν θεωρήσουμε ότι τα βακτηριοειδή είναι μη αναπτυσσόμενα κύτταρα, θα πρέπει να επιτύχουν μια ακριβή ισορροπία μεταξύ εισόδου και εξόδου άνθρακα και ενέργειας. Αυτό συμβαίνει γιατί ενώ σε ένα αναπτυσσόμενο κύτταρο η περίσσεια άνθρακα και αναγωγικών θα μπορούσε απλώς να διοχετευθεί στη βιοσύνθεση, αντίθετα σε ένα μη αναπτυσσόμενο κύτταρο θα προκαλούσε προβλήματα (Prell and Poole, 2006).

Τα φυμάτια, ανάλογα με τον τύπο τους, συμπεριφέρονται διαφορετικά ως προς τα σημεία όπου γίνεται ο μεταβολισμός του άνθρακα. Συγκεκριμένα, στα καθορισμένα φυμάτια φαίνεται να λαμβάνει χώρα μεγαλύτερο ποσοστό του μεταβολισμού του άνθρακα στα μη μολυσμένα κύτταρα της αζωτοδεσμεύουσας ζώνης και του εσωτερικού φλοιού του φυματίου σε σχέση με το αντίστοιχο ποσοστό στα μη καθορισμένα φυμάτια. Αντίθετα τα μη καθορισμένα φυμάτια φαίνεται να παρουσιάζουν μια πιο ομοιόμορφη κατανομή μεταξύ μολυσμένων και μη μολυσμένων κυττάρων (Day and Copeland, 1991; Robinson et al., 1999; Hohjenc et al., 2003).

### **1.2.2 Ο μεταβολισμός του άνθρακα στα φυμάτια**

Ο άνθρακας που παρέχεται αρχικά στο φυμάτιο προκύπτει από τα φωτοσυνθετικά προϊόντα του φυτού ξενιστή, τα οποία μεταφέρονται στο φυμάτιο μέσω του φλοιώματος του φυτού υπό τη μορφή του μορίου της σακχαρόζης (Gordon et al., 1999) (Εικόνα 1.6). Σύμφωνα με πειράματα σήμανσης που έγιναν, φαίνεται ότι η σακχαρόζη αποτελεί το φωτοσυνθετικό προϊόν που είναι το πιο άφθονο μεταξύ όλων των σακχάρων που μεταφέρονται από το βλαστό στο φυμάτιο (Reibach and Streeter, 1983; Kouchi and Nakaji, 1985; Gordon et al., 1985).

Η σακχαρόζη φθάνει στους συμβιωτικούς ιστούς μέσω του αγγειακού ιστού του φυματίου, τόσο σε φυμάτια που αναπτύσσονται, όσο και σε εκείνα που αζωτοδεσμεύουν (Vance and Heichel, 1991). Στη συνέχεια, η σακχαρόζη διασπάται σε εξόζες μέσω δύο διαφορετικών οδών, οι οποίες όμως τελικά καταλήγουν στο ίδιο τελικό προϊόν που είναι η 6-φωσφορογλυκόζη. Συγκεκριμένα, ακολουθώντας την πρώτη και κύρια οδό η σακχαρόζη διασπάται μέσω της συνθάσης της σακχαρόζης σε UDP-γλυκόζη και φρουκτόζη.

Εναλλακτικά, το ένζυμο της ιμπερτάσης καταλύει τη διάσπαση της σακχαρόζης σε φρουκτόζη και γλυκόζη. Και τα δύο ένζυμα παρουσιάζουν μεγαλύτερη δραστικότητα στα μη μολυσμένα κύτταρα του φυματίου σε σχέση με τα κύτταρα των ριζών που τα περιβάλλουν (Singh et al., 1994; Chopra et al., 1998; Gordon et al., 1999; Flemetakis et al., 2006). Η 6-φωσφοργλυκόζη που προκύπτει και από τις δύο οδούς καταβολισμού της σακχαρόζης οδηγείται στο μεταβολικό μονοπάτι της γλυκόλυσης από το οποίο ακολούθως θα προκύψει το φωσφοενολοπυροσταφυλικό οξύ.

Παράλληλα με τον καταβολισμό της σακχαρόζης, τα φυμάτια δεσμεύουν διοξείδιο του άνθρακα και το μετατρέπουν σε ανθρακικά ιόντα με τη βοήθεια του ενζύμου της καρβονικής ανυδράσης. Τα ιόντα αυτά χρησιμοποιεί η καρβοξυλάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού για να καρβοξυλιώσει το φωσφοενολοπυροσταφυλικό οξύ. Αυτή η αντίδραση αποτελεί αφετηρία για την παραγωγή των C<sub>4</sub>-δικαρβοξυλικών οξέων, δηλαδή οξαλοξικού και μηλικού, τα οποία όπως φαίνεται είναι τα άμεσα υποστρώματα που χρειάζονται τα βακτηριοειδή για να παράγουν το ATP που απαιτείται για τη δραστικότητα της νιτρογενάσης (Vance, 2008). Σύμφωνα με μελέτες, τα δικαρβοξυλικά οξέα διεγείρουν την αζωτοδέσμευση από τα βακτηριοειδή *in vitro*, γεγονός που μπορεί να αποδεικνύει το ρόλο τους ως πηγή άνθρακα για το μεταβολισμό των βακτηριοειδών *in planta* (Poole and Allaway, 2000; Ludwig and Poole, 2003). Έτσι, το οξαλοξικό οξύ που προκύπτει από την καρβοξυλίωση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού μετατρέπεται στη συνέχεια, μέσω του ενζύμου της αφυδρογονάσης του μηλικού σε μηλικό οξύ.

Για να χρησιμοποιηθεί από το βακτηριοειδές ένα δικαρβοξυλικό οξύ όπως είναι το μηλικό, ένα μόριο οξειδώνεται και πάλι σε οξαλοξικό μέσω της αφυδρογονάσης του μηλικού και ένα δεύτερο μόριο αποκαρβοξυλιώνεται οξειδωτικά σε πυροσταφυλικό μέσω του μηλικού ενζύμου. Έπειτα, η αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού μετατρέπει το πυροσταφυλικό σε ακέτυλο-CoA, το οποίο πλέον συμπυκνώνεται μαζί με το οξαλοξικό που δημιουργήθηκε από την παράλληλη οξείδωση του μηλικού για τη δημιουργία του κιτρικού οξέος (Prell and Poole, 2006, Mitsch et al., 2007). Η παραγωγή του κιτρικού οξέος αποτελεί το πρώτο βήμα για την έναρξη του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων που είναι το κύριο μεταβολικό μονοπάτι στα ριζόβια.

Η οξείδωση των ενώσεων μέσω του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων παρέχει αναγωγικά ισοδύναμα, ATP, και μεταβολίτες για την παραγωγή αμινοξέων και για άλλα βιοσυνθετικά μονοπάτια (White et al., 2007). Παρόλα αυτά, φαίνεται ότι ο κύκλος των τρικαρβοξυλικών οξέων λειτουργεί με διαφορετικό τρόπο ανάλογα με τον τύπο ανάπτυξης των ριζοβίων. Συγκεκριμένα, σε ταχέως αναπτυσσόμενα ριζόβια, όπως είναι το *S. meliloti* και το *R.*





Στην εισαγωγή των δικαρβοξυλικών οξέων μέσα στα βακτηριοειδή εμπλέκονται δύο ενεργοί μεταφορείς. Ο ένας έχει φυτική προέλευση και εντοπίζεται στην περιβακτηριακή μεμβράνη του συμβιοσώματος (Udvardi et al . 1988; Day et al . 1989). Ο δεύτερος, ο οποίος είναι το προϊόν του γονιδίου *dctA* στα ριζόβια, είναι μια περμεάση που είναι ενσωματωμένη στην εσωτερική μεμβράνη του βακτηριοειδούς (Ronson et al., 1984; Engelke et al . 1989; Jording and Pühler, 1993).

### **1.2.2.1 Η σακχαρόζη ή τα C4-δικαρβοξυλικά οξέα αποτελούν τη βασική πηγή άνθρακα για το βακτηριοειδές;**

Τα φυμάτια εξαρτώνται κυρίως από την είσοδο και το μεταβολισμό της σακχαρόζης για να τους παρέχει ενέργεια και σκελετούς άνθρακα για τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση, για την αφομοίωση της αμμωνίας και την εξαγωγή αμινοξέων και άλλων αζωτούχων ενώσεων (Gordon, 1995; Vance et al., 1997). Επιπλέον, η σακχαρόζη είναι η κύρια πηγή σκελετών άνθρακα για την βιοσύνθεση της κυτταρίνης και του αμύλου κατά την ανάπτυξη του φυματίου (Flemetakis et al., 2006). Αλλά και για το ίδιο το φυτό, η σακχαρόζη αποτελεί μεταβολίτη-κλειδί για την ανάπτυξή του. Συμμετέχει καθοριστικά σε ποικίλες φυσιολογικές διαδικασίες, όπως στην κατανομή και μεταφορά του άνθρακα, όπως και στη ρύθμιση της ανάπτυξης, της αποθήκευσης, της μεταγωγής σημάτων, της απόκρισης σε καταπονήσεις και της έκφρασης γονιδίων (Sturm and Tang, 1999; Smeekens, 2000).

Από την άλλη πλευρά, τα αζωτοδεσμευτικά βακτηριοειδή βρίσκονται σε φυτικά κύτταρα στο κέντρο του φυματίου, ενώ ο φλοιός του φυτού βρίσκεται μέσα στο σύστημα του αγγειακού δικτύου του φυματίου στον εσωτερικό φλοιό και είναι κλεισμένος μέσα σε μια επιδερμίδα που λειτουργεί ως αποπλαστικό φράγμα (Abd-Alla et al., 2000, Hartman et al., 2002). Φαίνεται ότι ο μεταβολισμός της σακχαρόζης διενεργείται στα μη μολυσμένα κύτταρα του φλοιού του φυματίου (Day and Copeland, 1991), και θεωρείται ότι αυτά τα κύτταρα συσσωρεύουν σάκχαρα και τα μετατρέπουν σε οργανικά οξέα, τα οποία μπορούν έπειτα να απελευθερωθούν στον αποπλάστη (Kavroulakis et al., 2000). Στη συνέχεια, τα οργανικά ανιόντα μπορούν είτε να συσσωρευτούν παθητικά μέσα στο κυτταρόπλασμα των μολυσμένων κυττάρων λόγω του χαμηλού αποπλαστικού pH, είτε να μεταφερθούν συμπλαστικά από τα μη μολυσμένα κύτταρα (White et al., 2007). Η άποψη αυτή ενισχύεται από την ύπαρξη ενός  $Suc/H^+$  συµμεταφορέα (*LjSUT4*) στα φυμάτια του *L. jaronicus*, ο οποίος εντοπίζεται κυρίως στα κύτταρα των αγγειακών δεσμών και τα παρεγχυματικά κύτταρα του φυματίου, και όχι στα κύτταρα του κεντρικού ιστού όπου βρίσκονται τα βακτηριοειδή (Flemetakis et al., 2003; Colebatch et al., 2004).

Σύμφωνα με αναλύσεις πρωτεομάτων και μεταγραφημάτων, έχει αποδειχθεί η παρουσία διαφόρων μεταφορέων σακχάρων που εκφράζονται στη μεμβράνη του συμβιοσώματος του *L. japonicus* και του *M. truncatula* (Wienkoop and Saalbach, 2003; Colebatch et al., 2004; El Yahyaoui et al., 2004; Kouchi et al., 2004). Ωστόσο, μεταφορά σακχάρων έχει αποδειχθεί μόνο στη μεμβράνη του συμβιοσώματος του *P. vulgaris*, και σε φυμάτια άλλων φυτών φαίνεται να υπάρχει μεταφορά μόνο μέσω διάχυσης (Herrada et al., 1989; Udvardi and Day, 1997; Day et al., 2001).

Βιοχημικές έρευνες προτείνουν ότι το μηλικό και/ή το ηλεκτρικό, αντί για τη γλυκόζη, είναι οι κύριες, αν όχι οι μοναδικές, ενώσεις του άνθρακα που μεταφέρονται μέσω της μεμβράνης του συμβιοσώματος στο βακτηριοειδές ώστε να παρέχουν την απαιτούμενη ενέργεια και τους σκελετούς άνθρακα (Ronson et al., 1981; Finan et al., 1983; Vance and Heichel, 1991). Θα μπορούσαμε λοιπόν να πούμε ότι τα οργανικά οξέα ( $C_4$ -δικαρβοξυλικά οξέα) τα οποία προκύπτουν από το μεταβολισμό της σακχαρόζης και τη δέσμευση του  $CO_2$  που υπάρχει στο φυμάτιο της ρίζας, και όχι η ίδια η σακχαρόζη, είναι τα άμεσα υποστρώματα που χρειάζονται τα βακτηριοειδή για να παράγουν το ATP που χρειάζονται για τη δραστικότητα της νιτρογενάσης (Vance, 2008).

Η παραπάνω άποψη στηρίζεται από το γεγονός ότι ριζόβια που περιέχουν μεταλλάξεις οι οποίες σχετίζονται με την καταστολή της πρόσληψης και/ή του μεταβολισμού των οργανικών οξέων είναι μη λειτουργικά (Fix<sup>-</sup>). Αντίθετα, εκείνα στα οποία οι μεταλλάξεις δεν τους επιτρέπουν να χρησιμοποιήσουν τα σάκχαρα παραμένουν λειτουργικά (Fix<sup>+</sup>) (Vance, 2008). Επίσης, ενώ το κυτταρόπλασμα του φυτού-ξενιστή περιέχει όλα τα ένζυμα που χρειάζονται για τη χρήση της σακχαρόζης, στα βακτηριοειδή ένα ή περισσότερα από τα ένζυμα που απαιτούνται για τη διάσπαση της σακχαρόζης και τη γλυκόλυση εμφανίζουν ελλιπή δραστικότητα (Copeland et al., 1989, 1995; Irigoyen et al., 1990). Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι τα  $C_4$ -δικαρβοξυλικά οξέα, αντίθετα με τη σακχαρόζη, μεταφέρονται με μεγάλους ρυθμούς μέσω της μεμβράνης του συμβιοσώματος σε όλα τα φυμάτια, χωρίς καμία εξαίρεση, γεγονός που υποδεικνύει το ρόλο τους ως κύριας πηγής άνθρακα για το μεταβολισμό του βακτηριοειδούς (Herrada et al., 1989; Ouyang et al., 1990; Ouyang and Day, 1992). Έτσι, το σύστημα μεταφοράς των  $C_4$ -δικαρβοξυλικών οξέων (Dct) έχει δειχθεί ότι είναι σημαντικό για την αζωτοδέσμευση από τα βακτηριοειδή σε πολλά ψυχανθή (Poole and Allaway, 2000; Ludwig and Poole, 2003; Yurgel and Kahn, 2004). Έτσι, τα οργανικά οξέα των φυματίων παρέχουν σκελετούς άνθρακα για την αφομοίωση του  $NH_4^+$ , το οποίο προκύπτει από τη δέσμευση του  $N_2$ , σε αμινοξέα (King et al., 1986; Rosendahl et al., 1990; Schulze et al., 2002).

### 1.2.3 Τα ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό του άνθρακα

#### 1.2.3.1 Καρβοξυλάση του φωσφοροενολοπυροσταφυλικού (PEPC)

Η PEPC είναι το ένζυμο που καταλύει την μη αντιστρεπτή καρβοξυλίωση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού οξέος σε οξαλοξικό. Είναι ένα τετραμερές που αποτελείται από υπομονάδες οι οποίες έχουν μοριακό βάρος 110 kD και βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα (Chollet et al., 1996; Pathirana et al., 1997). Κωδικοποιείται από μια πολυγονιδιακή οικογένεια, και, τουλάχιστον στα ψυχανθή, ένα από τα γονίδια της PEPC παρουσιάζει αυξημένη έκφραση στα φυμάτια των ριζών (Vance, 2008).

Όσον αφορά στα φυτά  $C_4$  και CAM, ο ρόλος της PEPC είναι καθοριστικός, καθώς καταλύει την αρχική ενσωμάτωση του διοξειδίου του άνθρακα στα οργανικά οξέα και συγκεντρώνει αποτελεσματικά το δεσμευμένο διοξείδιο του άνθρακα στα φύλλα (Chollet et al., 1996). Στα φυτά  $C_3$  ο ρόλος της PEPC είναι επίσης σημαντικός καθώς κατέχει σημαντικό ρόλο στο άνοιγμα των στοματίων, στην κίνηση των τριχιδίων, στην ιοντική ισορροπία και το pH-stat. Όμως ειδικά για τα φυμάτια των ψυχανθών ( $C_3$ ) που αζωτοδεσμεύουν, φαίνεται ότι η λειτουργία τους εξαρτάται από την δραστικότητα της PEPC (Schultze et al., 1998). Συγκεκριμένα, η PEPC παρέχει τον απαιτούμενο άνθρακα για την αφομοίωση του αζώτου από τα αμινοξέα και το μηλικό οξύ για τα βακτηριοειδή ως πηγή ενέργειας για τη νιτρογενάση (Vance et al., 1994; Vance, 2000). Φαίνεται λοιπόν ότι τα ψυχανθή, τα οποία είναι κατ' εξοχήν  $C_3$  φυτά, στα φυμάτια τους χρησιμοποιούν το βασικό μονοπάτι των  $C_4$  φυτών, για να μεταβολίζουν τον άνθρακα που τους παρέχεται.

Σύμφωνα με μελέτες (Egli et al., 1989; Vance et al., 1994; Vance, 2000), η PEPC παρουσιάζει αυξημένη ενζυμική δραστικότητα, ποσότητα πρωτεΐνης και mRNA στα φυμάτια των ψυχανθών σε σχέση με τις ρίζες τους. Αξίζει να αναφερθεί ότι το ένζυμο αποτελεί περίπου το 1% της διαλυτής πρωτεΐνης του φυματίου. Επίσης, ο Vance (2008) αναφέρει ότι πειράματα ανοσοσήμανσης και *in situ* mRNA υβριδισμού έδειξαν ότι η πρωτεΐνη και το RNA της PEPC υπάρχουν στα μολυσμένα αλλά και στα μη μολυσμένα κύτταρα της ζώνης που αζωτοδεσμεύει, με τα μολυσμένα κύτταρα να παρουσιάζουν μεγαλύτερη έκφραση σε σχέση με τα μη μολυσμένα. Επίσης, έχει παρατηρηθεί σημαντική έκφραση της PEPC στον εσωτερικό φλοιό και στις αγγειακές δέσμες των φυματίων.

Η PEPC επηρεάζει και εμμέσως τη λειτουργία του φυματίου. Συγκεκριμένα, μπορεί να επηρεάσει τη σύνθεση του μηλικού, ενός μορίου που όπως προαναφέρθηκε είναι απαραίτητο για τη λειτουργία του βακτηριοειδούς. Έρευνες δείχνουν ότι για να διασφαλιστεί η αδιάκοπη σύνθεση του μηλικού στα ενεργά φυμάτια των ψυχανθών θα

πρέπει η PEPC να είναι φωσφορυλιωμένη, ώστε να μην παρεμποδίζεται από την παρουσία του μηλικού (Shuller et al., 1990; Shuller and Werner, 1993; Zhang et al., 1995; White et al., 2007). Επίσης, όσον αφορά στον καταβολισμό της σακχαρόζης αλλά και στην αζωτοδέσμευση, η μείωση των επιπέδων έκφρασης μιας ισομορφής της PEPC του *L. jaronicus* (*Ljperc1*) που εκφράζεται ιδιαίτερα στα φυμάτια οδήγησε σε σημαντική μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας της συνθάσης της σακχαρόζης και σε περιορισμό της αζωτοδέσμευσης (Nomura et al., 2006). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η χαμηλή αποδοτικότητα της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης που παρατηρήθηκε στο *M. truncatula* σε σύγκριση με το αλφάλφα συσχετίστηκε με τη χαμηλότερη δραστηριότητα της PEPC και με τη χαμηλότερη συγκέντρωση οργανικών οξέων σε αυτό το ψυχανθές-μοντέλο (Sulieman and Schulze, 2010).

#### 1.2.3.2 Αφυδρογονάση του μηλικού οξέος (MDH)

Η αφυδρογονάση του μηλικού είναι το ένζυμο που καταλύει την αντιστρεπτή αναγωγή του οξαλοξικού οξέος σε μηλικό. Στα ανώτερα φυτά υπάρχει σε τουλάχιστον πέντε διαφορετικές μορφές, οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την εξειδίκευση του συνενζύμου και τον υποκυτταρικό εντοπισμό (Gietl, 1992). Στα φυμάτια υπάρχουν τέσσερις NAD<sup>+</sup>-εξαρτώμενες αφυδρογονάσεις του μηλικού: α) η κυτταρόπλασματική (c), β) η μιτοχονδριακή (m), γ) η γλυοξυσωμική (g) και δ) αυτή που εκφράζεται ιδιαίτερα στα φυμάτια (nodule-enhanced: ne) (Miller et al., 1998). Η NADH-εξαρτώμενη χλωροπλαστική (cp) αφυδρογονάση του μηλικού δεν ανιχνεύεται στα φυμάτια.

Η πρωτεΐνη neMDH είναι ένα διμερές που αποτελείται από δύο υπομονάδες μοριακού βάρους 43 kD. Κατά την ανάπτυξη των φυματίου τα μετάγραφα και η πρωτεΐνη της neMDH αυξάνουν πολύ, όμως η συνολική MDH του φυματίου παραμένει σχετικά σταθερή (Vance, 2008). Από την άλλη πλευρά, παρά το γεγονός ότι και η cMDH εκφράζεται σημαντικά στα φυμάτια, τα επίπεδα του RNA και της πρωτεΐνης της δεν είναι αυξημένα σε σύγκριση με εκείνα των ριζών. Επίσης, η έκφραση της cMDH δεν συσχετίζεται με κάποιο αζωτοδεσμευτικό πρότυπο (Vance, 2008).

Φαίνεται ότι οι δύο ισομορφές neMDH και cMDH έχουν διαφορετικά κινητικά χαρακτηριστικά. Σύμφωνα με έρευνες που έγιναν στη μηδική (Schulze et al., 2002), αποδεικνύεται ότι η neMDH παρουσιάζει 7 φορές μεγαλύτερη συγγένεια προς το οξαλοξικό σε σχέση με τη συγγένεια που παρουσιάζει η cMDH. Επιπλέον, οι σταθερές κινητικής της neMDH για το οξαλοξικό και το NADH είναι 70 και 100 φορές μεγαλύτερες από εκείνες για το μηλικό και το NAD<sup>+</sup>, αντίστοιχα. Είναι προφανές λοιπόν ότι η καταλυτική δραστηριότητα

της *peMDH* ευνοεί σε εντυπωσιακό βαθμό την παραγωγή μηλικού έναντι της παραγωγής οξαλοξικού, και το στοιχείο αυτό θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την τροποποίηση του μεταβολισμού του μηλικού στο φυτό (Schulze et al., 2002).

### 1.2.3.3 Μηλικό ένζυμο (ME)

Το μηλικό ένζυμο είναι το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση της οξειδωτικής αποκαρβοξυλίωσης του μηλικού οξέος η οποία θα δώσει πυροσταφυλικό,  $\text{CO}_2$  και  $\text{NADPH/NADH}$  υπό την παρουσία ενός δισθενούς κατιόντος (Drincovich et al., 2001). Στα ριζόβια υπάρχουν δύο μορφές του μηλικού ενζύμου: το  $\text{NADP}^+$ -εξαρτώμενο και το  $\text{NAD}^+$ -εξαρτώμενο.

Η ευρεία παρουσία του μηλικού ενζύμου στα φυτά ενισχύει την άποψη ότι η λειτουργία του είναι ευρεία και πιθανώς ότι ο ρόλος του είναι αναπληρωτικός (Kelly et al., 1976; Lance and Rustin, 1984; Artus and Edwards, 1985; Wedding, 1989). Αυτό σημαίνει ότι καθώς ακολουθούνται δύο μονοπάτια για το μεταβολισμό του μηλικού οξέος (μέσω της *MDH* ή μέσω του μηλικού ενζύμου), μειώνεται η εξάρτηση του φυτικού κυττάρου από τη γλυκόλυση για την παραγωγή ενέργειας και σκελετών άνθρακα, και δίνεται η δυνατότητα άμεσης χρησιμοποίησης των μεγάλων αποθεμάτων αποθηκευμένων καρβοξυλικών οξέων (συγκεκριμένα μηλικού και κιτρικού) τα οποία υπάρχουν σε πολλά φυτά. Επιπλέον, παρέχει μεγαλύτερο μεταβολικό όγκο για περιπτώσεις όπου οι περιβαλλοντικές ή αναπτυξιακές καταπονήσεις απαιτούν μεγάλες ποσότητες ενέργειας ή μεταβολιτών ώστε να αντιμετωπίσουν έκτακτες καταστάσεις (Wedding, 1989).

Έρευνες δείχνουν ότι οι δύο μορφές του μηλικού ενζύμου παρουσιάζουν διαφορετικά χαρακτηριστικά και ότι η δράση τους προωθείται από διαφορετικούς παράγοντες. Συγκεκριμένα, το  $\text{NADP}^+$ -εξαρτώμενο μηλικό ένζυμο έχει μεγάλη συγγένεια προς το μηλικό και ενεργοποιείται από το αμμώνιο, ενώ το  $\text{NAD}^+$ -εξαρτώμενο μηλικό ένζυμο έχει μικρότερη συγγένεια προς το μηλικό και ενεργοποιείται από τα άλατα καλίου και αμμωνίου (Finan et al., 1991; Driscoll and Finan, 1993, 1996).

### 1.2.3.4 Καρβονική ανυδράση (CA)

Η καρβονική ανυδράση είναι το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση αλληλομετατροπής μεταξύ διοξειδίου του άνθρακα και ανθρακικού ανιόντος ( $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ ). Η καρβονική ανυδράση είναι ένα μεταλλοένζυμο που περιέχει ψευδάργυρο (Zn). Στην αντίδραση της ενυδάτωσης που καταλύεται από την *CA*, το διοξείδιο του άνθρακα αντιδρά με ένα ενδιάμεσο  $\text{Zn-OH}$  στην ενεργή πλευρά του ενζύμου, ενώ στην αντίστροφη αντίδραση αφυδάτωσης που επίσης καταλύεται από την *CA*, το  $\text{HCO}_3^-$  αντιδρά με το  $\text{Zn-H}_2\text{O}$ .

Η καρβονική ανυδράση είναι ένα ευρέως διαδεδομένο ένζυμο στη φύση και οι ποικίλες ισομορφές του εντοπίζονται σε φυτά, ζώα, και μικροοργανισμούς. Συμμετέχει σε ένα μεγάλο εύρος διαφορετικών φυσιολογικών και βιοχημικών διαδικασιών, όπως είναι η αναπνοή, η εξισορρόπηση οξέων-βάσεων, η φωτοσύνθεση στα  $C_3$  και τα  $C_4$  φυτά, η διάχυση ανόργανων οξέων μεταξύ των κυττάρων, ο μεταβολισμός του άνθρακα στα φυμάτια, και μία πληθώρα διεργασιών κατά τις οποίες λαμβάνει χώρα μεταφορά ιόντων, αερίων και υγρών (Tashian, 1989; Atkins et al., 2001).

Έχουν χαρακτηριστεί τρεις διαφορετικές τάξεις της CA, που ονομάζονται αντίστοιχα  $\alpha$ ,  $\beta$  και  $\gamma$  (Tripp et al., 2001). Η CA τύπου  $\alpha$  έχει εντοπιστεί σε θηλαστικά, φυτά, ευβακτήρια και ιούς (Moroney et al., 2001; Tripp et al., 2001). Ο τύπος  $\beta$  της CA απαντάται σε φυτά, φύκη, ευβακτήρια (Hewett-Emmett and Tashian, 1996), αρχαιοβακτήρια (Smith and Ferry, 1999) και σε ορισμένες ζύμες του γένους *Saccharomyces* (Gotz et al., 1999). Τέλος, από το αρχαιοβακτήριο *Methanosarcina thermophila* έχει απομονωθεί το ένζυμο της CA που ανήκει στον  $\gamma$  τύπο (Alber and Ferry, 1994) και θεωρείται ότι η προέλευσή του είναι πρωτόγονη. Οι παραπάνω τάξεις στις οποίες κατατάσσονται οι ισομορφές της CA δεν παρουσιάζουν μεταξύ τους καμία σημαντική ομολογία στην αλληλουχία ή τη δομή τους. Παρόλα αυτά, και οι τρεις τύποι της CA είναι μεταλλοένζυμα  $Zn^{+2}$  και όλοι λειτουργούν με έναν παρόμοιο καταλυτικό μηχανισμό, ο οποίος χρησιμοποιεί ένα άτομο ψευδαργύρου που είναι σημαντικό για την κατάλυση (Lindskog, 1997; Tripp et al., 2001). Συνεπάγεται ότι προφανώς η CA έχει εξελιχθεί τρεις διαφορετικές φορές και μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα παράδειγμα συγκλίνουσας εξέλιξης μιας καταλυτικής λειτουργίας (Hewett-Emmett and Tashian, 1996). Εικάζεται επίσης ότι ενδέχεται να υπάρχει και μια τέταρτη τάξη καρβονικών ανυδρασών ( $\delta$ -CA) που χρησιμοποιείται από οργανισμούς όπως είναι το διάτομο *Thalassiosira weissflogii*. Αυτή η CA διαφέρει από τους προηγούμενους τύπους στο γεγονός ότι το μέταλλο που χρησιμοποιεί είναι το Cd και όχι το Zn. Βέβαια, δεν είναι σαφές εάν αυτό το παράδειγμα αποτελεί μια CA που όντως εξαρτάται αποκλειστικά από το Cd ή που εναλλακτικά, σε συνθήκες όπου το περιβάλλον είναι περιοριστικό ως προς τα ιόντα  $Zn^{+2}$ , χρησιμοποιεί το Cd ως μια μορφή προσαρμοστικού μηχανισμού (Lane and Morel, 2000).

Στο *L. japonicus*, έχουν βρεθεί δύο γονίδια που κωδικοποιούν για CA τύπου  $\alpha$  (Tsikou et al., 2011). Η ανάλυση της χωρο-χρονικής έκφρασης των *LjCAA1* και *LjCAA2* αποκάλυψε ότι και τα δύο γονίδια επάγονται νωρίς κατά το σχηματισμό του φυματίου και παραμένουν ενεργές σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια του φυματίου. Παρόλα αυτά, και τα δύο γονίδια καταστέλλονται ελάχιστα σε μη λειτουργικά φυμάτια που σχηματίστηκαν από μεταλλαγμένα στελέχη *M. loti*, υποδεικνύοντας ότι τα γονίδια αυτά μπορεί να εμπλέκονται

και σε βιοχημικές και φυσιολογικές διεργασίες που δεν σχετίζονται άμεσα με τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση (Flemetakis and Wang, 2013). Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι και το *M. loti* περιέχει μία ενεργή περιπλασμική CA α-τύπου στη συμβιωτική του νησίδα (Kaltoniati et al., 2009). Το γονίδιο *MICaa1* βρέθηκε να εκφράζεται και στα αζωτοδεσμευτικά βακτηριοειδή και στα ελευθέρως διαβιούντα ριζόβια. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η έκφραση του γονιδίου στα ελευθέρως διαβιούντα βακτήρια επάγεται όταν αυξάνεται το pH του θρεπτικού μέσου. Ο σχηματισμός φυματίων στο *L. jaronicus* από κάποιο μεταλλαγμένο ως προς το *MICaa1* στέλεχος δεν οδήγησε σε διαφορές στο υπέργειο τμήμα του φυτού και στη διατροφική του κατάσταση, ενώ τα φυτά σχημάτιζαν περισσότερα φυμάτια με υψηλότερο φρέσκο βάρος, περιεχόμενο άζωτο, περιεχόμενο  $^{13}\text{C}$ , καθώς και υψηλότερη δραστικότητα νιτρογενάσης. Έχει προταθεί ότι παρότι στο μεταλλαγμένο στέλεχος δεν καταργείται η ικανότητα σχηματισμού φυματίων, αυτή η CA α-τύπου συμμετέχει σε ένα βοηθητικό, μη εξαρτώμενο από το ATP μηχανισμό που θα μπορούσε να ρυθμίζει τον περιπλασμικό χώρο των βακτηριοειδών παρέχοντας μία εναλλακτική πηγή πρωτονίων, δημιουργώντας, έτσι, ένα ευνοϊκό περιβάλλον για πρωτονίωση της αμμωνίας και διευκολύνοντας τη διάχυση και τη μεταφορά της στο φυτό (Day et al., 2001; White et al., 2007).

Γενικά, η CA παίζει σημαντικό ρόλο σε διάφορες λειτουργίες των φυτών που σχετίζονται με τη φωτοσύνθεση. Οι τρεις βασικές λειτουργίες της CA στα φωτοσυνθετικά συστήματα είναι: α) η μετατροπή του  $\text{HCO}_3^-$  σε  $\text{CO}_2$ , ως υπόστρωμα για τη δέσμευσή του από την καρβοξυλάση/οξυγενάση της διφωσφοροριβουλόζης - RubisCO ( $\text{C}_3$  φυτά), β) η μετατροπή του  $\text{CO}_2$  σε  $\text{HCO}_3^-$ , ως υπόστρωμα για τη δέσμευσή του από την καρβοξυλάση του φωσφοροενολοπυροσταφυλικού οξέος - PEPC ( $\text{C}_4$  φυτά) και γ) η γρήγορη εξασφάλιση της ισορροπίας μεταξύ  $\text{CO}_2$  και  $\text{HCO}_3^-$ , έτσι ώστε να είναι δυνατή η αύξηση της διευκολυνόμενης διάχυσης του  $\text{CO}_2$ .

Ειδικότερα, στα φύλλα  $\text{C}_3$  φυτών, η κυτταροπλασματική ισομορφή της CA διευκολύνει τη διάχυση του  $\text{CO}_2$  μέσα στο στρώμα και η χλωροπλαστική ισομορφή της CA, επιταχύνοντας την αφυδάτωση του  $\text{HCO}_3^-$ , διατηρεί την παροχή του  $\text{CO}_2$  ώστε να δεσμεύεται από την καρβοξυλάση/οξυγενάση της διφωσφοροριβουλόζης (RubisCO) (Fett and Coleman 1994, Chollet et al., 1996). Όσον αφορά στα φύλλα των  $\text{C}_4$  φυτών, η δραστικότητα της CA περιορίζεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων του μεσοφύλλου, όπου μετατρέπει το  $\text{CO}_2$  σε  $\text{HCO}_3^-$ , που είναι το υπόστρωμα της PEPC (Badger and Price, 1994).

Η CA εκφράζεται όμως και σε μη φωτοσυνθετικούς ιστούς. Συγκεκριμένα, αναμένεται να είναι σημαντικός ο ρόλος της στη δέσμευση του  $\text{CO}_2$  απουσία φωτός, καθώς παρέχει το



υπόστρωμα για την καρβοξυλίωση του οξαλοξικού από την PEPC (Chollet et al., 1996). Πιστεύεται ότι στη συμβιωτική αζωτοδέσμευση, η δέσμευση του CO<sub>2</sub> απουσία φωτός παρέχει το 30% του σκελετών άνθρακα που απαιτούνται για τη σύνθεση αμιδίων ή για το μεταβολισμό του βακτηριοειδούς (Rosendahl et al., 1990). Παρόλα αυτά, φαίνεται ότι ο ρόλος της CA στο μεταβολισμό του CO<sub>2</sub> είναι διαφορετικός μεταξύ νεαρών και ώριμων φυματίων. Έτσι, στα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης του φυματίου η CA φαίνεται να διευκολύνει την ανακύκλωση του CO<sub>2</sub>, ενώ στα μετέπειτα στάδια φαίνεται να διευκολύνει τη διάχυση του CO<sub>2</sub> έξω από το σύστημα του φυματίου (Kavroulakis et al., 2000).

## **1.2.4 Ο ρόλος του άνθρακα στην αζωτοδέσμευση**

### **1.2.4.1 Διαθεσιμότητα άνθρακα**

Τα φωτοσυνθετικά προϊόντα μεταφέρονται στο φυμάτιο σε μορφή σακχαρόζης και αποθηκεύονται εκεί σε μορφή αμύλου. Αποθήκευση αμύλου στους ιστούς ερμηνεύεται γενικώς ως περίσσεια υδατανθράκων. Ενεργά αζωτοδεσμευτικά φυμάτια σε όλα τα ψυχανθή περιέχουν άμυλο τόσο σε μολυσμένα όσο και σε μη-μολυσμένα κύτταρα (Cralle and Heichel, 1985; Gordon et al., 1985; Hostak et al., 1987; Kouchi et al., 1985; Minchin et al., 1981). Ενώ το άμυλο συσσωρεύεται κατά τη διάρκεια της ημέρας, η δραστηριότητα της νιτρογενάσης συνεχίζεται και κατά τη διάρκεια της νύχτας. Έχει δείχτει ότι η κύρια πηγή άνθρακα για τη δραστηριότητα της νιτρογενάσης κατά τη διάρκεια της νύχτας προέρχεται από τις δεξαμενές υδατανθράκων στο βλαστό (Gordon et al., 1985; Kouchi et al., 1985; Walsh et al., 1987). Τα αποθέματα αμύλου στη ρίζα φαίνεται να μην είναι διαθέσιμα για αζωτοδέσμευση, ενώ τα αποθέματα υδατανθράκων στα φυμάτια μεταβολίζονται μόνο στην περίπτωση που εξαντληθούν τα εξωτερικά αποθέματα και ιδίως εκείνα του βλαστού (Hostak et al., 1987; Kouchi et al., 1985; Walsh et al., 1987). Αυτές οι παρατηρήσεις δείχνουν ότι τα φωτοσυνθετικά προϊόντα που μεταφέρονται στο φυμάτιο βρίσκονται σε περίσσεια τόσο για τις ανάγκες της αζωτοδέσμευσης όσο και για τις ανάγκες της ανάπτυξης άλλων οργάνων.

Η σκοτεινή δέσμευση του CO<sub>2</sub> από την PEPC (phospho-*enol*-pyruvate carboxylase) αποτελεί μια επιπλέον πηγή άνθρακα για τη λειτουργία του φυματίου. Στο αλφάλφα αποτελεί το 12% των συνολικών απαιτήσεων σε σκελετούς άνθρακα για την αφομοίωση του δεσμευμένου αζώτου (Ta et al., 1986). Στη σόγια, η μισή περίπου ποσότητα CO<sub>2</sub> που καταλήγει στο εσωτερικό του φυματίου ανακυκλώνεται με τη δράση της PEPC και υπολογίστηκε να είναι 1.5 mg C / mg δεσμευμένου N<sub>2</sub> (Warembourg and Roumet, 1989).

#### 1.2.4.2 Συσχέτιση άνθρακα και αζωτοδέσμευσης

Η διαδικασία της αζωτοδέσμευσης έχει μεγάλο κόστος στα προϊόντα της φωτοσύνθεσης που καταναλώνει και πολλές ανησυχίες έχουν προκύψει από το γεγονός ότι αυτά τα φωτοσυνθετικά προϊόντα θα μπορούσαν διαφορετικά να συμμετέχουν στην αύξηση της παραγωγής. Μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν κάποιες ενδείξεις που να υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η αζωτοδέσμευση μειώνει την παραγωγή. Επιπλέον, πειράματα σε ψυχανθή στο χωράφι σπάνια δείχνουν αυξημένη τελική παραγωγή από τη χρήση επιπρόσθετης λίπανσης με διάφορες μορφές αζώτου (Vance and Heichel, 1991).

Λίπανση με CO<sub>2</sub> σε φυτά σόγιας στον αγρό αύξησε σημαντικά την αζωτοδέσμευση (Hardy and Havelka, 1976; Havelka and Hardy, 1976), ενισχύοντας τη μάζα των φυματίων και τη συσσώρευση αζώτου. Η δραστηριότητα της νιτρογενάσης ανταποκρίθηκε στη λίπανση με CO<sub>2</sub> αποδεικνύοντας ότι η φωτοσύνθεση μπορεί να περιορίσει την αζωτοδέσμευση. Τα ψυχανθή ανταποκρίνονται σε μια μεγάλου διαστήματος αυξημένη παροχή φωτοσυνθετικών προϊόντων, αυξάνοντας τη μάζα όλων των οργάνων, συμπεριλαμβανομένων και των φυματίων. Αλφάλφα που επιλέχτηκε εξαιτίας της αυξημένης μάζας φυματίων, παρουσίασε μια αναλογική αύξηση στη μάζα όλων των οργάνων (Cralle et al., 1987).

Γενικώς, πειραματικές συνθήκες που ενισχύουν τη φωτοσύνθεση, όπως αυξημένη συγκέντρωση CO<sub>2</sub> στην ατμόσφαιρα (Hardy and Havelka, 1976; Finn and Brun, 1982; Murphy, 1986; Soussana and Hartwig, 1996; Schortemeyer et al., 1999) και αυξημένη ένταση φωτός (Lawn and Brun, 1974; Hardy and Havelka, 1976; Bethlenfalvay and Phillips, 1977), συνήθως σχετίζονται με αυξημένη αζωτοδέσμευση. Ομοίως, χειρισμοί που περιορίζουν τη φωτοσύνθεση, όπως αποφύλλωση (Fujita et al., 1988), σκίαση (Tricot, 1993), σύντομη φωτοπερίοδος (Murphy, 1986) και μειωμένη ένταση φωτός (Feigenbaum and Mengel, 1979), μειώνουν την αζωτοδέσμευση.

Αποτελέσματα ερευνών δείχνουν ότι τα φυμάτια των ψυχανθών σπάνια έχουν επιπλέον ικανότητα δραστηριότητας νιτρογενάσης η οποία να μπορεί να ενεργοποιηθεί αυξάνοντας την ικανότητα των φυτών να φωτοσυνθέτουν. Η παροχή των φωτοσυνθετικών προϊόντων φαίνεται πως είναι αρκετή τόσο για τη δράση της νιτρογενάσης όσο και για τη σύνθεση της νιτρογενάσης. Η άποψη αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι μπιζέλι στο οποίο παρατηρήθηκε αυξημένος ρυθμός αφομοίωσης CO<sub>2</sub> στα φύλλα, δεν παρουσίασε αυξημένη αζωτοδέσμευση στο χωράφι (Mahon, 1982). Επιπλέον, παρόλο που πηγές και καταβόθρες N και C ανταποκρίνονται στην αυξημένη παροχή φωτοσυνθετικών προϊόντων, η

συσσώρευση N καθυστερεί τη συσσώρευση C, καθώς η φωτοσύνθεση αυξάνεται (Wilson et al., 1933).

Η μείωση της αζωτοδέσμησης που παρατηρήθηκε σε έλλειψη νερού σχετίστηκε με την αύξηση των συνολικών υδατανθράκων (Fujita et al., 1988) ή με την αυξημένη συγκέντρωση διαλυτής σακχαρόζης (Minchin et al., 1986). Οι Vance and Heichel (1991) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η αζωτοδέσμηση δεν μπορεί να περιορίζεται άμεσα από την παροχή C, αλλά μάλλον περιορίζεται από το O<sub>2</sub> (Hunt and Layzell, 1993). Ο περιορισμός της αζωτοδέσμησης από τον άνθρακα θα πρέπει να πηγάζει από την αδυναμία να χρησιμοποιηθεί ο άνθρακας στα φυμάτια (Vance et al., 1998) καθώς περιορίζονται σημαντικά ένζυμα του μεταβολισμού του άνθρακα, όπως η συνθάση της σακχαρόζης (Gordon et al., 1993; Gonzales et al., 1995).

Παρόλο που η δράση της νιτρογενάσης φαίνεται να περιορίζεται μάλλον από το O<sub>2</sub> παρά από τον άνθρακα (Hunt and Layzell, 1993; Vance and Heichel, 1991), η δραστηριότητα της αζωτοδέσμησης μπορεί να εξαρτάται από την παροχή άνθρακα. Κατά την ανάπτυξη φυτών *Pisum sativum* εμφανίστηκε να υπάρχει μια γραμμική συσχέτιση μεταξύ της ποσότητας άνθρακα που κατανέμεται στα φυμάτια και στην ειδική δραστηριότητα της αζωτοδέσμησης (Voisin et al., 2003). Αυτό δείχνει ότι η αζωτοδέσμηση είναι ισχυρά συνδεδεμένη με την παροχή άνθρακα.

#### **1.2.4.3 Έλλειψη άνθρακα**

Η αζωτοδέσμηση εξαρτάται από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως αποφύλλωση, έλλειψη νερού, διαρκής σκοτάδι και λίπανση νιτρικών (Vance et al., 1979; Witty et al., 1986; Layzell et al., 1990). Στις περισσότερες συνθήκες καταπόνησης, η αρχική μείωση της δραστηριότητας της νιτρογενάσης οφείλεται στην μειωμένη συγκέντρωση O<sub>2</sub> που φτάνει στα μολυσμένα κύτταρα και τα βακτηριοειδή (Witty et al., 1986; Carroll et al., 1987; Layzell et al., 1990; Escuredo et al., 1996). Παρατεταμένες συνθήκες καταπόνησης επάγουν την πρόωρη γήρανση του φυματίου. Η γήρανση που επάγεται από καταπόνηση έχει συσχετιστεί με αυξημένη παραγωγή οξειδωτικών ουσιών και την ταυτόχρονα μειωμένη αντιοξειδωτική προστασία (Escuredo et al., 1996; Gogorcena et al., 1997).

Η έκθεση φυτών σόγιας σε συνθήκες παρατεταμένου σκοταδιού επάγει δομικές και μεταβολικές αλλαγές στα φυμάτια που μοιάζουν με φυσιολογική γήρανση, γεγονός που δηλώνει ότι οι μηχανισμοί που ελέγχουν τις διαδικασίες αυτές είναι όμοιοι (Pfeiffer et al., 1983; Cohen et al., 1986). Το παρατεταμένο σκοτάδι προάγει την παραγωγή τοξικών ριζών

ΌΗ σε φυμάτια από φασόλι, που είναι μια άμεση ένδειξη οξειδωτικής καταπόνησης (Becana and Klucas, 1992).

Η έκθεση φυτών σόγιας σε μικρής διάρκειας συνθήκες σκοταδιού είναι αρκετή για να προκαλέσει γρήγορη μείωση στα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων που κωδικοποιούν για σημαντικές πρωτεΐνες του φυματίου και στη δραστικότητα του ενζύμου συνθάση της σακχαρόζης (SS) (Gordon et al., 1993). Επιπλέον, καταπόνηση σκοταδιού μείωσε την αναπνοή και τη δραστικότητα της νιτρογενάσης σε φυμάτια σόγιας και λούπινου (Layzell et al., 1990; Iannetta et al., 1993).

Στο φασόλι, μετά από συνεχές σκοτάδι μίας ημέρας η *in vivo* δραστικότητα της νιτρογενάσης ήταν σχεδόν μηδενική και τα υποστρώματα άνθρακα είχαν εξαντληθεί. Η μείωση της αναπνευστικής δραστηριότητας αύξησε τη συγκέντρωση οξυγόνου στην κεντρική ζώνη σε ποσοστό 1%, μια συγκέντρωση ικανή να προκαλέσει την απενεργοποίηση της νιτρογενάσης. Μετά από δύο ημέρες σκοτάδι, μειώθηκε το επίπεδο των πρωτεϊνών της νιτρογενάσης, καθώς επίσης, μειώθηκαν οι δραστηριότητες των ενζύμων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό του άνθρακα και του αζώτου. Για την πλήρη κατάρρευση του μεταβολισμού του φυματίου χρειάστηκαν 4 ημέρες συνεχούς σκότους, όπου μειώθηκε η περιεχόμενη ποσότητα σε ψυχανθαιμοσφαιρίνη και η αντιοξειδωτική προστασία. Στο τελικό στάδιο γήρανσης σημειώθηκε οξειδωτική καταπόνηση με τη συσσώρευση κατεστραμμένων πρωτεϊνών (Gogorcena et al., 1997).

Ομοίως στο μπιζέλι, η *in vivo* δραστικότητα της νιτρογενάσης μειώθηκε σημαντικά μετά από συνεχές σκοτάδι μίας ημέρας ενώ η περιεχόμενη σακχαρόζη μειώθηκε κατά 97%. Μετά από συνεχές σκοτάδι 2 ημερών, μειώθηκαν σημαντικά η ψυχανθαιμοσφαιρίνη, οι υδατάνθρακες και πολλές αντιοξειδωτικές ουσίες, ενώ συσσωρεύτηκαν τροποποιημένες πρωτεΐνες. Πλήρης κατάρρευση του μεταβολισμού του φυματίου παρατηρήθηκε μετά από 4 ημέρες συνεχούς σκότους που συνοδεύτηκε από εκτενείς δομικές ζημιές (Matamoros et al., 1999a).

## 1.3 Μεταβολισμός του θείου

### 1.3.1 Γενικά

Το θείο, όπως ο άνθρακας και το άζωτο, κατέχει σημαντική θέση στο μεταβολισμό των φυτών και κατ' επέκταση όλων των ζωντανών οργανισμών (Takahashi et al., 2011). Σε ελεύθερη κατάσταση βρίσκεται στην ατμόσφαιρα σε αέρια μορφή (οξείδιο του θείου  $SO_2$ ) και στο έδαφος (θειικά ιόντα  $SO_4^{2-}$ ), ενώ στην οργανική του μορφή παίρνει μέρος σε πλήθος ενώσεων και διεργασιών απαραίτητων για την επιβίωση των οργανισμών. Η πρώτη

οργανική ένωση στην οποία συμμετέχει το θείο είναι η κυστεΐνη (Cys), η οποία μαζί με τη μεθειονίνη (Met) αποτελούν τα μοναδικά αμινοξέα που περιέχουν θείο (Takahashi et al., 2011). Η Cys και η Met αποτελούν δομικούς λίθους για τις πρωτεΐνες, σχηματίζοντας δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ τους. Οι δεσμοί αυτοί σταθεροποιούν τη δομή των πρωτεϊνών και είναι καθοριστικής δομικής και λειτουργικής σημασίας για αυτές. Επίσης τα παράγωγά τους δρουν ως πρόδρομα μόρια για την σύνθεση: γλουταθειόνης (GSH), ομογλουταθειόνης (hGSH), συμπαραγόντων όπως σίδηρο – θείο πρωτεΐνες, αίμης, σιδηροαίμης, κέντρα μολυβδαινίου, βασικών πρωτεϊνών όπως η βιοτίνη και η θειαμίνη, θειικών εστέρων όπως το συνένζυμο A και θειικών συμπαραγόντων (Takahashi et al., 2011; Beinert, 2000; Leustek et al., 2000; Saito, 2000; Marquet, 2001; Gerder and Lill, 2002; Mendel and Hänsch, 2002; Noctor et al., 2002). Επίσης, θείο περιέχουν δευτερογενείς μεταβολίτες και ένα πλήθος ενώσεων με διάφορες ιδιότητες όπως οι Nod παράγοντες των ριζόβιων, η αντισηπτική αλινίνη στο σκόρδο. Επιπροσθέτως, οι υδρόφιλες κεφαλές των σουλφολιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών περιέχουν επίσης θείο (Sanda et al., 2001). Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι 300 περίπου διαφορετικοί μεταβολίτες ενσωματώνουν θείο στο *Arabidopsis thaliana*, ενώ έχει γίνει αναφορά για άλλους 140 περίπου μεταβολίτες που δεν έχουν καταχωρηθεί στις βάσεις δεδομένων ακόμα (Gigolashvili and Kopriva, 2014; Gläser et al., 2014).

Σε οξειδωμένη μορφή στο περιβάλλον, το θείο βρίσκεται στο έδαφος υπό την μορφή θειικών ιόντων ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) (Takahashi et al., 2011). Πριν από την ενσωμάτωσή τους στις οργανικές ενώσεις τα θειικά πρέπει να αναχθούν. Η αναγωγή των θειικών πραγματοποιείται μέσω ενός μονοπατιού αντιδράσεων όπου τα θειικά μετατρέπονται αρχικά σε θειώδη και στην συνέχεια σε υδρόθειο ( $\text{H}_2\text{S}$ ). Το  $\text{H}_2\text{S}$ , με την σειρά του ενσωματώνεται σε ένα σκελετό άνθρακα αζώτου για να σχηματίσει την Cys. Αυτό το μονοπάτι χρησιμοποιείται από τους προκαρυώτες, τους μύκητες και τους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς (Kredich, 1996; Marzluf, 1997; Tomas and Sarbin-Kerjan, 1997; Leustek et al., 2000). Σε αντίθεση με τους παραπάνω οργανισμούς τα ζώα και ο άνθρωπος δεν είναι ικανοί να ανάγουν τα ανόργανα θειικά σε υδρόθειο. Γι' αυτό το λόγο, ο μεταβολισμός αυτών των οργανισμών εξαρτάται από τη δίαιτά τους σε θείο, κυρίως σε ανηγμένη μορφή. Ο εφοδιασμός αυτός γίνεται μέσω θειούχων αμινοξέων και βασικών βιταμινών που περιέχουν θείο (Ravel et al., 1998; Tabe and Higgins, 1998; Galili and Hofgen, 2002; Nikiforova et al., 2002; Noji and Saito, 2002; Hesse and Hoefgen, 2003).

Το φυτό μοντέλο *A. thaliana*, καθώς και το βακτήριο *Escherichia coli* χρησιμοποιήθηκαν για να καθοριστούν οι μοριακοί και βιοχημικοί μηχανισμοί αναγωγής και ενσωμάτωσης του

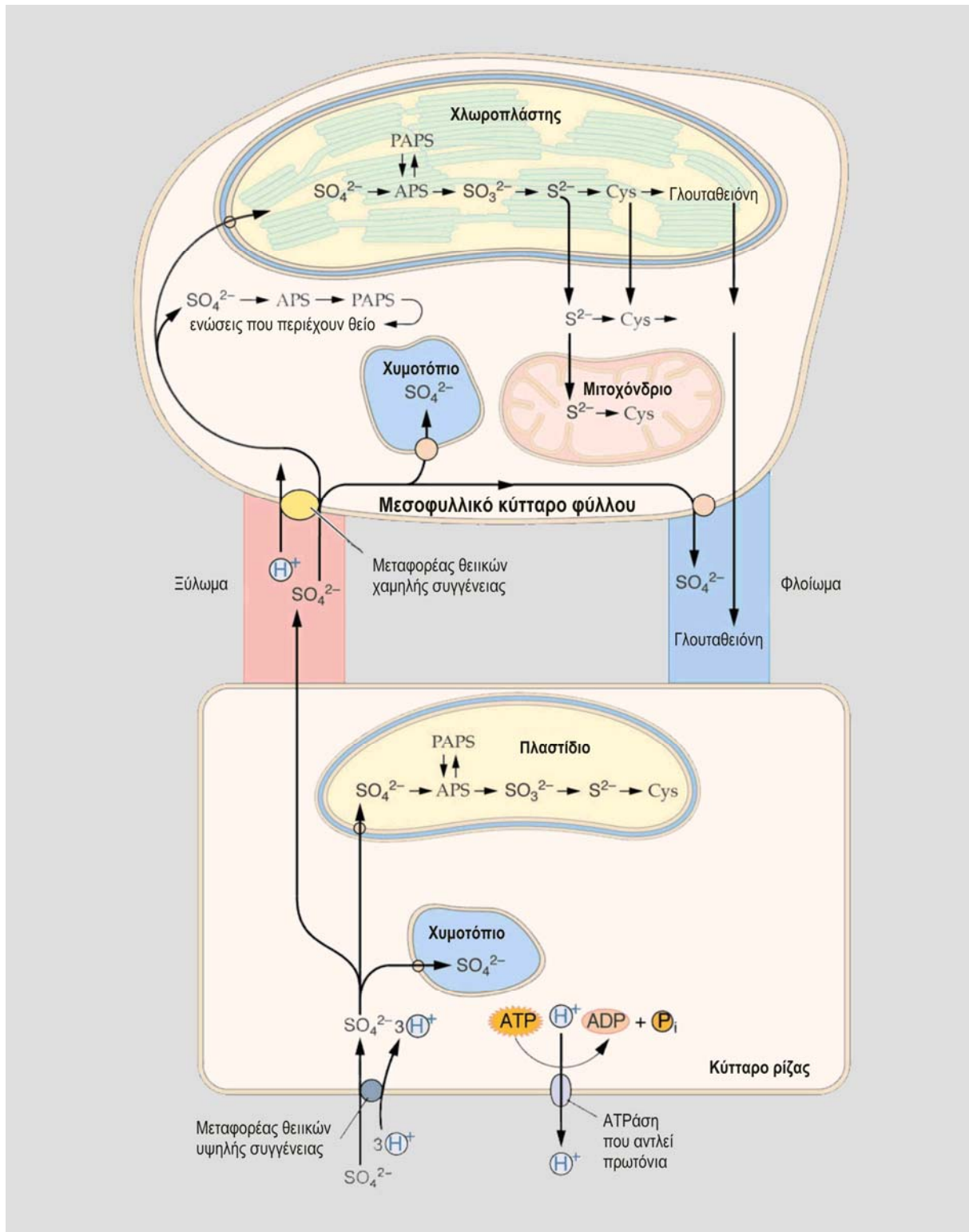
θείου στα φυτά και στα βακτήρια αντίστοιχα (Leustek et al., 2002; Hell et al., 2002; Noji and Saito, 2002). Επίσης τεχνολογίες όπως αυτή των μικροσυστοιχιών και της αντίστροφης γενετικής, έχουν οδηγήσει στον εντοπισμό και τη μερική κατανόηση της βιοχημικής και γενετικής ρύθμισης του μονοπατιού που οδηγεί στη βιοσύνθεση της κυστεΐνης και των παραγώγων της (Met και GSH), σε συνδυασμό με το μεταβολισμό του κυττάρου (Nikiforova et al., 2002; Noctor et al., 2002; Noji and Saito, 2002; Hesse and Hoefgen, 2003; Hirai et al., 2003; Nikiforova et al., 2003). Οι χημικές ιδιότητες του θείου, των οργανικών ενώσεων που περιέχουν θείο και του θείου των πρωτεϊνών συνεισφέρουν σε σημαντικές βιοχημικές αντιδράσεις τόσο στο μεταβολισμό των οργανισμών, όσο και στην απόκριση αυτών σε παράγοντες βιοτικού και αβιοτικού στρες (Beinert, 2000; Foyer et al., 2001; Cooper et al., 2002; Dixon et al., 2002; Hall, 2002; Milter, 2002; Noctor et al., 2002; Dietz 2003; Giles et al., 2003).

Η πολλαπλή χρήση του θείου μπορεί εν μέρει να προέρχεται από την ιδιότητά του να οξειδώνεται σε πολλαπλά στάδια. Η οξειδωτική του κατάσταση επιτρέπει στο θείο να υπάρχει σε διάφορες βαθμίδες οξείδωσης, από +6 της πιο σταθερής μορφής του θειικού ανιόντος σε -2 του ατόμου του θείου ( $S^{2-}$ ) και του υδρόθειου ( $H_2S$ ). Τα θειικά αποτελούν την κύρια πηγή θείου για τα φυτά και τους μικροοργανισμούς, βρίσκονται στο έδαφος και αποτελούν την πιο σταθερή μορφή του στοιχείου αυτού. Λόγω της σταθερότητας των θειικών οι οργανισμοί πρέπει να δαπανήσουν μεγάλο ποσό ενέργειας για την αναγωγή τους (Takahashi et al., 2011). Τα θειικά στο έδαφος προέρχονται από την αποσάθρωση των μητρικών πετρωμάτων. Ωστόσο, η εκβιομηχάνιση προσθέτει επιπλέον πηγές θειικών μέσω της ατμοσφαιρικής ρύπανσης. Η καύση των ορυκτών καυσίμων απελευθερώνει πολλές αέριες μορφές του θείου, συμπεριλαμβανομένων του διοξειδίου του θείου ( $SO_2$ ) και του υδρόθειου ( $H_2S$ ) (Takahashi et al., 2011; Hawkesford, 2000). Οι αέριες μορφές αυτές επανέρχονται στο έδαφος μέσω της βροχής. Όταν το  $SO_2$  διαλυθεί στο νερό υδρολύεται και σχηματίζεται θειικό οξύ ( $H_2SO_4$ ), το οποίο είναι το κύριο συστατικό της όξινης βροχής. Τα φυτά μπορούν να μεταβολίσουν το διοξείδιο του θείου το οποίο προσλαμβάνουν σε αέρια μορφή μέσω των στομάτων των φύλλων τους (Rennenberg and Polle, 1994; Rennenberg and Herschbach, 1996). Ωστόσο, παρατεταμένη διάρκεια έκθεσης (ανώτερη των 8 ωρών) σε υψηλά επίπεδα συγκέντρωσης  $SO_2$  (πάνω από 0,3 ppm) στην ατμόσφαιρα, προκαλεί εκτεταμένες βλάβες στους ιστούς, λόγω του σχηματισμού θειικού οξέος.

### 1.3.2 Μεταβολισμός του θείου και αλληλεπίδρασή του με το μεταβολισμό του αζώτου και του άνθρακα

Στα φυτά και πολλούς μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται χρησιμοποιώντας ως πηγή θείου θειικά, αυτά προσλαμβάνονται με τη βοήθεια εξειδικευμένων μεταφορέων (Εικόνα 1.7). Λόγω του ότι τα θειικά είναι πολύ σταθερά χρειάζεται να ενεργοποιηθούν πριν την αναγωγή τους με αδενυλίωση σχηματίζοντας 5'-φωσφοθειική αδενοσίνη (APS) μέσω μίας αντίδρασης που καταλύεται από τη ATP σουλφουρυλάση (ATPS) (Suter et al., 2000; Leustek and Saito, 1999; Brunold, 1993; Schmidt, 1972). Το APS ανάγεται προς θειώδες ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) από την αναγωγή του APS (APR) και στη συνέχεια προς υδρόθειο ( $\text{S}^{2-}$ ) από την αναγωγή του θειώδους (SIR) (Suter et al., 2000). Η βιοσύνθεση κυστεΐνης πραγματοποιείται μέσω της δράσης της θειολολυάσης της Ο-ακετυλοσερίνης (OASTL) από το υδρόθειο και την Ο-ακετυλοσερίνη (OAS). Η τελευταία συντίθεται μέσω μίας αντίδρασης που καταλύεται από την Ο-ακετυλομεταφοράση της σερίνης (SAT) από την σερίνη και το ακετυλο-συνένζυμο Α (Kopriva and Rennenberg, 2004; Leustek et al., 2000; Suter et al., 2000; Kopriva and Koprivona, 2003). Η κυστεΐνη αποτελεί την προδρομο ένωση για τη βιοσύνθεση άλλων ενώσεων ανηγμένου θείου, συμπεριλαμβανομένου πρωτογενών μεταβολιτών, όπως μεθειονίνη, γλουταθειόνη, ομογλουταθειόνη και συνένζυμο, καθώς και δευτερογενών μεταβολιτών, όπως φυτοχελατίνες, γλυκοζινολικά, και άλλα (Van der Weerden and Anderson, 2013; Noctor et al., 2012; Hassinen et al., 2011; Takahashi et al., 2011).

Ο σκελετός άνθρακα και το άζωτο της κυστεΐνης προέρχεται, επομένως, από τη σερίνη, η οποία παράγεται από την φωτοαναπνοή στους φωτοαυτοτροφικούς ιστούς ή από το μονοπάτι φωσφορυλίωσης του 3-φωσφογλυκερινικού που λαμβάνει χώρα στο πλαστίδια των μη φωτοσυνθετικών ιστών (Ho and Saito, 2001). Το άζωτο της σερίνης αποτελεί προϊόν της αναγωγής και της αφομοίωσης αζώτου. Εφόσον η αφομοίωση του αζώτου στα φυτά επιτυγχάνεται από το μονοπάτι της GS-GOGAT, το οποίο απαιτεί 2-οξο-γλουταρικό, εμπλέκονται και καταβολικές αντιδράσεις του κύκλου του κιτρικού οξέος που λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια. Στα φυτά που αφομοιώνουν άζωτο στις ρίζες, όπως, για παράδειγμα, τα δασικά Νορβηγικά έλατα (*Picea abies* L. [Karst.]) και η Ευρωπαϊκή οξιά (*Fagus sylvatica* L.), το άζωτο στη σερίνη της φωτοαναπνοής εξαρτάται, επίσης, από τη μεταφορά αμινοξέων από τις ρίζες στο βλαστό με μεταφορά μέσω του ξυλώματος (Geßler et al., 1998).



**Εικόνα 1.7:** Υποκυτταρική οργάνωση της πρόσληψης, της αφομοίωσης και του μεταβολισμού του θείου στα φυτικά κύτταρα της ρίζας και του φύλλου.

Η βιοσύνθεση της γλουταθειόνης (γ-γλουταμυλκυστεΐνυλγλυκίνης) εξαρτάται από τη σύνδεση και τη διαθεσιμότητα των αμινοξέων από τα οποία αποτελείται, συγκεκριμένα της κυστεΐνης, του γλουταμινικού οξέος και της γλυκίνης. Η ένωση των αμινοξέων αυτών επιτυγχάνεται με δύο ATP-εξαρτώμενες αντιδράσεις που καταλύονται από δύο ξεχωριστά



ένζυμα: α) τη συνθετάση της γ-γλουταμυλκυστεΐνης (γECS) που συνθέτει τη γ-γλουταμυλκυστεΐνη από την κυστεΐνη και το γλουταμινικό και β) τη συνθετάση της γλουταθειόνης (GSHS), η οποία ενώνει τη γλυκίνη στο καρβονικό άκρο της γ-γλουταμυλκυστεΐνης (May et al., 1998; Noctor et al., 1998). Κάποια ψυχανθή, περιέχουν ένα ομόλογο τριπεπτίδιο, την ομογλουταθειόνη (γ-γλουταμυλκυστεΐνυλαλανίνη), η σύνθεση της οποίας πραγματοποιείται με τη δράση της ίδιας συνθετάσης της γ-γλουταμυλκυστεΐνης (γECS) και της συνθετάσης της ομογλουταθειόνης (hGSHS), η οποία εμφανίζει πολύ υψηλότερη συγγένεια για την αλανίνη απ'ότι για τη γλυκίνη (Frendo et al., 2013; Macnicol, 1987; Klarheck et al., 1988; Frendo et al., 2001; Iturbe-Ormaetxe et al., 2002). Η σύνθεση της γλουταθειόνης και της ομογλουταθειόνης ρυθμίζεται, επομένως, από την διαθεσιμότητα κυστεΐνης που εξαρτάται από το μεταβολισμό του θείου, του αζώτου και του άνθρακα, αλλά και από τη διαθεσιμότητα γλουταμινικού και γλυκίνης/αλανίνης. Το γλουταμινικό οξύ, το κύριο προϊόν του μονοπατιού GS-GOGAT κατά την αφομοίωση αζώτου, παράγεται σε μεγάλες ποσότητες σε φωτοαυτοτροφικά κύτταρα και είναι το κύριο αμινοξύ που μεταφέρεται από τις ρίζες στα φύλλα μέσω του ξυλώματος στα φυτά που δεσμεύουν άζωτο στις ρίζες (Geßler et al., 1998). Επομένως, είναι απίθανο να παρουσιαστεί έλλειμμα γλουταμινικού οξέος στα φωτοαυτοτροφικά κύτταρα. Η γλυκίνη είναι ενδιάμεσο προϊόν της φωτοαναπνοής των φωτοαυτοτροφικών κυττάρων, ενώ η γλυκίνη και η αλανίνη μπορούν να μετατραπούν σε πυροσταφυλικό και να εισέλθουν στο κύκλο του κιτρικού οξέος. Επομένως, η διαθεσιμότητα της γλυκίνης και της αλανίνης εξαρτάται από την αφομοίωση του αζώτου και από τον κύκλο του κιτρικού οξέος στα μιτοχόνδρια. Έτσι, η σύνθεση της γλουταθειόνης και της ομογλουταθειόνης ενέχει ένα μεγαλύτερο βαθμό πολυπλοκότητας από ότι η σύνθεση της κυστεΐνης όσον αφορά στην αλληλεπίδρασή της με το μεταβολισμό του θείου, του αζώτου και του άνθρακα (Kopriva and Rennenberg, 2004).

### 1.3.3 Πρόσληψη θεικών

Αφότου τα θειικά προσληφθούν από το εδαφικό διάλυμα μέσω του μεμβρανικού συστήματος μεταφοράς της ρίζας, είτε συσσωρεύονται σταδιακά στα κυτταρικά χυμοτόπια της ρίζας ή του βλαστού είτε εισέρχονται στο πολύπλοκο μεταβολικό μονοπάτι αναγωγής των θεικών. Ανάμεσα στην πρόσληψη των θεικών από τα κύτταρα της ρίζας και στην αναγωγή τους στους απομακρυσμένους χλωροπλάστες των φύλλων, οι οποίοι είναι η κύρια θέση αφομοίωσης των θεικών, πολλά βήματα μεταφοράς μεταξύ κυττάρων μέσω πλασμοδέσματα, καθώς και μεσοκυττάριας και ενδοκυττάριας διαμεμβρανικής μεταφοράς πρέπει να πραγματοποιηθούν. Ο συντονισμός μεταφοράς θεικών τόσο σε μικρές όσο και σε μεγάλες αποστάσεις απαιτεί την ύπαρξη μηχανισμών εξειδικευμένων σημάτων που

αποβλέπουν στον να ελέγχονται και να ρυθμίζονται με ένα συντονισμένο τρόπο τα γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην πρόσληψη και μεταφορά των θεικών, καθώς και στο μονοπάτι αφομοίωσης των θεικών. Αυτοί οι ρυθμιστές εκφράζονται σε απόκριση εσωτερικών και εξωτερικών σημάτων διαθεσιμότητας των θεικών και σε συντονισμό με τα μονοπάτια αναγωγής και αφομοίωσης του θείου, του αζώτου και του άνθρακα, συμπεριλαμβανομένου των ορμονικών μέσω των περίπλοκων, πολυ-επίπεδων μεταβολικών δικτύων (Davidian and Kopriva, 2010; Amtmann and Armengaud, 2009; Gojon et al., 2009).

### 1.3.3.1 Φυτικοί μεταφορείς θεικών

Στα περισσότερα φυτά, τα γονίδια που κωδικοποιούν για πιθανούς μεταφορείς θεικών κατατάσσονται σε πέντε υπο-οικογένειες (*Sultr1-Sultr5*) με βάση την ομοιότητα τους ως προς την πρωτεϊνική τους αλληλουχία (Davidian and Kopriva, 2010; Hawkesford, 2003). Στο *A. thaliana*, 14 μέλη έχουν ταυτοποιηθεί, αλλά μόνο για λίγους από αυτούς έχει προσδιοριστεί η λειτουργία τους. Ένα από τα δύο γονίδια της υπο-οικογένειας *AtSultr5*, ο *AtSultr5;2*, έχει δειχθεί ότι κωδικοποιεί για μεταφορέα μολυβδενίου υψηλής συγγένειας και μετονομάστηκε σε *MOT1* (Tomatsu et al., 2007). Πράγματι, ο μεταφορέας αυτός δεν μπορεί να αποκαταστήσει το φαινότυπο του μεταλλαγμένου στελέχους ζύμης ως προς τους θεικούς μεταφορείς της (Cherest et al., 1997; Tomatsu et al., 2007). Επίσης, ο πρώτος θεικός μεταφορέας φυτικής ρίζας υψηλής συγγένειας SHST1, που ανήκει στην ομάδα των SULTR1 και κλωνοποιήθηκε από το φυτό *Stylosanthes hamata* (Smith et al., 1995), αποδείχθηκε ότι εμπλέκεται στην πρόσληψη του μολυβδενίου σε τάξη μεγέθους των nM όταν εκφράστηκε σε κύτταρα ζύμης, αποκαλύπτοντας μια πιθανή διπλή λειτουργία μεταφοράς (Fitzpatrick et al., 2008).

Είναι ξεκάθαρο ότι η πρόσληψη θεικών από τη ρίζα πραγματοποιείται υπό τον έλεγχο του *AtSULTR1;2* που αποτελεί τον κύριο μεμβρανικό μεταφορέα θεικών υψηλής συγγένειας της ρίζας (El Kassis et al., 2007). Έχει προταθεί ότι ο *AtSultr1;2* εκφράζεται στις κυτταροπλασματικές μεμβράνες των κυττάρων της επιδερμίδας και του παρεγχύματος της ρίζας, ενώ στο ακρορίζιο είναι ο κύριος μεταφορέας θεικών της ρίζας που ευθύνεται για τη θρέψη του φυτού σε θείο (Shibagaki et al., 2002; Yoshimoto, et al., 2002; El Kassis et al., 2007; Barberon et al., 2008). Ο *SULTR1;2* έχει προταθεί ότι δρα ως αισθητήρας ανίχνευσης των επιπέδων θείου του φυτού (Zhang et al., 2014), ωστόσο επιπλέον πειράματα απαιτούνται για τη διερεύνηση του ακριβή μηχανισμού ανίχνευσης. Επίσης, ο *LjSultr1;2* επάγεται και κατά την έλλειψη θείου και κατά το σχηματισμό μυκόρριζας στις ρίζες του *L. japonicus* και θεωρείται η πρωτεΐνη-κλειδί για την πρόσληψη θεικών (Giovannetti et al., 2014). Ο *AtSultr1;1* έχει

επίσης ταυτοποιηθεί ως μεταφορέας θεικών υψηλής συγγένειας (Vidmar et al., 2000), αλλά η έκφρασή του στις ρίζες είναι πολύ χαμηλότερη από αυτήν του *AtSultr1;2* (Rouached et al., 2008). Η συσσώρευση μεταγραφημάτων και των δύο γονιδίων διεγείρεται από την έλλειψη θεικών. Το τρίτο μέλος των μεταφορέων θεικών υψηλής συγγένειας της πρώτης ομάδας μεταφορέων είναι ο *AtSultr1;3*, ο οποίος εκφράζεται εξειδικευμένα στα αγγεία του φλοιώματος και είναι υπεύθυνος για τη μεταφορά θεικών από την πηγή στη καταβόθρα (Yoshimoto et al., 2003).

Οι μεταφορείς θεικών χαμηλής συγγένειας *AtSULTR2;1* και *AtSULTR2;2* εκφράζονται στα ή κοντά στα παρεγχυματικά κύτταρα του ξυλώματος (Takahashi et al., 1997, 2000) και εμπλέκονται στη μεταφορά θεικών σε μεγάλες αποστάσεις. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι ο *SULTR2;1* αλληλεπιδρά με τον *SULTR3;5* όταν εκφράζονται ταυτόχρονα σε ζύμη αυξάνοντας τη δυναμικότητα της ζύμης στην πρόσληψη θεικών. Επίσης, έχει δειχθεί ότι και οι δύο μεταφορείς εκφράζονται στο ξυλώδες παρέγχυμα και στα περικυκλικά κύτταρα της ρίζας υποδεικνύοντας ότι η συνεργιστική τους δράση που παρατηρήθηκε στη ζύμη συνεισφέρει στον έλεγχο της μεταφοράς θεικών σε μεγάλες αποστάσεις κατά μήκος της ρίζας. Πράγματι, έχει δειχθεί ότι και οι δύο πρωτεΐνες συνεισφέρουν στη βελτιωμένη ανάκτηση θεικών από τον αποπλασμικό χώρο κατά την έλλειψη θείου (Kataoka et al., 2004a). Αξίζει να σημειωθεί ότι όταν ο *AtSULTR3;5* εκφράζεται μόνος του στη ζύμη, δεν έχει την ικανότητα να μεταφέρει θειικά, προτείνοντας ότι *in vivo* ένα ετερομερές σύμπλοκο *SULTR* απαιτείται για την αποτελεσματική ρύθμιση της μεταφοράς θεικών κάτω από ειδικές συνθήκες (Rouached et al., 2005).

Κάποια μέλη της ομάδας *AtSULTR3* παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης σε διάφορα στάδια ανάπτυξης των σπόρων, σε σύγκριση με άλλα όργανα (Zuber et al., 2010). Ο μεταφορέας θεικών *SULTR3;5* της λεύκας φαίνεται ότι εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση με παθογόνους μύκητες (Gigolashvili and Korovina, 2014; Petre et al., 2012). Επίσης, έχει προταθεί ότι κάποια ομόλογα μέλη της υπο-ομάδας *SULTR3* εμπλέκονται στη μεταφορά θεικών στα αναπτυσσόμενα έμβρυα του ρεβιθιού (*Cicer arietinum*) (Tabe et al., 2003), ενώ ο συμβιωτικός μεταφορέας θεικών *SST1* (Symbiotic Sulfate Transporter) είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη λειτουργικών φυματίων (Krusell et al., 2005).

Τα δύο μέλη της οικογένειας *AtSULTR4* εντοπίζονται στον τονοπλάστη. Έχει προταθεί ότι οι μεταφορείς *AtSULTR4;1* και *AtSULTR4;2* εμπλέκονται στην επανακινητοποίηση των θεικών από τα χυμοτόπια στο κυτταρόπλασμα, καθώς το περιεχόμενο σε θειικά που μετρήθηκε σε χυμοτόπια που απομονώθηκαν από τη μεταλλαγμένη σειρά ως προς τα γονίδια *AtSULTR4;1* και *AtSULTR4;2* είναι ιδιαίτερα αυξημένο (Kataoka et al., 2004b). Παρότι οι δύο πρωτεΐνες

έχουν παρόμοιο υποκυτταρικό εντοπισμό, η έκφραση του *SULTR4;2* είναι πιο ευαίσθητη στην έλλειψη θείου και στις ρίζες και στο βλαστό σε σύγκριση με τον *SULTR4;1*. Επίσης, ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι στα φύλλα της ελαιοκράμβης (*Brassica napus*) ο *BnSULTR4;2* εκφράζεται περισσότερο από ότι ο *BnSULTR4;1* σε συνθήκες έλλειψης θείου (Parmar et al., 2007; Dubousset et al., 2009), ενώ στις ίδιες συνθήκες το περιεχόμενο των φύλλων της ελαιοκράμβης σε θειικά μειώνεται σημαντικά σε σχέση με την επαγωγή του *BnSULTR4;1* επιβεβαιώνοντας την εμπλοκή και των δύο μελών της ομάδας *SULTR4* στην επανακινητοποίηση των θεικών από τα χυμοτόπια (Dubousset et al., 2009).

### 1.3.3.2 Ρύθμιση της πρόσληψης θεικών

Ένα από τα πιο γνωστά χαρακτηριστικά της πρόσληψης θεικών είναι η έντονη επαγωγή της από την περιορισμένη διαθεσιμότητα θεικών. Η ανεπάρκεια θείου επηρεάζει την πρόσληψη θεικών από τις ρίζες μέσω των μεταφορέων θεικών υψηλής και χαμηλής συγγένειας και μεταφορείς των χυμοτοπίων *SULTR4* (Clarkson et al., 1983; Takahashi et al., 1997; Kataoka et al., 2004b). Αυτή η επαγωγή καταστέλλεται γρήγορα, όταν παρέχονται στο φυτό θειικά ή άλλες πηγές θείου (Herschbach and Rennenberg, 1994; Lappartient et al., 1999). Την επίδραση της έλλειψης θείου μπορεί να μιμηθεί ο χειρισμός με Ο-ακετυλοσερίνη, η οποία συσσωρεύεται κάτω από αυτές τις συνθήκες και επάγει τα επίπεδα των μεταγραφημάτων των μεταφορέων θεικών όπως και τη δυναμικότητα της πρόσληψης θεικών (Smith et al., 1997). Αντίθετα, η πρόσληψη θεικών καταστέλλεται, όταν παρέχεται στα φυτά ανηγμένο θείο. Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί παρέχοντας στις ρίζες των φυτών γλουταθειόνη ή κυστεΐνη (Lappartient and Touraine, 1996; Vauclare et al., 2002) ή με εφαρμογή αέριου  $H_2S$  ή  $SO_2$  (Herschbach et al., 1995). Θεωρείται ότι η Ο-ακετυλοσερίνη και η γλουταθειόνη κατέχουν κυρίαρχο ρόλο στην επαγωγή και την καταστολή της έκφρασης των περισσότερων γονιδίων που κωδικοποιούν για μεταφορείς θεικών της ρίζας, καθώς και για ένζυμα του μεταβολικού μονοπατιού του θείου, αντίστοιχα (Hopkins et al., 2005). Επομένως, η πρόσληψη θεικών προσαρμόζεται ανάλογα με τα επίπεδα θείου του φυτού, κάτι που είναι σε συμφωνία με το ότι ο μεταβολισμός του θείου ρυθμίζεται ανάλογα με τη ζήτηση σε θείο που υπάρχει κάθε φορά (Lappartient and Touraine, 1996).

Ωστόσο, η πρόσληψη θεικών συντονίζεται, επίσης, με την επαγωγή της πρόσληψης και της αφομοίωσης του αζώτου και του άνθρακα. Κατά τον περιορισμό διαθεσιμότητας αζώτου, η πρόσληψη θεικών μειώνεται δραστικά (Smith, 1980; Clarkson et al., 1989). Η μείωση αυτή της πρόσληψης αντιστοιχεί σε μειωμένη συσσώρευση μεταγραφημάτων των μεταφορέων *AtSULTR1;1* και *AtSULTR1;2* (Maruyama-Nakashita et al., 2004). Επιπρόσθετα, τα γονίδια που κωδικοποιούν για μεταφορείς θεικών υψηλής συγγένειας επάγονται από τη

σακχαρόζη (Maruyama-Nakashita et al., 2004). Επίσης, σε συμφωνία με τη ρύθμιση ανάλογα με τη ζήτηση, η πρόσληψη θεικών αυξάνεται κατά τη παροχή καδμίου (Nocito et al., 2006). Συμπερασματικά, η ρύθμιση της πρόσληψης θεικών αποτελεί μία επιβεβαίωση του σημαντικού της ρόλου στον έλεγχο της θρέψης του φυτού σε θείο (Vauclare et al., 2002).

### **1.3.4 Αναγωγή και αφομοίωση θεικών**

#### **1.3.4.1 Γενετική οργάνωση της αναγωγής και της αφομοίωσης των θεικών**

Τα περισσότερα ένζυμα της αναγωγής και της αφομοίωσης των θεικών, με εξαίρεση την αναγωγή του θειώδους, κωδικοποιούνται από πολλαπλά γονίδια, όπως ακριβώς συμβαίνει και με την πολυμελή οικογένεια των γονιδίων που κωδικοποιούν για μεταφορείς θεικών. Αυτό οφείλεται αφενός στο ότι πολλά μεταβολικά βήματα πραγματοποιούνται σε διαφορετικά διαμερίσματα του κυττάρου. Η σουλφουρυλάση του ATP και η κινάση του APS (APK), για παράδειγμα, εντοπίζονται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στα πλαστίδια (Lunn et al., 1990; Rotte and Leustek, 2000; Mugford et al., 2009), ενώ η κυστεΐνη συντίθεται στο κυτταρόπλασμα, τα πλαστίδια, αλλά και στα μιτοχόνδρια (Ruffet et al., 1995; Harms et al., 2000; Jost et al., 2000). Ωστόσο, ακόμα και η αναγωγή του APS που εντοπίζεται σχεδόν αποκλειστικά στα πλαστίδια (Koprivona et al., 2001), κωδικοποιείται από τρία γονίδια στο *A. thaliana* και τουλάχιστον δύο γονίδια σε άλλα ανώτερα φυτά (Kopriva et al., 2007a). Η σουλφουρυλάση του ATP και η κινάση του APS είναι ακόμα πιο περίπλοκες αφού κωδικοποιούνται από τέσσερις η καθεμία. Μεταξύ των ισοτύπων της κινάσης του APS, η APK3 στερείται πεπτιδίου-οδηγού και εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα (Mugford et al., 2009), ενώ και τα τέσσερα γονίδια της σουλφουρυλάσης του ATP κωδικοποιούν για χλωροπλαστικές πρωτεΐνες. Στο *A. thaliana* η Ο-ακετυλο-μεταφορά της σερίνης κωδικοποιείται από πέντε γονίδια (Kawashima et al., 2005). Το πιο πολύπλοκο στοιχείο της αφομοίωσης των θεικών είναι η θειολολυάση της Ο-ακετυλοσερίνης, η οποία κωδικοποιείται από εννέα γονίδια (Jost et al., 2000; Watanabe et al., 2008a).

Παρότι ακόμη δεν έχουν αποδοθεί συγκεκριμένες λειτουργίες στα περισσότερα γονίδια, πρόσφατα έχει επιτευχθεί μεγάλη πρόοδος με το χαρακτηρισμό μεταλλαγμένων φυτών *A. thaliana* στα οποία ένα ή περισσότερα γονίδια έχουν διακοπεί (Heeg et al., 2008; Watanabe et al., 2008a, 2008b; Krueger et al., 2009; Mugford et al., 2009). Οι αναλύσεις αυτές έδειξαν ότι στις περισσότερες περιπτώσεις (APK, SAT, OASTL) η έλλειψη ενός μόνο γονιδίου δεν οδηγεί σε ορατό φαινότυπο και ότι τουλάχιστον στη οικογένεια της Ο-ακετυλο-μεταφοράς της σερίνης κάθε ισότυπος είναι ικανός να διατηρήσει την ανάπτυξη και να

ολοκληρώσει τον βιολογικό κύκλο του φυτού (Heeg et al., 2008; Watanabe et al., 2008a, 2008b; Mugford et al., 2009). Ωστόσο, πρέπει να δίνεται μεγάλη προσοχή στην ανάλυση μεταλλαγμάτων καθώς όπως έχει δειχθεί διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης μπορεί να οδηγήσουν σε διαφορετικά συμπεράσματα, όπως για παράδειγμα η ισχυρή παρεμπόδιση της ανάπτυξης λόγω της μειωμένης έκφρασης της μιτοχονδριακής Ο-ακετυλο-μεταφοράσης της σερίνης που παρατηρήθηκε από τους Haas et al. (2008), παρότι τέτοια παρεμπόδιση δεν ανιχνεύθηκε από τους Watanabe et al., (2008b) στις μεταλλαγμένες σειρές που δημιουργήθηκαν με ένθεση T-DNA.

#### **1.3.4.2 Ρύθμιση της αναγωγής και της αφομοίωσης των θεικών**

Η αφομοίωση των θεικών ρυθμίζεται κυρίως από τη ζήτηση για ανηγμένο θείο και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες και συντονίζεται από την αφομοίωση του αζώτου και του άνθρακα (Kopriva and Rennenberg, 2004). Τα πρώτα πειράματα επικεντρώθηκαν στο πρώτο βήμα του μονοπατιού και αποκάλυψαν ότι η σουλφουρυλάση του ATP επάγεται από την έλλειψη θείου (Logan et al., 1996) και παρεμποδίζεται από τη χαμηλή διαθεσιμότητα αζώτου (Smith, 1980; Reuveny et al., 1980). Ενώσεις που περιέχουν ανηγμένο θείο, όπως η γλουταθειόνη, παρεμπόδισε την σουλφουρυλάση του ATP, γεγονός που οδήγησε στη διαμόρφωση της ιδέας ότι η ρύθμιση του μονοπατιού καθοδηγείται από τη ζήτηση (Lappartient and Touraine, 1996; Lappartient et al., 1999). Η ίδια ρύθμιση αποδείχθηκε αργότερα και για την αναγωγή του APS (Koprivona et al., 2000; Vauclare et al., 2002). Ωστόσο, ολόένα και περισσότερες αναφορές προτείνουν ότι η αναγωγή του APS είναι το κυρίως ρυθμιστικό βήμα του μονοπατιού, καθώς σε πολλές περιπτώσεις η αναγωγή του APS ρυθμίζεται από συγκεκριμένους χειρισμούς, ενώ άλλα ένζυμα του μονοπατιού δεν επηρεάζονται (Hatzfeld et al., 1998; Westerman et al., 2001; Koprivona et al., 2000; Vauclare et al., 2002; Hesse et al., 2003). Αυτό επιβεβαιώθηκε και αναλύοντας τον έλεγχο των ροών. Οι αναλύσεις αυτές αποκάλυψαν ότι η αναγωγή του APS κατέχει το 90% του ελέγχου των ροών μέσω της αναγωγής των εσωτερικών αποθεμάτων θεικών και μοιράζεται εξίσου τον έλεγχο με την πρόσληψη θεικών (Vauclare et al., 2002). Έτσι, έχει αποδειχθεί ότι η αναγωγή του APS εμπλέκεται ισχυρά στον έλεγχο της συσσώρευσης θεικών, αφού η χαμηλή δραστηριότητα της αναγωγής του APS συσχετίστηκε με τα υψηλά επίπεδα θεικών που παρατηρήθηκαν στα φύλλα του *A. thaliana* (Loudet et al., 2007). Πράγματι, η υπερέκφραση της αναγωγής του APS οδηγεί σε έντονα αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία και την ευρωστία των φυτών λόγω της συσσώρευσης τοξικών ανόργανων ενώσεων όπως το θειώδες και τα θειοθειικά (Martin et al., 2005), ενώ στα φυτά που υπερεκφράστηκαν η σουλφουρυλάση του ATP, η Ο-ακετυλομεταφοράση της σερίνης ή η θειολυάση της Ο-

ακετυλοσερίνης δεν παρατηρήθηκε φαινότυπος (Saito et al., 1994; Hatzfeld et al., 1998; Blaszczyk et al., 1999; Pilon-Smits et al., 1999). Επομένως, η ρύθμιση της αναγωγής του APS αποτελεί μία καλή προσέγγιση της ρύθμισης ολόκληρου του μονοπατιού αφομοίωσης των θειικών. Ωστόσο, και άλλα βήματα του μονοπατιού, και κυρίως η συντονισμένη δράση της Ο-ακετυλο-μεταφοράς της σερίνης και της θειολουάσης της Ο-ακετυλοσερίνης κατά τη βιοσύνθεση της κυστεΐνης, είναι υπεύθυνα για τον αποτελεσματικό συντονισμό της ρύθμισης, όπως για παράδειγμα για τη διατήρηση σταθερής συγκέντρωσης της κυστεΐνης παρά τις μεγάλες διαφορές στο ρυθμό της σύνθεσής της (Vauclare et al., 2002; Berkowitz et al., 2002; Riemenschneider et al., 2005).

Συμπερασματικά, η αναγωγή του APS και επομένως και η αφομοίωση των θειικών ρυθμίζεται από τα επίπεδα θείου του φυτού και επάγεται από την έλλειψη θείου και παρεμποδίζεται από την παρουσία ανηγμένου θείου, όπως το διοξείδιο του θείου, το υδρόθειο, η κυστεΐνη ή η γλουταθειόνη (Kopriva and Koprivova, 2004). Επίσης συνδέεται με το μεταβολισμό του αζώτου, αφού η έλλειψη αζώτου καταστέλλει την αναγωγή του APS, ενώ η έκθεση σε αμμώνιο ή αμινοξέα αυξάνει τη δραστικότητα της αναγωγής του APS (Brunold and Suter, 1984; Koprivova et al., 2000). Η αναγωγή του APS παρουσιάζει ημερήσιο ρυθμό με υψηλή δραστικότητα κατά τη διάρκεια της ημέρας και χαμηλή δραστικότητα κατά τη διάρκεια της νύχτας (Kopriva et al., 1999). Σε φυτά που έχουν υποβληθεί σε συνθήκες σκότους η δραστικότητα της αναγωγής του APS επάγεται με επανέκθεση των φυτών στο φως ή με παροχή σακχάρων (Kopriva et al., 1999; Hesse et al., 2003). Επίσης, η δραστικότητα της αναγωγής του APS συσχετίζεται με τη διαθεσιμότητα διοξειδίου του άνθρακα στην ατμόσφαιρα (Kopriva et al., 2002). Τέλος, η δραστικότητα της αναγωγής του APS και/ή τα επίπεδα μεταγραφημάτων επάγονται από στρες βαρέων μετάλλων αλατότητας, υψηλής έντασης φωτός και χαμηλών θερμοκρασιών (Lee and Leustek, 1999; Brunner et al., 1995; Koprivova et al., 2008; Queval et al., 2009). Σε μεταλλαγμένες σειρές που συσσωρεύουν Ο-ακετυλοσερίνη αυξάνονται τα μεταγραφήματα της APR1 (Ohkama-Ohtsu et al., 2004). Σε όλες αυτές τις συνθήκες, η δραστικότητα της αναγωγής του APS ακολουθεί τη ζήτηση σε ανηγμένο θείο, είτε για τις ανάγκες του φυτού σε γλουταθειόνη και άλλες ενώσεις που εμπλέκονται στην άμυνα του φυτού έναντι των στρες είτε λόγω αλλαγής της διαθεσιμότητας των πρόδρομων ενώσεων.

#### **1.3.4.3 Μετα-μεταγραφική και μετα-μεταφραστική ρύθμιση της αναγωγής και της αφομοίωσης των θειικών**

Οι περισσότερες αναφορές που πραγματεύονται τη ρύθμιση της δραστικότητας της αναγωγής του APS και της σουλφουρυλάσης του ATP αποκάλυψαν μία καλή συσχέτιση

μεταξύ των επιπέδων των μεταγραφημάτων, της συσσώρευσης πρωτεϊνών και των ενζυμικών δραστηριοτήτων (Kopriva et al., 1999; Lappartient et al., 1999; Koprivona et al., 2000; Westerman et al., 2001; Vauclare et al., 2002; Hesse et al., 2003), οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η ρύθμιση γίνεται κατά κύριο λόγο σε μεταγραφικό επίπεδο. Ωστόσο, η σύνθεση κυστεΐνης και η δραστικότητα της Ο-ακετυλο-μεταφοράς της σερίνης και της θειολολυάσης της Ο-ακετυλοσερίνης ρυθμίζονται περισσότερο από αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης στο ενζυμικό σύμπλοκο της συνθάσης κυστεΐνης, παρόλο που και μεταγραφική ρύθμιση λαμβάνει χώρα (Droux et al., 1998; Barroso et al., 1999; Berkowitz et al., 2002; Droux, 2003). Η Ο-ακετυλο-μεταφορά της σερίνης ενεργοποιείται έντονα από τη σύνδεσή της με την θειολολυάση της Ο-ακετυλοσερίνης, η οποία, όμως, είναι ανενεργή και έχει μόνο ρυθμιστικό χαρακτήρα στο σύμπλοκο (Droux et al., 1998). Η αλληλεπίδραση των δύο ενζύμων επηρεάζεται έντονα από τη συγκέντρωση της Ο-ακετυλοσερίνης, η οποία διαχωρίζει το σύμπλοκο, και από το υδρόθειο που δρα με αντίθετο τρόπο ενισχύοντας την πρόσδεση (Droux et al., 1998; Berkowitz et al., 2002). Η Ο-ακετυλο-μεταφορά της σερίνης, όμως, υπόκειται, επίσης, σε παρεμπόδιση από την κυστεΐνη (Saito et al., 1995). Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι κάθε ισότυπος της Ο-ακετυλο-μεταφοράς της σερίνης εμφανίζει διαφορετική ευαισθησία στην κυστεΐνη. Στο *A. thaliana*, για παράδειγμα, η κυτταροπλασματική Ο-ακετυλο-μεταφορά της σερίνης παρεμποδίζεται από την κυστεΐνη, ενώ στο μπιζέλι παρεμποδίζεται ο πλαστιδιακός ισότυπος (Noji et al., 1998; Droux, 2003).

Ωστόσο, έχουν βρεθεί και άλλα επίπεδα ρύθμισης για την σουλφουρυλάση του ATP και την αναγωγή του APS. Έχει δειχθεί ότι η αναγωγή του APS υπόκειται πολύ γρήγορα σε μετα-μεταφραστική ρύθμιση από οξειδοαναγωγικές διεργασίες λόγω οξειδωτικού στρες (Bick et al., 2001). Πράγματι, το διμερές ένζυμο της αναγωγής του APS μπορεί να αναχθεί λόγω περίσσειας θειολών σε ανενεργά μονομερή (Kopriva and Koprivona, 2004). Ο πολύπλοκος τρόπος με τον οποίο ρυθμίζεται η αναγωγή του APS αποκαλύφθηκε με την διερεύνηση της ρύθμισης της αναγωγής του APS λόγω στρες αλατότητας χρησιμοποιώντας μεταλλαγμένες σειρές ως προς τα μονοπάτια σημάτων (Koprivona et al., 2008). Ενώ στα φυτά άγριου τύπου βρέθηκε να υπάρχει συσχέτιση όσον αφορά τη ρύθμιση των μεταγραφημάτων, των πρωτεϊνών και των δραστηριοτήτων, στα μεταλλαγμένα φυτά παρουσία ιασμονικού, σαλικυλικού, αιθυλενίου, κυττοκινίνης ή γιβερλίνης, η απόκριση των mRNA και της δραστικότητας δε συνδέονται. Λόγω του ότι σε πολλούς γονότυπους, τα επίπεδα mRNA επάγονταν από την αλατότητα, ενώ η συσσώρευση πρωτεϊνών όχι, θεωρείται πιθανό ότι μια μεταφραστική ρύθμιση συνεισφέρει σημαντικά στον έλεγχο της αναγωγής του APS (Koprivona et al., 2008).



Ένα επιπρόσθετο επίπεδο ρύθμισης της αναγωγής του APS ίσως να αντιπροσωπεύουν διάφορες πιθανές αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης όπως συμβαίνει και με τη ρύθμιση της σύνθεσης κυστεΐνης μέσω της συναρμολόγησης του συμπλόκου της συνθάσης της κυστεΐνης. Υπάρχουν πολλές ενδείξεις για μια πιθανή σύνδεση της σουλφουρυλάσης του ATP, της αναγωγής του APS και της αναγωγής του θειώδους σε ένα σύμπλοκο αναγωγής θεικών που εντοπίζεται στα πλαστίδια. Αρχικά, η σουλφουρυλάση του ATP είναι ένα πολύ αναποτελεσματικό ένζυμο με την χημική ισορροπία να μετατοπίζεται προς την αντίστροφη αντίδραση (Renosto et al., 1993). Για να παρέχεται επαρκές APS για την αναγωγή των θεικών, τα προϊόντα των αντιδράσεων πρέπει να απομακρύνονται γρήγορα. Έτσι, η σύνδεση της σουλφουρυλάσης του ATP με τη αναγωγή του APS θα διευκόλυε σίγουρα τη διοχέτευση του υποστρώματος. Το προϊόν της αναγωγής του APS, το θειώδες, είναι πολύ ενεργό χημικά και κυτταροτοξικό, επομένως, θα ήταν μεγάλο πλεονέκτημα η γρήγορη χρησιμοποίησή του από την αναγωγή του θειώδους. Πράγματι, έχει δειχθεί ότι η σουλφουρυλάση του ATP αλληλεπιδρά εξειδικευμένα με την αναγωγή του APS *in vitro* (Cumming et al., 2007). Με ανοσοεντόπιση πρωτεϊνών και ηλεκτρονική μικροσκοπία ανοσοχρυσού βρέθηκε ότι η αναγωγή του APS και η αναγωγή του θειώδους εντοπίζονται σε ένα συγκεκριμένο υπο-διαμέρισμα των πλαστιδίων του *Chlamydomonas reinhardtii* που συνδέεται με το πυρηνοειδές (Patron et al., 2008). Χρησιμοποιώντας χίμαιρες πρωτεϊνών με GFP βρέθηκε ότι στο βρύο *Physcomitrella patens* η αναγωγή του APS και η αναγωγή του θειώδους εμφάνισαν παρόμοιο και πολύ ιδιαίτερο «σημειακό»/διάστικτο πρότυπο εντοπισμού, πολύ διαφορετικό από αυτό άλλων πλαστιδιακών πρωτεϊνών (Kopriva et al., 2007b). Συνοψίζοντας, είναι πιθανό να υπάρχει ένα τέτοιο σύμπλοκο αναγωγής θεικών, ωστόσο, περισσότερη έρευνα πρέπει να πραγματοποιηθεί για να αποδειχθεί η ύπαρξή του.

#### **1.3.4.4 Σήματα που εμπλέκονται στη ρύθμιση της αναγωγής και της αφομοίωσης θεικών**

Όπως και στη ρύθμιση της πρόσληψης θεικών, υπάρχει περιορισμένη πληροφορία για τα σήματα που επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων της αναγωγής και της αφομοίωσης των θεικών. Τόσο η Ο-ακετυλοσερίνη όσο και η γλουταθειόνη, οι οποίες εμπλέκονται στη ρύθμιση της πρόσληψης των θεικών, θεωρούνται σήματα και για τη ρύθμιση της αναγωγής και της αφομοίωσης των θεικών. Ο ρόλος της γλουταθειόνης ως σήμα για τα επίπεδα θείου αξιολογήθηκε με πειράματα που συνδύασαν χειρισμούς με κυστεΐνη, γλουταθειόνη και BSO (buthionine sulfoximine), από τα οποία φάνηκε ότι η σουλφουρυλάση του ATP και η αναγωγή του APS ρυθμίζονται εξειδικευμένα από τη γλουταθειόνη (Lappartient et al.,

1999; Vauclore et al., 2002). Ενδιαφέρον παρουσιάζει, ωστόσο, ότι στο καλαμπόκι τον ίδιο ρόλο εκπληρώνει η κυστεΐνη (Bolchi et al., 1999). Ο ρόλος της Ο-ακετυλοσερίνης ως γενικό σήμα για τα επίπεδα θείου έχει αμφισβητηθεί. Αφενός, ο χειρισμός με Ο-ακετυλοσερίνη οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα mRNA για τα περισσότερα γονίδια που εμπλέκονται στο μονοπάτι της αναγωγής και της αφομοίωσης (Neuenschwander et al., 1991; Korpinova et al., 2000). Επιπρόσθετα, η μεταγραφική απόκριση του *A. thaliana* στο χειρισμό με Ο-ακετυλοσερίνη ήταν παρόμοια με αυτή που παρατηρήθηκε κατά την έλλειψη θείου (Hirai et al., 2005) και κατά την έλλειψη θείου που σχετίστηκε με τη συσσώρευση Ο-ακετυλοσερίνης. Αφετέρου, σε άλλες αναφορές δε βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της κινητικής της συσσώρευσης της Ο-ακετυλοσερίνης και της επαγωγής της πρόσληψης και αφομοίωσης των θειικών (Hopkins et al., 2005; Rouached et al., 2008). Ωστόσο, η διακύμανση της συγκέντρωσης έχει ισχυρή επίδραση στην πρόσδεση της Ο-ακετυλο-μεταφοράς της σερίνης και της θειολολυάσης της Ο-ακετυλοσερίνης στο σύμπλοκο της συνθάσης της κυστεΐνης και συνεισφέρει έτσι στη γρήγορη και δυναμική ρύθμιση της σύνθεσης της κυστεΐνης (Berkowitz et al., 2002).

Πολλές φυτορμόνες και άλλες ενώσεις επηρεάζουν τα επίπεδα μεταγραφημάτων και τη δραστικότητα της αναγωγής του APS. Λόγω του σημαντικού ρόλου των ενώσεων που περιέχουν θείο στην άμυνα του φυτού στα στρες, δεν προκαλεί έκπληξη το ότι το ιασμονικό ρυθμίζει συντονισμένα πολλά από τα βήματα της αναγωγής και της αφομοίωσης των θειικών (Jost et al., 2005). Η αναγωγή του APS επάγεται επίσης από άλλες φυτορμόνες που εμπλέκονται στην απόκριση στα στρες, όπως το σαλικυλικό και το αιθυλένιο. Η διακοπή των μονοπατιών των τριών αυτών ορμονών καταργεί την επαγωγή της αναγωγής του APS από το στρες αλατότητας (Korpinova et al., 2008). Το αφισικό οξύ έχει αντίθετη επίδραση στη σύνθεση κυστεΐνης και την αναγωγή του APS. Ενώ τα mRNA της κυτταροπλασματικής θειολολυάσης της Ο-ακετυλοσερίνης επάγονται μετά από 24 ώρες στρες αλατότητας με ένα τρόπο εξαρτώμενο από το αφισικό οξύ, καθώς και από απευθείας εφαρμογή αφισικού οξέος (Barroso et al., 1999), εφαρμογή αυτής της φυτορμόνης σε ρίζες του *A. thaliana* οδηγεί σε μία ισχυρή μετα-μεταγραφική παρεμπόδιση της αναγωγής του APS (Korpinova et al., 2008). Επίσης, και άλλες φυτορμόνες ρυθμίζουν την αναγωγή του APS, όπως η κυτοκίνη (Ohkama et al., 2002) και η γιββερελλίνη (Korpinova et al., 2008). Ωστόσο, ποιες από αυτές τις επιρροές είναι άμεσες και ποιες ορμόνες είναι όντως σήματα στην αναγωγή του APS απομένει να διαλευκανθεί.

### 1.3.5 Βιοσύνθεση της γλουταθειόνης και της ομογλουταθειόνης

#### 1.3.5.1 Σύνθεση και ρόλος της γλουταθειόνης και της ομογλουταθειόνης

Οι πολυσύνθετες λειτουργίες της γλουταθειόνης και της ομογλουταθειόνης περιλαμβάνουν την εξουδετέρωση ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS), βαρέων μετάλλων και ξενοβιοτικών, την παροχή καταλυτικού θείου, την μεταφορά και την αποθήκευση θείου, τα οξειδοαναγωγικά σήματα και άλλα (Takahashi et al., 2011, Foyer and Noctor, 2009). Τα πιο σχετικά ένζυμα που χρησιμοποιούν γλουταθειόνη είναι η αναγωγάση της γλουταθειόνης, η γ-γλουταμυλμεταφοράση, η γλουταθειονο-S-μεταφοράση και οι γλουταρεδοξίνες (Takahashi et al., 2011). Η οξειδοαναγωγή της γλουταθειόνης είναι μία πολύ σημαντική λειτουργία και για το λόγο αυτό το κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια του *A. thaliana* έχουν ένα εφεδρικό σύστημα για την περίπτωση ανεπαρκούς αναγωγής της γλουταθειόνης (Marty et al., 2009). Πρόσφατα παραδείγματα αποδεικνύουν τη σημασία της ομοιόστασης της οξειδοαναγωγής της γλουταθειόνης και το ρόλο της στη μεταφορά της αυξίνης και τη μετάδοση σημάτων (Bashandy et al., 2010; Koprivova et al., 2010).

Η γλουταθειόνη είναι το προϊόν δύο ATP-εξαρτώμενων αντιδράσεων που καταλύονται από τη συνθετάση της γ-γλουταμυλκυστεΐνης (γECS) και τη συνθετάση της γλουταθειόνης (GSHS), ενώ η ομογλουταθειόνη συντίθεται από τη δράση της ίδιας συνθετάσης της γ-γλουταμυλκυστεΐνης (γECS) και της συνθετάσης της ομογλουταθειόνης (hGSHS) (Frendo et al., 2013). Τα γονίδια που κωδικοποιούν για τη συνθετάση της γλουταθειόνης και τη συνθετάση της ομογλουταθειόνης εμφανίζουν πολύ υψηλή ομολογία και εντοπίζονται σε σειρά στο ίδιο χρωμόσωμα στα ψυχανθή-μοντέλα *M. truncatula* (Frendo et al., 2001) και *L. jaronicus* (Matamoros et al., 2003). Τα ευρήματα αυτά ενισχύουν την υπόθεση ότι το γονίδιο της συνθετάσης της ομογλουταθειόνης προήλθε από διπλασιασμό του γονιδίου της συνθετάσης της γλουταθειόνης μετά το διαχωρισμό των Fabales, Solanales και Brassicales (Frendo et al., 2001). Παρά την στενή τους σχέση, τα δύο γονίδια ρυθμίζονται με διαφορετικό τρόπο στα φυτικά όργανα και σε απόκριση σε στρεσογόνες συνθήκες ή σε χημικά σήματα, όπως ορμόνες και ενεργές ρίζες οξυγόνου και αζώτου (RONS, Reactive Oxygen and Nitrogen Species). Έτσι, το *M. truncatula* παράγει αποκλειστικά γλουταθειόνη στα φύλλα και γλουταθειόνη και ομογλουταθειόνη στις ρίζες και τα φυμάτια (Frendo et al., 1999), ενώ το *L. jaronicus* παράγει σχεδόν αποκλειστικά ομογλουταθειόνη στις ρίζες και τα φύλλα και γλουταθειόνη και ομογλουταθειόνη στα φυμάτια (Matamoros et al., 2003). Στα ψυχανθή παρατηρείται θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων mRNA και των δραστηριοτήτων της συνθετάσης της γλουταθειόνης και της συνθετάσης της ομογλουταθειόνης (Frendo et al., 1999; Matamoros et al., 1999b, 2003). Στις ρίζες του *M.*

*truncatula* η έκφραση της συνθετάσης της γ-γλουταμυλκυστεΐνης και της συνθετάσης της γλουταθειόνης επάγονται από το μονοξείδιο του αζώτου, σε αντίθεση με τη συνθετάση της ομογλουταθειόνης (Innocenti et al., 2007). Στις ρίζες του *L. japonicus*, το μονοξείδιο του αζώτου, οι κυτοκινίνες και οι πολυαμίνες επάγουν τη συνθετάση της γλουταθειόνης, και όχι τη συνθετάση της ομογλουταθειόνης, ενώ τα μεταγραφήματα και η δραστικότητα της συνθετάσης της ομογλουταθειόνης επάγονται από τις αυξίνες (Clemente et al., 2012). Εν τούτοις, παρότι η ύπαρξη της ομογλουταθειόνης στα ψυχανθή έχει ανακαλυφθεί εδώ και πολλά χρόνια, ο λόγος που αυτή η θειόλη αντικατέστησε τη γλουταθειόνη σε κάποια ψυχανθή παραμένει άγνωστος.

### 1.3.5.2 Ρύθμιση της σύνθεσης της γλουταθειόνης και της ομογλουταθειόνης

Τα γονίδια που κωδικοποιούν για τη συνθετάση της γ-γλουταμυλκυστεΐνης, τη συνθετάση της γλουταθειόνης και τη συνθετάση της ομογλουταθειόνης μπορούν να ρυθμιστούν μεταγραφικά από ορμόνες και ενεργές ρίζες οξυγόνου και αζώτου, όπως προαναφέρθηκε. Μία αξιοσημείωτη περίπτωση τέτοιας ρύθμισης αποτελεί η συντονισμένη επαγωγή των γονιδίων της συνθετάσης της γ-γλουταμυλκυστεΐνης και της συνθετάσης της γλουταθειόνης στο *A. thaliana* (Xiang and Oliver, 1998) και των τριών γονιδίων του *L. japonicus* (Clemente et al., 2012) μετά από έκθεση σε γασμονικό οξύ. Ωστόσο, έχει δειχθεί ότι το βιοσυνθετικό μονοπάτι της γλουταθειόνης και της ομογλουταθειόνης ελέγχεται και σε μεταφραστικό και μετα-μεταφραστικό επίπεδο επηρεάζοντας τη σταθερότητα των μεταγραφημάτων της συνθετάσης της γ-γλουταμυλκυστεΐνης και την ενζυμική της δραστικότητα, αντίστοιχα (Rausch et al., 2007; Galant et al., 2011). Η μετα-μεταφραστική ρύθμιση του φυτικού ενζύμου της συνθετάσης της γ-γλουταμυλκυστεΐνης θα μπορούσε να επιτευχθεί μέσω διαμοριακού δισουλφιδικού δεσμού που είναι πιθανό να λειτουργεί *in vivo* ως οξειδοαναγωγικός διακόπτης, έτσι ώστε η οξειδωση να κατευθύνει την ισορροπία προς την πιο ενεργή, διμερή μορφή της (Galant et al., 2011).

Ένας άλλος, εξίσου σημαντικός μηχανισμός ρύθμισης μπορεί να στηρίζεται στη διαμερισματοποίηση του μονοπατιού βιοσύνθεσης των θειολών. Σε πολλά φυτά, η συνθετάση της γ-γλουταμυλκυστεΐνης εντοπίζεται μόνο στα πλαστίδια, ενώ στο μπιζέλι και το σπανάκι, η δραστικότητα της συνθετάσης της γ-γλουταμυλκυστεΐνης εντοπίζεται και στους χλωροπλάστες και στο κυτταρόπλασμα (Hell and Bergmann, 1990; Klapheck et al., 1987). Στα φυμάτια, μελέτες υποκυτταρικής ανοσοεντόπισης πρωτεϊνών και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας ανοσοχρυσού, έδειξαν ότι η συνθετάση της γ-γλουταμυλκυστεΐνης εντοπίζεται στα πλαστίδια, ενώ η συνθετάση της γλουταθειόνης και η συνθετάση της ομογλουταθειόνης εντοπίζονται τόσο στα πλαστίδια όσο και στο κυτταρόπλασμα (Moran et

al., 2000; Clemente et al., 2012). Ο εντοπισμός της συνθετάσης της γλουταθειόνης στα μιτοχόνδρια των φυματίων του cowpea (*Vigna unguiculata*) πρέπει να επιβεβαιωθεί με ηλεκτρονική μικροσκοπία, καθώς και να εξεταστεί και σε φυμάτια άλλων ψυχανθών (Moran et al., 2000). Παρόμοιος υποκυτταρικός εντοπισμός έχει αναφερθεί και στο *A. thaliana*, όπου η συνθετάση της γ-γλουταμυλκυστεΐνης περιορίζεται στα πλαστίδια, ενώ η δραστικότητα της συνθετάσης της γλουταθειόνης εντοπίζεται στα πλαστίδια και κατά κύριο λόγο στο κυτταρόπλασμα ως αποτέλεσμα διαφορετικής συρραφής του ίδιου μεταγραφήματος της συνθετάσης της γλουταθειόνης (Rausch et al., 2007; Galant et al., 2011; Gromes et al., 2008; Wachter et al., 2005). Λόγω του ότι η γ-γλουταμυλκυστεΐνη πρέπει να μεταφερθεί από τα πλαστίδια στο κυτταρόπλασμα, όπου λαμβάνει χώρα το μεγαλύτερο μέρος της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης και της ομογλουταθειόνης, η υποκυτταρική διαμερισματοποίηση προσφέρει ένα δυναμικό κανάλι μεταφοράς οξειδοαναγωγικών σημάτων από τους χλωροπλάστες και πιθανόν από άλλα πλαστίδια (Mullineaux and Rausch, 2005). Τα σπορόφυτα T-DNA μεταλλαγμένων φυτών *A. thaliana* ως προς τη συνθετάση της γλουταθειόνης δεν επιζούν, όμως επανέρχονται πλήρως με τη δράση κυτταροπλασματικής συνθετάσης της γλουταθειόνης, γεγονός που αποδεικνύει ότι η γλουταθειόνη μπορεί να εισέλθει στα πλαστίδια (Pasternak et al., 2008). Μια ακόμα πρόσφατη μελέτη δείχνει ότι μεμβρανικές πρωτεΐνες του *A. thaliana* που παρουσιάζουν ομολογία με τους μεταφορείς χλωροκίνης του παρασίτου της ελονοσίας *Plasmodium falciparum* είναι υπεύθυνες για τη μεταφορά γ-γλουταμυλκυστεΐνης και γλουταθειόνης από το χλωροπλάστη στο κυτταρόπλασμα συνεισφέροντας, έτσι, στην ομοίωση της γλουταθειόνης (Mullineaux and Rausch, 2005).

### 1.3.6 Μεταβολισμός του θείου και συμβιωτική αζωτοδέσμευση

Ο ρόλος του θείου ως συστατικό πολλών βιολογικών μορίων είναι γνωστός και πολύ σημαντικός. Συμμετέχει στη δομή των πρωτεϊνών και σε πολλούς πρωτεϊνικούς συμπαράγοντες. Στο εσωτερικό των βακτηροειδών βρίσκεται περίπου η μισή ποσότητα των συνολικών πρωτεϊνών που περιέχουν τα φυμάτια του *L. jaronicus* (Gaude et al., 2004). Οι δομικές πρωτεΐνες της νιτρογενάσης NifH, NifD και NifK είναι από τις πιο άφθονες στο εσωτερικό των βακτηροειδών. Κάθε ενεργό σύμπλοκο νιτρογενάσης περιέχει δυο NifH, μια NifD και μια NifK υπομονάδα με συνολικά 75 αμινοξέα που περιέχουν θείο στο σύμπλοκο του *M. loti*. Επίσης, περιέχει τέσσερα μέταλλο-θείο σύμπλοκα ([4Fe-4S], [8Fe-7S], [4Fe-3S] και [3Fe-Mo-3S]) τα οποία δρουν ως αγωγοί για τη ροή ηλεκτρονίων προς το μοριακό άζωτο και την αναγωγή αυτού (Dos Santos et al., 2004). Το γεγονός αυτό καταδεικνύει ότι το θείο αποτελεί ένα πολύ σημαντικό παράγοντα για τη λειτουργία των φυματίων.

Πολλές έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί για να καθοριστεί η μορφή του παρεχόμενου θείου που είναι διαθέσιμο στα βακτηριοειδή από τα φυτά ξενιστές τους κατά τη διάρκεια της συμβιωτικής σχέσης. Οι έρευνες αυτές πραγματοποιήθηκαν με αυξότροφα στελέχη βακτηρίων τα οποία μελετήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να αφομοιώνουν και να αναπτύσσονται με διαφορετικές πηγές θείου. Ένα αυξότροφο ως προς τη μεθειονίνη στέλεχος του ριζόβιου βακτηρίου *R. leguminosarum* δημιουργεί λειτουργικά φυμάτια στις ρίζες του μπιζελιού (Pain, 1979), υποδεικνύοντας ότι τα βακτηριοειδή εφοδιάζονται με επαρκή ποσότητα μεθειονίνης από τα κύτταρα του φυτού ξενιστή τους. Σε αντίθεση με το παραπάνω, μεταλλαγμένα στελέχη του *S. meliloti* αυξότροφα στην μεθειονίνη δημιουργούν μη λειτουργικά φυμάτια στις ρίζες της μηδικής, υποδεικνύοντας ότι ο εφοδιασμός τους από τα κύτταρα της ρίζας δεν είναι επαρκής για να καλύψει τις ανάγκες τους (Kerppola and Kahn, 1988). Μια άλλη μελέτη απαντάει στο ερώτημα για το ποιές μορφές θείου παρέχονται στα βακτηριοειδή του *Rhizobium etli* κατά την συμβίωση του με το *P. vulgaris*. Ένα μεταλλαγμένο στέλεχος του *R. etli* ως προς το γονίδιο που κωδικοποιεί για την συνθάση της σιδηροαίμης (*cysG*), καταστεί το στέλεχος αυτό ανίκανο να αναπτυχθεί με θειικά ως μοναδική πηγή θείου. Το στέλεχος αυτό δημιουργεί λειτουργικά φυμάτια στις ρίζες του *P. vulgaris* γεγονός που παραπέμπει στο συμπέρασμα ότι τα μολυσμένα κύτταρα του φυματίου μπορούν να εφοδιάζουν τα βακτηριοειδή τους και με πηγές θείου διαφορετικές από τα θειικά (Tate et al., 1997). Πιθανόν το παρεχόμενο θείο να βρίσκεται υπό τη μορφή κυστεΐνης, μεθειονίνης και γλουταθειόνης. Μια αντίστοιχη έρευνα με το *R. etli* αλλά αυτή τη φορά το μεταλλαγμένο στέλεχος ήταν ως προς το *metZ* γονίδιο, που κωδικοποιεί για την σουλφρυδηλάση της Ο-ηλεκτρουλομοσερίνης. Το στέλεχος αυτό δεν μπορεί να αναπτυχθεί με θειικά ως μοναδική πηγή θείου ενώ αναπτύσσεται κανονικά με μεθειονίνη, κυσταθειονίνη και ομοκυστεΐνη (Tate et al., 1999). Το *metZ*- στέλεχος δημιουργεί μη λειτουργικά φυμάτια στις ρίζες του *P. vulgaris*. Το γεγονός αυτό αφαιρεί την μεθειονίνη από την παραπάνω υπόθεση. Στο *S. meliloti* τα γονίδια *gshA* και *gshB*, που καταλύουν τις δυο συνεχόμενες αντιδράσεις βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης, είναι απαραίτητα για τη δημιουργία λειτουργικών φυματίων με τη μηδική (Harrison et al., 2005). Μεταλλαγμένα στελέχη του *S. meliloti* ως προς τα *gshA* και *gshB* έδειξαν ότι κάτω από συνθήκες ελεύθερης ανάπτυξης τα βακτηριακά κύτταρα απαιτούσαν τη σωστή λειτουργία μόνο του *gshA* γονιδίου ενώ για τη δημιουργία και ανάπτυξη των φυματίων χρειαζόνταν και τα δυο γονίδια. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει ότι τα βακτηριοειδή δεν εφοδιάζονται με επαρκή ποσότητα γλουταθειόνης από τα κύτταρα του φυτού ξενιστή τους.

Σε κάθε περίπτωση, το κάθε φυτό ξενιστής παρέχει διαφορετικά θρεπτικά συστατικά στα βακτηριοειδή του. Η διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων, από τη σύγκριση διαφορετικών συστημάτων ριζόβιων-ψυχανθών, είναι δύσκολη. Από τη μεριά του φυτού, έχει περιγραφεί ένας μεταφορέας θεικών που εδράζεται στην συμβιωτική μεμβράνη των φυματίων του *L. jaronicus* (Wienkoop and Saalbach, 2003), ο οποίος είναι εξειδικευμένος για τα φυμάτια και απαραίτητος για την συμβιωτική αζωτοδέσμευση στο σύστημα *L. jaronicus*-*M. loti* (Krusell et al., 2005). Το *sst1* είναι το μοναδικό γονίδιο θεικών που έχει βρεθεί μέχρι τώρα να εκφράζεται εξειδικευμένα στα φυμάτια του *L. jaronicus* και αποτελεί μια σημαντική ένδειξη ότι το θείο αποτελεί σημαντικό στοιχείο για τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση στο συγκεκριμένο φυτό.

Πληθώρα μελετών έχουν αναδείξει τη σημασία της πρόσληψης και του μεταβολισμού του θείου στην εγκαθίδρυση και λειτουργία της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης. Στο *L. jaronicus*, η δραστηριότητα του συμβιωτικού μεταφορέα θεικών SST1 εμπλέκεται στη μεταφορά των θεικών από το κυτταρόπλασμα του φυτικού κυττάρου στα ενδοκυττάρια βακτηριοειδή, όπου το θρεπτικό στοιχείο είναι απαραίτητο για τη βιοσύνθεση πρωτεϊνών και συμπαραγόντων, συμπεριλαμβανομένου της νιτρογενάσης (Krusell et al., 2005). Επιπλέον, ο σημαντικός ρόλος της γλουταθειόνης που συντίθεται είτε από το φυτό είτε από τα βακτήρια και της ομογλουταθειόνης που παράγεται αποκλειστικά από το φυτό στη συμβιωτική αζωτοδέσμευση, το σχηματισμό του φυματίου και τη γήρανση του φυματίου έχει αποδειχτεί σε πολλές ερευνητικές εργασίες (Frendo et al., 2013; El Msehli et al., 2011; Becana et al., 2010; Chang et al., 2009; Muglia et al., 2008; Bianucci et al., 2008; Harrison et al., 2005; Krusell et al., 2005; Matamoros et al., 1999b, 2003). Γενετικές μελέτες που χρησιμοποίησαν μεταλλαγμένα, αυξοτροφικά ως προς την κυστεΐνη και τη μεθειονίνη, στελέχη *S. meliloti* Rmd201 έδειξαν ότι ο εμβολιασμός του *M. truncatula* με αυξότροφα μεθειονίνης οδηγεί σε ανάπτυξη μη λειτουργικών *fix* φυματίων, ενώ με τον εμβολιασμό με αυξότροφα κυστεΐνης αναπτύσσονται αζωτοδεσμευτικά φυμάτια (Abbas et al., 2002). Εν τούτοις, λίγα γνωρίζουμε μέχρι σήμερα για τους ακριβείς μοριακούς και βιοχημικούς μηχανισμούς που διέπουν την πρόσληψη, αναγωγή και μεταβολισμό του θείου κατά τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση, όπου τα φυμάτια αποτελούν μία νέα ισχυρή πηγή αφομοιωμένου αζώτου για το φυτό.

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η συμβιωτική αζωτοδέσμευση επιφέρει σημαντικές συστημικές αλλαγές στο μεταβολισμό ολόκληρου του φυτού (Fotelli et al., 2011). Ωστόσο, αν και η εγκαθίδρυση της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης έχει μελετηθεί διεξοδικά, οι μοριακές και βιοχημικές αλλαγές που λαμβάνουν χώρα στο υπόλοιπο φυτό κατά τη

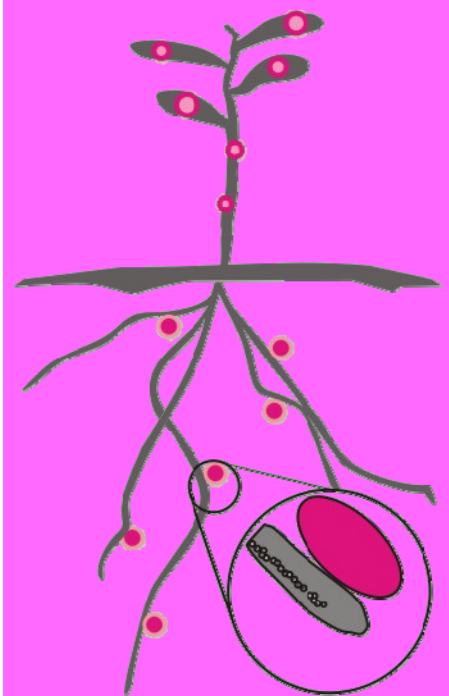
συμβιωτική αζωτοδέσμευση έχουν μελετηθεί ελάχιστα. Ειδικά για το θείο, είναι καλά τεκμηριωμένο ότι η αφομοίωση και ο μεταβολισμός του σχετίζονται στενά με τη διαθεσιμότητα του αζώτου (Davidian and Kopriva, 2010; Hesse et al., 2004; Kopriva and Rennenberg, 2004; Koprivova et al., 2000; Vauclare et al., 2002; Ho and Saito, 2001; Clarkson et al., 1989; Smith, 1980). Παρά τη σύνδεση αυτή, ελάχιστη δουλειά έχει γίνει για τη μελέτη της αφομοίωσης και του μεταβολισμού του θείου στα ψυχανθή, όπου τα φυμάτια αποτελούν την κύρια πηγή αφομοιωμένου αζώτου για το φυτό. Με σκοπό τη μελέτη των μοριακών και βιοχημικών μηχανισμών που διέπουν το μεταβολισμό του φυτού κατά την εγκαθίδρυση της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις των  $^{35}\text{S}$ -ροών, των συγκεντρώσεων των S-μεταβολιτών και της δραστηριότητας της αναγωγής του APS οι οποίες συνδυάστηκαν με την τρανσκριπτομική και τη μεταβολομική ανάλυση. Έτσι, στην παρούσα διδακτορική διατριβή, παρουσιάζεται για πρώτη φορά ένας λεπτομερής χάρτης των αλλαγών που σχετίζονται με την πρόσληψη, την αναγωγή, την αφομοίωση και το μεταβολισμό του θείου, καθώς και των αλλαγών του μεταβολομικού προτύπου που παρατηρούνται στα συμβιωτικά και μη συμβιωτικά όργανα του *L. jaronicus* κατά την εγκαθίδρυση της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης από το *M. loti* άγριου τύπου. Επιπλέον, για να διαπιστωθεί εάν οι αλλαγές που παρατηρούνται συνδέονται με την ενεργή συμβιωτική αζωτοδέσμευση ή εάν απλά σχετίζονται με το σχηματισμό φυματίου, στις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν συμπεριλήφθηκαν και τα μεταλλαγμένα ριζοβιακά στελέχη *M. loti* *ΔnifA* και *ΔnifH*. Ο εμβολιασμός φυτών *L. jaronicus* με τα εν λόγω μεταλλαγμένα στελέχη οδηγεί στο σχηματισμό μη λειτουργικών φυματίων που στερούνται της ενζυμικής δραστηριότητας της νιτρογενάσης. Η ανάπτυξη του φυματίου από το στέλεχος *ΔnifH* είναι φυσιολογική, σε αντίθεση με το στέλεχος *ΔnifA* το οποίο αδυνατεί να διαφοροποιηθεί σε βακτηριοειδές εντός του φυματίου (Fotelli et al., 2011).



## Κεφάλαιο

# Υλικά και μέθοδοι

# 2



## 2 Υλικά και μέθοδοι

### 2.1 Φυτικό υλικό, βακτηρίαση στελέχη και συνθήκες ανάπτυξης

#### 2.1.1 Το ψυχανθές *L. jaronicus* ως φυτικό μοντέλο και το ριζόβιο *M. loti*

Ως φυτικό υλικό για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε το ψυχανθές *L. jaronicus* (οικότυπος Gifu B-129). Το *L. jaronicus* ανήκει στην τάξη Leguminosae ή Fabales (χεδρωπών) και την οικογένεια των Papilionaceae ή Fabaceae (ψυχανθών). Το γένος *Lotus* αποτελείται από περισσότερα από 200 είδη, με πιθανό κέντρο εξάπλωσης τη λεκάνη της Μεσογείου, όπου και απαντάται η μεγαλύτερη ποικιλία ειδών. Τα τελευταία χρόνια το διπλοειδές είδος *L. jaronicus* χρησιμοποιείται ευρύτατα σαν φυτικό μοντέλο για τη μελέτη της συμβιωτικής σχέσης ψυχανθών-ριζοβίων λόγω αρκετών πλεονεκτημάτων που εμφανίζει, όπως το μικρό του μέγεθος και ο σχετικά μικρός κύκλος ζωής, η αυτογονιμότητα, το μικρό μέγεθος του γενώματος και η σχετικά εύκολη δημιουργία διαγονιδιακών φυτών.

Για τον εμβολιασμό των φυτών χρησιμοποιήθηκε το συμβιωτικό αζωτοδεσμευτικό βακτήριο *M. loti* στέλεχος R7A καθώς και τα στελέχη *ΔnifA* και *ΔnifH* που είναι μεταλλαγμένα ως προς το γονίδιο *nifA2* και *nifH*, αντίστοιχα. Ο εμβολιασμός φυτών *L. jaronicus* με τα μεταλλαγμένα στελέχη οδηγεί στο σχηματισμό φυματίων που δεν αζωτοδεσμεύουν διότι στερούνται της ενζυμικής δραστηριότητας της νιτρογενάσης. Σε αντίθεση με το στέλεχος *ΔnifH*, το στέλεχος *ΔnifA*, εντός του φυματίου δε διαφοροποιείται σε βακτηριοειδές.

##### 2.1.1.1 Προετοιμασία σπόρων

Για την ομοιόμορφη και γρήγορη βλάστηση των σπερμάτων του *L. jaronicus* είναι απαραίτητη η τοποθέτησή τους σε πυκνό θειικό οξύ ( $H_2SO_4$ ) για 5 λεπτά. Ακολουθούν δύο εκπλύσεις με απιονισμένο νερό. Η αποστείρωση των σπερμάτων πραγματοποιείται με την εμβάπτισή τους σε διάλυμα 2% υποχλωριώδους νατρίου και 0,02% Tween 20 για 20 λεπτά. Στη συνέχεια, τα σπέρματα ξεπλένονται έξι φορές με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό. Τέλος, απλώνονται σε τρυβλία, που ο πυθμένας τους καλύπτεται με δύο φύλλα διηθητικό χαρτί Whatmann 3MM, εμποτισμένα σε αποστειρωμένο απιονισμένο νερό και αφήνονται για προφύτρωση στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου, για 72 ώρες.

##### 2.1.1.2 Καλλιέργεια ριζοβίων και μόλυνση φυτών *L. jaronicus*

Τα ριζόβια καλλιεργούνται είτε σε υγρό θρεπτικό υλικό **YMB** στους 30°C υπό συνεχή ανάδευση είτε σε τρυβλία που περιέχουν θρεπτικό υλικό YMB + 1,5% Agar στους 30°C για 72 ώρες. Στα τρυβλία όπου αναπτύσσονται τα στελέχη R7A *ΔnifA* και *ΔnifH* περιέχονται 30

μg/ml καναμυκίνη και 50 μg/ml τζενταμυκίνη, αντίστοιχα. Η μόλυνση των φυτών γίνεται αμέσως μετά την προβλάστηση των σπόρων, με τη διαβροχή των ριζιδίων των νεαρών εκφύτων με εναιώρημα των ριζοβίων σε θρεπτικό διάλυμα YMB ( $OD_{600}:0,1$ ).

### 2.1.1.3 Συνθήκες ανάπτυξης και καλλιέργειας του *L. japonicus*

Για την ανάπτυξη τους, τα νεαρά έκφυτα μετά την προβλάστηση, μεταφέρονται σε δοχεία που περιέχουν αποστειρωμένη χαλαζιακή άμμο κοκκομετρίας 0,2-0,6 mm και ποτίζονται με θρεπτικό διάλυμα **Hoagland**. Στην περίπτωση που τα φυτά εμβολιάζονται με ριζόβια άγριου τύπου, χρησιμοποιείται θρεπτικό διάλυμα Hoagland χωρίς άζωτο (**Hoagland -N**), ενώ τα φυτά που εμβολιάζονται με τα μεταλλαγμένα *fix<sup>-</sup>* ριζόβια ποτίζονται εναλλάξ με θρεπτικό διάλυμα Hoagland και Hoagland -N. Τα φυτά τοποθετούνται σε κλίβανο επώασης ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία 26°C, φωτοπερίοδος 16 ώρες φώς/8 ώρες σκοτάδι).

### 2.1.2 Βλάστηση σπερμάτων και καλλιέργεια φυτών *A. thaliana*

Τα σπέρματα του *A. thaliana* τοποθετούνται σε erpendorf και ενυδατώνονται για περίπου 24 ώρες στους 4°C. Στη συνέχεια, αφαιρείται το νερό και απολυμαίνονται με αιθανόλη (96%) για 15-20 δευτερόλεπτα, με ήπια ανάδευση. Η αιθανόλη αφαιρείται και προστίθεται διάλυμα 3% υποχλωριώδους νατρίου για 60 δευτερόλεπτα. Τα σπέρματα ξεπλένονται αρκετές φορές με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό και τοποθετούνται σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα **MS**. Ακολούθως, τα τρυβλία τοποθετούνται σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών θερμοκρασίας 22°C και φωτοπεριόδου 16 ώρες φώς/8 ώρες σκοτάδι. Μετά από περίπου 10 ημέρες τα φυτά έχουν φτάσει στο στάδιο μεταφύτευσης. Κάθε φυτό για να αναπτυχθεί τοποθετείται σε θήκη σποράς που περιέχει μαύρη τύρφη και ποτίζονται όταν είναι απαραίτητο με νερό βρύσης.

### 2.1.3 Ανάπτυξη βακτηρίων *E. coli*

Το *E. coli* αναπτύσσεται είτε σε υγρό θρεπτικό μέσο **LB**, είτε σε στερεό LB με 1,5% άγαρ στους 37°C για περίπου 16 ώρες, παρουσία κατάλληλων αντιβιοτικών. Τα στελέχη *E. coli* που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα XL1 Blue, DH5α και M15[pREP4].

## 2.2 Απομόνωση γενωματικού DNA

Η μέθοδος είναι τροποποίηση της μεθόδου Dellaporta (Dellaporta et al., 1984) και επιτρέπει την απομόνωση 20-50 μg γενωματικού DNA με μέσο μέγεθος 50-100 kb.

- 1-2 gr φυτικού ιστού (ολόκληρα φυτάρια ή φύλλα) ομογενοποιούνται σε γουδί λειοτρίβησης παρουσία υγρού αζώτου.
- Οι ομογενοποιημένοι ιστοί μεταφέρονται σε σωλήνες φυγοκέντρου των 40 ml, όπου και προστίθενται 15 ml ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης DNA **DEB**.

- Ακολουθεί προσεκτική ανάδευση χωρίς τη χρήση μηχανικού αναδευτήρα έτσι ώστε να αποτραπεί η μηχανική θραύση του γενωματικού DNA.
- Προστίθεται 1 ml διαλύματος 20% SDS και το μίγμα αφού αναδευτεί καλά επωάζεται στους 65°C για 1 ώρα με συνεχή απαλή ανακίνηση.
- Προστίθενται 5 ml διαλύματος 5M οξικού καλίου και το δείγμα αφού αναμιχθεί τοποθετείται στον πάγο για 20 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση του δείγματος στις 15.000 σ.α.λ. για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C. Το υπερκείμενο φιλτράρεται, διαμέσου Miracloth, σε νέο σωλήνα φυγοκέντρου.
- Για την κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων προστίθενται 15 ml ισοπροπανόλης. Το δείγμα αναδύεται καλά και επωάζεται στους -20°C για 30 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση του δείγματος στις 15.000 σ.α.λ. για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C. Το ίζημα που προκύπτει αφού αφεθεί να στεγνώσει στον αέρα, επαναδιαλύεται σε 0,7 ml ddH<sub>2</sub>O. Η επαναδιάλυση γίνεται στους 4°C χωρίς ανάδευση για 24 ώρες.
- Το δείγμα μεταφέρεται σε σωλήνα erpendorf, όπου προστίθεται 1 μl **RNase A (10 mg/ml)** και επωάζεται στους 37°C για 1 ώρα
- Το γενωματικό DNA καθαρίζεται με φαινόλη, φαινόλη/χλωροφόρμιο, χλωροφόρμιο (Παράγραφος 2.6.1).
- Μετά τον καθαρισμό το γενωματικό DNA κατακρημνίζεται με την προσθήκη 2 όγκων αιθανόλης και 1/10 όγκου διαλύματος **3M οξικού νατρίου pH 5,2**. Το δείγμα αφήνεται στους -20°C για 30 λεπτά.

## 2.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα *E. coli*

### 2.3.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο Βρασμού

(Holmes and Quigley, 1981)

- 5 ml θρεπτικού διαλύματος LB που περιέχουν το κατάλληλο αντιβιοτικό, εμβολιάζονται με μία μεμονωμένη αποικία κυττάρων *E. coli*. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 37°C με συνεχή ανακίνηση για 12-14 ώρες.
- Από την παραπάνω καλλιέργεια 1,5 ml μεταφέρονται σε σωλήνα erpendorf και φυγοκεντρούνται στις 6.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Αφού το υπερκείμενο απομακρυνθεί πλήρως, το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 150 μl διαλύματος **STEL**, προσθέτοντας και 1 μl **λυσοζύμη (50 mg/ml)**.
- Ακολουθεί επώαση στους 100°C για 45 δευτερόλεπτα και φυγοκέντρηση στις 13.000 σ.α.λ. για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το ίζημα που αποτελείται από τα βακτηριακά υπολείμματα, απομακρύνεται και το πλασμιδιακό DNA κατακρημνίζεται με την προσθήκη 180 μl ισοπροπανόλης.
- Το πλασμιδιακό DNA συλλέγεται με φυγοκέντρηση στις 13.000 σ.α.λ. για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, και αφού ξεπλυθεί με 70% v/v αιθανόλη και στεγνώσει, επαναδιαλύεται σε 20 μl ρυθμιστικού διαλύματος **TE**.

### 2.3.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA υψηλής καθαρότητας

Στην περίπτωση που το προς απομόνωση πλασμίδιο θα χρησιμοποιηθεί για αλληλούχηση τότε χρησιμοποιείται είτε το QIAprep Spin Miniprep Kit της εταιρείας QIAGEN είτε το NucleoSpin Plasmid της εταιρείας MACHEREY-NAGEL, σύμφωνα με τις οδηγίες του εκάστοτε κατασκευαστή.

## 2.4 Απομόνωση ολικού RNA από φυτικούς ιστούς

### 2.4.1 Μέθοδος Brusslan and Tobin

(Brusslan and Tobin, 1992)

- 0,2 gr φρέσκου φυτικού ιστού ομογενοποιούνται σε γουδί λειοτριβήσεως παρουσία υγρού αζώτου.
- Το δείγμα μεταφέρεται σε σωλήνα erpendorf που περιέχει 300 μl διαλύματος εκχύλισης RNA **REB** και 300 μl μίγματος φαινόλη/χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη 25:24:1 **PIC pH 8,3**.
- Ακολουθεί καλή ανάδευση με χρήση μηχανικού αναδευτήρα (vortex) για 30 sec και το δείγμα φυγοκεντρείται στις 13.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Η υδάτινη φάση μεταφέρεται προσεκτικά σε νέο σωλήνα erpendorf και επαναλαμβάνεται η εκχύλιση με 300 μl μίγματος PIC.
- Αφού προηγηθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, η υδάτινη φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα erpendorf και τα νουκλεϊκά οξέα κατακρημνίζονται με την προσθήκη 1/10 όγκου 3M οξικού νατρίου pH 5,2 και ενός όγκου ισοπροπανόλης
- Φυγοκέντρηση στις 13.000 σ.α.λ. για 15 λεπτά στους 4°C.
- Το ίζημα των νουκλεϊκών οξέων επαναδιαλύεται σε 1125 μl διαλύματος **10T/10E** και το RNA κατακρημνίζεται εκλεκτικά με την προσθήκη 375 μl διαλύματος 8M LiCl και επώαση στους 4°C για τουλάχιστον 12 ώρες.
- Το ολικό RNA συλλέγεται με φυγοκέντρηση στις 13.000 σ.α.λ. για 15 λεπτά στους 4°C.
- Το ίζημα ξεπλένεται με 70% v/v αιθανόλη, στεγνώνεται και επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο διαλύματος TE.
- Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του δείγματος προσδιορίζονται φωτομετρικά, ενώ η ακεραιότητα του RNA διαπιστώνεται με ανάλυση του δείγματος σε πηκτή αγαρόζης.

### 2.4.2 Απομόνωση ολικού RNA από “δύστροπους” φυτικούς ιστούς

Η απομόνωση ολικού RNA από μερικούς φυτικούς ιστούς παρουσιάζει δυσκολίες λόγω της παρουσίας σε αυτούς διαφόρων οξειδωτικών συστατικών. Στην περίπτωση του *L. jaronicus* παρουσιάστηκε πρόβλημα λόγω οξειδωτικών συστατικών κατά την απομόνωση ολικού RNA από τα φύλλα και τους βλαστούς φυτών που είχαν εμβολιαστεί με τα μεταλλαγμένα ριζόβια *M. loti* *ΔnifA* και *ΔnifH*, όπου και χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω τεχνική:

- 0,2 gr φρέσκου φυτικού ιστού ομογενοποιούνται σε γουδί λειοτριβήσεως παρουσία υγρού αζώτου.
- Το δείγμα μεταφέρεται σε σωλήνα erpendorf που περιέχει 500 μl διαλύματος εκχύλισης RNA **REB2** προθερμασμένου στους 65°C.
- Ακολουθεί καλή ανάδευση με χρήση μηχανικού αναδευτήρα (vortex) για 30 sec και το δείγμα τοποθετείται στους 65°C για 15 λεπτά. Ανα διαστήματα γίνεται εκ νέου ανάδευση στο μηχανικό αναδευτήρα (vortex).
- Στο δείγμα προστίθενται 500 μl χλωροφορμίου και ακολουθεί καλή ανάδευση με χρήση μηχανικού αναδευτήρα (vortex) για 30 sec.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 13.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Η υδάτινη φάση μεταφέρεται προσεκτικά σε νέο σωλήνα erpendorf και επαναλαμβάνεται η εκχύλιση με 500 μl χλωροφορμίου.
- Αφού προηγηθεί φυγοκέντρωση στις 13.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, η υδάτινη φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα erpendorf και τα νουκλεϊκά οξέα κατακρημνίζονται με την προσθήκη 1/10 όγκου 3M οξικού νατρίου pH 5,2 και ενός όγκου ισοπροπανόλης
- Φυγοκέντρωση στις 13.000 σ.α.λ. για 15 λεπτά στους 4°C.
- Το ίζημα των νουκλεϊκών οξέων επαναδιαλύεται σε 1125 μl διαλύματος **10T/10E** και το RNA κατακρημνίζεται εκλεκτικά με την προσθήκη 375 μl διαλύματος 8 M LiCl και επώαση στους 4°C για τουλάχιστον 12 ώρες.
- Το ολικό RNA συλλέγεται με φυγοκέντρωση στις 13.000 σ.α.λ. για 30 λεπτά στους 4°C.
- Το ίζημα ξεπλένεται με 70% v/v αιθανόλη, στεγνώνεται και επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο διαλύματος TE.
- Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του δείγματος προσδιορίζονται φωτομετρικά, ενώ η ακεραιότητα του RNA διαπιστώνεται με ανάλυση του δείγματος σε πηκτή αγαρόζης.

## 2.5 Απομάκρυνση DNA από δείγματα RNA

Κατά την απομόνωση ολικού RNA, παρόλο που πραγματοποιείται ένα βήμα εκλεκτικής κατακρήμνισης του με LiCl, ενδέχεται να περιέχεται στο δείγμα και γονιδιωματικό DNA. Για να αποφευχθεί η λήψη λανθασμένων αποτελεσμάτων, κατά την μελέτη των επιπέδων έκφρασης γονιδίων, απαιτείται ο καθαρισμός του RNA από το γονιδιωματικό DNA. Αυτό επιτυγχάνεται με τη δράση του ενζύμου DNase I. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- Σε αποστειρωμένο σωλήνα erpendorf προετοιμάζεται το παρακάτω μίγμα:
 

Δείγμα ολικού RNA (200 μg/μl).....	20 μl
DNase I (1 unit/μl) .....	2 μl
RNase Out (40 units/μl) .....	1 μl
10X ρυθμιστικό διάλυμα DNase.....	5 μl
ddH <sub>2</sub> O.....	28 μl

Η DNase I είναι απαλλαγμένη από πιθανή δράση RNάσης, ενώ η παρουσία RNase Out (παρεμποδιστή δράσης RNασών) είναι απαραίτητη για την διαφύλαξη της ακεραιότητας του RNA κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Τα δείγματα επωάζονται για περίπου 1 ώρα και 30 λεπτά.

- Το μίγμα επωάζεται στους 37°C για περίπου 1 ώρα και 30 λεπτά
- Μετά το πέρας της αντίδρασης, προστίθενται στο δείγμα 100 μl ddH<sub>2</sub>O και 150 μl μίγματος φαινόλη/χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη 25:24:1 PIC pH 8,3
- Ακολουθεί καλή ανάδευση με χρήση μηχανικού αναδευτήρα (vortex) για 30 sec και το δείγμα φυγοκεντρείται στις 13.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Η υδάτινη φάση μεταφέρεται προσεκτικά σε νέο σωλήνα erpendorf και προστίθενται στο δείγμα 150 μl χλωροφόρμιο.
- Αφού προηγηθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, η υδάτινη φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα erpendorf και τα νουκλεϊκά οξέα κατακρημνίζονται με την προσθήκη 1/10 όγκου **3M οξικού νατρίου pH 5,2** και 2,5 όγκων αιθανόλης.
- Τα δείγματα επωάζονται στους -20°C για περίπου 16 ώρες και στη συνέχεια μεταφέρονται για 30 λεπτά στους -80°C.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 σ.α.λ. για 30 λεπτά στους 4°C.
- Το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα ξεπλένεται με 70 % v/v αιθανόλη, στεγνώνεται και επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο ddH<sub>2</sub>O
- Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του δείγματος προσδιορίζονται φωτομετρικά, ενώ η ακεραιότητα του RNA διαπιστώνεται με ανάλυση του δείγματος σε πηκτή αγαρόζης.
- Για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της αντίδρασης πραγματοποιείται αντίδραση PCR στο καθαρό πλέον RNA και η μη παρουσία ενισχυμένου προϊόντος επιβεβαιώνει την επιτυχία της απομάκρυνσης του DNA.

## 2.6 Ανάλυση νουκλεϊκών οξέων

### 2.6.1 Καθαρισμός νουκλεϊκών οξέων με PIC

- Σε σωλήνα φυγοκέντρου που περιέχει το δείγμα των νουκλεϊκών οξέων προς καθαρισμό, προστίθεται ίσος όγκος PIC και το μίγμα ανακινείται καλά για την ανάμιξη των δύο φάσεων.
- Οι δύο φάσεις διαχωρίζονται με φυγοκέντρηση στις 13.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Η υπερκείμενη υδάτινη φάση, που περιέχει τα νουκλεϊκά οξέα, μεταφέρεται με προσοχή σε νέο σωλήνα φυγοκέντρου που περιέχει ίσο όγκο μίγματος φαινόλης/χλωροφόρμιο/ισοαμυλικής αλκοόλης PIC (25:24:1) και ακολουθεί καλή ανάμιξη των φάσεων.

- Η υδάτινη φάση διαχωρίζεται με φυγοκέντρηση στις 13.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και μεταφέρεται σε νέο σωλήνα φυγοκέντρου που περιέχει ίσο όγκο μίγματος χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1).
- Ακολουθεί ο τελικός διαχωρισμός της υδάτινης φάσης με φυγοκέντρηση στις 13.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και η μεταφορά της σε νέο σωλήνα φυγοκέντρησης, όπου τα νουκλεϊνικά οξέα κατακρημνίζονται με την προσθήκη 1/10 όγκου διαλύματος 3M οξικού νατρίου pH 5,2 και δύο όγκων αιθανόλης.
- Το δείγμα παραμένει στους -20°C για 12 ώρες και τα νουκλεϊνικά οξέα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 13.000 σ.α.λ. για 15 λεπτά στους 4°C.
- Το ίζημα ξεπλένεται με 70% v/v αιθανόλη και αφού στεγνώσει επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο ddH<sub>2</sub>O ή ρυθμιστικού διαλύματος TE.

### 2.6.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των νουκλεϊνικών οξέων σε υδατικό διάλυμά τους γίνεται με τη χρήση του σπεκτροφωτομέτρου NanoDrop ND-100 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA). Για την ποσοτικοποίηση δείγματος νουκλεϊνικών οξέων απαιτείται μόλις 1 μl από το δείγμα που τοποθετείται στη συσκευή και πραγματοποιείται η μέτρηση. Η καθαρότητα ενός δείγματος νουκλεϊνικών οξέων υπολογίζεται από τους λόγους OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> και OD<sub>240</sub>/OD<sub>260</sub>, όταν οι τιμές των λόγων είναι μεταξύ 1,8 και 2,2 τότε το δείγμα θεωρείται ικανοποιητικής καθαρότητας.

### 2.6.3 Ανάλυση δεσοξυριβοζονουκλεϊνικών οξέων (DNA) σε πηκτή αγαρόζης

Ο διαχωρισμός των δεσοξυριβοζονουκλεϊνικών οξέων με βάση το μέγεθος και την διαμόρφωσή τους γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Στην περίπτωση διαχωρισμού γραμμικών μορίων DNA, ο διαχωρισμός τους σε πηκτή αγαρόζης είναι ανάλογος με το μέγεθος τους. Το εύρος μεγεθών που μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτή αγαρόζης εξαρτάται από τη συγκέντρωση της πηκτής σε αγαρόζη και κυμαίνεται από 0,1 έως 100 kb. Στον πίνακα 2.1 αναφέρονται οι τυπικές συγκεντρώσεις αγαρόζης ανάλογα, με το επιθυμητό εύρος διαχωρισμού.

**Πίνακας 2.1:** Συγκέντρωση πηκτής αγαρόζης ανάλογα με το επιθυμητό εύρος διαχωρισμού

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



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

- Κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης προστίθεται σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης **1X TAE** και θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να λιώσει.
- Στην λιωμένη αγαρόζη προστίθεται 0,001% v/v **διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου** και αφήνεται να κρυώσει μέχρι τους 50°C.
- Η πηκτή τοποθετείται σε συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης και αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου.
- Στα δείγματα του DNA που πρόκειται να αναλυθούν, προστίθεται 1/10 όγκου διαλύματος χρωστικής **10X DLB**.
- Μόλις στερεοποιηθεί η πηκτή, απομακρύνεται η χτένα και τοποθετείται στο δοχείο ηλεκτροφόρησης το οποίο συμπληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X TAE.
- Τα δείγματα αναλύονται σε ηλεκτρικό πεδίο εντάσεως που δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 5 Vcm<sup>-1</sup>.

#### **2.6.4 Πέψη δεσοξυριβοζονουκλεϊνικών οξέων (DNA) με ενδονουκλεάσες περιορισμού**

Οι πέψεις δειγμάτων DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού γίνονται σε όγκους που κυμαίνονται από 20 μl μέχρι και 100 μl, ανάλογα με την ποσότητα του DNA που υποβάλλεται σε πέψη.

- Σε σωλήνα erpendorf τοποθετείται το δείγμα του DNA, το ρυθμιστικό διάλυμα που απαιτείται για την δράση του ενζύμου, RNase A εάν το δείγμα περιέχει RNA και τέλος ddH<sub>2</sub>O μέχρι τον επιθυμητό όγκο. Μία τυπική αντίδραση πέψης σε τελικό όγκο 30 μl περιλαμβάνει:

Δείγμα DNA.....	1-5 μl
10X ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου .....	3 μl
RNase A (1 mg/ml).....	1 μl
ddH <sub>2</sub> O έως τελικό όγκο.....	29 μl

- Προστίθεται 1 μl ενδονουκλεάση περιορισμού. Συνήθως χρησιμοποιείται μία μονάδα ενζύμου (1 unit) ανά μικρογραμμάριο δείγματος DNA.
- Το δείγμα αναμιγνύεται καλά και επωάζεται για 3 ώρες στην κατάλληλη θερμοκρασία.
- Μετά το πέρας της αντίδρασης τα προϊόντα αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης.

#### **2.6.5 Ανάκτηση κλάσματος DNA από πηκτή αγαρόζης**

Η απομόνωση των τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης έγινε σύμφωνα με QIAquick® Gel Extraction Kit της QIAGEN ή το NucleoSpin® Extract II της εταιρείας MACHERY-NAGEL σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

### 2.6.6 Ενοποίηση άκρων DNA με τη χρήση της DNA λιγάσης

Η αντίδραση της DNA λιγάσης πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 10 μl. Για τη μεγιστοποίηση της πιθανότητας δημιουργίας ανασυνδυασμένων πλασμιδίων, η αναλογία άκρων πλασμιδίου φορέα και ένθετου DNA ρυθμίζεται στο 1:3 αντίστοιχα.

- Σε σωλήνα erpendorf αναμινγούνται τα παρακάτω:
 

Ένθετο DNA.....	1 μl
Πλασμιδιακός φορέας.....	1 μl
10X Ρυθμιστικό διάλυμα ( <b>10X LIB</b> ) .....	1 μl
T4 DNA λιγάση (1 unit/μl) (Promega).....	1 μl
ddH <sub>2</sub> O.....	6 μl
- Το δείγμα επωάζεται στους 4°C για 14-16 ώρες ή εναλλακτικά στους 25°C για 3 ώρες.

## 2.7 Μετασχηματισμός *E. coli*

### 2.7.1 Προετοιμασία ικανών προς μετασχηματισμό κυττάρων *E. coli*

Τα στελέχη *E. coli* που χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία ικανών προς μετασχηματισμό κυττάρων ήταν τα XL1 Blue, DH5a και M15[pREP4]. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί παραλλαγή της μεθόδου που περιγράφεται από τους Cohen et al., 1972.

- 200 ml θρεπτικού διαλύματος LB εμβολιάζονται με 100 μl πρόσφατης καλλιέργειας του κατάλληλου στελέχους.
- Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 37°C έως οπτική πυκνότητα OD<sub>600</sub>=0,2-0,3.
- Τα βακτηριακά κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 6.000 σ.α.λ. για 10 λεπτά στους 4°C.
- Το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 50 ml διαλύματος 0,1 M παγωμένου MgCl<sub>2</sub>. Η επαναδιάλυση γίνεται πάντα με ανακίνηση μέσα στον πάγο ώστε τα κύτταρα να παραμείνουν παγωμένα.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 6.000 σ.α.λ. για 10 λεπτά στους 4°C.
- Τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 25 ml διαλύματος 0,1 M παγωμένου CaCl<sub>2</sub> και αφήνονται στον πάγο για 20 λεπτά.
- Τέλος τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 6.000 σ.α.λ. για 10 λεπτά στους 4°C και επαναδιαλύονται σε 10 ml διαλύματος 0,1 M παγωμένου CaCl<sub>2</sub>.
- Η αποθήκευση των ικανών κυττάρων γίνεται σε μικρά έτοιμα προς χρήση κλάσματα στους -80°C με την προσθήκη 20% v/v γλυκερόλης.

### 2.7.2 Προετοιμασία κυττάρων *E. coli* “υψηλής ικανότητας”

(Inue et al., 1990)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για την προετοιμασία κυττάρων *E. coli* υψηλής ικανότητας μετασχηματισμού ( $3 \times 10^7$  cfu/μg pUC18 DNA), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στις περιπτώσεις μετασχηματισμού με πλασμίδια μεγάλου μεγέθους, όπου η συχνότητα μετασχηματισμού μειώνεται δραματικά όσο αυξάνεται το μέγεθος του πλασμιδίου.

- 5 ml θρεπτικού διαλύματος **SOB** εμβολιάζονται με το κατάλληλο στέλεχος *E. coli*.
- Η καλλιέργεια αναπτύσσεται για 12-14 ώρες με συνεχή ανακίνηση στους 37°C.
- 200 ml θρεπτικού διαλύματος SOB σε κωνική φλάσκα των 2 lt, εμβολιάζονται με την παραπάνω νκαλλιέργεια.
- Η νέα καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 18°C με καλή ανακίνηση, έως οπτική πυκνότητα  $OD_{600}=0,6$ .
- Όλοι οι παρακάτω χειρισμοί πρέπει να γίνονται στους 4°C.
- Η καλλιέργεια και οι σωλήνες φυγοκέντρου που θα χρησιμοποιηθούν ψύχονται στον πάγο για 10 λεπτά.
- Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 3.000 σ.α.λ. για 10 λεπτά στους 4°C.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 1/3 του αρχικού όγκου παγωμένου διαλύματος **TB** και αφήνεται στον πάγο για 10 λεπτά.
- Το βακτηριακό αιώρημα φυγοκεντρείται στις 3.000 σ.α.λ. για 10 λεπτά στους 4°C.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 1/12 του αρχικού όγκου παγωμένου διαλύματος TB.
- Προστίθεται DMSO σε τελική συγκέντρωση 7% και αφού αναμιχθεί απαλά, το δείγμα αφήνεται στον πάγο για 10 λεπτά.

### 2.7.3 Μετασχηματισμός ικανών κυττάρων *E. coli*

- Σε σωλήνα erppendorf μεταφέρονται, μέσα σε πάγο, 100 μl ικανά προς μετασχηματισμό κύτταρα από το κατάλληλο στέλεχος *E. coli*.
- Προστίθενται 10-100 ng πλασμιδιακό DNA σε όγκο που δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1/10 του όγκου των κυττάρων που χρησιμοποιούνται.
- Το δείγμα επωάζεται στον πάγο για 30 λεπτά.
- Η είσοδος του πλασμιδίου στα κύτταρα επιτυγχάνεται με την υποβολή τους σε θερμικό σοκ στους 42°C για 1-2 λεπτά.
- Προστίθενται 200 μl θρεπτικού διαλύματος LB και τα δείγματα επωάζονται στους 37°C για 1 ώρα.
- Τέλος τα κύτταρα απλώνονται σε τρυβλίο με θρεπτικό υλικό LB που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό για την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων.

Στην περίπτωση που πρέπει να επιλέξουμε τις αποικίες που φέρουν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, προσθέτουμε στα κύτταρα πριν αυτά απλωθούν στο τρυβλίο, 10 μl **100 mM IPTG** και 100 μl **2% X-Gal**. Οι αποικίες που φέρουν μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο

εμφανίζονται μπλέ λόγω της δράσεως της β-γαλακτοσιδάσης ενώ αυτές που φέρουν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο εμφανίζονται λευκές.

## 2.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) αποτελεί την πλέον εξειδικευμένη και ευαίσθητη μέθοδο ενισχύσεως ακολουθιών DNA και RNA, *in vitro* ή και *in situ*. Η αντίδραση προϋποθέτει την ύπαρξη δύο ολιγονουκλεοτιδίων, που έχουν την ικανότητα να υβριδίζουν στις συμπληρωματικές αλυσίδες DNA ή cDNA, τα οποία δρουν ως εκκινητές της σύνθεσης της αλυσίδας του DNA. Η σχεδίαση των εκκινητών είναι τέτοια, ώστε η σύνθεση της αλυσίδας του DNA να γίνεται προς την κατεύθυνση του άλλου. Η σύνθεση γίνεται με τη δράση μίας θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης, παρουσία των απαραίτητων νουκλεοτιδίων καθώς και ιόντων  $Mg^{+2}$ . Κατά τη διάρκεια μίας τυπικής αντίδρασης, πρώτο στάδιο αποτελεί η αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, με τη θέρμανση του δείγματος. Ακολουθεί μείωση της θερμοκρασίας και υβριδισμός των εκκινητών στις αποδιατεταγμένες αλυσίδες. Η σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων γίνεται με θέρμανση του δείγματος στη βέλτιστη θερμοκρασία για τη δράση της DNA πολυμεράσης. Η όλη διαδικασία αποδιάταξης, υβριδισμού των εκκινητών και σύνθεσης της συμπληρωματικής αλυσίδας επαναλαμβάνεται για ένα αριθμό κύκλων (συνήθως 20-35). Κατά τη διάρκεια των διαδοχικών κύκλων και εφόσον δεν υφίστανται περιοριστικοί παράγοντες όπως έλλειψη νουκλεοτιδίων και εκκινητών ή παραγωγή παρεμποδιστών της πολυμεράσης, η συσσώρευση των προϊόντων της αντίδρασης γίνεται με εκθετικό ρυθμό.

Πέρα από την τυπική αντίδραση ενισχύσεως δίκλωνων τμημάτων DNA, τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί μια σειρά από παραλλαγές της βασικής διαδικασίας που περιγράφηκε παραπάνω. Μία από τις παραλλαγές επιτρέπει τη χρησιμοποίηση, ως αρχικής μήτρας για την αντίδραση ενισχύσεως μορίων RNA (RT-PCR), τα οποία αρχικά μεταγράφονται σε cDNA με τη δράση του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse transcriptase). Επιπλέον, είναι δυνατή η ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης με την χρήση της τεχνικής της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (qRealTime PCR). Οι δύο παραπάνω τεχνικές χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια της παρούσας μελέτης και θα παρουσιαστούν με μεγαλύτερη λεπτομέρεια.

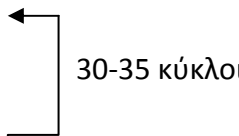
### 2.8.1 Ενίσχυση ακολουθιών DNA με την χρήση της τεχνικής PCR

Οι ακριβείς συνθήκες πραγματοποίησης μίας τυπικής αντίδρασης PCR προσαρμόζονται κάθε φορά στις απαιτήσεις του συγκεκριμένου πειράματος. Συγκεκριμένα, η ποσότητα του DNA που προστίθεται ως μήτρα εξαρτάται από το είδος του. Στην περίπτωση γενωματικού

DNA, χρησιμοποιείται 1 ng-1 μg, ενώ για πλασμιδιακό DNA αρκούν 1pg-100 ng. Επίσης η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών εξαρτάται κάθε φορά από τη θερμοκρασία τήξεως ( $T_m$ ) τους. Εκτός από τις επιμέρους διαφορές, η τυπική αντίδραση PCR πραγματοποιείται ως εξής:

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

Μήτρα DNA.....	1 μl
Εκκινητής 1 (30 μM) .....	1 μl
Εκκινητής 2 (30 μM) .....	1 μl
Μίγμα dNTP's (10 mM το καθένα).....	1 μl
<b>10X ρυθμιστικό διάλυμα PCR</b> .....	5 μl
Taq DNA πολυμεράση (1unit/μl).....	1 μl
ddH <sub>2</sub> O.....	40 μl
- Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιείται για την ενίσχυση του DNA είναι:
 

Αρχική αποδιάταξη: 94°C για 3 λεπτά	
Αποδιάταξη: 94°C για 1 λεπτό	
Υβριδισμός εκκινητών 48-56°C για 1 λεπτό	
Επιμήκυνση 72°C για 1 λεπτό/ Kb προϊόντος	
Τελική επιμήκυνση 72°C για 10 λεπτά	

### 2.8.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR)

Η PCR αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription PCR, RT-PCR) χρησιμοποιείται για την παραγωγή συμπληρωματικού DNA (cDNA) από RNA. Εδώ χρησιμοποιείται μια RNA εξαρτώμενη πολυμεράση, η αντίστροφη μεταγραφάση που χρησιμοποιεί ως μήτρα RNA. Για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης ως μήτρα χρησιμοποιήθηκε ολικό RNA, που απομονώθηκε από διάφορους ιστούς του *L. japonicus*. Ως εκκινητής χρησιμοποιήθηκαν 12 – 18μερή ολιγο (dT)

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

Μήτρα RNA.....	1 μg
Εκκινητής ολιγο (dT)12 – 18μερή (500 μg/ml) .....	1 μl
Μίγμα dNTPs (10 mM το καθένα) .....	1 μl
ddH <sub>2</sub> O έως τελικό όγκο .....	12 μl
- Το RNA αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 65°C για 5 λεπτά, ώστε να επιτραπεί ο υβριδισμός εκκινητή – RNA.
- Το δείγμα μεταφέρεται αμέσως σε πάγο για να διατηρηθεί σε μονόκλωνη κατάσταση.
- Ακολουθεί σύντομη φυγοκέντρηση και προσθήκη και των παρακάτω:
 

5X ρυθμιστικό διάλυμα First-Strand .....	4 μl
RNaseOUT (40 units/μl) .....	1 μl
0.1 M DTT .....	2 μl

- Το δείγμα προθερμαίνεται στους 42°C για 2 λεπτά πριν την προσθήκη 1 μl της αντίστροφης μεταγραφάσης SuperScript II (200 units/μl)
- Ακολουθεί επώαση του δείγματος στους 42°C για 50 λεπτά
- Η αντίδραση σταματά με θέρμανση του δείγματος στους 70°C για 15 λεπτά

### **2.8.3 ΠΟΣΟΤΙΚΗ PCR ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (QUANTITATIVE REAL TIME PCR - qrt PCR)**

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qRT-PCR) είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της προόδου μιας αντίδρασης PCR σε πραγματικό χρόνο. Επίσης, είναι δυνατή η ποσοτικοποίηση μιας πολύ μικρής ποσότητας προϊόντος PCR (DNA, cDNA ή RNA) με πολύ μεγάλη ακρίβεια. Βασίζεται στην ανίχνευση του φθορισμού, ο οποίος εκπέμπεται όταν κάποιο μόριο αναφοράς (SYBR<sup>®</sup> Green) προσδεθεί στη μικρή αύλακα της δίκλωνης έλικας ενός μορίου DNA (προϊόντος της PCR). Τα προϊόντα της PCR συσσωρεύονται μετά από κάθε κύκλο ενίσχυσης των ακολουθιών, γι' αυτό με την πρόοδο της αντίδρασης ο φθορισμός που παράγεται από το μόριο αναφοράς αυξάνει. Με αυτό τον τρόπο διευκολύνεται η παρακολούθηση της αντίδρασης ενώ αυτή βρίσκεται σε εξέλιξη ([http://www.premierbiosoft.com/tech\\_notes/real\\_time\\_PCR.html](http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/real_time_PCR.html)). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η SYBR Green παράγει φθορισμό όταν προσδέεται σε οποιοδήποτε δίκλωνο μόριο DNA, όπως διμερή εκκινητών ή ανεπιθύμητα προϊόντα της αντίδρασης του PCR. Λόγω αυτού του φαινομένου ο προσεκτικός σχεδιασμός των εκκινητών και οι προσεκτικοί χειρισμοί κατά την διάρκεια των πειραμάτων είναι αναγκαίοι για την αποφυγή μολύνσεων και κατ'έκταση την παραλαβή εσφαλμένων μετρήσεων φθορισμού.

Η PCR πραγματικού χρόνου χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης. Στα πλεονεκτήματά της ανήκουν η ικανότητά της να μετρά τις συγκεντρώσεις των νουκλεϊνικών οξέων σε ένα άπειρο δυναμικό εύρος, η υψηλή ευαισθησία της και η ικανότητα να επεξεργάζεται πολλά δείγματα ταυτόχρονα. Επιπλέον, η PCR πραγματικού χρόνου επιτρέπει την ανίχνευση των προϊόντων της PCR κατά τα πρώτα στάδια της αντίδρασης. Αυτή η ικανότητά της να μετρά την κινητική της αντίδρασης σε αυτά τα αρχικά στάδια της PCR παρέχει ένα συγκριτικό πλεονέκτημα έναντι της παραδοσιακής PCR που περιγράφηκε νωρίτερα.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η iTaq Fast SYBR GreenI Supermix με ROX (BioRad), Η ROX χρησιμοποιείται ως χρωστική αναφοράς για την εξομάλυνση μικροδιαφορών μεταξύ των διαφορετικών αντιδράσεων. Για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων qRT-PCR χρησιμοποιήθηκε ο θερμοκυκλοποιητής Mx3005P (Stratagene). Για μία τυπική αντίδραση τελικού όγκου 10 μl αναμιγνύονται:

Μήτρα cDNA .....	1 μl
iTaq Fast SYBR GreenI Supermix με ROX (BioRad).....	5 μl
Εκκινητής 1 (0,5 μM) .....	2 μl
Εκκινητής 2 (0,5 μM) .....	2 μl

Η αντίδραση ξεκινά με αρχική ενεργοποίηση της πολυμεράσης στους 95°C για 10 λεπτά, ακολουθούν 40 κύκλοι με το στάδιο αποδιάταξης στους 95°C για 45 δευτερόλεπτα και ένα στάδιο υβριδισμού και επιμήκυνσης στο 60°C για 1 λεπτό. Στο τέλος κάθε κύκλου η λαμβάνονται οι τιμές απορρόφησης για τις χρωστικές SYBR Green και ROX. Όταν ολοκληρωθούν οι 40 κύκλοι τα ενισχυμένα τμήματα αποδιατάσσονται σταδιακά με αύξηση της θερμοκρασίας κάθε 30 δευτερόλεπτα κατά 0,5°C από τους 60°C έως τους 95°C και λαμβάνεται η καμπύλη τήξης του καθενός με σκοπό τον έλεγχο της εξειδίκευσης των εκκινητών, όταν ενισχύεται ένα μόνο προϊόν η καμπύλη έχει μια κορυφή. Επιπλέον τα δείγματα αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης 4 % (w/v) για την επιβεβαίωση της παρουσίας μοναδικού προϊόντος και κατά συνέπεια της καταλληλότητας των εκκινητών.

Για την κανονικοποίηση μικρών διαφορών μεταξύ των ποσοτήτων των μητρών του cDNA χρησιμοποιούνται ως εσωτερικοί μάρτυρες τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου αναφοράς της ουβικιτίνης του *L. japonicus*, ενώ ο σχεδιασμός των εκκινητών έγινε με τη χρήση του εξειδικευμένου λογισμικού Primer Express (Applied Biosystems) και το μέγεθος της ενισχυόμενης περιοχής κυμαίνεται από 70 έως 150 ζεύγη βάσεων.

Για τη σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων χρησιμοποιείται μια τροποποιημένη μορφή της μεθόδου σύγκρισης των κύκλων όπου εμφανίζεται το κατώφλι (threshold) της αντίδρασης PCR. Αναλυτικότερα, τα σχετικά επίπεδα των μεταγράφων του υπό μελέτη γονιδίου (X) υπολογίζονται ως ένα ποσοστό των μεταγράφων του γονιδίου αναφοράς της ουβικιτίνης (U), και συγκεκριμένα, ως  $(1+E)^{-\Delta Ct}$ , όπου το  $\Delta Ct$  ισούται με  $Ct^X - Ct^U$  και E είναι η αποδοτικότητα της αντίδρασης PCR (PCR efficiency). Η E για κάθε ένα από τα γονίδια που ενισχύονται υπολογίζεται από το λογισμικό LinRegPCR (Ramakers et al., 2003), το οποίο εφαρμόζει τη μέθοδο της γραμμικής παλινδρόμησης στο λογάριθμο των τιμών του φθορισμού που δίνονται ανά κύκλο της αντίδρασης. Όλες οι αντιδράσεις qRT-PCR πραγματοποιούνται σε τρεις βιολογικές επαναλήψεις.

## 2.9 *In situ* υβριδισμός

Για τη μελέτη της χωροταξικής και χρονικής ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του *in situ* RNA-RNA υβριδισμού σε λεπτές τομές φυτικών ιστών. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε, αποτελεί

τροποποίηση των τεχνικών που έχουν δημοσιευτεί μέχρι σήμερα (Van de Wiel et al., 1990, Kouchi and Hata 1993, Papadopoulou et al., 1996).

## 2.9.1 Προετοιμασία λεπτών φυτικών τομών

### 2.9.1.1 Μονιμοποίηση ιστών

- Τα φυτικά όργανα που βρίσκονται στο κατάλληλο αναπτυξιακό στάδιο, συλλέγονται προσεκτικά και τοποθετούνται σε **διάλυμα μονιμοποίησης**.
- Οι ιστοί παραμένουν στο διάλυμα μονιμοποίησης για 1 ώρα υπό κενό αέρος, με σκοπό την απομάκρυνση του αέρα που βρίσκεται παγιδευμένος μέσα στον ιστό.
- Το διάλυμα μονιμοποίησης αντικαθίσταται με νέο, στο οποίο οι ιστοί παραμένουν για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή εναλλακτικά για 12 ώρες στους 4°C.
- Μετά το πέρας της μονιμοποίησης, οι ιστοί ξεπλένονται με εμβάπτιση τους για 20 λεπτά σε **1X ρυθμιστικό διάλυμα μονιμοποίησης**.
- Ακολουθεί αφυδάτωση των ιστών με εμβάπτιση τους σε σειρά διαλυμάτων αλκοόλης αυξανόμενης συγκεντρώσεως (10%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%), για 20 λεπτά στο κάθε διάλυμα.
- Κατά τη διαδικασία της αφυδάτωσης μπορεί να γίνει η χρώση των ιστών, όταν αυτοί βρίσκονται στο διάλυμα 50% αλκοόλης, με την προσθήκη **5% (w/v) σαφρανίνης**. Στην περίπτωση της χρώσης, οι ιστοί παραμένουν εντός της χρωστικής για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
- Τέλος, οι ιστοί εμβαπτίζονται σε 100% αλκοόλη με τρεις αλλαγές ανά 1 ώρα.

### 2.9.1.2 Διαφανοποίηση των ιστών

- Η 100% αιθανόλη αντικαθίσταται με διάλυμα 25% ξυλενίου (σε 100% αιθανόλη), όπου και οι ιστοί παραμένουν για 1 ώρα.
- Ακολουθούν αλλαγές του διαλύματος με 50%, 75% και 100% ξυλένιο ανά 1 ώρα.
- Η εμβάπτιση σε 100% ξυλένιο για 1 ώρα επαναλαμβάνεται 3 φορές.

### 2.9.1.3 Έγκλειση ιστών σε παραφίνη

- Στα φιαλίδια που περιέχουν τους φυτικούς ιστούς εντός 100% ξυλενίου, προστίθενται σταδιακά κομμάτια παραφίνης (Paramat-BDH), σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μετά τον κορεσμό του ξυλενίου, η διαδικασία συνεχίζεται στους 42°C, μέχρι να επέλθει εκ νέου κορεσμός του ξυλενίου με παραφίνη.
- Το μίγμα ξυλενίου-παραφίνης απομακρύνεται γρήγορα και αντικαθίσταται με λιωμένη και φιλτραρισμένη παραφίνη στους 60°C.
- Οι ιστοί τοποθετούνται σε επωαστικό θάλαμο θερμοκρασίας 60°C, όπου η παραφίνη αντικαθίσταται με νέα δύο φορές την ημέρα. Σε κάθε περίπτωση, η θερμοκρασία του θαλάμου δε θα πρέπει να υπερβεί τους 62°C, για να μην αλλοιωθεί η δομή της παραφίνης.



- Η διάρκεια αυτής της διαδικασίας εξαρτάται από το είδος και το μέγεθος του φυτικού τμήματος. Στην περίπτωση των ιστών που χρησιμοποιήθηκαν, αρκούν 7 ημέρες.
- Μετά το πέρας της παραπάνω διαδικασίας, η παραφίνη με τους ιστούς μεταφέρεται σε προθερμασμένα ειδικά μεταλλικά εκμαγεία, τα οποία περιέχουν λιωμένη παραφίνη στους 60°C.
- Οι ιστοί προσανατολίζονται, κατά το δυνατό, εντός της παραφίνης με τη βοήθεια προθερμασμένης βελόνας και τα εκμαγεία μεταφέρονται προσεκτικά σε κρύα επιφάνεια, όπου αφήνονται μέχρι να στερεοποιηθεί η παραφίνη.
- Οι εγκλεισμένοι ιστοί μπορούν να φυλαχθούν στους 4°C για μεγάλο χρονικό διάστημα, μέχρι τη λήψη των τομών.

#### 2.9.1.4 Καθαρισμός και προετοιμασία των αντικειμενοφόρων

- Οι αντικειμενοφόροι τοποθετούνται σε γυάλινα δοχεία χρώσεως και πλένονται σχολαστικά με απορρυπαντικό για 4 ώρες τουλάχιστον.
- Ακολούθως, ξεπλένονται καλά με άφθονο νερό για 2 ώρες και εμβαπτίζονται σε 10% v/v διάλυμα HCl.
- Το υδροχλωρικό οξύ ξεπλένεται καλά με απιονισμένο νερό και οι αντικειμενοφόροι αποστειρώνονται.
- Πριν στεγνώσουν από την αποστείρωση, οι αντικειμενοφόροι εμβαπτίζονται σε **διάλυμα πολυ-L-λυσίνης** για τουλάχιστον 10 λεπτά.
- Η περίσσεια του διαλύματος απομακρύνεται και οι αντικειμενοφόροι αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Μόλις θα πρέπει να λαμβάνεται ώστε να επιτευχθεί ομοιόμορφη κάλυψη των αντικειμενοφόρων.
- Οι αντικειμενοφόροι φυλάσσονται στους -20°C μέχρι τη χρήση τους, μέσα σε καλά κλεισμένα κουτιά, ώστε να αποφευχθεί η είσοδος υγρασίας.

#### 2.9.1.5 Τομές ιστών

- Οι λεπτές τομές των ιστών (7 μm) γίνονται με τη βοήθεια μικροτόμου (LEICA Jung RM2025) με αναλώσιμο μεταλλικό μαχαίρι.
- Οι κατάλληλες τομές επιλέγονται στο στερεοσκόπιο και μεταφέρονται σε αντικειμενοφόρους στους 42°C. Πάνω στις αντικειμενοφόρους έχει προηγουμένως τοποθετηθεί μία σταγόνα αποστειρωμένου νερού για το καλύτερο τέντωμα της τομής.
- Η περίσσεια του νερού απομακρύνεται και οι τομές αφήνονται στους 42°C για τουλάχιστον 12 ώρες.

#### 2.9.1.6 Απομάκρυνση της παραφίνης από τις τομές

- Οι αντικειμενοφόροι με τις τομές εμβαπτίζονται σε 100% ξυλένιο για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, με τακτική ανακίνηση.
- Το ξυλένιο αντικαθίσταται με διάλυμα 50% ξυλενίου (σε 100% αιθανόλη) για 15 λεπτά.
- Τέλος, οι αντικειμενοφόροι μεταφέρονται σε 100% αιθανόλη για 15 λεπτά.

- Αφού στεγνώσουν καλά, σε θερμοκρασία δωματίου, οι τομές φυλάσσονται στους  $-20^{\circ}\text{C}$  σε καλά κλεισμένα κουτιά, ώστε να αποφευχθεί η είσοδος υγρασίας.

## 2.9.2 Προετοιμασία του μη ραδιενεργά σημασμένου RNA ανιχνευτή

### 2.9.2.1 Πέψη του πλασμιδιακού φορέα για την *in vitro* μεταγραφή του ένθετου DNA

Σε όλα τα ακόλουθα στάδια ιδιαίτερη μέριμνα θα πρέπει να λαμβάνεται έτσι ώστε να αποφευχθεί η μόλυνση των δειγμάτων με ένζυμα υδρόλυσης του RNA (RNάσες) που είναι άφθονα στο περιβάλλον.

Ο πλασμιδιακός φορέας pBlueScriptII KS που φέρει το ένθετο DNA, υπόκειται σε πέψη με το κατάλληλο ένζυμο περιορισμού όπως περιγράφεται, παραπάνω (Παράγραφος 2.6.4), με σκοπό την παραγωγή γραμμικού πλασμιδιακού DNA. Στην περίπτωση μεταγραφής πληροφοριακού (sense) RNA το ένζυμο περιορισμού επιλέγεται έτσι ώστε να κόβει το πλασμίδιο στο 3'-άκρο του ένθετου DNA. Αντίστοιχα, για την παραγωγή αντιπληροφοριακού (anti-sense) RNA, το ένζυμο περιορισμού επιλέγεται έτσι ώστε να κόβει το πλασμίδιο στο 5'-άκρο του ένθετου DNA.

- Μετά το τέλος της πέψης το πλασμίδιο καθαρίζεται με εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο (Παράγραφος 2.6.1).
- Το DNA κατακρημνίζεται με την προσθήκη 0,1 όγκου 3M οξικού νατρίου pH 5,2 και 2 όγκων απόλυτης αιθανόλης. Το δείγμα επώαζεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για τουλάχιστον 2 ώρες.
- Ακολουθεί συλλογή του DNA με φυγοκέντρηση στις 13.000 σ.α.λ. για 15 λεπτά στους  $4^{\circ}\text{C}$ .
- Το γραμμικό πλασμίδιο ξεπλένεται με 70% v/v αιθανόλη και επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο αποστειρωμένου νερού.

### 2.9.2.2 *In vitro* μετάφραση σημασμένου RNA

Σε κάθε πείραμα *in situ* υβριδισμού προετοιμάζεται πληροφοριακό και αντιπληροφοριακό σημασμένο RNA. Το πρώτο χρησιμοποιείται για την πραγματοποίηση υβριδισμού ώστε να εντοπιστεί τυχόν μη εξειδικευμένο σήμα υποβάθρου. Η μεταγραφή των δύο τύπων RNA καθορίζεται από την πέψη του πλασμιδίου, όπως αναφέρθηκε ήδη, αλλά και από την επιλογή της κατάλληλης RNA πολυμεράσης. Η σήμανση γίνεται με την χρήση DIG-11-dUTP (Boehringer-Mannheim) σημασμένων νουκλεοτιδίων. Μια τυπική αντίδραση *in vitro* μεταγραφής πραγματοποιείται ως εξής:

- Σε σωλήνα erppendorf προστίθενται τα ακόλουθα:
 

Γραμμικό πλασμιδιακό DNA.....	11 μl (1-2 μg)
10X σημασμένα NTPs (Boehringer-Mannheim).....	2 μl
5X ρυθμιστικό διάλυμα RNA πολυμ.....	4μl
RNase Out (40 units/μl) (Invitrogen) .....	1μl

T3 ή T7 RNA πολυμεράση (20 units/μl) (Boehringer-Mannheim) ..... 2μl

- Το μίγμα επωάζεται στους 37°C για δύο ώρες.
- Για την απομάκρυνση του DNA προστίθεται 1 μl DNάση (2 units/μl) και η επώαση στους 37°C συνεχίζεται για 10 λεπτά.
- Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη 2 μl διαλύματος 0,2 M EDTA pH 8,0 και το σημασμένο RNA κατακρημνίζεται με την προσθήκη 2,5 μl 4 M LiCl και 75 μl αιθανόλης.
- Ακολουθεί επώαση στους -20°C για τουλάχιστον 2 ώρες και το RNA συλλέγεται με φυγοκέντρηση στις 13.000 σ.α.λ. για 15 λεπτά στους 4°C.
- Το ίζημα ξεπλένεται με 70% v/v αιθανόλη και επαναδιαλύεται σε 100 μl ddH<sub>2</sub>O.
- Η συγκέντρωση του RNA προσδιορίζεται φωτομετρικά ενώ η ποιότητα του ελέγχεται με ανάλυση δείγματος σε πηκτή αγαρόζης.

### 2.9.2.3 Υδρόλυση του σημασμένου RNA ανιχνευτή

Η υδρόλυση μέρους του ανιχνευτή που θα χρησιμοποιηθεί (περίπου το 80% της συνολικής ποσότητας ανιχνευτή) κρίνεται αναγκαία για την καλύτερη διείσδυση του ανιχνευτή μέσα στην τομή του ιστού. Έχει βρεθεί ότι το ιδανικό μέγεθος του ανιχνευτή είναι περίπου 150 βάσεις.

- Στην κατάλληλη ποσότητα ανιχνευτή προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος **0,2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub>**.
- Το μίγμα επωάζεται στους 60°C για χρονικό διάστημα που εξαρτάται από το αρχικό μέγεθος του ανιχνευτή και δίνεται από τον τύπο

$$t = (L_{\text{αρχ}} - L_{\text{τελ}}) / K \times L_{\text{αρχ}} \times L_{\text{τελ}}$$

όπου: t η διάρκεια της υδρόλυσης σε λεπτά, L<sub>αρχ</sub> το αρχικό μέγεθος του ανιχνευτή (σε kb), L<sub>τελ</sub>=0.15 kb και K σταθερά που ισούται με 0,11 kb/λεπτό.

- Η υδρόλυση σταματά με την προσθήκη 2 μl 5% οξικού οξέος.
- Ο υδρολυμένος ανιχνευτής κατακρημνίζεται με την προσθήκη 2,5 μl 3 M οξικού νατρίου pH 5,2, διπλάσιου όγκου αιθανόλης και 1 μl γλυκογόνου (1 μg/μl) (Boehringer-Mannheim), το οποίο δρα ως φορέας καθίζησης.
- Το δείγμα επωάζεται στους -20°C για τουλάχιστον 12 ώρες και ο ανιχνευτής συλλέγεται με φυγοκέντρηση στις 13.000 σ.α.λ. για 20 λεπτά, στους 4°C.
- Το ίζημα ξεπλένεται με 70% v/v αιθανόλη και επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο αποστειρωμένου νερού.

### 2.9.3 Διαδικασία in situ RNA-RNA υβριδισμού

#### 2.9.3.1 Διαδικασία προετοιμασίας των τομών για τον υβριδισμό

- Οι αντικειμενοφόροι με τις τομές αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον μία ώρα, χωρίς να ανοιχθούν, για να ξεπαγώσουν.

- Ακολουθως, οι τομές ενυδατώνονται με εμβάπτισή τους σε διαλύματα αιθανόλης 100% δύο φορές, 90%, 70%, 50%, 30%, 10%, για 1 λεπτό σε κάθε συγκέντρωση.
- Αφού ξεπλυθούν μία φορά με **ρυθμιστικό διάλυμα πρωτεΐνάσης K**, μεταφέρονται σε νέο διάλυμα πρωτεΐνάσης που περιέχει 1 µg/ml πρωτεΐνάση K (Boehringer-Mannheim), όπου και επωάζονται για 30 λεπτά στους 37°C.
- Μετά την επώαση, οι αντικειμενοφόροι ξεπλένονται δύο φορές με αποστειρωμένο νερό.
- Στη συνέχεια, οι αντικειμενοφόροι μεταφέρονται σε διάλυμα 0,1 M τριαιθανολαμίνης/0,25% οξικού ανυδρίτη, όπου και επωάζονται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με ήπια ανάδευση.
- Ακολουθως ξεπλένονται σε διάλυμα 2X **SSC** για 5 λεπτά και αφυδατώνονται περνώντας αντίστροφα από τη σειρά αλκοολών.
- Τέλος οι αντικειμενοφόροι αφήνονται να στεγνώσουν για τουλάχιστον 1 ώρα σε κενό αέρος.

### 2.9.3.2 Προετοιμασία διαλύματος υβριδισμού

Οι παρακάτω ποσότητες έχουν υπολογιστεί για μία αντικειμενοφόρο.

- Σε 8 µl υδρολυμένου ανιχνευτή προστίθενται 2 µl μη υδρολυμένου. Η συγκέντρωση του ανιχνευτή έχει ρυθμιστεί έτσι ώστε στα 10 µl τελικού όγκου να περιέχονται 100-500 ng RNA.
- Για την αποδιάταξη της δευτεροταγούς δομής του RNA προστίθενται 10 µl απιονισμένου φορμαμίδιου και το μίγμα επωάζεται στους 68°C για 10 λεπτά.
- Μετά το τέλος της αποδιάταξης, το δείγμα μεταφέρεται στον πάγο.
- Στον αποδιατεταγμένο ανιχνευτή προστίθενται 80 µl διαλύματος υβριδισμού που περιέχει:
 

Απιονισμένο φορμαμίδιο .....	40 µl
5M NaCl .....	6 µl
<b>50X Denhardt's</b> .....	2 µl
100X TE pH 7,5.....	1 µl
1M DTT.....	7 µl
<b>50% Dextran sulphate</b> .....	20 µl
ddH <sub>2</sub> O.....	4 µl
- Το μίγμα θερμαίνεται στους 60°C για 3 λεπτά και αφού ανακατευτεί καλά τοποθετείται πάνω στις τομές. Ιδιαίτερη προσοχή χρειάζεται ώστε να αποφευχθεί ο εγκλωβισμός φυσαλίδων αέρα μέσα στο διάλυμα υβριδισμού.

### 2.9.3.3 Διαδικασία υβριδισμού

- Οι αντικειμενοφόροι σκεπάζονται με καλυπτρίδες. Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δοθεί έτσι ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός φυσαλίδων.
- Οι αντικειμενοφόροι τοποθετούνται σε κουτί, η βάση του οποίου καλύπτεται με διηθητικό χαρτί εμποτισμένο σε διάλυμα 2X SSC, έτσι ώστε να μη στεγνώσουν οι τομές.
- Ο υβριδισμός πραγματοποιείται στους 42°C, για τουλάχιστον 12-16 ώρες.

#### 2.9.3.4 Ξεπλύματα υβριδισμού

- Οι καλυπτρίδες απομακρύνονται με εμβάπτιση των αντικειμενοφόρων σε διάλυμα 4X SSC / 5 mM DTT, για 10 λεπτά
- Το διάλυμα αντικαθίσταται με νέο ίδιας σύστασης, όπου οι αντικειμενοφόροι αφήνονται για 10 λεπτά με τακτική ήπια ανακίνηση.
- Το παραπάνω ξέπλυμα επαναλαμβάνεται τρεις φορές.
- Ακολούθως, οι αντικειμενοφόροι επωάζονται σε 200 ml **ρυθμιστικού διαλύματος RNάσης** που περιέχει 50 µg/ml RNάση A, στους 37°C για 30 λεπτά.
- Η RNάση απομακρύνεται με 4 ξεπλύματα σε ρυθμιστικό διάλυμα RNάσης στους 37°C για 20 λεπτά το καθένα.
- Τέλος, οι αντικειμενοφόροι ξεπλένονται με διάλυμα 2X SSC / 1 mM DTT σε θερμοκρασία δωματίου με τακτική ήπια ανακίνηση.

#### 2.9.3.5 Ανοσολογική ανίχνευση του υβριδισμένου ανιχνευτή

Η ανίχνευση του σήματος υβριδισμού γίνεται με τη χρήση ενός συμπλόκου αντισώματος αντι-DIG που φέρει συζευγμένη αλκαλική φωσφατάση. Το αντίσωμα αναγνωρίζει και προσκολλάται στο σημασμένο με διγοξιγενίνη ανιχνευτή ενώ η αλκαλική φωσφατάση καταλύει το σχηματισμό χρωμοφόρου ιζήματος με την προσθήκη των αντιδραστηρίων **BCIP** και **NBT** (Boehringer-Mannheim).

- Οι αντικειμενοφόροι εμβαπτίζονται σε ρυθμιστικό διάλυμα **Buf.1** για 3-5 λεπτά.
- Ακολούθως, μεταφέρονται σε διάλυμα **Buf.2** για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το διάλυμα αντικαθίσταται με ρυθμιστικό διάλυμα **TBB**, όπου οι αντικειμενοφόροι αφήνονται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Οι τομές καλύπτονται με ρυθμιστικό διάλυμα Buf.1 που περιέχει 1:500 αντίσωμα αντι-DIG και αφήνονται για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το μη δεσμευμένο αντίσωμα απομακρύνεται με εμβάπτιση των αντικειμενοφόρων σε διάλυμα TBB για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολουθούν τρία ξεπλύματα με ρυθμιστικό διάλυμα Buf.1, για 20 λεπτά το καθένα, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Οι τομές εξισορροπούνται σε ρυθμιστικό διάλυμα **Buf.3** για 10 λεπτά και καλύπτονται με **διάλυμα χρωματικής αντίδρασης**.
- Η χρωματική αντίδραση λαμβάνει χώρα στο σκοτάδι και η ανάπτυξη του χρώματος ελέγχεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα στο μικροσκόπιο.
- Η χρωματική αντίδραση τερματίζεται με ξέπλυμα των αντικειμενοφόρων με ρυθμιστικό διάλυμα TE.
- Οι τομές αφυδατώνονται με σειρά διαλυμάτων αιθανόλης 10%, 30%, 50%, 70%, 90% και δύο φορές σε 100% για ένα λεπτό σε κάθε διάλυμα.
- Τέλος, αφού στεγνώσουν καλά οι τομές μονιμοποιούνται με την κάλυψη τους με DPX πριν την τοποθέτηση της καλυπτρίδας.

## 2.10 Υποκυτταρικός εντοπισμός πρωτεϊνών

Ο υποκυτταρικός εντοπισμός των υπό μελέτη πρωτεϊνών στο φυτικό κύτταρο πραγματοποιήθηκε με παροδικό μετασχηματισμό επιδερμικών κυττάρων φύλλων *A. thaliana* με τη χρήση επιταχυνόμενων μικροσωματιδίων χρυσού επικαλυμμένων με πλασμιδιακό DNA. Οι κωδικές περιοχές των υπό μελέτη πρωτεϊνών κλωνοποιήθηκαν σε σύντηξη με την GFP στο άμινο τελικό άκρο της στον φορέα pOL GFPS65C που έχει σχεδιαστεί για την παροδική έκφραση γονιδίων στο φυτικό κύτταρο.

### 2.10.1 Προετοιμασία των μικροσωματιδίων χρυσού και κατακρήμνιση του DNA

- 60 mg μικροσωματιδίων χρυσού διαμέτρου 1 μm τοποθετούνται σε 1 ml 100% αιθανόλης.
- Ακολουθεί vortex για 2 λεπτά και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 10.000 σ.α.λ.
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ξέπλυμα με αιθανόλη επαναλαμβάνετε 3 φορές.
- Στο τέλος απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθεται 1 ml ddH<sub>2</sub>O, τα σωματίδια ξεπλένονται άλλη μία φορά και επαναδιαλύονται σε 500 μl ddH<sub>2</sub>O
- Τα σωματίδια χωρίζονται σε κλάσματα των 50 μl έτοιμων για χρήση.
- Σε erpendorf που περιέχει 50 μl μικροσωματιδίων χρυσού προστίθενται με την σειρά που αναφέρονται: 5 μl πλασμιδιακό DNA (1 μg/μl) ακολουθεί σύντομο vortex, 50 μl 2,5 M CaCl<sub>2</sub> ακολουθεί σύντομο vortex, 20 μl 0,1 M σπερμιδίνη ακολουθεί vortex για 3 λεπτά.
- Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα στις 10.000 σ.α.λ. και απομακρύνεται το υπερκείμενο.
- Τα μικροσωματίδια ξεπλένονται με 140 μl 70% αιθανόλης, ακολουθεί vortex για 10 δευτερόλεπτα, φυγοκέντρηση και απομάκρυνση του υπερκειμένου.
- Τέλος, τα μικροσωματίδια επαναδιαλύονται σε 50 μl 100% αιθανόλης που είναι αρκετά για την πραγματοποίηση 4-8 βομβαρδισμών.

### 2.10.2 Μετασχηματισμός φύλλων με τη μέθοδο του βομβαρδισμού

Ο βομβαρδισμός πραγματοποιήθηκε με τη συσκευή PDS-1000/He της εταιρίας Bio-Rad. Το επίπεδο του κενού που εφαρμόστηκε στο θάλαμο της συσκευής ήταν 28-29 inches Hg, ώστε να μειωθεί η τριβή που θα έχουν τα επιταχυνόμενα σωματίδια. Η πίεση με την οποία επιταχύνονται τα σωματίδια χρυσού ρυθμίζεται από τα δισκία διάρρηξης (rupture discs) που είναι κατασκευασμένα να διαρρηγνύονται όταν σε αυτά εφαρμοστεί συγκεκριμένη πίεση. Χρησιμοποιήθηκαν δισκία που σπάνε στα 1100 psi. Η απόσταση μεταξύ του δισκίου διάρρηξης και δισκίου (macrocarrier) στο οποίο εναποτίθενται τα σωματίδια χρυσού ήταν 1/4". Η απόσταση μεταξύ του macrocarrier και του πλέγματος μείωσης της ταχύτητας (stopping screen) των σωματιδίων χρυσού ήταν 11 mm. Η απόσταση μεταξύ του πλέγματος

μείωσης της ταχύτητας των σωματιδίων και του ιστού ήταν 6 cm. Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν σωματίδια χρυσού διαμέτρου 1  $\mu\text{m}$ .

- Τα νεαρά φύλλα ροζέτας από *A. thaliana* που πρόκειται να μετασχηματιστούν κόβονται προσεκτικά και ξεπλένονται με αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O.
- Τα φύλλα τοποθετούνται με την κάτω επιδερμίδα τους προς τα πάνω σε τρυβλία τα με θρεπτικό MS.
- Ο περιβάλλον χώρος και η συσκευή απολυμαίνονται με 70% αιθανόλη.
- Παράλληλα απολυμαίνονται με 100% αιθανόλη τα δισκία διάρρηξης (rapture discs), τα δισκία στα οποία εναποτίθενται τα σωματίδια χρυσού (macrocarriers) και το πλέγμα μείωσης της πίεσης του αέριου ήλιου όπως και οποιοδήποτε άλλο εξάρτημα χρησιμοποιείται.
- Τα υλικά αφήνονται στο θάλαμο νηματικής ροής (laminar) για να στεγνώσουν.
- Για κάθε μετασχηματισμό 6-8 μl μικροσωματιδίων χρυσού επικαλυμμένα με DNA τοποθετούνται στα ειδικά δισκία macrocarrier και αφήνονται να στεγνώσουν.
- Τα διάφορα εξαρτήματα τοποθετούνται στις κατάλληλες θέσεις στο θάλαμο της συσκευής.
- Με αντλία κενού εφαρμόζεται το κενό αέρος και όταν έχει την κατάλληλη τιμή σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα αφήνεται το ήλιο να επιταχύνει τα σωματίδια χρυσού να εισχωρήσουν στον ιστό.
- Τα τρυβλία με φύλλα που βομβαρδίστηκαν τοποθετήθηκαν μέχρι τη παρατήρηση τους σε θάλαμο με θερμοκρασία 22-25°C με χαμηλό φωτισμό.
- Τα μετασχηματισμένα κύτταρα είναι ορατά εξαιτίας της παραγωγής GFP και μελετήθηκαν με συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης (Confocal Laser Scanning Microscopy). Η διέγερση της GFP και της χλωροφύλλης έγινε στα 488 nm.

## 2.11 Προσδιορισμός συγκέντρωσης θεϊκών ιόντων

Η συγκέντρωση των θεϊκών ιόντων σε ιστούς του φυτού *L. japonicus* προσδιορίστηκαν με την τεχνική της χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής (ion exchange chromatography). Ο διαχωρισμός των ιόντων στην τεχνική αυτή εξαρτάται από την αντιστρεπτή προσρόφηση των φορτισμένων διαλυτών μακρομορίων στις ακινητοποιημένες ιοντοανταλλακτικές ομάδες αντίθετου φορτίου. Στην χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής τα ανιόντα προσροφούνται στις θετικά φορτισμένες ομάδες που είναι ακινητοποιημένες στη στατική φάση της στήλης. Τα προς ανάλυση ανιόντα εκλούνται και απελευθερώνονται από τον ιοντοανταλλάκτη με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος αυξάνοντας την ιοντική ισχύ. Τα ιόντα που εκλούνται μπορούν να μετρηθούν μέσω της αγωγιμότητας.

### 2.11.1 Προετοιμασία δειγμάτων για τον προσδιορισμό συγκέντρωσης θειικών ιόντων

- Σε ειδικό σωλήνα erpendorf με βιδωτό καπάκι τοποθετούνται 100 mg PVP (polyvinylpyrrolidone) και αφήνονται να διαβραχούν σε 1 ml ddH<sub>2</sub>O για περίπου 16 ώρες στους 4°C.
- 50 mg ομογενοποιημένου φυτικού υλικού προστίθεται στο παραπάνω erpendorf και αναδεύεται καλά με χρήση μηχανικού αναδευτήρα για 1 ώρα στους 4°C.
- Ακολουθεί αποδιάταξη των πρωτεϊνών με τοποθέτηση του δείγματος σε υδατόλουτρο στους 100°C για 10 λεπτά.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 13.000 σ.α.λ. για 10 λεπτά στους 4°C.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erpendorf και αποθηκεύεται στους -80°C μέχρι την ανάλυσή του.
- Πριν την ανάλυση, το δείγμα ξεπαγώνει και φυγοκεντρείται ξανά στις 13.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά στους 4°C.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε 200 µl glass micro-inserts (0.1 mm x 15 mm, VWR, Darmstadt, Germany) και τα micro-inserts τοποθετούνται σε 2 ml γυάλινα φιαλίδια υγρής χρωματογραφίας (VWR, Darmstadt, Germany).
- 50 µl δείγματος εγχύονται σε σύστημα χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής

### 2.11.2 Ιοντική χρωματογραφία (IC)

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης θειικών ιόντων πραγματοποιήθηκε στο σύστημα ιοντικής χρωματογραφίας DX-120 (Dionex, Idstein, Germany) συνδεδεμένο με σύστημα ελέγχου που χρησιμοποιεί το λογισμικό επεξεργασίας PeakNet software package Version 4.3 (Dionex, Idstein, Germany). Τα δείγματα εγχύθηκαν με τη βοήθεια συστήματος αυτόματης δειγματοληψίας (AS3500, Thermo Separation Products, Piscataway, USA) με βρόγχο 50 µl. Το σύστημα χρωματογραφίας διαθέτει 2 προ-στήλες. Η πρώτη προ-στήλη (IonPac<sup>®</sup>NG1, 4 x 35 mm, Dionex, Idstein, Germany) απορροφά τα υπολείμματα φαινολικών ενώσεων. Η δεύτερη προ-στήλη (RFIC<sup>™</sup> Ion-Pac<sup>®</sup>AG9-SC, 4 x 50 mm, Dionex, Idstein, Germany) συσσωρεύει τα ιόντα του δείγματος μειώνοντας, έτσι, το χρόνο έκλουσης. Η αναλυτική στήλη (RFIC<sup>™</sup> IonPac<sup>®</sup>AS9-SC, 4 x 250 mm, Dionex, Idstein, Germany) διαχωρίζει τα ιόντα μέσω βαθμιδωτής έκλουσης που δημιουργείται από ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών ιόντων (0,75 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Ο ρυθμός ροής ορίζεται στο 0,5 ml ανά λεπτό. Η πίεση που δημιουργείται από τον ρυθμό ροής ρυθμίζεται στα 1100 psi όπως προτείνεται από τον κατασκευαστή των στηλών. Η ανίχνευση και ο διαχωρισμός των εκλούμενων ιόντων βελτιώνεται με τη χρήση του αυτόαναγεννώμενου καταστολέα ASRS<sup>®</sup>ULTRA II 4-mm (Dionex, Idstein, Germany). Ο καταστολέας ενισχύει την αγωγιμότητα του αναλυτή και μειώνει την αγωγιμότητα υποβάθρου (background). Τα ιόντα που



απαιτούνται για την καταστολή του υπόβαθρου αναγεννώνται από τη συνεχή ηλεκτρόλυση του νερού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική βελτίωση των ορίων ανίχνευσης της μεθόδου. Τα ιόντα ανιχνεύονται από τον αγωγιμομετρικό ανιχνευτή και τα δεδομένα μεταδίδονται στο σύστημα ελέγχου.

### 2.11.3 Ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση θειικών ιόντων

Πρότυπες καμπύλες βαθμονόμησης δημιουργήθηκαν χρησιμοποιώντας διαδοχικές αραιώσεις διαλύματος 1 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (25, 50, 100, 200, 400 και 800 μM). Οι συγκεντρώσεις θειικών ιόντων των δειγμάτων υπολογίστηκαν αυτόματα από το λογισμικό επεξεργασίας PeakNet software package Version 4.3 (Dionex, Idstein, Germany).

## 2.12 Προσδιορισμός περιεκτικότητας θειολών

Ο προσδιορισμός περιεκτικότητας θειολών πραγματοποιήθηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC, High Performance Liquid Chromatography).

### 2.12.1 Προετοιμασία δειγμάτων για τον προσδιορισμό περιεκτικότητας θειολών

- Σε ειδικό σωλήνα erpendorf (safe seal) τοποθετούνται 50 mg PVPP (polyvinylpolyglyrolidone) και αφήνονται να διαβραχούν σε 750 ml 0,1 M HCl για περίπου 16 ώρες στους 4°C.
- 30-100 mg ομογενοποιημένου φυτικού υλικού προστίθεται στο παραπάνω erpendorf και αναδεύεται καλά με χρήση μηχανικού αναδευτήρα.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 13.000 σ.α.λ. για 30 λεπτά στους 4°C.
- Ακολουθεί ρύθμιση του pH στο 8,3 ± 0,2 προσθέτοντας 180 ml ρυθμιστικού διαλύματος 200 mM CHES pH 9,3 σε 120 ml του υπερκείμενου.
- Η αναγωγή των θειολών πραγματοποιείται με την προσθήκη 30 ml 15 mM DTT (Dithiothreitol) και επώαση του δείγματος για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολουθεί παραγωγοποίηση (Derivatization) των θειολών με προσθήκη 20 ml 30 mM mBBr (monobromobimane) σε συνθήκες σκότους για 15 λεπτά.
- Με την προσθήκη 250 ml 10% οξικού οξέος η αντίδραση της παραγωγοποίησης διακόπτεται και τα σύμπλοκα θειολων-mBBr σταθεροποιούνται.
- Τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 13.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά στους 4°C και μεταφέρονται σε 2 ml σκουρόχρωμα γυάλινα φιαλίδια υγρής χρωματογραφίας (VWR, Darmstadt, Germany)
- 50 ml δείγματος εγχύονται σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC)

### 2.12.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC)

Τα mBBr-παραγωγα διαχωρίστηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) χρησιμοποιώντας χρωματογράφο αντίστροφης φάσης (Beckman Gold System, Beckman, Krefeld, Germany) και φθορισμομετρικό ανιχνευτή (Shimadzu RF-

535-Fluorescence HPLC Monitor, Shimadzu Europe GmbH, Duisburg, Germany). 50  $\mu$ l δείγματος εγχύθηκαν στο σύστημα HPLC με τη βοήθεια αυτόματου δειγματολήπτη (System Gold 507e Autosampler, Beckman, Krefeld, Germany). Τα παράγωγα των θειολών διαχωρίστηκαν με μία ODS-hypersil column (SUPERCOSIL<sup>TM</sup> LC-18 HPLC Column, 5  $\mu$ m particle size, 25 cm x 4.6 mm, Sigma-Aldrich, Munich, Germany) με βάση την πολικότητά τους. Οι συνθήκες έκλουσης μεταβάλλονταν γραμμικά από ελάχιστα υδροφοβικές σε πολύ υδροφοβικές με τη χρήση δύο διαφορετικών διαλυμάτων έκλουσης. Το διάλυμα έκλουσης A περιείχε 10% μεθανόλη και 0,25% οξικό οξύ, ενώ το διάλυμα έκλουσης B περιείχε 90% μεθανόλη και 0,25% οξικό οξύ. Το pH και των δύο διαλυμάτων έκλουσης είχε ρυθμιστεί στο 3,9. Η δυαδική βαθμίδωση των δύο διαλυμάτων έκλουσης δημιουργήθηκε αυτόματα από ένα σύστημα δύο αντλιών που ελέγχεται από το HPLC GOLD software. Χρησιμοποιώντας ρυθμό ροής 1 ml/λεπτό, οι αρχικές συνθήκες (96% διάλυμα έκλουσης A και 4% διάλυμα έκλουσης B) μεταβάλλονταν σταδιακά προς 80% διάλυμα έκλουσης A και 20% διάλυμα έκλουσης B στα πρώτα 20 λεπτά της ανάλυσης. Μετά το πέρας των 20 λεπτών όλα τα mBBr-παράγωγα εκλούονταν από τη στήλη. Στη συνέχεια, το ποσοστό του διαλύματος έκλουσης B αυξήθηκε από 20% σε 100% μέσα σε διάστημα ενός λεπτού. Οι συνθήκες αυτές διατηρήθηκαν για 8 λεπτά, ώστε να ολοκληρωθεί το ξέπλυμα της στήλης. Τέλος, το ποσοστό του διαλύματος έκλουσης B μειώθηκε και πάλι στο 4% μέσα σε 30 sec. Τα εκλούόμενα παράγωγα θειολών διεγέρθηκαν από μία λάμπα στα 380 nm και ο φθορισμός τους μετρήθηκε στα 480 nm σε φθορισμομετρικό ανιχνευτή. Τα δεδομένα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το 32Karat software (Beckman, Krefeld, Germany).

### 2.12.3 Ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση θειολών

Οι κορυφές ταυτοποιήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας πρότυπο διάλυμα 0,1 mM κυστεΐνης, 0,1 mM  $\gamma$ -γλουταμυλκυστεΐνης, 1 mM γλουταθειόνης και 1 mM ομογλουταθειόνης. 0, 5, 10, 15, 20 or 30  $\mu$ l του πρότυπου διαλύματος προστέθηκαν σε ειδικό σωλήνα erpendorf (safe seal) που περιέχει 50 mg PVPP (polyvinylpyrrolidone) και 750  $\mu$ l 0,1 M HCl. Παράλληλα με την προετοιμασία των δειγμάτων, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία για τα πρότυπα διαλύματα (παρ. 2.7.1), ώστε να κατασκευαστεί οι αντίστοιχες πρότυπες καμπύλες. Το εμβαδόν των κορυφών υπολογίστηκε αυτόματα από το 32Karat software (Beckman, Krefeld, Germany).

## 2.13 Μέτρηση ενζυμικής δραστηριότητας της αναγωγής του APS

Ο προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας της αναγωγής του APS πραγματοποιείται μέσω της μέτρησης παραγωγής πτητικού  $^{35}\text{S}$ -θειώδους που σχηματίζεται παρουσία 75  $\mu\text{M}$   $\text{AP}^{35}\text{S}$  και 4 mM DTE, σύμφωνα με τους Brunold and Suter (1990).

- 70-90 mg φρέσκου φυτικού υλικού λειοτριβείται σε 500 ml **EB** μέσα σε γουδί που έχει τοποθετηθεί πάνω σε πάγο αμέσως μετά τη συλλογή του.
- Στη συνέχεια, το δείγμα διηθείται, ώστε να απομακρυνθούν τα στερεά υπολείμματα του φυτικού υλικού.
- Σε ειδικό σωλήνα erpendorf με βιδωτό αποσπώμενο καπάκι προστίθενται τα παρακάτω:
 

1 M Tris/HCl pH 9,0.....	50 $\mu\text{l}$
2 M $\text{MgSO}_4$ .....	200 $\mu\text{l}$
0.2 M DTE.....	10 $\mu\text{l}$
3.75 mM $\text{AP}^{35}\text{S}$ , ειδ. δραστηριότητα 2000 dpm/ $\mu\text{l}$ .....	10 $\mu\text{l}$
1 M $\text{Na}_2\text{SO}_3$ .....	100 $\mu\text{l}$
dd $\text{H}_2\text{O}$ .....	110 $\mu\text{l}$
Δείγμα.....	20 $\mu\text{l}$
- Το μείγμα αναδεύεται με χρήση μηχανικού αναδευτήρα (vortex). Το καπάκι του erpendorf αφαιρείται και το δείγμα επωάζεται στους 37°C για 30 λεπτά.
- Το erpendorf τοποθετείται μέσα σε ειδικό φιαλίδιο σπινθηρισμού 20 ml (Packard, Groningen, Netherlands) που περιέχει 1 ml TAA (Triethanolamine).
- Μέσα στο erpendorf προστίθενται 200  $\mu\text{l}$  1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  και το φιαλίδιο σπινθηρισμού σφραγίζεται καλά με καπάκι, ώστε να μην διαφεύγει το προϊόν της ενζυμικής αντίδρασης ( $^{35}\text{SO}_3^{2-}$ ), καθώς είναι πτητικό.
- Το δείγμα επωάζεται για 16 ώρες, ώστε να το πτητικό  $^{35}\text{SO}_3^{2-}$  να δεσμευτεί στο TAA.
- Το erpendorf αφαιρείται από το φιαλίδιο σπινθηρισμού, αφού ξεπλυθούν τα εξωτερικά του τοιχώματα με 200  $\mu\text{l}$  dd $\text{H}_2\text{O}$ .
- Στο φιαλίδιο σπινθηρισμού προστίθενται 5 ml κοκτέιλ σπινθηρισμού (Optiphase HiSafe 2, PerkinElmer, Massachusetts, USA).
- Ακολουθεί πολύ καλή ανάδευση και η μέτρηση της ραδιενέργειας του δείγματος σε μετρητή υγρού σπινθηρισμού (Wallac 1409, Wallac, Turcu, Finland).

## 2.14 Προσδιορισμός ρυθμού πρόσληψης θεικών και της κατανομής τους στα διάφορα όργανα φυτών *L. jaronicus*

### 2.14.1 Πρόσληψη ραδιενεργά σημασμένων θεικών

- Σε φιαλίδια τοποθετήθηκαν 2 ml Hoagland –N προσαρμοσμένο σε 0.1 mM  $\text{SO}_4^{2-}$  που περιείχε 10  $\mu\text{Ci}$  ( $3.7 \times 10^5$  Bq)  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  (Hartmann Analytic, Braunschweig, Germany).
- Φυτά *L. jaronicus* μεταφέρθηκαν στα φιαλίδια, έτσι ώστε μόνο το ριζικό τους σύστημα να βρίσκεται μέσα στο ραδιενεργό θρεπτικό διάλυμα.

- Η επώαση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) και 180±30 μE (Osram L 58W/12 Lumilux de luxe Daylight and Osram L 58W/77 Fluora, Osram, Munchen) για 1 ώρα.
- Η πρόσληψη των θεικών διακόπηκε με 3 ξεπλύματα του ριζικού συστήματος των φυτών με μη-ραδιενεργό θρεπτικό διάλυμα.
- Τα φυμάτια, οι ρίζες, οι βλαστοί και τα φύλλα συλλέχθηκαν προσεκτικά, ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε υγρό άζωτο
- Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι να πραγματοποιηθεί η ανάλυση της περιεκτικότητας τους σε  $^{35}\text{S}$ .

#### 2.14.2 Προσδιορισμός περιεκτικότητας $^{35}\text{S}$

- Κάθε δείγμα μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο σπινθηρισμού 20 ml
- Προστίθεται 1 ml διαλυτοποιητής ιστών (Soluene 350, Perkin Elmer Inc, Waltham, USA) για κάθε 20 mg δείγματος
- Το δείγμα επώαζεται για 16 ώρες
- Προστίθενται 200 ml 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  και ακολουθεί επώαση για 16 ώρες.
- Στο φιαλίδιο σπινθηρισμού προστίθενται 5 ml κοκτέιλ σπινθηρισμού Optiphase HiSafe 2 (PerkinElmer, Massachusetts, USA).
- Ακολούθησε πολύ καλή ανάδευση και η μέτρηση της ραδιενέργειας του δείγματος σε μετρητή υγρού σπινθηρισμού (Wallac 1409, Wallac, Turcu, Finland).

### 2.15 Προσδιορισμός του ρυθμού πρόσληψης θεικών από διάφορα φυτικά όργανα και της ροής τους στις δεξαμενές θείου

#### 2.15.1 Πρόσληψη ραδιενεργά σημασμένων θεικών

- Σε κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν 10 ml Hoagland -N προσαρμοσμένο σε 0.1 mM  $\text{SO}_4^{2-}$  που περιείχε 150 μCi ( $5.5 \times 10^6$  Bq)  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  (Hartmann Analytic, Braunschweig, Germany) και 3% σακχαρόζη.
- Φυμάτια ή ρίζες φυτών *L. japonicus* μεταφέρθηκαν στις κωνικές φιάλες και επώαστηκαν υπό συνεχή ανάδευση για 4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
- Η πρόσληψη των θεικών διακόπηκε με 3 ξεπλύματα του κάθε δείγματος με μη-ραδιενεργό θρεπτικό διάλυμα.
- Τα δείγματα λειοτριβήθηκαν σε υγρό άζωτο και αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι να πραγματοποιηθεί η ανάλυση τους ως προς την περιεκτικότητά τους σε  $^{35}\text{S}$  και τη ροή του στους μεταβολίτες που περιέχουν θείο .

#### 2.15.2 Προσδιορισμός περιεκτικότητας $^{35}\text{S}$

- 20 mg κάθε δείγματος μεταφέρθηκαν σε φιαλίδιο σπινθηρισμού 20 ml που περιείχε 1 ml διαλυτοποιητή ιστών (Soluene 350, Perkin Elmer Inc, Waltham, USA).
- Στη συνέχεια, ακολουθήθηκε η διαδικασία όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.14.2

### 2.15.3 Προσδιορισμός ροής του $^{35}\text{S}$ στο εσωτερικό απόθεμα θειικών

- Ο προσδιορισμός συγκέντρωσης των θειικών πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.11.
- Κατά την ανάλυση των δειγμάτων στην IC, όλο το έκλουσμα συλλέχτηκε σε κλάσματα του 1.2 ml σε φιαλίδιο σπινθηρισμού 5 ml από συλλέκτη κλασμάτων.
- Σε κάθε κλάσμα προστέθηκαν 4 ml κοκτέιλ σπινθηρισμού Optiphase HiSafe 2 (PerkinElmer, Massachusetts, USA).
- Ακολούθησε πολύ καλή ανάδευση και η μέτρηση της ραδιενέργειας του κάθε κλάσματος σε μετρητή υγρού σπινθηρισμού (Wallac 1409, Wallac, Turcu, Finland).

### 2.15.4 Προσδιορισμός ροής του $^{35}\text{S}$ στα αποθέματα θειολών

- Ο προσδιορισμός περιεκτικότητας θειολών πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.12.
- Κατά την ανάλυση των δειγμάτων στην HPLC, όλο το έκλουσμα συλλέχτηκε σε κλάσματα του 1 ml σε φιαλίδιο σπινθηρισμού 5 ml από συλλέκτη κλασμάτων.
- Σε κάθε κλάσμα προστέθηκαν 4 ml κοκτέιλ σπινθηρισμού Optiphase HiSafe 3 (PerkinElmer, Massachusetts, USA).
- Ακολούθησε πολύ καλή ανάδευση και η μέτρηση της ραδιενέργειας του κάθε κλάσματος σε μετρητή υγρού σπινθηρισμού (Wallac 1409, Wallac, Turcu, Finland).

### 2.15.5 Προσδιορισμός ροής του $^{35}\text{S}$ στα αποθέματα πρωτεϊνών

- 30 mg κάθε δείγματος μεταφέρθηκαν σε σωλήνα errendorf που περιείχε 1 ml **PEB** με σκοπό την απομόνωση ολικών πρωτεϊνών.
- Ακολούθησε καλή ανάδευση με χρήση μηχανικού αναδευτήρα (vortex) για 30 sec
- Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 13.000 σ.α.λ. για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε προσεκτικά σε νέο σωλήνα errendorf και 100 μl TCA προστέθηκαν στα δείγματα με σκοπό τη συμπύκνωση των πρωτεϊνών.
- Ακολούθησε επώαση για 30 λεπτά στους 4°C και φυγοκέντρηση στις 13.000 σ.α.λ. για 10 λεπτά στους 4°C.
- Το ίζημα των πρωτεϊνών ξεπλένεται 2 φορές με 100 μl κρύας ακετόνης.
- Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 13.000 σ.α.λ. για 10 λεπτά στους 4°C.
- Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και το ίζημα στεγνώθηκε και επαναδιαλύθηκε σε 400 μl 0.2 N NaOH.
- Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια σπινθηρισμού 20 ml που περιείχαν 5 ml κοκτέιλ σπινθηρισμού Optiphase HiSafe 2 (PerkinElmer, Massachusetts, USA).
- Ακολούθησε πολύ καλή ανάδευση και η μέτρηση της ραδιενέργειας του κάθε κλάσματος σε μετρητή υγρού σπινθηρισμού (Wallac 1409, Wallac, Turcu, Finland).

## 2.16 Ανάλυση μεταβολιτών με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS)

### 2.16.1 Εκχύλιση μεταβολιτών

- Φρέσκο φυτικό υλικό συλλέγεται και ομογενοποιείται σε γουδί λειοτριβήσεως παρουσία υγρού αζώτου.
- 50 mg ομογενοποιημένου φυτικού υλικού μεταφέρονται σε σωλήνα erpendorf που περιέχει 400 μl κρύου διαλύματος εκχύλισης **MEB**.
- Ακολουθεί ανάδευση με χρήση μηχανικού αναδευτήρα (vortex).
- Τα δείγματα τοποθετούνται σε θερμο-αναδευτήρα (Erpendorf, Hamburg, Germany), όπου επωάζονται στους 70°C για 15 λεπτά με ήπια ανάδευση στις 1.200 σ.α.λ.
- 200 μl χλωροφόρμιο προστίθενται στο δείγμα
- Ακολουθεί επώαση υπό συνεχή ανάδευση στις 1.200 σ.α.λ. για 5 λεπτά στους 37°C.
- 400 μl ddH<sub>2</sub>O προστίθενται στο δείγμα
- Ακολουθεί ανάδευση με μηχανικό αναδευτήρα (vortex) και φυγοκέντρηση στις 13.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- 100 μl από το υπερκείμενο μεταφέρονται σε νέο σωλήνα erpendorf
- Τα δείγματα εξατμίζονται με αέριο άζωτο

### 2.16.2 Παραγωγοποίηση (derivatization)

Με την παραγωγοποίηση, μια χημική ένωση μετατρέπεται σε ένα νέο προϊόν παρόμοιας χημικής σύστασης με νέες χημικές ιδιότητες. Οι νέες ιδιότητες καθιστούν τα μόρια καταλληλότερα για διαχωρισμό και ποσοτικοποίηση κατά τη χρωματογραφική ανάλυση. Με την τεχνική του GC-MS μπορούν να αναλυθούν μόνο ενώσεις που είναι πτητικές και θερμοσταθερές. Η χημική παραγωγοποίηση των δειγμάτων είχε ως στόχο να αποδώσει στις προς ανάλυση ουσίες αυτές τις δύο ιδιότητες και για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν δύο χειρισμοί:

A) Προσθήκη της ομάδας CH<sub>3</sub>-O-NH<sub>2</sub> (methoxyamine). Μ'αυτό το χειρισμό επιτυγχάνεται η σταθεροποίηση των ομάδων καρβονυλίων (=C=O). Παρεμποδίζεται ο κετο-ενολ ταυτομερισμός και ο σχηματισμός πολλαπλών ακέτυλ- ή κέτυλ- δομών.

B) Προσθήκη πυριτικής ομάδας (σιλανοποίηση). Κατά την αντίδραση αυτή ένα ενεργό πρωτόνιο αντικαθίσταται από μια αλκυλοσιλομάδα, συνήθως τριμεθυλοσιλομάδα. Τα σιλανοπαράγωγα δημιουργούνται από αντικατάσταση του ενεργού πρωτονίου ομάδων όπως -OH, -COOH, =NH, -NH<sub>2</sub>, -SH από την ομάδα -Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.

Με τον τρόπο αυτό, μη πτητικές ενώσεις μπορούν να μετασχηματιστούν σε περισσότερο πτητικά προϊόντα, καθώς με την προσθήκη μιας νέας ομάδας μετατρέπονται σε λιγότερο πολικές ενώσεις.

Η παραγωγοποίηση πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας την παρακάτω διαδικασία:

- Στα δείγματα προστίθενται 25 μl **MOX**.
- Τα δείγματα τοποθετούνται σε θερμο-αναδευτήρα και αναδύονται στις 1.200 σ.α.λ. για 90 λεπτά στους 30°C.
- Ακολουθεί σύντομη φυγοκέντρηση στις 13.000 σ.α.λ. για 30 δευτερόλεπτα.
- 75 μl MSTFA (N-methyl-N- (trimethylsilyl) trifluoroacetamide) προστίθενται στα δείγματα.
- Τα δείγματα επωάζονται στους 37°C για 30 λεπτά με ήπια ανάδευση στις 1.200 σ.α.λ.
- Ακολουθεί σύντομη φυγοκέντρηση στις 13.000 σ.α.λ. για 2 λεπτά στους 20°C.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε 100 μl glass micro-inserts (0.1 mm x 15 mm, VWR, Darmstadt, Germany) και τα micro-inserts τοποθετούνται σε 1.5 ml γυάλινα φιαλίδια αέριας χρωματογραφίας (VWR, Darmstadt, Germany) τα οποία με τη βοήθεια ειδικού εργαλείου σφραγίζονται αεροστεγώς με ειδικά καπάκια (VWR, Darmstadt, Germany).
- Τα δείγματα αφήνονται σε ηρεμία για 2 ώρες πριν εγχυθούν στο GC-MS.

### 2.16.3 Αέριος χρωματογραφία-Φασματομετρία μάζας (GC-MS)

Η αεριοχρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με αέριο χρωματογράφο Agilent (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) GC 7890N ο οποίος είναι εξοπλισμένος με τετραπολικό φασματογράφο μάζας ως ανιχνευτή 5975C Inert XL EI/CI (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). 1 μl δείγματος εγχύθηκε στο σύστημα GC-MS με τη βοήθεια αυτόματου δειγματολήπτη (MPS2-XL, GERSTEL, Mülheim, Germany) σε θερμοκρασία 230 °C. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε He με ρυθμό ροής 1.1 ml/min. Η θερμοκρασία του θαλάμου μεταβαλλόταν σύμφωνα με προκαθορισμένο πρόγραμμα: 80 °C για 2 λεπτά και αύξηση στους 325°C με ρυθμό 5°C/min όπου διατηρείται για 10 λεπτά. Ο συνολικός χρόνος διέλευσης ήταν 61 λεπτά. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν HP-5MS 5% Phenyl Methyl Silox, μήκος: 30 m, διάμετρος: 0.25 mm, πάχος: 0.25 μm (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).

Για την ανάλυση των χρωματογραφημάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System, version 2.71) που παρέχεται από το NIST (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA). Η ταυτοποίηση των ουσιών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τις βιβλιοθήκες FiehnLab και Golm με βάση το χρόνο έκλουσης από τη χρωματογραφική κολώνα και την ομοιότητα των φασμάτων μαζών.

Η επαναληψιμότητα των μεταβολιτών ελέγχθηκε για κάθε έναν μεταβολίτη χωριστά και κάποιος μεταβολίτης απορρίπτονταν στην περίπτωση που δεν επαναλαμβανόταν σε τουλάχιστον 60% των βιολογικών επαναλήψεων. Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές του εμβαδού της κορυφής του κάθε μεταβολίτη ( $X_i$ ). Η κανονικοποίηση έγινε ως προς την τιμή που λήφθηκε για τη ριβιτόλη που είχε προστεθεί σε όλα τα δείγματα ως μεταβολίτης αναφοράς, καθώς επίσης και ως προς το φρέσκο βάρος του κάθε δείγματος, σύμφωνα με τον τύπο:

$$N_i = X_i \times X_{is}^{-1} \times \text{φρέσκο βάρος}^{-1}$$

όπου  $N_i$  η σχετική απόκριση του κάθε μεταβολίτη και  $X_{is}$  το εμβαδό της καμπύλης του μεταβολίτη αναφοράς.

## 2.17 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε εφαρμόζοντας t-test ανά ζεύγος. Όταν τα δείγματα δεν παρουσίαζαν κανονικότητα, εφαρμόζονταν Mann-Whitney Rank Sum test. Η στατιστική επεξεργασία έγινε με τη χρήση του προγράμματος SigmaStat 3.5. Όπου σαφώς αναφέρεται, πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης (ONE WAY ANOVA) και έλεγχος δοκιμών μέσω της δοκιμασίας Bonferroni. Η στατιστική επεξεργασία έγινε με τη χρήση του προγράμματος SPSS Statistics 17.0. Τέλος, πραγματοποιήθηκε πολυμεταβλητή ανάλυση με τη μέθοδο των κύριων συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA) για την ομαδοποίηση των δειγμάτων με χρήση του πρόσθετου Multibase 2015 του προγράμματος Microsoft Excel. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν για τιμές ανεξάρτητων σετ φυτών που χρησιμοποιήθηκαν ως βιολογικές επαναλήψεις. Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των θειικών και των θειολών και της ενζυμικής δραστηριότητας της αναγωγής του APS, καθώς και για την ανάλυση των ροών του  $^{35}\text{S}$  πραγματοποιήθηκαν δύο ανεξάρτητα πειράματα σε διαφορετικές χρονικές περιόδους κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες συμπεριλαμβανομένου των μαρτύρων και όλων των γονότυπων χρησιμοποιώντας ανεξάρτητα σετ φυτών ως βιολογικές επαναλήψεις. Η τρανσκριπτομική και η μεταβολομική ανάλυση πραγματοποιήθηκαν σε τρία και πέντε σετ φυτών που αναπτύχθηκαν ανεξάρτητα χρησιμοποιώντας τα ως βιολογικές επαναλήψεις.



## 2.18 Σύνθεση ρυθμιστικών διαλυμάτων και θρεπτικών μέσων

### 2.18.1 Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης βακτηρίων

#### YMB

---

Σε 1 lt dH<sub>2</sub>O προστίθενται 10 gr Mannitol, 0,5 gr K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 gr MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,1 gr NaCl και 0,5 gr Yeast extract. Για την παρασκευή τρυβλίων προστίθενται 15 gr Agar. Το θρεπτικό διάλυμα αποστειρώνεται και φυλάσσεται στους 4°C.

#### LB

---

Σε 1lt dH<sub>2</sub>O προστίθενται 10 gr Bacto-tryptone, 5 gr Yeast extract και 5 gr NaCl. Για την παρασκευή τρυβλίων προστίθενται 15 gr Agar. Το θρεπτικό διάλυμα αποστειρώνεται και φυλάσσεται στους 4°C.

#### SOB

---

Σε 1lt dH<sub>2</sub>O προστίθενται 20 gr Bacto-tryptone, 5 gr Yeast extract και 0,5 gr NaCl. Για την παρασκευή τρυβλίων προστίθενται 15 gr Agar. Το θρεπτικό διάλυμα αποστειρώνεται και φυλάσσεται στους 4°C.

### 2.18.2 Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης φυτικού υλικού

#### Hoagland

---

Για την παρασκευή του θρεπτικού διαλύματος Hoagland χρησιμοποιήθηκαν μητρικά διαλύματα των απαραίτητων στοιχείων. Για 1 lt θρεπτικού διαλύματος προστίθενται: 2 ml 1M MgSO<sub>4</sub>, 1 ml 1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 ml 0,1M FeEDTA, 1 ml διαλύματος ιχνοστοιχείων, 5 ml M KNO<sub>3</sub> και 5 ml M Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O.

Διάλυμα ιχνοστοιχείων: Σε 1 lt dH<sub>2</sub>O προστίθενται 2,86 gr H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1,81 gr MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0,11 gr ZnCl<sub>2</sub>, 0,05 gr CuCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O και 0,02 gr H<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.

#### Hoagland -N

---

Για την παρασκευή του θρεπτικού διαλύματος Hoagland -N χρησιμοποιήθηκαν μητρικά διαλύματα των απαραίτητων στοιχείων. Για 1 lt θρεπτικού διαλύματος προστίθενται: 2 ml 1M MgSO<sub>4</sub>, 1 ml 1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 ml 0,1M FeEDTA, 1 ml διαλύματος ιχνοστοιχείων, 10 ml 0,5M CaCl<sub>2</sub> και 5 ml 1M KCl.

Διάλυμα ιχνοστοιχείων: Σε 1 lt dH<sub>2</sub>O προστίθενται 2,86 gr H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1,81 gr MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0,11 gr ZnCl<sub>2</sub>, 0,05 gr CuCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O και 0,02 gr H<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.

---

**MS**

---

0.441% Murashige & Skoog μείγμα αλάτων και βιταμινών, 2% σακχαρόζη, 0,05% 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES), 0,3% phytigel, pH 5,7.

**2.18.3 Παρασκευή και συγκεντρώσεις αντιβιοτικών****Καναμυκίνη**

---

Μητρικό διάλυμα: 30 mg/ml σε ddH<sub>2</sub>O. Τελική συγκέντρωση: 30 μg/ml θεραπευτικού διαλύματος.

**Τζενταμυκίνη**

---

Μητρικό διάλυμα: 50 mg/ml σε ddH<sub>2</sub>O. Τελική συγκέντρωση: 50 μg/ml θεραπευτικού διαλύματος.

**Αμπικιλίνη**

---

Μητρικό διάλυμα: 50 mg/ml σε ddH<sub>2</sub>O. Τελική συγκέντρωση: 50 μg/ml θεραπευτικού διαλύματος.

**2.18.4 Διαλύματα απομόνωσης πλασμιδιακού DNA****STEL**

---

8% Σακχαρόζη, 5% Triton X100 , 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM EDTA.

**Λυσοζύμη**

---

50 mg λυσοζύμης διαλύονται σε 1 ml ddH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C.

**2.18.5 Διαλύματα απομόνωσης γενωματικού DNA****DEB**

---

100 mM Tris-HCl pH 8,0 , 50 mM NaCl, 10 mM 2-μερκαπτοαιθανόλη, 50 mM EDTA

**RNase A**

---

10 mg RNase A διαλύονται σε 1 ml 10 mM Tris-HCl pH 7,5 / 15 mM NaCl. Το διάλυμα θερμαίνεται στους 100°C για 15 λεπτά, με σκοπό την αδρανοποίηση τυχόν δράσης DNase, αφήνεται να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου και φυλάσσεται στους -20°C

**2.18.6 Διαλύματα απομόνωσης ολικού RNA****REB**

---

50 mM Tris-HCl pH 8,3, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% Lauryl sarcosine.

---

**REB2**

---

2% PVP (Polyvinylpyrrolidone), 0,5 g/lit σπερμιδίνη, 2M NaCl, 25 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8,3, 2% CTAB (cetyltrimethylammonium bromide). Η CTAB προστίθεται τελευταία και ενώ το διάλυμα θερμαίνεται στους 65°C. Το διάλυμα αποστειρώνεται και ακριβώς πριν τη χρήση προστίθεται 3% β-μερκαπτοαιθανόλη.

---

**PIC**

---

Φαινόλη, ισοαμυλική αλκοόλη και χλωροφόρμιο αναμιγνύονται σε αναλογία 24:1:24. Το μείγμα εξισορροπείται με 100 mM Tris-HCl pH 8,3 / 10 mM EDTA.

---

**3M οξικό νάτριο pH 5,2**

---

Σε τελικό όγκο 1 lt ddH<sub>2</sub>O διαλύονται 246,09 gr άνυδρο οξικό νάτριο. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 5,2 με την προσθήκη πυκνού οξικού οξέος. Το τελικό διάλυμα αποστειρώνεται και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

---

**10T/10E**

---

10 mM Tris-HCl pH 8,3, 10 mM EDTA.

---

**TE**

---

10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA.

**2.18.7 Διαλύματα ανάλυσης νουκλεϊνικών οξέων**

---

**1X TAE**

---

40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA.

---

**50X TAE**

---

Για την παρασκευή 1 lt πυκνού διαλύματος διαλύονται 242 gr Tris base, 57,1 ml οξικού οξέος και 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 σε ddH<sub>2</sub>O, μέχρι τελικού όγκου 1 lt.

---

**Βρωμιούχο αιθίδιο**

---

Το βρωμιούχο αιθίδιο παρασκευάζεται ως πυκνό διάλυμα 0,5 mg/ml σε ddH<sub>2</sub>O και φυλάσσεται στους 4°C. Η τελική συγκέντρωση του βρωμιούχου αιθιδίου στην πηκτή είναι 0,5 μg/ml.

---

**DLB**

---

0.25% Μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανό του ξυλενίου και 30% γλυκερόλη.

---

**10X LIB**

---

0,66 M Tris-HCl pH 7,6 , 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT, 10 mM ATP. Το πυκνό ρυθμιστικό διάλυμα λιγάζσης φυλάσσεται σε μικρές ποσότητες στους -20°C.

**2.18.8 Διαλύματα μετασχηματισμού κυττάρων *E. coli*****TB**

---

10 mM Pipes ή Hepes, 55 mM MnCl<sub>2</sub>, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται πριν την προσθήκη του MgCl<sub>2</sub>, στο 6,7 με KOH. Μετά την προσθήκη του MgCl<sub>2</sub> το τελικό διάλυμα αποστειρώνεται διαμέσου φίλτρου 0,45 μm και φυλάσσεται στους 4°C.

**100mM IPTG**

---

23,8 gr IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, Boehringer-Mannheim) διαλύονται σε 1 ml ddH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα αποστειρώνεται με φιλτράρισμα (0.22 μm Millipore) και φυλάσσεται στους -20°C.

**2% X-Gal**

---

0,02 gr X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosidase, Boehringer-Mannheim) προστίθενται σε 1 ml διμεθυλ-φορμαμίδιο.

**2.18.9 Διαλύματα αντιδράσεως PCR****10X ρυθμιστικό διάλυμα PCR**

---

100 mM Tris-HCl pH 8,3 , 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% (w/v) gelatin.

**2.18.10 Διαλύματα *in situ* υβριδισμού****Διάλυμα μονιμοποίησης**

---

Σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη προστίθενται 10 ml διαλύματος 10% παραφολμαδεΐδης, 0,25 ml γλουταραλδεΐδης, 2,5 ml 10X ρυθμιστικό διάλυμα μονιμοποίησης και 12,5 ml ddH<sub>2</sub>O. Το pH του διαλύματος πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 7,2 και 7,4.

**Διάλυμα 10% παραφολμαδεΐδης**

---

10 gr παραφολμαδεΐδης διαλύονται σε 100 ml ddH<sub>2</sub>O με έντονη ανάδευση. Για την υποβοήθηση της διάλυσης προστίθενται μερικές σταγόνες διαλύματος 10 N NaOH. Το διάλυμα παραφολμαδεΐδης φυλάσσεται στους 4°C στο σκοτάδι.

**10X Ρυθμ. διάλυμα μονιμοποίησης**

---

100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 6,8, 1 M NaCl. Για την παρασκευή 100 ml αναμινύονται 68,4 ml 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 31,6 ml 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> και 5,84 gr NaCl.

---

**0,5% Σαφρανίνη**

---

0,5 gr σαφρανίνη διαλύονται σε 100 ml 50% αιθανόλη.

---

**Poly-L-λυσίνη**

---

100 µg /ml πολυ-L-λυσίνη σε αποστειρωμένο διάλυμα 10 mM Tris-HCl pH 8,0. Το διάλυμα φιλτράρεται και φυλάσσεται στους -20°C

---

**0.2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> / NaHCO<sub>3</sub>**

---

Σε 100 ml ddH<sub>2</sub>O διαλύονται 1,59 gr Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> και 0,42 gr NaHCO<sub>3</sub>. Το διάλυμα αποστειρώνεται με φιλτράρισμα (0.22 µm Millipore).

---

**Ρυθμ. διάλυμα πρωτεΐνάσης K**

---

100 mM Tris-HCl pH 7,5 , 50 mM EDTA.

---

**50X Denhardt's**

---

1% Ficoll, 1% Polyvinylpyrrolidone , 1% BSA.

---

**50% Dextran sulphate**

---

500 µl Dextran sulfate διαλύονται σε 500 µl αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O. Για την υποβοήθηση της διάλυσης το μείγμα θερμαίνεται στους 65°C. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C.

---

**Ρυθμ. διάλυμα RNάσης**

---

500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7,5.

---

**TBB**

---

0,3% Tween 20 και 1% BSA σε Buf.1

---

**20X SSC**

---

Σε τελικό όγκο 1 lt ddH<sub>2</sub>O προστίθενται 175,3 gr NaCl και 88,2 gr κιτρικού νατρίου. Το τελικό διάλυμα αποστειρώνεται και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

---

**Buf.1**

---

150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 7,5

---

**Buf.2**

---

0,5% αντιδραστήριο μπλοκαρίσματος (Boehringer-Mannheim) σε διάλυμα Buf.1.

---

**Buf.3**

---

100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl pH 9,2

---

**BCIP**

---

5% BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, Sigma) διαλύεται σε 100% διμεθυλφορμαμίδιο. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C

---

**NBT**

---

5% NBT (nitro blue tetrazolium choride, Sigma) διαλύεται σε 70% διμεθυλφορμαμίδιο. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C.

---

**Διάλυμα χρωματικής αντίδρασης**

---

0,34 gr/ml NBT, 0,175 mg/ml BCIP διαλύονται σε διάλυμα ανίχνευσης Buf.3. Σε 10 ml διαλύματος Buf.3 προστίθενται 35 μl διαλύματος BCIP και 35 μl διαλύματος NBT (DIG-system kit, Boehringer-Mannheim)

**2.18.11 Διαλύματα για τον προσδιορισμό θειολών**

---

**200 mM CHES pH 9,3**

---

Σε τελικό όγκο 1 lt ddH<sub>2</sub>O διαλύονται 41,46 gr CHES (2-(Cyclohexylamino)-ethansulphonic acid). Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 9,3 με την προσθήκη 1N NaOH.

---

**30 mM mBBr**

---

Για την παρασκευή 30 ml διαλύματος, 244 mg mBBr (monobromobimane) διαλύονται σε 30 ml ακετονιτρίλιο.

---

**Διάλυμα έκλουσης A**

---

10% μεθανόλη και 0,25% οξικό οξύ. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 3,9 με την προσθήκη 10 M NaOH.

---

**Διάλυμα έκλουσης B**

---

90% μεθανόλη και 0,25% οξικό οξύ. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 3,9 με την προσθήκη 0,1 M NaOH.

**2.18.12 Διαλύματα για τη μέτρηση ενζυμικής δραστηριότητας της αναγωγάσης του APS (APR)**

---

**EB**

---

0.1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,7, 5 mM Na-EDTA, 0.5 mM AMP, 10 mM DTE, 10 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 10 mM L-cysteine, 1% Triton, 2% PVP-40.

---

**0.1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7.7**

---

Για τη παρασκευή 240 ml 0.1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,7 αναμιγνύονται 50 ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> και 190 ml K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

**2.18.13 Διαλύματα απομόνωσης πρωτεϊνών****PEB**

---

125 mM Tris-HCl pH 6,8, 6% SDS.

**2.18.14 Διαλύματα εκχύλισης και παραγωγοποίησης μεταβολιτών****MEB**

---

Για τη παρασκευή 10 ml MEB αναμιγνύονται 9.875 ml μεθανολη και 0.125 ml διάλυμα ριβιτόλης.

**Διάλυμα ριβιτόλης**

---

Σε 1 ml ddH<sub>2</sub>O διαλύεται 1 mg ριβιτόλη.

**MOX**

---

Σε 1 ml άνυδρης πυριδίνης διαλύονται 20 mg υδροχλωρική μεθοξυαμίνη.

**2.19 Γονότυποι στελεχών *E. coli*****XL1 Blue**

---

supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA46, thi, relA1, lacF'[proAB+lacIq lacZ15 Tn10]

**DH5α**

---

F<sup>-</sup>, endA1, glnV44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96, deoR, nupG, Φ80d/lacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>), λ<sup>-</sup>

**M15[pREP4]**

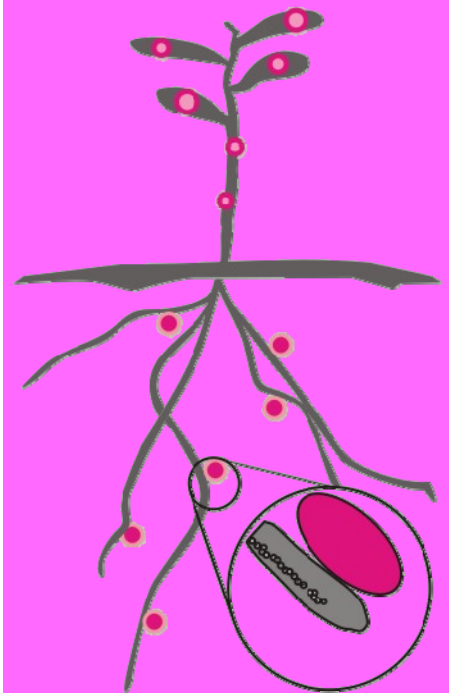
---

nals, strs, rifs, thi<sup>-</sup>, lac<sup>-</sup>, ara<sup>+</sup>, gal<sup>+</sup>, mtl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, recA<sup>+</sup>, uvr<sup>+</sup>, lon<sup>+</sup>.

## Κεφάλαιο

# Αποτελέσματα

# 3





### 3 Αποτελέσματα

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η συμβιωτική αζωτοδέσμευση επιφέρει σημαντικές συστημικές αλλαγές στο μεταβολισμό ολόκληρου του φυτού (Fotelli et al., 2011). Ωστόσο, αν και η εγκαθίδρυση της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης έχει μελετηθεί διεξοδικά, οι μοριακές και βιοχημικές αλλαγές που λαμβάνουν χώρα στο υπόλοιπο φυτό κατά τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση έχουν μελετηθεί ελάχιστα. Ειδικά για το θείο, είναι καλά τεκμηριωμένο ότι η αφομοίωση και ο μεταβολισμός του σχετίζονται στενά με τη διαθεσιμότητα του αζώτου (Davidian and Kopriva, 2010; Hesse et al., 2004; Kopriva and Rennenberg, 2004; Koprivova et al., 2000; Vauclare et al., 2002; Ho and Saito, 2001; Clarkson et al., 1989; Smith, 1980). Παρά τη σύνδεση αυτή, ελάχιστη δουλειά έχει γίνει για τη μελέτη της αφομοίωσης και του μεταβολισμού του θείου στα ψυχανθή, όπου τα φυμάτια αποτελούν την κύρια πηγή αφομοιωμένου αζώτου για το φυτό. Με σκοπό τη μελέτη των μοριακών και βιοχημικών μηχανισμών που διέπουν το μεταβολισμό του φυτού κατά την εγκαθίδρυση της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις των  $^{35}\text{S}$ -ροών, των συγκεντρώσεων των S-μεταβολιτών και της δραστηριότητας της αναγωγής του APS οι οποίες συνδυάστηκαν με την τρανσκριπτομική και τη μεταβολομική ανάλυση. Έτσι, στην παρούσα διδακτορική διατριβή, παρουσιάζεται για πρώτη φορά ένας λεπτομερής χάρτης των αλλαγών που σχετίζονται με την πρόσληψη, την αναγωγή, την αφομοίωση και το μεταβολισμό του θείου, καθώς και των αλλαγών του μεταβολομικού προτύπου που παρατηρούνται στα συμβιωτικά και μη συμβιωτικά όργανα του *L. jaronicus* κατά την εγκαθίδρυση της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης από το *M. loti* άγριου τύπου. Επιπλέον, για να διαπιστωθεί εάν οι αλλαγές που παρατηρούνται συνδέονται με την ενεργή συμβιωτική αζωτοδέσμευση ή εάν απλά σχετίζονται με το σχηματισμό φυματίου, στις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν συμπεριλήφθηκαν και τα μεταλλαγμένα ριζοβιακά στελέχη *M. loti* *ΔnifA* και *ΔnifH*. Ο εμβολιασμός φυτών *L. jaronicus* με τα εν λόγω μεταλλαγμένα στελέχη οδηγεί στο σχηματισμό μη λειτουργικών φυματίων που στερούνται της ενζυμικής δραστηριότητας της νιτρογενάσης. Η ανάπτυξη του φυματίου από το στέλεχος *ΔnifH* είναι φυσιολογική, σε αντίθεση με το στέλεχος *ΔnifA* το οποίο αδυνατεί να διαφοροποιηθεί σε βακτηριοειδές εντός του φυματίου (Fotelli et al., 2011).

#### 3.1 Επίδραση της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης στη συγκέντρωση θειικών ιόντων

Η επίδραση της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης στη συγκέντρωση θειικών σε φυμάτια και μη συμβιωτικά όργανα του φυτού *L. jaronicus* μελετήθηκε. Για το σκοπό αυτό αναπτύχθηκαν φυτά *L. jaronicus* που είτε δεν εμβολιάστηκαν είτε εμβολιάστηκαν με το *M. loti* wt, το *ΔnifA*

ή το *ΔnifH* στέλεχος. Ακολούθησε η συλλογή φυματίων, ριζών, βλαστών και φύλλων και ο προσδιορισμός της συγκέντρωσηςθειικών με την τεχνική της ιοντικής χρωματογραφίας. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε πέντε βιολογικές επαναλήψεις.

Η συσσώρευσηθειικών στα φυμάτια φαίνεται ότι επηρεάζεται από την ύπαρξη συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης. Τα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια συσσωρεύουν σχετικά χαμηλά επίπεδαθειικών (Εικόνα 3.1). Αντίθετα, τα *fix<sup>-</sup>* φυμάτια που σχηματίστηκαν από το μεταλλαγμένο ριζοβιακό στέλεχος *ΔnifA* ή το *ΔnifH* συσσωρεύουν 2 και 4 φορές περισσότεραθειικά σε σύγκριση με τα *fix<sup>+</sup>* φυτά, αντίστοιχα. Στις ρίζες που εμβολιάστηκαν με το ριζόβιο αγρίου τύπου η συγκέντρωσηθειικών είναι 5 φορές υψηλότερη από αυτή που παρατηρείται στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια και 1.5 φορές υψηλότερη από τη συγκέντρωσηθειικών στις μη εμβολιασμένες ρίζες. Ακόμα υψηλότερα επίπεδαθειικών εμφανίζουν οι ρίζες που εμβολιάστηκαν με τα *fix<sup>-</sup>* στελέχη χωρίς να παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μεταλλαγμένων στελεχών. Η συσσώρευσηθειικών σε βλαστούς που συλλέχθηκαν από φυτά που εμβολιάστηκαν από το ριζόβιο αγρίου τύπου είναι 2 φορές υψηλότερη από αυτή που παρατηρείται στα *fix<sup>+</sup>* φυμάτια και 43% χαμηλότερη από αυτή των βλαστών μη εμβολιασμένων φυτών. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι οι βλαστοί φυτών που εμβολιάστηκαν με το μεταλλαγμένο στέλεχος *ΔnifA* ή το *ΔnifH* εμφανίζουν 5 και 3.5 φορές υψηλότερα επίπεδαθειικών από ότι οι βλαστοί



**Εικόνα 3.1:** Συγκέντρωσηθειικών ιόντων σε φυμάτια και μη συμβιωτικά όργανα.

Η συγκέντρωσηθειικών ιόντων ( $SO_4^{2-}$ ) σε φυμάτια, ρίζες, βλαστούς και φύλλα μη εμβολιασμένων φυτών και φυτών που εμβολιάστηκαν με το *M. loti* wt ή το *ΔnifA* ή το *ΔnifH* παρουσιάζεται. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο πέντε ανεξάρτητων βιολογικών επαναλήψεων  $\pm$  S.E. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές επισημαίνονται με διαφορετικά γράμματα ( $P < 0.05$ ).

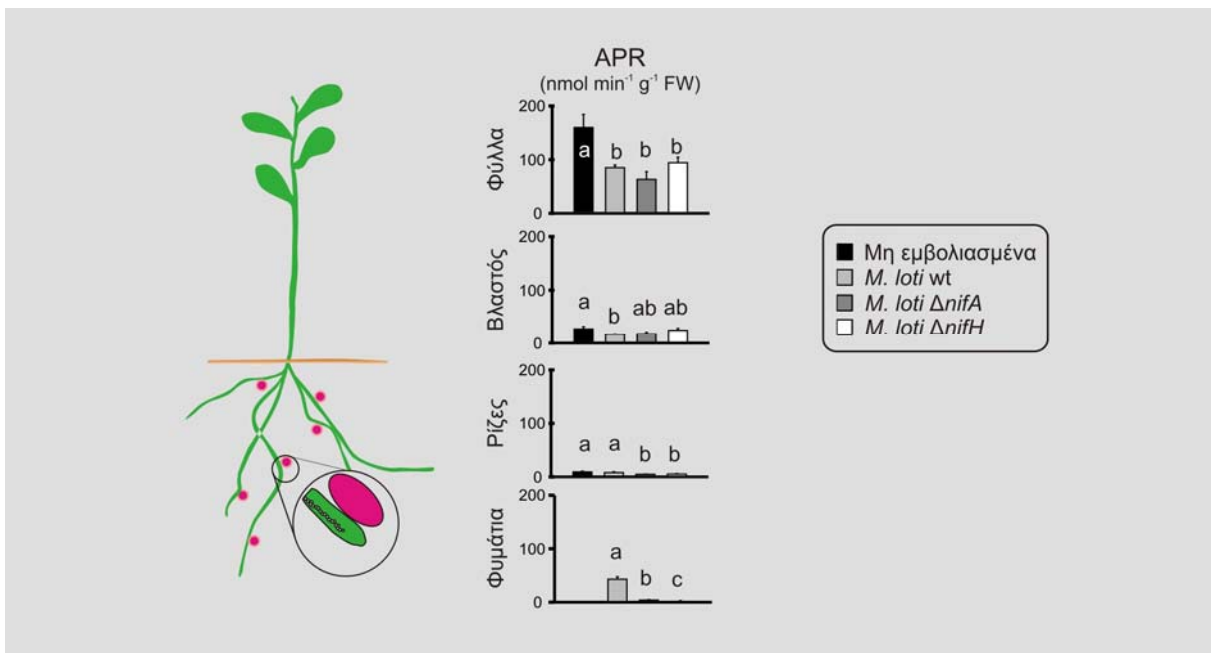
αζωτοδεσμευτικών φυτών, αντίστοιχα. Τα επίπεδα θειικών στα φύλλα φυτών που εμβολιάστηκαν με το *M. loti* wt εμφανίζονται 5 φορές υψηλότερα από ότι στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια, ενώ είναι παρόμοια με αυτά στα φύλλα μη εμβολιασμένων φυτών. Τα φύλλα *fix<sup>-</sup>* φυτών παρουσιάζουν παρόμοιο πρότυπο με τους βλαστούς των ίδιων φυτών όσον αφορά στη συγκέντρωση θειικών. Συγκεκριμένα, τα φύλλα φυτών που εμβολιάστηκαν με τα *fix<sup>-</sup>* στελέχη *ΔnifA* ή *ΔnifH* συσσωρεύουν 2.8 και 1.5 φορές περισσότερα θειικά, αντίστοιχα, από τα φύλλα *fix<sup>+</sup>* φυτών. Γενικά, στα φυτά που φέρουν μη λειτουργικά φυμάτια αυξάνεται η συσσώρευση θειικών, ιδιαίτερα στα υπέργεια όργανα.

### 3.2 Μελέτη της ενζυμικής δραστικότητας της αναγωγής του APS (APR)

Η αναγωγή του APS θεωρείται ένζυμο-κλειδί στο μονοπάτι της αναγωγής των θειικών (Vauclare et al., 2002). Για το λόγο αυτό μετρήθηκε η ενζυμική δραστικότητα της αναγωγής του APS σε φυμάτια και μη συμβιωτικά όργανα του φυτού *L. jaronicus*. Αναπτύχθηκαν φυτά *L. jaronicus* που είτε δεν εμβολιάστηκαν είτε εμβολιάστηκαν με το *M. loti* wt, το *ΔnifA* ή το *ΔnifH* στέλεχος. Ακολούθησε η συλλογή φυματίων, ριζών, βλαστών και φύλλων και ο άμεσος προσδιορισμός της ενζυμικής δραστικότητας της αναγωγής του APS μέσω της μέτρησης παραγωγής πτητικού <sup>35</sup>S-θειώδους που σχηματίζεται παρουσία 75 μΜ AP<sup>35</sup>S και 4 mM DTE (Brunold and Suter, 1990). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε πέντε βιολογικές επαναλήψεις.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα υψηλά επίπεδα της ενζυμικής δραστικότητας της αναγωγής του APS που παρατηρούνται στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια (Εικόνα 3.2). Η δραστικότητα της αναγωγής του APS στα φυμάτια αγρίου τύπου είναι 5 φορές υψηλότερη από αυτή που εμφανίζεται στις ρίζες των αντίστοιχων φυτών. Αξιοσημείωτο είναι ότι η υψηλή δραστικότητα της αναγωγής του APS στα φυμάτια φαίνεται να συνδέεται στενά με τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση, καθώς και οι δύο τύποι *fix<sup>-</sup>* φυματίων εμφανίζουν σχεδόν μηδενική ενζυμική δραστικότητα. Μεταξύ των οργάνων του *L. jaronicus* οι ρίζες είναι αυτές που παρουσιάζουν τα χαμηλότερα επίπεδα δραστικότητας της αναγωγής του APS. Η δραστικότητα της αναγωγής του APS στις μη εμβολιασμένες ρίζες και τις ρίζες αζωτοδεσμευτικών φυτών παρουσιάζει παρόμοια επίπεδα, ενώ στις ρίζες *fix<sup>-</sup>* φυτών ελαφρώς χαμηλότερα. Η ενζυμική δραστικότητα αναγωγής του APS στους βλαστούς του *L. jaronicus* είναι υψηλότερη αυτής των ριζών, αλλά παραμένει σχετικά χαμηλή αντιπροσωπεύοντας μόνο το 40% της αντίστοιχης ενζυμικής δραστικότητας στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια. Η ενζυμική δραστικότητα αναγωγής του APS δεν παρουσιάζει μεγάλες διαφορές μεταξύ των βλαστών των διαφορετικών φυτών που μελετήθηκαν. Πιο συγκεκριμένα, οι βλαστοί των *fix<sup>+</sup>* φυτών έχουν λίγο χαμηλότερη ενζυμική δραστικότητα

αναγωγής του APS από τους βλαστούς μη εμβολιασμένων φυτών, ενώ οι βλαστοί και των δύο τύπων *fix* φυτών δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ούτε με τους βλαστούς αζωτοδεσμευτικών φυτών ούτε με τους βλαστούς μη εμβολιασμένων φυτών. Όπως ήταν αναμενόμενο, τα υψηλότερα επίπεδα ενζυμικής δραστηριότητας της αναγωγής του APS εντοπίζονται στα φύλλα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι τα φύλλα των αζωτοδεσμευτικών φυτών εμφανίζουν 50% χαμηλότερη ενζυμική δραστηριότητα αναγωγής του APS σε σύγκριση με τα φύλλα των μη εμβολιασμένων φυτών. Τέλος, παρατηρείται ότι η παρουσία μη λειτουργικών φυματίων δεν επηρεάζει σημαντικά την ενζυμική δραστηριότητα αναγωγής του APS στα φύλλα αφού τα επίπεδα της είναι παρόμοια με αυτά των φύλλων αζωτοδεσμευτικών φυτών. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι κατά τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση, τα φυμάτια αποτελούν ένα νέο τόπο αναγωγής των θεικών, που οδηγεί σε μερική μετατόπιση της αναγωγής των θεικών από τα φύλλα στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια.



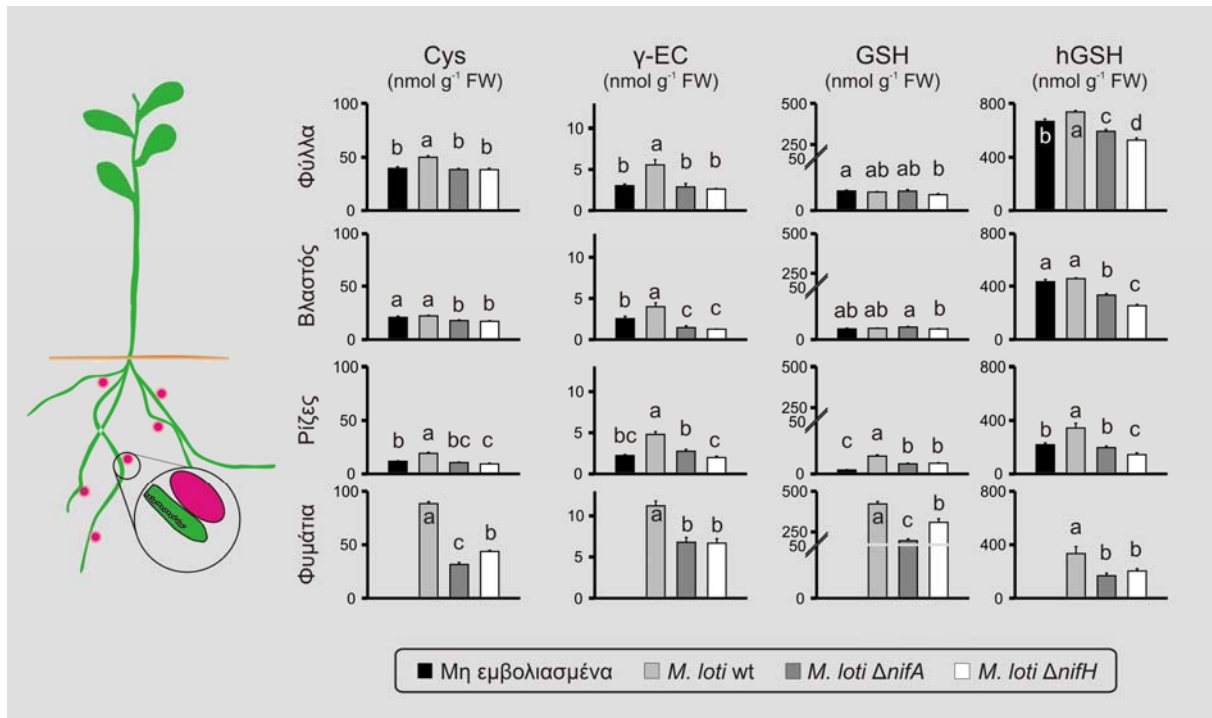
**Εικόνα 3.2:** Ενζυμική δραστηριότητα της αναγωγής του APS (APR) σε φυμάτια και μη συμβιωτικά όργανα.

Η ενζυμική δραστηριότητα της αναγωγής του APS (APR) σε φυμάτια, ρίζες, βλαστούς και φύλλα μη εμβολιασμένων φυτών και φυτών που εμβολιάστηκαν με το *M. loti* wt ή το *ΔnifA* ή το *ΔnifH* παρουσιάζεται. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο πέντε ανεξάρτητων βιολογικών επαναλήψεων  $\pm$  S.E. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές επισημαίνονται με διαφορετικά γράμματα ( $P < 0.05$ ).

### 3.3 Επίδραση συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης στη συγκέντρωση θειολών

Η επίδραση της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης στη συγκέντρωση θειολών σε φυμάτια και μη συμβιωτικά όργανα του φυτού *L. jaronicus* μελετήθηκε. Για το σκοπό αυτό αναπτύχθηκαν φυτά *L. jaronicus* που είτε δεν εμβολιάστηκαν είτε εμβολιάστηκαν με το ριζόβιο αγρίου τύπου ή το μεταλλαγμένο στέλεχος *ΔnifA* ή το *ΔnifH*. Συλλέχθηκαν φυμάτια, ρίζες, βλαστοί και φύλλα από τα οποία απομονώθηκαν στη συνέχεια οι θειόλες. Ακολούθησε αναγωγή και παραγωγοποίηση θειολών με mBBr (monobromobimane), ώστε να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των θειολών με την βοήθεια της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε πέντε βιολογικές επαναλήψεις.

Η υψηλότερη συγκέντρωση κυστεΐνης απαντάται στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια και αγγίζει τα  $88.4 \pm 1.9$  nmol  $g^{-1}$  φρέσκου βάρους (FW) αντιπροσωπεύοντας την πενταπλάσια συγκέντρωση από αυτή που παρατηρείται στις γεινιάζουσες ρίζες (Εικόνα 3.3). Τα μη λειτουργικά φυμάτια που σχηματίστηκαν από το μεταλλαγμένο ριζόβιο *ΔnifA* ή το *ΔnifH* εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα κυστεΐνης κατά 65% και 50%, αντίστοιχα, σε σύγκριση με τα *fix<sup>+</sup>* φυμάτια. Στις ρίζες που εμβολιάστηκαν με το ριζόβιο αγρίου τύπου συσσωρεύεται 1.6 φορές περισσότερη κυστεΐνη από ότι στις μη εμβολιασμένες ρίζες. Οι ρίζες και των δύο τύπων *fix<sup>-</sup>* φυτών εμφανίζουν 48-55% χαμηλότερη συγκέντρωση κυστεΐνης σε σύγκριση με τις ρίζες που εμβολιάστηκαν με το *M. loti* wt. Οι βλαστοί των αζωτοδεσμευτικών φυτών συσσωρεύουν 4 φορές λιγότερη κυστεΐνη από ότι τα φυμάτια που σχηματίστηκαν από το ριζόβιο αγρίου τύπου. Οι βλαστοί των *fix<sup>+</sup>* και των μη εμβολιασμένων φυτών παρουσιάζουν παρόμοια επίπεδα κυστεΐνης, ενώ οι βλαστοί και των δύο τύπων *fix<sup>-</sup>* φυτών φαίνεται συσσωρεύουν 20-23% χαμηλότερη κυστεΐνη. Η συγκέντρωση κυστεΐνης που παρατηρείται στα φύλλα φυτών που εμβολιάστηκαν με το *M. loti* wt αντιπροσωπεύει μόλις το 44% αυτής που εμφανίζεται στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια και είναι 26% υψηλότερη από τη συγκέντρωση της στα φύλλα μη εμβολιασμένων φυτών. Τα φύλλα και των 2 τύπων *fix<sup>-</sup>* φυτών συσσωρεύουν 23% λιγότερη κυστεΐνη σε σύγκριση με τα φύλλα των αζωτοδεσμευτικών φυτών.



**Εικόνα 3.3:** Συγκέντρωση θειολών σε φυμάτια και μη συμβιωτικά όργανα.

Η συγκέντρωση της κυστεΐνης (Cys), της γ-γλουταμυλκυστεΐνης (γ-EC), της γλουταθειόνης (GSH) και της ομογλουταθειόνης (hGSH) σε φυμάτια, ρίζες, βλαστούς και φύλλα μη εμβολιασμένων φυτών και φυτών που εμβολιάστηκαν με το *M. loti* wt ή το *ΔnifA* ή το *ΔnifH* παρουσιάζονται. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο πέντε ανεξάρτητων βιολογικών επαναλήψεων  $\pm$  S.E. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές επισημαίνονται με διαφορετικά γράμματα ( $P < 0.05$ ).

Όπως και στην περίπτωση της κυστεΐνης, η υψηλότερη συσσώρευση γ-γλουταμυλκυστεΐνης παρατηρείται στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια (Εικόνα 3.3). Τα μη λειτουργικά φυμάτια που σχηματίστηκαν είτε από το μεταλλαγμένο στέλεχος *ΔnifA* είτε το *ΔnifH*, συσσωρεύουν 40% λιγότερη γ-γλουταμυλκυστεΐνη σε σύγκριση με τα φυμάτια άγριου τύπου. Η συγκέντρωση της γ-γλουταμυλκυστεΐνης στις ρίζες που εμβολιάστηκαν με το *M. loti* wt αντιπροσωπεύει μόλις το 43% αυτής που παρατηρείται στα *fix<sup>+</sup>* φυμάτια, ενώ είναι 2.1 φορές υψηλότερη από αυτή των μη εμβολιασμένων ριζών. Οι ρίζες που εμβολιάστηκαν με το μεταλλαγμένο ριζόβιο *ΔnifA* ή το *ΔnifH* συσσωρεύουν 42% και 59% λιγότερη γ-γλουταμυλκυστεΐνη σε σύγκριση με τις ρίζες των αζωτοδεσμευτικών φυτών. Οι βλαστοί των *fix<sup>+</sup>* φυτών έχουν 65% χαμηλότερη συγκέντρωση γ-γλουταμυλκυστεΐνης από ότι τα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια, και 57% υψηλότερη συγκέντρωση από ότι οι βλαστοί μη εμβολιασμένων φυτών. Οι βλαστοί και των 2 τύπων *fix<sup>-</sup>* φυτών συσσωρεύουν 65% λιγότερη γ-γλουταμυλκυστεΐνη από τους βλαστούς των αζωτοδεσμευτικών φυτών.

Η γλουταθειόνη συσσωρεύεται σχεδόν αποκλειστικά στα φυμάτια. Η συγκέντρωση γλουταθειόνης στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια φτάνει τα  $422 \pm 15$  nmol g<sup>-1</sup> FW και είναι 24 φορές υψηλότερη από αυτή που παρατηρείται στις ρίζες που εμβολιάστηκαν με το ριζόβιο

άγριου τύπου (Εικόνα 3.3). Τα φυμάτια που σχηματίστηκαν από το μεταλλαγμένο ριζόβιο *ΔnifA* ή το *ΔnifH* συσσωρεύουν 54% και 27% λιγότερη γλουταθειόνη, αντίστοιχα, σε σύγκριση με τα φυμάτια άγριου τύπου. Οι ρίζες που εμβολιάστηκαν με το *M. loti* wt εμφανίζουν 5 φορές περισσότερη γλουταθειόνη από ότι οι μη εμβολιασμένες ρίζες. Η συγκέντρωση γλουταθειόνης στις ρίζες που εμβολιάστηκαν με το μεταλλαγμένο στέλεχος *ΔnifA* ή το *ΔnifH* είναι 40-43% χαμηλότερη από αυτή που παρατηρείται στις ρίζες των *fix<sup>+</sup>* φυτών. Οι βλαστοί και τα φύλλα των φυτών που εμβολιάστηκαν με το ριζόβιο άγριου τύπου συσσωρεύουν χαμηλά επίπεδα γλουταθειόνης που φτάνουν μόλις το 2% και 4%, αντίστοιχα, της γλουταθειόνης που συσσωρεύεται στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια. Η συμβιωτική αζωτοδέσμευση δε φαίνεται να επηρεάζει τα επίπεδα ομογλουταθειόνης στα υπέργεια όργανα του φυτού, καθώς η συγκέντρωση της γλουταθειόνης τόσο στους βλαστούς όσο και στα φύλλα δεν εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μη εμβολιασμένων, των αζωτοδεσμευτικών και των *fix<sup>-</sup>* φυτών.

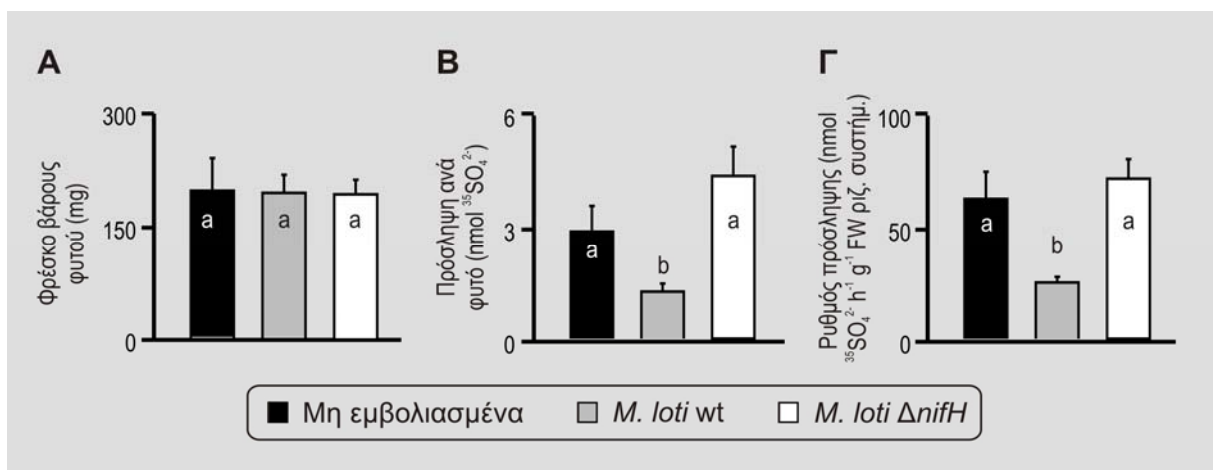
Η ομογλουταθειόνη βρίσκεται, επίσης, σε αφθονία στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια η συγκέντρωση της οποίας φτάνει τα  $333.2 \pm 52.5$  nmol  $g^{-1}$  FW, τιμή παρόμοια με αυτή που εμφανίζεται στις γειτνιαζουσες ρίζες (Εικόνα 3.3). Τα μη λειτουργικά φυμάτια που σχηματίστηκαν από το μεταλλαγμένο στέλεχος *ΔnifA* ή το *ΔnifH* συσσωρεύουν 50% και 40% λιγότερη ομογλουταθειόνη, αντίστοιχα, σε σύγκριση με τα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια. Οι ρίζες που εμβολιάστηκαν με το ριζόβιο άγριου τύπου παρουσιάζουν 57% υψηλότερη συγκέντρωση ομογλουταθειόνης από ότι οι μη εμβολιασμένες ρίζες. Στις ρίζες που εμβολιάστηκαν με το *fix<sup>-</sup>* ριζόβιο *ΔnifA* ή το *ΔnifH*, η συγκέντρωση της ομογλουταθειόνης είναι 57% και 42% χαμηλότερη σε σύγκριση με τις ρίζες των αζωτοδεσμευτικών φυτών. Τα επίπεδα ομογλουταθειόνης στους βλαστούς των αζωτοδεσμευτικών και των μη εμβολιασμένων φυτών είναι παρόμοια, ενώ στους βλαστούς των *fix<sup>-</sup>* φυτών που εμβολιάστηκαν το μεταλλαγμένο ριζόβιο *ΔnifA* ή το *ΔnifH* είναι 27% και 45% χαμηλότερα, αντίστοιχα. Σε αντίθεση με τις υπόλοιπες θειόλες που συσσωρεύονται κυρίως στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια, τα υψηλότερα επίπεδα ομογλουταθειόνης απαντώνται στα φύλλα. Η συγκέντρωση ομογλουταθειόνης στα φύλλα των *fix<sup>+</sup>* φυτών φτάνει τα  $734.5 \pm 11.1$  nmol  $g^{-1}$  FW και είναι 11% υψηλότερη από τη συγκέντρωση ομογλουταθειόνης στα φύλλα μη εμβολιασμένων φυτών. Τα φύλλα των φυτών που εμβολιάστηκαν με το μεταλλαγμένο ριζόβιο *ΔnifA* ή το *ΔnifH* εμφανίζουν κατά 10% και 20%, αντίστοιχα, χαμηλότερα επίπεδα ομογλουταθειόνης σε σύγκριση με τα φύλλα των αζωτοδεσμευτικών φυτών.

Συνοψίζοντας, τα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια φαίνεται να συσσωρεύουν υψηλότερα επίπεδα θειολών με εξαίρεση την ομογλουταθειόνη της οποίας η μέγιστη συγκέντρωση

απαντάται στα φύλλα. Αντίθετα, και στους δύο τύπους *fix<sup>-</sup>* φυματίων η συγκέντρωση των θειολών εμφανίζεται σημαντικά χαμηλότερη. Επιπρόσθετα, τα υψηλά επίπεδα θειολών στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια φαίνεται να επηρεάζουν τη συσσώρευση αυτών και στα μη συμβιωτικά όργανα του *L. jaronicus*. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η μετατόπιση της δραστηριότητας της αναγωγής του APS στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια οδήγησε στην αυξημένη παραγωγή θειολών στα φυμάτια και την μεταφορά τους στα μη συμβιωτικά όργανα του φυτού.

### 3.4 Μελέτη της πρόσληψης θειικών και της κατανομής τους στο *L. jaronicus*

Αναλύθηκε η πρόσληψη θειικών και η κατανομή τους στα διάφορα φυτικά όργανα του *L. jaronicus* κατά τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση. Το ριζικό σύστημα ολόκληρων φυτών ηλικίας 6 εβδομάδων που είτε δεν εμβολιάστηκαν είτε εμβολιάστηκαν με το *M. loti* άγριου τύπου ή με το μεταλλαγμένο ριζόβιο *ΔnifH* τοποθετήθηκε σε προσαρμοσμένο θρεπτικό διάλυμα Hoagland που περιείχε <sup>35</sup>S-θειικά. Μετά από 1 ώρα επώασης, συλλέχθηκαν προσεκτικά τα φυμάτια, οι ρίζες, οι βλαστοί και τα φύλλα. Ακολούθησε η ζύγιση των δειγμάτων και ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας τους σε <sup>35</sup>S, ώστε να υπολογιστούν η πρόσληψη θειικών ανά φυτό, ο ρυθμός πρόσληψης θειικών από το ριζικό σύστημα των φυτών, ο ρυθμός πρόσληψης θειικών των φυτικών οργάνων, καθώς και η σχετική κατανομή του <sup>35</sup>S στα φυτικά όργανα του *L. jaronicus*. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε επτά ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις.

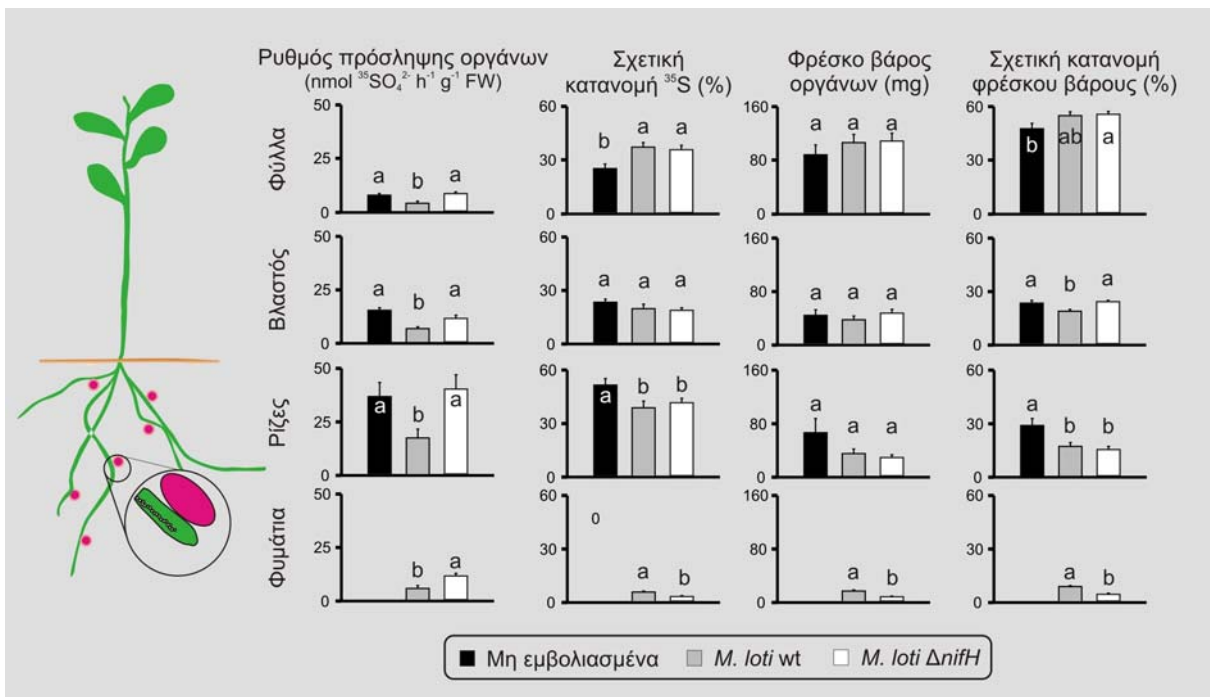


**Εικόνα 3.4:** Φυτικό φρέσκο βάρος και πρόσληψη θειικών φυτών *L. jaronicus*

Το ριζικό σύστημα ολόκληρων φυτών που είτε δεν εμβολιάστηκαν είτε εμβολιάστηκαν με το *M. loti* άγριου τύπου ή με το μεταλλαγμένο ριζόβιο *ΔnifH* εκτέθηκαν σε <sup>35</sup>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> για 1 ώρα. **(Α)** Το φρέσκο βάρος του φυτού, **(Β)** η πρόσληψη θειικών ανά φυτό και **(Γ)** ο ρυθμός πρόσληψης θειικών από το ριζικό σύστημα των φυτών παρουσιάζονται. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο επτά ανεξάρτητων βιολογικών επαναλήψεων  $\pm$  S.E. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές επισημαίνονται με διαφορετικά γράμματα ( $P < 0.05$ ).



Η πρόσληψη θεικών και ο ρυθμός πρόσληψης θεικών ανά ριζικό σύστημα στα αζωτοδεσμευτικά φυτά είναι 55-60% χαμηλότεροι από ότι στα μη εμβολιασμένα φυτά (Εικόνα 3.4). Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι οι αντίστοιχες τιμές στα φυτά που εμβολιάστηκαν με το *fix ΔnifH* στέλεχος είναι στο ίδιο εύρος με αυτές που παρατηρούνται στα μη εμβολιασμένα φυτά, παρότι δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές όσον αφορά τα φρέσκο βάρος των φυτών στις τρεις αυτές διαφορετικές καταστάσεις. Παρόμοιο πρότυπο παρατηρείται και για το ρυθμό πρόσληψης των φυτικών οργάνων (Εικόνα 3.5). Πιο συγκεκριμένα, τα όργανα φυτών *L. jaronicus* που εμβολιάστηκαν με το ριζόβιο άγριου τύπου εμφανίζουν 47-55% χαμηλότερο ρυθμό πρόσληψης από τα αντίστοιχα όργανα μη εμβολιασμένων φυτών. Τα όργανα των φυτών που φέρουν μη λειτουργικά φυμάτια, όπως και προηγουμένως, παρουσιάζουν ρυθμό πρόσληψης σε παρόμοια επίπεδα με τα αντίστοιχα όργανα μη εμβολιασμένων φυτών. Το φρέσκο βάρος των οργάνων και των τριών τύπων φυτών κυμαίνεται σε παρόμοια επίπεδα με εξαίρεση τα φυμάτια που είναι ελαφρύτερα όταν σχηματίζονται από το μεταλλαγμένο ριζόβιο (Εικόνα 3.5).



**Εικόνα 3.5:** Φρέσκο βάρος και κατανομή του  $^{35}\text{S}$  στα φυτικά όργανα του *L. jaronicus*.

Το ριζικό σύστημα ολόκληρων φυτών που είτε δεν εμβολιάστηκαν είτε εμβολιάστηκαν με το *M. loti* άγριου τύπου ή με το μεταλλαγμένο ριζόβιο *ΔnifH* εκτέθηκαν σε  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ . Μετά από 1 ώρα, τα φυμάτια, οι ρίζες, οι βλαστοί και τα φύλλα διαχωρίστηκαν προσεκτικά και μετρήθηκε το φρέσκο βάρος και η ραδιενέργεια του κάθε οργάνου. Η σχετική κατανομή του φρέσκου βάρους των φυτικών οργάνων υπολογίστηκε ορίζοντας το συνολικό φρέσκο βάρος του φυτού ως το 100%. Ο ρυθμός πρόσληψης θεικών υπολογίστηκε από την περιεκτικότητα του  $^{35}\text{S}$  και το φρέσκο βάρος των οργάνων. Η σχετική κατανομή του  $^{35}\text{S}$  υπολογίστηκε ορίζοντας το συνολικό  $^{35}\text{S}$  που εντοπίζεται σε ολόκληρο το φυτό ως το 100%. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο επτά ανεξάρτητων βιολογικών επαναλήψεων  $\pm$  S.E. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές επισημαίνονται με διαφορετικά γράμματα ( $P < 0.05$ ).

Η σχετική κατανομή του  $^{35}\text{S}$  που προσλαμβάνεται από τα διαφορετικά φυτικά όργανα προσδιορίστηκε ορίζοντας το συνολικό  $^{35}\text{S}$  που εντοπίζεται σε ολόκληρο το φυτό ως το 100%. Η σχετική αφθονία σε  $^{35}\text{S}$  που παρατηρείται στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια είναι υψηλότερη από ότι στα μη λειτουργικά φυμάτια που φέρουν το *ΔnifH* στέλεχος (Εικόνα 3.5). Οι ρίζες που έχουν φυμάτια ανεξάρτητα από το αν είναι λειτουργικά ή όχι επιδεικνύουν 25% χαμηλότερη σχετική αφθονία σε  $^{35}\text{S}$  σε σύγκριση με τις μη εμβολιασμένες ρίζες. Αυτό συνοδεύεται από υψηλότερη σχετική αφθονία σε  $^{35}\text{S}$  στα φύλλα των φυτών που εμβολιάστηκαν με το *M. loti* άγριου τύπου ή με το μεταλλαγμένο στέλεχος *ΔnifH* συγκριτικά με τα φύλλα μη εμβολιασμένων φυτών.

### 3.5 Μελέτη του ρυθμού πρόσληψης θεικών και της ροής τους στις διάφορες δεξαμενές θείου

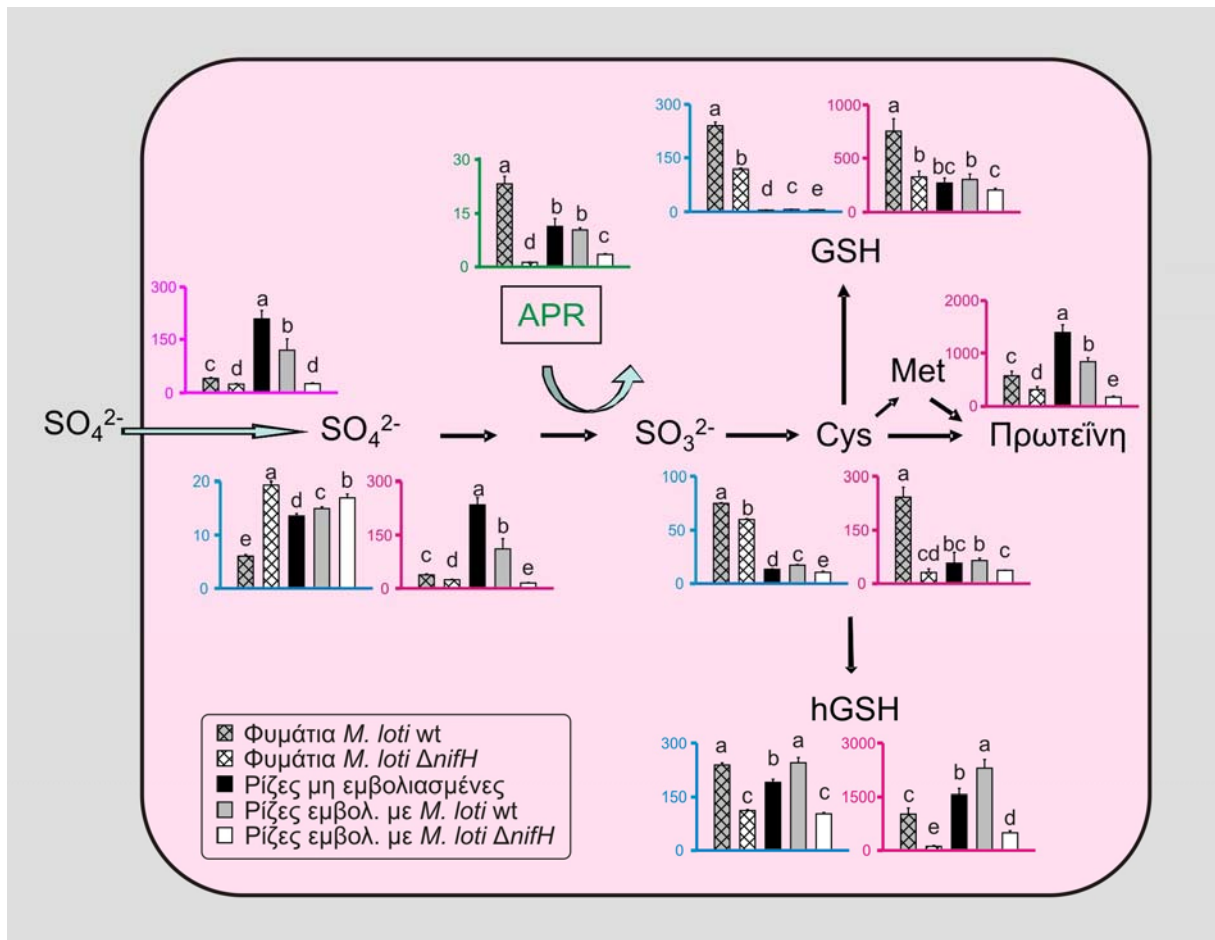
Με σκοπό να μελετηθεί η δυναμική των αζωτοδεσμευτικών φυματίων ως αφομοιωτές θείου, η ροή του θείου μέσω του μονοπατιού αναγωγής και αφομοίωσης των θεικών προσδιορίστηκε τόσο σε φυμάτια και όσο και σε ρίζες φυτών *L. japonicus* ηλικίας 6 εβδομάδων που είτε δε εμβολιάστηκαν είτε εμβολιάστηκαν με το *M. loti* άγριου τύπου ή με το μεταλλαγμένο στέλεχος *ΔnifH*. Για το λόγο αυτό, φυμάτια ή ρίζες φυτών *L. japonicus* μεταφέρθηκαν στις κωνικές φιάλες και επώαστηκαν υπό συνεχή ανάδευση για 4 ώρες σε προσαρμοσμένο θρεπτικό διάλυμα Hoagland που περιείχε  $^{35}\text{S}$ -θειικά. Ο ρυθμός πρόσληψης θεικών καθώς και η  $^{35}\text{S}$ -ροή στα αποθέματα θεικών, θειολών και πρωτεΐνης μετρήθηκαν. Επιπρόσθετα, προσδιορίστηκαν η συγκέντρωση θεικών και θειολών, καθώς και η δραστικότητα της αναγωγής του APS. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε οκτώ ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις. Λόγω του ότι το πρότυπο της συγκέντρωσης θεικών και θειολών, όπως και της δραστικότητας της αναγωγής του APS εμφανίζονται παρόμοια με αυτά που περιγράφεται στις παραγράφους 3.1, 3.2 και 3.3, σε αυτή την παράγραφο θα εστιάσουμε κυρίως στις  $^{35}\text{S}$ -ροές στις διάφορες δεξαμενές θείου.

Η πρόσληψη θεικών από τα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια εμφανίζεται 65% χαμηλότερη από τις ρίζες που εμβολιάστηκαν με το ριζόβιο άγριου τύπου (Εικόνα 3.6). Η  $^{35}\text{S}$ -ροή στα εσωτερικά αποθέματα θεικών είναι αντίστοιχα χαμηλότερη στα *fix<sup>+</sup>* φυμάτια σε σύγκριση με τις ρίζες των αντίστοιχων φυτών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια η  $^{35}\text{S}$ -ροή στα αποθέματα κυστεΐνης αγγίζει τα  $242.7 \pm 27.8 \text{ pmol } ^{35}\text{S } 4\text{h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FW}$  αντιπροσωπεύοντας μια σχεδόν 4 φορές υψηλότερη  $^{35}\text{S}$ -ροή συγκριτικά με τις ρίζες των *fix<sup>+</sup>* φυτών. Η ιδιαίτερα υψηλή  $^{35}\text{S}$ -ροή στα αποθέματα κυστεΐνης που παρατηρείται στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια υποδεικνύει το σημαντικό ρόλο των φυματίων στην αφομοίωση του θείου. Αυτό επιτυγχάνεται χάρη στην υψηλότερη

δραστικότητα αναγωγής του APS που επιδεικνύουν τα *fix<sup>+</sup>* φυμάτια σε σύγκριση με τις ρίζες των αντίστοιχων φυτών. Όπως με την κυστεΐνη, τα λειτουργικά φυμάτια εμφανίζουν 2.5 φορές υψηλότερη <sup>35</sup>S-ροή στα αποθέματα γλουταθειόνης σε σύγκριση με τις ρίζες που εμβολιάστηκαν με το *M. loti* wt. Ωστόσο, η <sup>35</sup>S-ροή στα αποθέματα ομογλουταθειόνης στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια είναι 55% χαμηλότερη σε σύγκριση με αυτή που παρατηρείται στις ρίζες των αντίστοιχων φυτών. Παρά την υψηλότερη <sup>35</sup>S-ροή στα αποθέματα κυστεΐνης, τα φυμάτια που σχηματίστηκαν από το ριζόβιο άγριου τύπου έχουν 30% χαμηλότερη <sup>35</sup>S-ροή στα αποθέματα πρωτεΐνης από ότι οι αντίστοιχες ρίζες. Τα *fix<sup>-</sup>* φυμάτια που σχηματίστηκαν από το μεταλλαγμένο στέλεχος *ΔnifH* επιδεικνύουν περίπου 60% χαμηλότερη πρόσληψη θεικών συνοδευόμενη από χαμηλότερη <sup>35</sup>S-ροή στα εσωτερικά αποθέματα θεικών σε σύγκριση με τα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια. Η <sup>35</sup>S-ροή στα αποθέματα κυστεΐνης που παρατηρείται στα *fix<sup>-</sup>* φυμάτια αντιπροσωπεύει μόλις το 10% από αυτή των λειτουργικών φυματίων, η οποία συμπίπτει με τη δραματική μείωση της δραστηριότητας της αναγωγής του APS που εμφανίζεται κατά 95% χαμηλότερη συγκριτικά με τα *fix<sup>+</sup>* φυμάτια. Ομοίως, η <sup>35</sup>S-ροή στα αποθέματα γλουταθειόνης και ομογλουταθειόνης στα μη λειτουργικά φυμάτια μειώθηκε κατά 60% και 90%, αντίστοιχα, σε σύγκριση με τα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια. Ταυτόχρονα, η <sup>35</sup>S-ροή στα αποθέματα πρωτεΐνης εμφανίζεται 45% χαμηλότερη στα *fix<sup>-</sup>* φυμάτια από ότι στα λειτουργικά φυμάτια. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν τη σημαντικά υψηλότερη συνεισφορά των αζωτοδεσμευτικών φυματίων στην αφομοίωση των θεικών σε σχέση με τις ρίζες.

Η πρόσληψη θεικών στις ρίζες που εμβολιάστηκαν με το *M. loti* wt εμφανίζεται κατά 50% μειωμένη από ότι στις μη εμβολιασμένες ρίζες (Εικόνα 3.6). Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με τη χαμηλότερη <sup>35</sup>S-ροή στα εσωτερικά αποθέματα θεικών που παρατηρείται στις ρίζες των αζωτοδεσμευτικών φυτών σε σύγκριση με τις μη εμβολιασμένες ρίζες. Στις ρίζες που εμβολιάστηκαν με το ριζόβιο άγριου τύπου η δραστηριότητα της αναγωγής του APS βρίσκεται σε παρόμοια επίπεδα με αυτή που μετράται στις μη εμβολιασμένες ρίζες. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα οι ρίζες τόσο των αζωτοδεσμευτικών όσο και των μη εμβολιασμένων φυτών να παρουσιάζουν παρόμοια <sup>35</sup>S-ροή στα αποθέματα κυστεΐνης και γλουταθειόνης. Αντίθετα, στις ρίζες των *fix<sup>+</sup>* φυτών παρατηρείται σχεδόν 50% αύξηση της <sup>35</sup>S-ροής στα αποθέματα ομογλουταθειόνης σε σύγκριση με τις μη εμβολιασμένες ρίζες σε βάρος της <sup>35</sup>S-ροής στα αποθέματα πρωτεΐνης που είναι 40% χαμηλότερη στις ρίζες των *fix<sup>+</sup>* φυτών από ότι στις μη εμβολιασμένες ρίζες. Στις ρίζες που εμβολιάστηκαν με το μεταλλαγμένο ριζόβιο *ΔnifH*, η πρόσληψη θεικών εμφανίζεται σημαντικά χαμηλότερη από ότι στις ρίζες των *fix<sup>+</sup>* φυτών, η οποία αντικατοπτρίζεται και στη χαμηλότερη <sup>35</sup>S-ροή στα εσωτερικά αποθέματα

θεικών. Η  $^{35}\text{S}$ -ροή στα αποθέματα τόσο της κυστεΐνης όσο και της γλουταθειόνης στις ρίζες των *fix<sup>-</sup>* φυτών εμφανίζεται ελάχιστα χαμηλότερη από ότι στις ρίζες των αζωτοδεσμευτικών φυτών, ενώ βρίσκεται σε παρόμοια επίπεδα με τις αντίστοιχες  $^{35}\text{S}$ -ροές που παρατηρούνται στις μη εμβολιασμένες ρίζες. Αντίθετα, στις ρίζες των φυτών που φέρουν μη λειτουργικά φυμάτια, η  $^{35}\text{S}$ -ροή στα αποθέματα ομογλουταθειόνης παρουσιάζεται ιδιαίτερα μειωμένη σε σύγκριση με τις ρίζες των *fix<sup>+</sup>* φυτών. Ομοίως, η  $^{35}\text{S}$ -ροή στα αποθέματα πρωτεΐνης είναι σημαντικά χαμηλότερη στις ρίζες των *fix<sup>-</sup>* φυτών από ότι στις ρίζες που φέρουν λειτουργικά φυμάτια. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι ο σχηματισμός λειτουργικών φυματίων έχει ως



**Εικόνα 3.6:** Συγκέντρωση S-μεταβολιτών και  $^{35}\text{S}$ -ροή στις διάφορες δεξαμενές

Ρίζες μη εμβολιασμένων φυτών *L. jaronicus*, καθώς και φυμάτια και ρίζες φυτών που εμβολιάστηκαν με το *M. loti* wt ή το *ΔnifH* στέλεχος αποκόπηκαν και εκτέθηκαν σε  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  για 4 ώρες με σκοπό τον προσδιορισμό της πρόσληψης θεικών και της  $^{35}\text{S}$ -ροής στις διάφορες δεξαμενές. Η πρόσληψη θεικών ( $\text{nmol } ^{35}\text{S } 4\text{h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{FW}$ ) επισημαίνεται με άξονες μωβ χρώματος και η ενζυμική δραστηριότητα της αναγωγάσης του APS (APR) ( $\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{FW}$ ) με άξονες πράσινου χρώματος. Η συγκέντρωση θεικών ( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{FW}$ ) και θειολών ( $\text{nmol g}^{-1} \text{FW}$ ) παρουσιάζεται με άξονες μπλε χρώματος. Η  $^{35}\text{S}$ -ροή στα εσωτερικά αποθέματα θεικών ( $\text{nmol } ^{35}\text{S } 4\text{h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{FW}$ ), θειολών ( $\text{pmol } ^{35}\text{S } 4\text{h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{FW}$ ) και πρωτεΐνης ( $\text{pmol } ^{35}\text{S } 4\text{h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{FW}$ ) επισημαίνονται με άξονες φούξια χρώματος. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο οκτώ ανεξάρτητων βιολογικών επαναλήψεων  $\pm$  S.E. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές επισημαίνονται με διαφορετικά γράμματα ( $P < 0.05$ ).

αποτέλεσμα την μετατόπιση της αφομοίωσης των θειικών στις ρίζες ευνοώντας τη βιοσύνθεση ομογλουταθειόνης.

### 3.6 Μελέτη του μεταγραφικού προτύπου έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του θείου στο *L. japonicus*

#### 3.6.1 *In silico* διερεύνηση και ανάλυση γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του θείου στο *L. japonicus*

Για τον εντοπισμό γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του θείου πραγματοποιήθηκε *in silico* έρευνα σε δημόσιες βάσεις δεδομένων και συγκεκριμένα στη miyakogusa.jp<sup>1</sup>, η οποία περιλαμβάνει τμήμα του γονιδιώματος του *L. japonicus* που έχει αλληλουχηθεί μέχρι σήμερα και στη DFCI<sup>2</sup>, η οποία περιλαμβάνει λίστα μεταγραφόμενων αλληλουχιών του *L. japonicus*. Ως ιχνηλάτες για τον εντοπισμό των υπό μελέτη γονιδίων χρησιμοποιήθηκαν αλληλουχίες ήδη χαρακτηρισμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην πρόσληψη, αναγωγή και αφομοίωση των θειικών. Τα γονίδια *L. japonicus* που βρέθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 3.1.

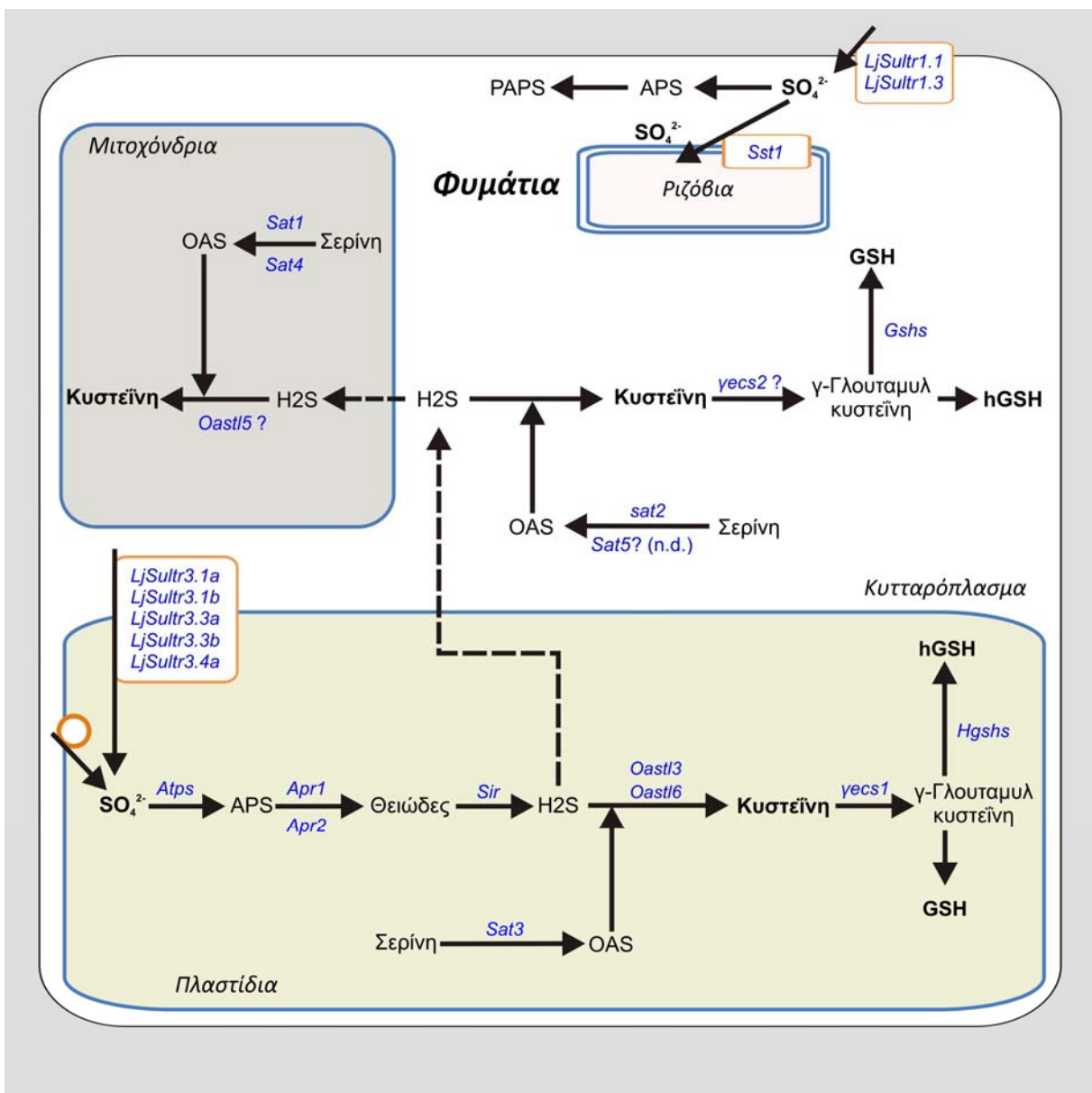
**Πίνακας 3.1:** Γονίδια του *L. japonicus* που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του θείου.

Σύμβολο γονιδίου	Κωδικός γονιδίου	EC	Περιγραφή
<i>Sst1</i>	chr2.CM0610.70.r2.m		Μεταφορέας θειικών
<i>LjSultr3.1a</i>	chr1.CM0322.150.r2.a		Μεταφορέας θειικών
<i>LjSultr3.1b</i>	chr5.CM0024.290.r2.m		Μεταφορέας θειικών
<i>LjSultr3.3a</i>	TC73148		Μεταφορέας θειικών
<i>LjSultr3.3b</i>	TC64492		Μεταφορέας θειικών
<i>LjSultr3.4a</i>	LjNEST96e4r CB829305		Μεταφορέας θειικών
<i>LjSultr1.1</i>	chr6.CM0314.360.r2.m		Μεταφορέας θειικών
<i>LjSultr1.3</i>	LjSGA_009447.1		Μεταφορέας θειικών
<i>Atps</i>	chr5.CM0200.440.r2.a	2.7.7.4 & 2.7.1.25	Σουλφουρυλάση του ATP
<i>Apr1</i>	TC76444	1.8.4.8	Αναγωγή του APS
<i>Apr2</i>	chr6.LjT01P07.200.r2.d	1.8.4.8	Αναγωγή του APS
<i>Sir</i>	TC64243	1.8.1.2	Αναγωγή του θειώδους
<i>Sat1</i>	chr2.CM0272.210.r2.m	2.3.1.30	O-ακετυλο-μεταφοράση της σερίνης
<i>Sat2</i>	chr3.CM0406.140.r2.d	2.3.1.30	O-ακετυλο-μεταφοράση της σερίνης
<i>Sat3</i>	chr6.CM0245.580.r2.a	2.3.1.30	O-ακετυλο-μεταφοράση της σερίνης
<i>Sat4</i>	chr2.LjT06P13.170.r2.d	2.3.1.30	O-ακετυλο-μεταφοράση της σερίνης

<sup>1</sup> <http://www.kazusa.or.jp/lotus/>

<sup>2</sup> *L. japonicus* gene index, [http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=L\\_japonicus](http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=L_japonicus)

<i>Sat5</i>	LjSGA_120561.1	2.3.1.30	Ο-ακετυλο-μεταφοράση της σερίνης
<i>Oast1</i>	TC62606	2.5.1.47	Θειολολυάση της Ο-ακετυλοσερίνης
<i>Oast2</i>	chr1.LjB12P21.10.r2.m	2.5.1.47	Θειολολυάση της Ο-ακετυλοσερίνης
<i>Oast3</i>	TC61783	2.5.1.47	Θειολολυάση της Ο-ακετυλοσερίνης
<i>Oast4</i>	TC60583	2.5.1.47	Θειολολυάση της Ο-ακετυλοσερίνης
<i>Oast5</i>	TC73997	4.4.1.9 & 2.5.1.47	Συνθετάση της β-κυανοαλανίνης/ Θειολολυάση της Ο-ακετυλοσερίνης
<i>Oast6</i>	TC69085	2.5.1.47	Θειολολυάση της Ο-ακετυλοσερίνης
<i>yecc1</i>	chr4.CM0004.360.r2.m	6.3.2.2	Συνθετάση της γ-γλουταμυλκυστεΐνης
<i>yecc2</i>	chr2.CM0021.3440.r2.m	6.3.2.2	Συνθετάση της γ-γλουταμυλκυστεΐνης
<i>Gshs</i>	chr1.CM0544.610.r2.m	6.3.2.3	Συνθετάση της γλουταθειόνης
<i>Hgshs</i>	chr1.CM0544.600.r2.m	6.3.2.3	Συνθετάση της ομογλουταθειόνης



**Εικόνα 3.7:** Σχηματική απεικόνιση του βιοχημικού μονοπατιού της πρόσληψης, ενεργοποίησης αναγωγής και αφομοίωσης του θείου στο *L. japonicus*.

Οι αμινοξικές ακολουθίες των γονιδίων που εντοπίστηκαν χρησιμοποιήθηκαν για την *in silico* πρόβλεψη πιθανού υποκυτταρικού εντοπισμού των αντίστοιχων πρωτεϊνών μέσω των online εφαρμογών iPSORT (<http://ipsort.hgc.jp/>) και TargetP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>). Τέλος, με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν κατά την *in silico* πρόβλεψη του υποκυτταρικού εντοπισμού, σχεδιάστηκε το βιοχημικό μονοπάτι της πρόσληψης, ενεργοποίησης αναγωγής και αφομοίωσης του θείου σε ένα τυπικό κύτταρο *L. jaronicus* (Εικόνα 3.7).

Ωστόσο, ο υποκυτταρικός εντοπισμός της αναγωγάσης του APS, APR1 που θεωρείται ένζυμο-κλειδί για το μεταβολισμό του θείου επιβεβαιώθηκε με παροδικό μετασχηματισμό επιδερμικών κυττάρων φύλλων *Arabidopsis* με την πλασμιδιακή κατασκευή που εκφράζει τη χιμαιρική πρωτεΐνη GFP-APR1 (Παράγραφος 3.8). Παράλληλα, ο χρονικός και χωροταξικός εντοπισμός των γονιδίων *Apr1* και *Apr2* που κωδικοποιούν για ισοτύπους της αναγωγάσης του APS μελετήθηκε σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια των αζωτοδεσμητικών φυματίων με τη μέθοδο του RNA-RNA *in situ* (Παράγραφος 3.9). Στη συνέχεια, σχεδιάστηκαν εξειδικευμένοι εκκινητές για τα γονίδια που εμπλέκονται στην πρόσληψη, αναγωγή και αφομοίωση του θείου και προσδιορίστηκαν τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων με τη βοήθεια της τεχνικής της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qRT-PCR) σε όργανα φυτών *L. jaronicus* που βρίσκονταν κάτω από διαφορετικές συνθήκες συμβίωσης ή μη (Παράγραφοι 3.6.2, 3.6.3 και 3.6.4). Ως εσωτερικός μάρτυρας για την κανονικοποίηση μικρών διαφορών στις ποσότητες των cDNA χρησιμοποιήθηκε ένα σταθερά εκφραζόμενο γονίδιο του *L. jaronicus* που κωδικοποιεί για ουβικιτίνη.

### **3.6.2 Μελέτη του μεταγραφικού προτύπου έκφρασης γονιδίων του *L. jaronicus* που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του θείου κατά τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση**

Με σκοπό τη μελέτη του μεταγραφικού προτύπου έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του θείου κατά τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση, αναπτύχθηκαν φυτά *L. jaronicus* που εμβολιάστηκαν με το ριζόβιο αγρίου τύπου (wt) *M. loti* R7A. Συλλέχθηκαν φυμάτια 14, 21 και 28 ημερών καθώς και ρίζες, βλαστοί και φύλλα. Ακολούθησε απομόνωση ολικού RNA και παραγωγή συμπληρωματικού DNA (cDNA). Η μελέτη του προτύπου έκφρασης πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qRT-PCR) με χρήση εξειδικευμένων εκκινητών. Οι εξειδικευμένοι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στην πρόσληψη, αναγωγή και αφομοίωση του θείου σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού Primer Express (Applied Biosystems), ώστε το μέγεθος

της ενισχυόμενης περιοχής να κυμαίνεται από 70 έως 150 ζεύγη βάσεων (Παράρτημα Α, πίνακας Α.1). Οι αντιδράσεις qRT-PCR πραγματοποιήθηκαν σε τρεις βιολογικές επαναλήψεις. Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης παρουσιάζονται στην εικόνα 3.8. Οι λόγοι των σχετικών επιπέδων έκφρασης μεταξύ των διαδοχικών σταδίων ανάπτυξης των φυματίων και των μη-συμβιωτικών οργάνων των αζωτοδεμευτικών φυτών *L. jaronicus* παρουσιάζονται στους πίνακες Α.2, Α.3, Α.4 και Α.5 του παραρτήματος Α, ενώ η στατιστική ανάλυση των δεδομένων παρουσιάζεται αναλυτικά στους πίνακες Β.1 και Β.2 του παραρτήματος Β.

Στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια και ιδιαίτερα στα νεαρά φυμάτια 14 ημερών παρατηρήθηκε μεταγραφική επαγωγή πολλών γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του θείου σε σχέση με τα μη-συμβιωτικά όργανα του φυτού *L. jaronicus* (Εικόνα 3.8). Ο συμβιωτικός μεταφορέας θειικών *Sst1* (Symbiotic Sulfate Transporter) που είναι απαραίτητος για τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση (Krusell et al., 2005) εκφράζεται εξειδικευμένα στα φυμάτια όλων των αναπτυξιακών σταδίων εμφανίζοντας 27-1400 φορές υψηλότερα σχετικά επίπεδα μεταγραφημάτων σε σύγκριση με τα μη-συμβιωτικά όργανα. Η συσσώρευση μεταγραφημάτων των μεταφορέων θειικών *LjSultr3.1b* και *LjSultr1.1* εμφανίζεται, επίσης, υψηλότερη σε όλα αναπτυξιακά στάδια των φυματίων και κυρίως στα νεαρά φυμάτια 14 ημερών σε σχέση με τα μη-συμβιωτικά όργανα. Η μέγιστη συσσώρευση mRNA του μεταφορέα θειικών *LjSultr3.4a* εμφανίζεται στα νεαρά φυμάτια 14 ημερών. Αντίθετα, τα mRNA των μεταφορέων θειικών *LjSultr3.1a* και *LjSultr1.3* συσσωρεύονται κυρίως στους βλαστούς των αζωτοδεσμευτικών φυτών. Παρόλα αυτά τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του *LjSultr1.3* παραμένουν σχετικά χαμηλά. Τα μεταγραφήματα των μεταφορέων θειικών *LjSultr3.3a* και *LjSultr3.3b* συσσωρεύονται κυρίως στους βλαστούς και τα φύλλα των αζωτοδεσμευτικών φυτών.

Όσον αφορά τα γονίδια που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση και αναγωγή των θειικών, η σουλφουρυλάση του ATP *Atps* εκφράζεται σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια του φυματίου, αν και τα υψηλότερα επίπεδα mRNA εμφανίζονται στις ρίζες των αζωτοδεσμευτικών φυτών (Εικόνα 3.8). Η έκφραση του *Apr2*, που αντιπροσωπεύει τον κύριο ισότυπο APS αναγωγάσης στα φυμάτια, επάγεται 3-9 φορές περισσότερο στα νεαρά φυμάτια 14 ημερών από ότι στα μη-συμβιωτικά όργανα. Αντίθετα, η υψηλότερη συσσώρευση μεταγραφημάτων του ισότυπου *Apr1* παρατηρήθηκε στις ρίζες. Τέλος, τα υψηλότερα επίπεδα mRNA της αναγωγάσης θειώδους *Sir* εμφανίστηκαν στα νεαρά φυμάτια 14 ημερών.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η βιοσύνθεση κυστεΐνης επάγεται μεταγραφικά στα φυμάτια όλων των αναπτυξιακών σταδίων, καθώς η έκφραση όλων των γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση κυστεΐνης εμφανίζουν υψηλά επίπεδα



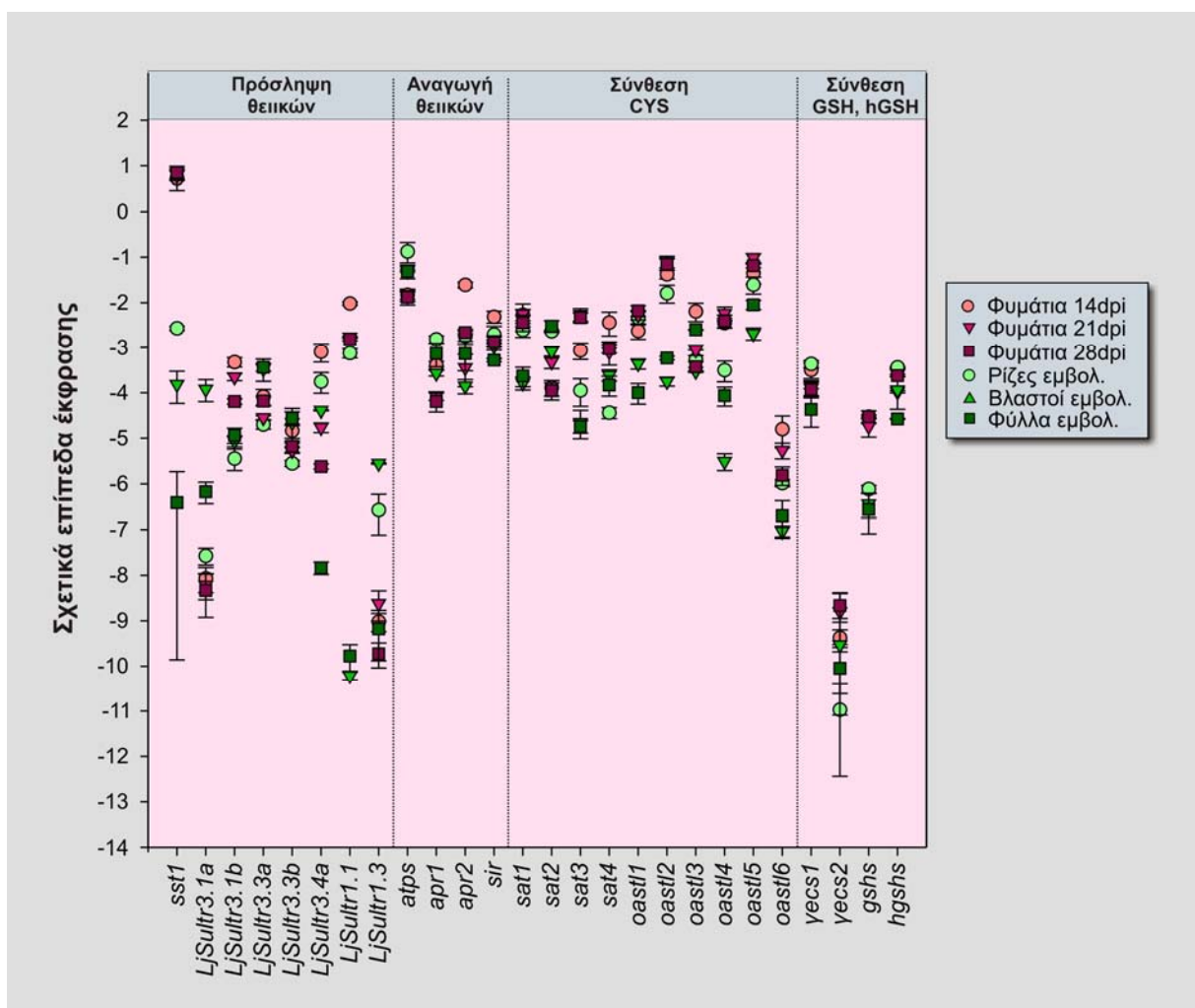
μεταγραφημάτων με εξαίρεση την Ο-ακετυλο-μεταφοράση της σερίνης *Sat2*, η οποία στα φυμάτια εμφανίζει την χαμηλότερη συσσώρευση μεταγραφημάτων (Εικόνα 3.8). Πιο συγκεκριμένα, οι ισότυποι της Ο-ακετυλο-μεταφοράσης της σερίνης *Sat3* και *Sat4* εκφράζονται κυρίως στα φυμάτια. Τα επίπεδα mRNA της *Sat3* είναι 2 φορές υψηλότερα στα ώριμα φυμάτια 21 και 28 ημερών συγκριτικά με τα νεαρά φυμάτια 14 ημερών, ενώ τα μεταγραφήματα της *Sat4* στα νεαρά φυμάτια 14 ημερών είναι 2 φορές αφθονότερα από τα ώριμα φυμάτια 21 και 28 ημερών. Η έκφραση των γονιδίων *Sat1* και *Oast1* επάγεται κατά την ανάπτυξη του φυματίου, αν και η επαγωγή δεν είναι στατιστικά σημαντική κατά τη σύγκριση με τις ρίζες. Τα μεταγραφήματα των θειολουασών της Ο-ακετυλοσερίνης *Oast3* και *Oast6* εμφανίζονται αφθονότερα στα νεαρά φυμάτια 14 ημερών αν και τα σχετικά επίπεδα της *Oast6* είναι αρκετά χαμηλά. Η έκφραση των υπόλοιπων θειολουάσων της Ο-ακετυλοσερίνης επάγονται σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια των αζωτοδεσμευτικών φυματίων με κυρίαρχους τους ισότυπους *Oast2* και *Oast5*.

Η μέγιστη συσσώρευση μεταγραφημάτων του γονιδίου *ycs1*, το οποίο αντιπροσωπεύει τον κυρίαρχο ισότυπο της συνθετάσης της γ-γλουταμυλκυστεΐνης, αφού τα σχετικά επίπεδα έκφρασής του είναι 100 φορές υψηλότερα από αυτά του *ycs2*, παρατηρείται στις ρίζες και στα νεαρά φυμάτια 14 ημερών (Εικόνα 3.8). Αντίθετα, τα επίπεδα μεταγραφημάτων της συνθετάσης της γ-γλουταμυλκυστεΐνης *ycs2* είναι 5-10 φορές υψηλότερα στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια ανεξαρτήτως του αναπτυξιακού σταδίου από ότι στις ρίζες. Τα μεταγραφήματα της συνθετάσης της γλουταθειόνης *Gshs* είναι 4-8 φορές πιο άφθονα σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια των φυματίων από ότι στα μη-συμβιωτικά όργανα. Αντίθετα, τα μέγιστα σχετικά επίπεδα έκφρασης της συνθετάσης της ομογλουταθειόνης *Hgshs* εμφανίζονται στις ρίζες και στα νεαρά φυμάτια 14 ημερών.

### **3.6.3 Μελέτη του μεταγραφικού προτύπου έκφρασης γονιδίων του *L. jaronicus* που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του θείου σε *fix<sup>-</sup>* φυμάτια που σχηματίστηκαν από τα μεταλλαγμένα στελέχη *ΔnifA* και *ΔnifH*.**

Με σκοπό να ελεγχθεί αν οι μεταγραφικές αλλαγές του μεταβολισμού του θείου που παρατηρούνται στα φυμάτια οφείλονται στη λειτουργική συμβιωτική αζωτοδέσμευση μελετήθηκε το μεταγραφικό πρότυπο έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων σε μη λειτουργικά φυμάτια (*fix<sup>-</sup>*). Αναπτύχθηκαν φυτά *L. jaronicus* που εμβολιάστηκαν με το *M. loti* wt, το *ΔnifA* ή το *ΔnifH*. Ο εμβολιασμός με τα μεταλλαγμένα στελέχη *ΔnifA* και *ΔnifH* οδηγεί στο σχηματισμό φυματίων που στερούνται της ικανότητας συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης. Η διαφορά μεταξύ των δύο τύπων *fix<sup>-</sup>* φυματίων είναι ότι τα φυμάτια

*ΔnifA* περιέχουν μη διαφοροποιημένα βακτήρια, ενώ τα φυμάτια *ΔnifH* αποικίζονται από πλήρως διαφοροποιημένα βακτηριοειδή. Ακολούθησε απομόνωση ολικού RNA φυματίων και παραγωγή συμπληρωματικού DNA (cDNA). Η μελέτη του προτύπου έκφρασης πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qRT-PCR) με χρήση των εξειδικευμένων εκκινήτων που σχεδιάστηκαν (Παράρτημα Α, πίνακας Α.1). Οι αντιδράσεις qRT-PCR πραγματοποιήθηκαν σε τρεις βιολογικές επαναλήψεις. Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης παρουσιάζονται στην εικόνα 3.9. Οι λόγοι των σχετικών επιπέδων έκφρασης μεταξύ των διαφορετικών τύπων φυματίων, καθώς και η στατιστική ανάλυση των δεδομένων παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα Α.6 του

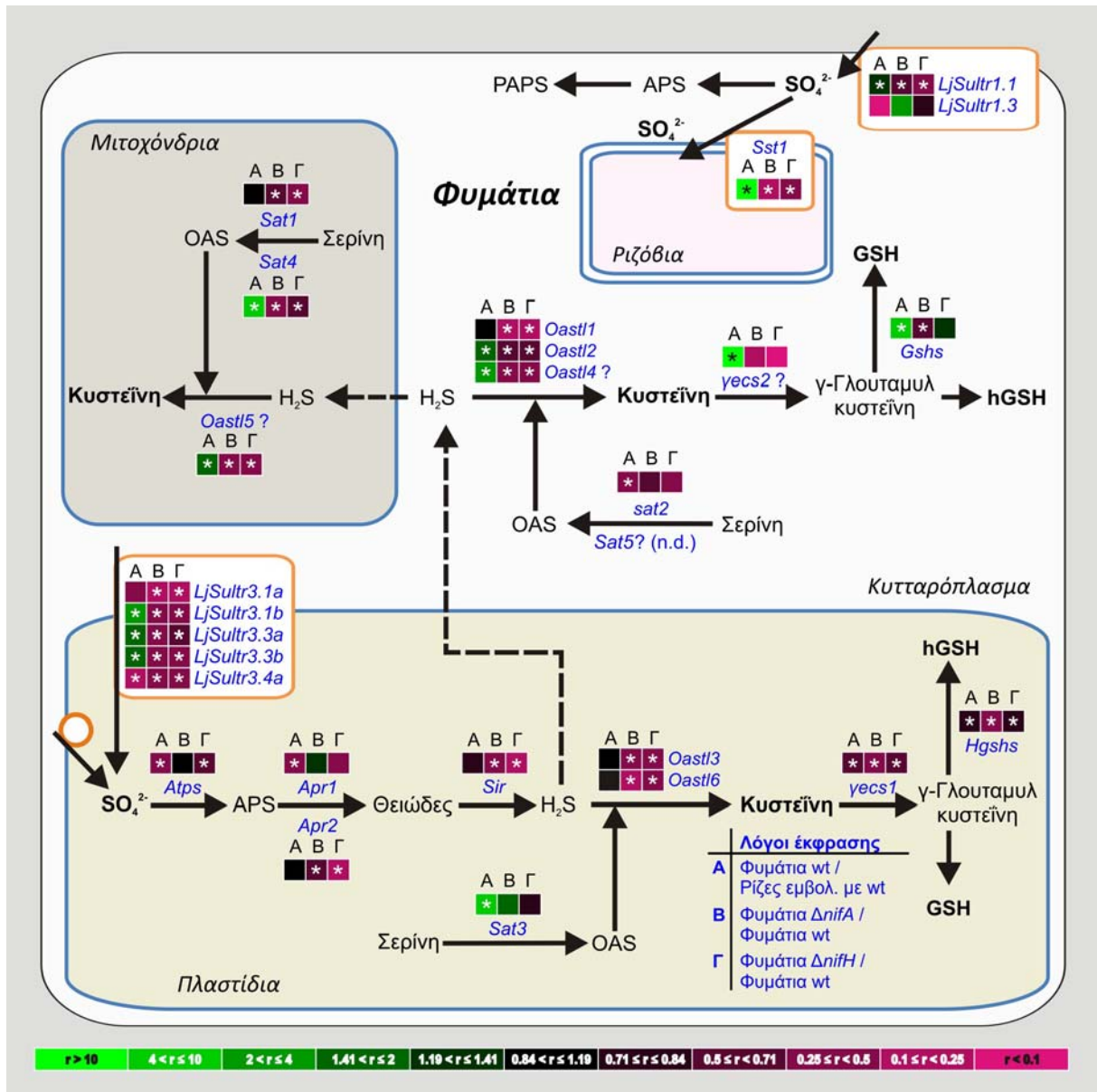


**Εικόνα 3.8:** Μεταγραφικό πρότυπο γονιδίων του *L. jaronicus* που εμπλέκονται στην πρόσληψη, αναγωγή και αφομοίωση των θεικικών κατά τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση.

Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων σε φυμάτια 14, 21 και 28 ημερών, καθώς και σε μη-συμβιωτικά όργανα φυτών *L. jaronicus* που εμβολιάστηκαν με το ριζόβιο *M. loti* wt. Τα επίπεδα έκφρασης κανονικοποιήθηκαν με βάση τα μεταγραφήματα του σταθερά εκφραζόμενου γονιδίου της ουβικιτίνης. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι τριών ανεξάρτητων βιολογικών επαναλήψεων  $\pm$  S.E και παρουσιάζονται σε λογαριθμική κλίμακα με βάση το e.

παραρτήματος Α και στον πίνακα Β.3 του παραρτήματος Β, αντίστοιχα.

Στα *fix<sup>-</sup>* φυμάτια που σχηματίστηκαν είτε από το μεταλλαγμένο στέλεχος *ΔnifA* είτε από το *ΔnifH* η έκφραση των περισσότερων γονιδίων που εμπλέκονται στην πρόσληψη, αναγωγή και αφομοίωση του θείου καταστέλλεται συγκριτικά με τα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια (Εικόνα 3.9). Η συσσώρευση μεταγραφημάτων όλων των μεταφορέων θειικών είναι χαμηλότερη από αυτή των *fix<sup>+</sup>* φυματίων, με εξαίρεση τον *LjSultr1.3* του οποίου τα μεταγραφήματα παραμένουν σταθερά. Τη μεγαλύτερη μεταγραφική καταστολή παρουσιάζει ο συμβιωτικός μεταφορέας θειικών *Sst1* του οποίου τα σχετικά επίπεδα έκφρασης στα φυμάτια *ΔnifA* και *ΔnifH* είναι 8 και 3 φορές χαμηλότερα από τα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια, αντίστοιχα. Όσον αφορά στο μονοπάτι ενεργοποίησης και αναγωγής των θειικών, τα μεταγραφήματα της σουλφουρυλάσης του ATP, *Atps*, εμφανίζονται να είναι 2 φορές λιγότερα στα φυμάτια που σχηματίστηκαν από το μεταλλαγμένο στέλεχος *ΔnifH*, ενώ τα επίπεδα mRNA της APS αναγωγής *Apr2* φαίνεται να είναι χαμηλότερα κατά 1.7 και 4 φορές στα φυμάτια που σχηματίστηκαν από τα μεταλλαγμένα στελέχη *ΔnifA* και *ΔnifH*, αντίστοιχα σε σύγκριση με τα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια (Εικόνα 3.9). Χαμηλότερα εμφανίζονται και τα επίπεδα έκφρασης της αναγωγής του θειώδους *Sir* στα *ΔnifA* και *ΔnifH* φυμάτια κατά 3.4 και 5.9 φορές, αντίστοιχα σε σύγκριση με τα *fix<sup>+</sup>* φυμάτια. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η μεταγραφική καταστολή των περισσότερων γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση κυστεΐνης στα μη λειτουργικά φυμάτια που σχηματίστηκαν από τα μεταλλαγμένα στελέχη *ΔnifA* και *ΔnifH* σε σύγκριση με τα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια (Εικόνα 3.9). Πιο συγκεκριμένα, τα σχετικά επίπεδα έκφρασης 2 μιτοχονδριακών ισοτύπων της Ο-ακετυλο-μεταφοράς της σερίνης, *Sat1* και *Sat4*, καθώς και όλων των ισοτύπων της θειολολυάσης της Ο-ακετυλοσερίνης είναι σημαντικά χαμηλότερα στα *fix<sup>-</sup>* φυμάτια σε σχέση με τα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια. Πέρα από τη βιοσύνθεση κυστεΐνης, τα σχετικά επίπεδα μεταγραφημάτων της συνθετάσης της γ-γλουταμυλκυστεΐνης *yecs1* και της συνθετάσης της ομογλουταθειόνης *Hgshs* εμφανίζονται σημαντικά χαμηλότερα και στους δύο τύπους *fix<sup>-</sup>* φυματίων σε σχέση με τα φυμάτια που σχηματίστηκαν από ριζόβια αγρίου τύπου (Εικόνα 3.9). Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης της συνθετάσης της γλουταθειόνης στα φυμάτια που δημιουργήθηκαν έπειτα από εμβολιασμό με το μεταλλαγμένο στέλεχος είναι 2 φορές χαμηλότερα από τα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια. Η έκφραση των υπόλοιπων γονιδίων που εξετάστηκαν δεν παρουσιάζει καμία στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους διαφορετικούς τύπους φυματίων (Πίνακας Α.6 του παραρτήματος Α και πίνακας Β.3 του παραρτήματος Β).



**Εικόνα 3.9:** Απεικόνιση μεταγραφικών αλλαγών γονιδίων του *L. jaronicus* που εμπλέκονται στην πρόσληψη, αναγωγή και αφομοίωση των θεικών κατά τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση με τη βοήθεια χρωματικού κώδικα.

(A) Χρωματική απεικόνιση των λόγων σχετικών επιπέδων έκφρασης γονιδίων του *L. jaronicus* σε φυμάτια σχηματισμένα από το *M. loti* wt σε σύγκριση με τα επίπεδα έκφρασης στις ρίζες των αντίστοιχων φυτών. (B, Γ) Χρωματική απεικόνιση των λόγων σχετικών επιπέδων έκφρασης γονιδίων σε *fix* φυμάτια σχηματισμένα είτε από το στέλεχος *ΔnifA* είτε από το *ΔnifH*, αντίστοιχα, σε σύγκριση με τα επίπεδα έκφρασης στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια που σχηματίστηκαν από το *M. loti* wt. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τρεις βιολογικές επαναλήψεις. Τα επίπεδα έκφρασης κανονικοποιήθηκαν με βάση τα μεταγραφήματα του σταθερά εκφραζόμενου γονιδίου της ουβικιτίνης.

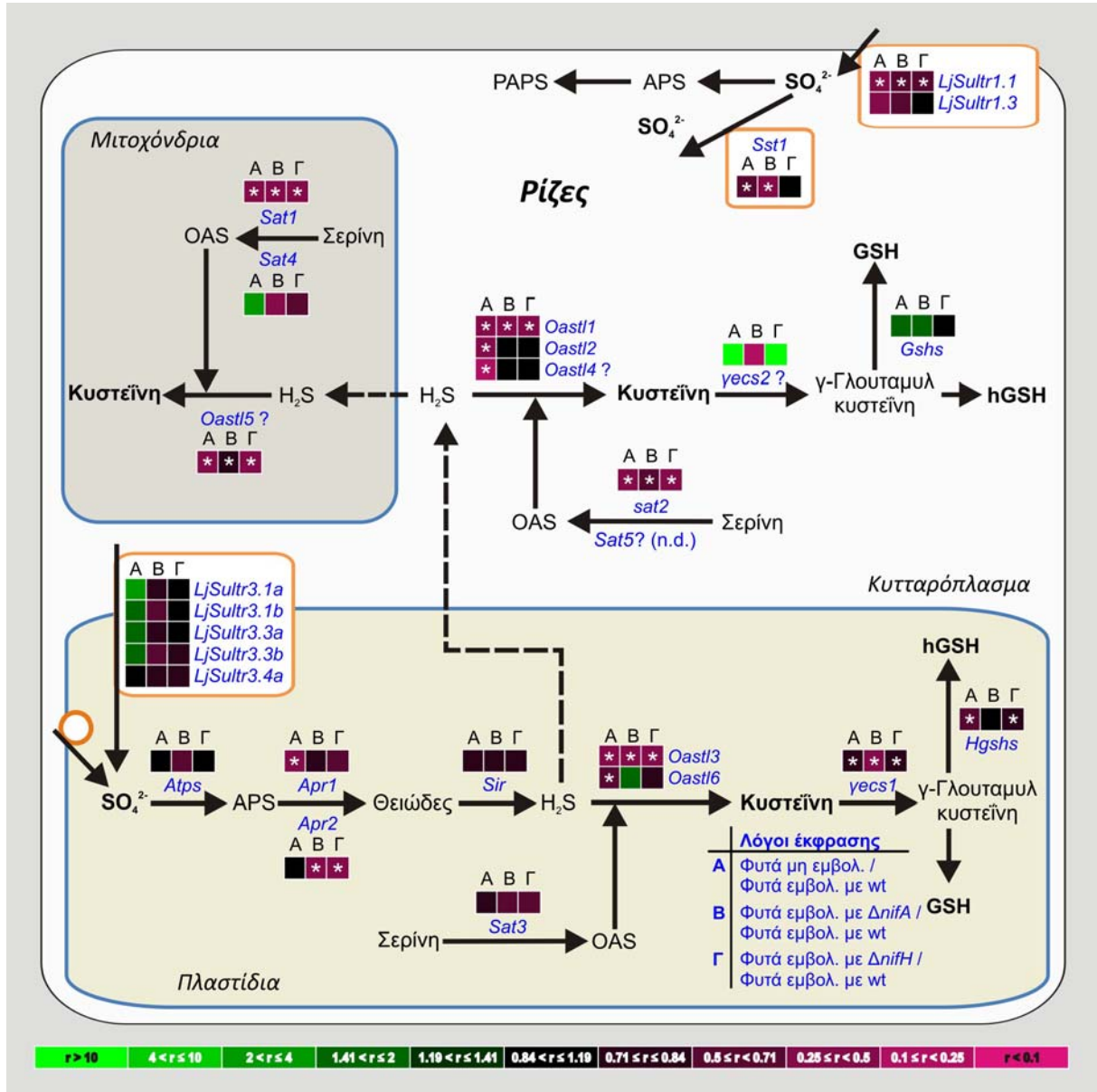
### 3.6.4 Η συμβιωτική αζωτοδέσμευση επιφέρει μεταγραφικές αλλαγές στο μεταβολισμό του θείου σε επίπεδο ολόκληρου φυτού

Με σκοπό να διερευνηθεί αν η μεταγραφική επαγωγή του μεταβολισμού του θείου που παρατηρείται στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια επηρεάζει την έκφραση των αντίστοιχων

γονιδίων σε επίπεδο ολόκληρου φυτού μελετήθηκε το μεταγραφικό πρότυπο έκφρασης αυτών σε μη-συμβιωτικά όργανα. Αναπτύχθηκαν φυτά *L. jaronicus* που είτε δεν εμβολιάστηκαν είτε εμβολιάστηκαν με το *M. loti* wt, το *ΔnifA* ή το *ΔnifH* στέλεχος. Ακολούθησε απομόνωση ολικού RNA από ρίζες, βλαστούς και φύλλα και παραγωγή συμπληρωματικού DNA (cDNA). Η μελέτη του προτύπου έκφρασης πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qRT-PCR) με χρήση των εξειδικευμένων εκκινήτων που σχεδιάστηκαν (Παράρτημα Α, πίνακας Α.1). Οι αντιδράσεις qRT-PCR πραγματοποιήθηκαν σε τρεις βιολογικές επαναλήψεις. Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης παρουσιάζονται στις εικόνες 3.10, 3.11 και 3.12. Οι λόγοι των σχετικών επιπέδων έκφρασης μεταξύ των διαφορετικών τύπων μη-συμβιωτικών οργάνων παρουσιάζονται στους πίνακες Α.7 και Α.8 του παραρτήματος Α, ενώ η στατιστική ανάλυση των δεδομένων παρουσιάζεται αναλυτικά στους πίνακες Β.4 και Β.5 του παραρτήματος Β.

Κατά τη μελέτη του προτύπου έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του θείου παρατηρείται ότι τόσο στις μη εμβολιασμένες ρίζες όσο και στις ρίζες που εμβολιάστηκαν με τα μεταλλαγμένα ριζοβιακά στελέχη πολλά από τα γονίδια εμφανίζουν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης από ότι στις ρίζες των αζωτοδεσμευτικών φυτών, ενώ δε παρατηρείται επαγωγή της έκφρασης κανενός από τα γονίδια που μελετήθηκαν (Εικόνα 3.10). Η έκφραση του μεταφορέα θειικών παρουσιάζεται κατά 74% και 44% χαμηλότερη στις μη εμβολιασμένες ρίζες και στις ρίζες που εμβολιάστηκαν με τα μεταλλαγμένα *fix* στελέχη, αντίστοιχα σε σχέση με τις ρίζες που εμβολιάστηκαν με το ριζόβιο αγρίου τύπου. Συστημικές μεταγραφικές μεταβολές παρατηρούνται και για τα γονίδια που συμμετέχουν στο μονοπάτι της αναγωγής των θειικών (Εικόνα 3.10). Συγκεκριμένα, τα επίπεδα mRNA της APS αναγωγάσης *Apr1* στις μη εμβολιασμένες ρίζες εμφανίζονται 50% χαμηλότερα, ενώ της *Apr2* στις ρίζες που εμβολιάστηκαν είτε με το *ΔnifA* είτε με το *ΔnifH* 60-70% είναι χαμηλότερα από ότι στις ρίζες που εμβολιάστηκαν με το *M. loti* wt. Αναφορικά με το μονοπάτι βιοσύνθεσης της κυστεΐνης, τόσο στις μη εμβολιασμένες ρίζες όσο και στις ρίζες που εμβολιάστηκαν με τα *fix* ριζοβια η συσσώρευση των μεταγραφημάτων των Ο-ακετυλο-μεταφορασών της σερίνης, *Sat1* και *Sat2*, καθώς και των θειολολυασών της Ο-ακετυλοσερίνης *Oast11*, *Oast13* και *Oast15* εμφανίζεται σημαντικά χαμηλότερη από ότι στις ρίζες που εμβολιάστηκαν με το ριζόβιο αγρίου τύπου (Εικόνα 3.10). Στις μη εμβολιασμένες ρίζες τρεις επιπλέον ισότυποι θειολολυάσης της Ο-ακετυλοσερίνης, οι *Oast12*, *Oast14* και *Oast16*, εκφράζονται σε σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με τις εμβολιασμένες ρίζες με το *M. loti* wt. Επιπλέον, τα επίπεδα μεταγραφημάτων της συνθετάσης της γ-γλουταμυλκυστεΐνης *yecs1* είναι χαμηλότερα και στις μη εμβολιασμένες ρίζες και στις

εμβολιασμένες ρίζες με τα *fix<sup>-</sup>* μεταλλαγμένα στελέχη (Εικόνα 3.10). Τέλος, τα επίπεδα mRNA της συνθετάσης της ομογλουταθειόνης *Hgshs* εμφανίζονται σημαντικά χαμηλότερα τόσο στις μη εμβολιασμένες ρίζες όσο και στις εμβολιασμένες ρίζες με το *ΔnifH* στέλεχος σε σχέση με τις ρίζες που εμβολιάστηκαν με ριζόβια αγρίου τύπου.



**Εικόνα 3.10:** Απεικόνιση μεταγραφικών αλλαγών γονιδίων που εμπλέκονται στην πρόσληψη, αναγωγή και αφομοίωση των θεικών στις ρίζες του φυτού *L. jaronicus* κατά τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση με τη βοήθεια χρωματικού κώδικα.

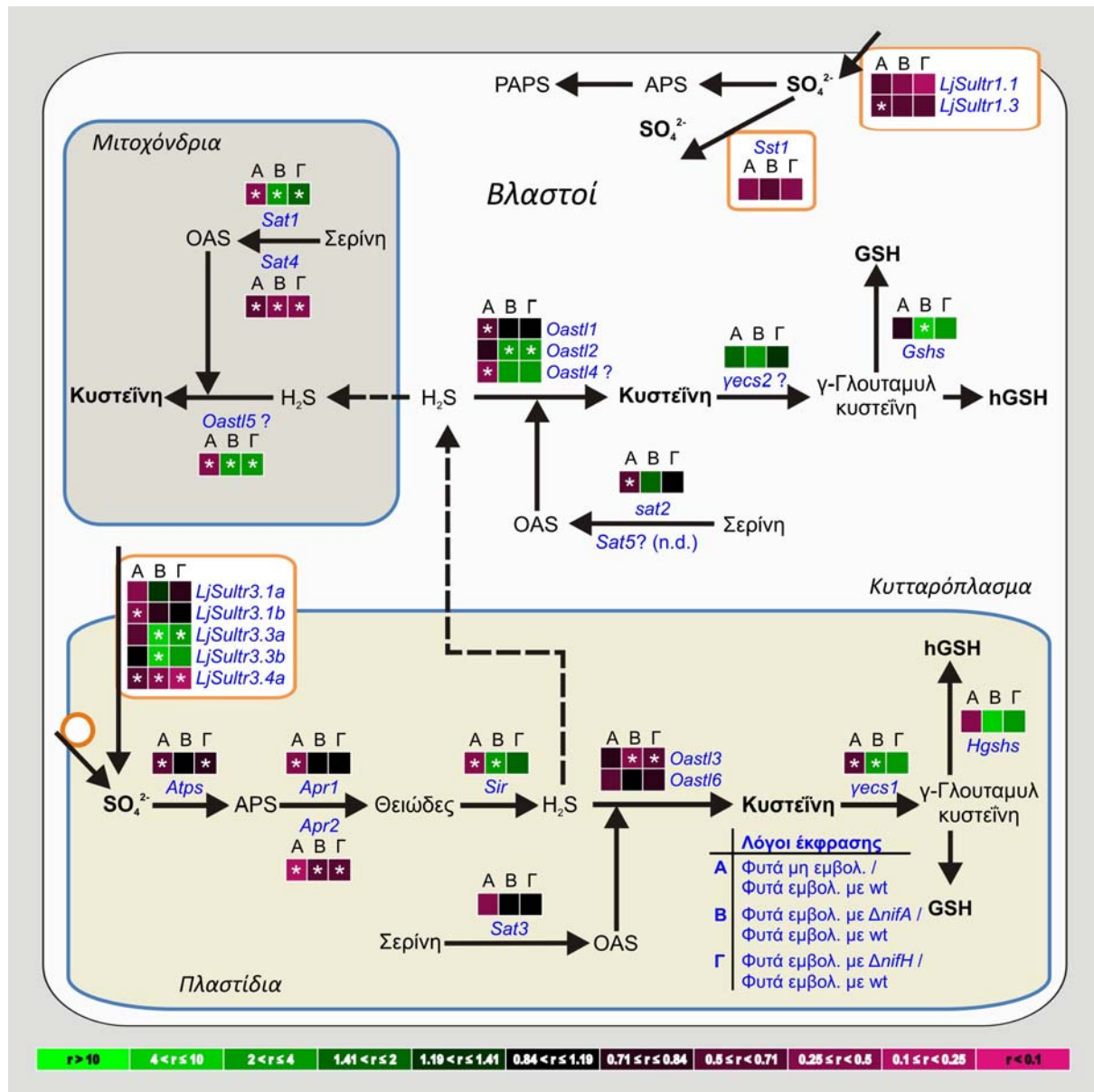
(A) Χρωματική απεικόνιση των λόγων σχετικών επιπέδων έκφρασης γονιδίων του *L. jaronicus* σε μη εμβολιασμένες ρίζες σε σύγκριση με τα επίπεδα έκφρασης ριζών εμβολιασμένων με το *M. loti* wt. (B, Γ) Χρωματική απεικόνιση των λόγων σχετικών επιπέδων έκφρασης γονιδίων σε ρίζες εμβολιασμένες είτε με το στέλεχος *ΔnifA* είτε με το *ΔnifH*, αντίστοιχα, σε σύγκριση με τα επίπεδα έκφρασης σε ρίζες εμβολιασμένες με το *M. loti* wt. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τρεις βιολογικές επαναλήψεις. Τα επίπεδα έκφρασης κανονικοποιήθηκαν με βάση τα μεταγραφήματα του σταθερά εκφραζόμενου γονιδίου της ουβικιτίνης.

Τα επίπεδα mRNA του μεταφορέα θειικών *LjSultr3.4a* τόσο στους βλαστούς μη εμβολιασμένων φυτών όσο και στους βλαστούς φυτών που εμβολιάστηκαν με τα μεταλλαγμένα στελέχη *ΔnifA* και *ΔnifH* εμφανίζονται μειωμένα σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα στους βλαστούς αζωτοδεσμευτικών φυτών (Εικόνα 3.11). Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των μεταφορέων θειικών *LjSultr3.1b* και *LjSultr1.3* στους βλαστούς μη εμβολιασμένων φυτών εμφανίζονται κατά 61% και 46% χαμηλότερα από ότι στους βλαστούς φυτών εμβολιασμένων με το *M. loti* αγρίου τύπου. Στους βλαστούς και των δύο τύπων *fix<sup>+</sup>* φυτών συσσωρεύονται 4-7 φορές περισσότερα μεταγραφήματα του μεταφορέα θειικών *LjSultr3.3a*, ενώ στους βλαστούς φυτών που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος *ΔnifA* τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του μεταφορέα θειικών *LjSultr3.3b* είναι 5.7 φορές υψηλότερα από ότι στους βλαστούς αζωτοδεσμευτικών φυτών. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι στους βλαστούς μη εμβολιασμένων φυτών παρατηρείται μεταγραφική καταστολή όλου του μονοπατιού της ενεργοποίησης και αναγωγής των θειικών καθώς και πολλών γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση κυστεΐνης και (ομο)γλουταθειόνης σε σύγκριση με τους βλαστούς φυτών εμβολιασμένων με ριζόβια αγρίου τύπου (Εικόνα 3.11). Πιο συγκεκριμένα, η έκφραση του γονιδίου *Atps* που κωδικοποιεί για σουλφουρυλάση του ATP εμφανίζεται κατά 35% χαμηλότερη στους βλαστούς μη εμβολιασμένων φυτών σε σύγκριση με τους βλαστούς αζωτοδεσμευτικών φυτών. Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των δύο ισότυπων της αναγωγής του APS, *Apr1* και *Apr2*, στους βλαστούς μη εμβολιασμένων φυτών αντιπροσωπεύουν μόνο το 28% και 21%, αντίστοιχα, των επιπέδων που παρατηρούνται στους βλαστούς *fix<sup>+</sup>* φυτών. Επίσης, τα σχετικά επίπεδα μεταγραφημάτων του γονιδίου *Sir* που κωδικοποιεί για την αναγωγή του θειώδους είναι κατά 64% χαμηλότερα στους βλαστούς μη εμβολιασμένων φυτών σε σχέση με τους βλαστούς αζωτοδεσμευτικών φυτών. Όσον αφορά στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της κυστεΐνης, τα μεταγραφήματα τριών ισότυπων της Ο-ακετυλο-μεταφοράσης της σερίνης και συγκεκριμένα των *Sat1*, *Sat2* και *Sat4* συσσωρεύονται σε βλαστούς μη εμβολιασμένων φυτών κατά 74%, 49% και 41% λιγότερο, αντίστοιχα, από ότι σε βλαστούς φυτών που εμβολιάστηκαν με το *M. loti* wt (Εικόνα 3.11). Επιπλέον, μειωμένη έκφραση κατά 48%, 62% και 65%, αντίστοιχα, παρατηρείται για τα γονίδια *Oast1*, *Oast4* και *Oast5* που κωδικοποιούν για ισότυπους θειολυάσης της Ο-ακετυλοσερίνης. Τέλος, τα σχετικά επίπεδα μεταγραφημάτων του γονιδίου *yecs1* που κωδικοποιεί για τη συνθετάση της γ-γλουταμυλκυστεΐνης και εμπλέκεται στη βιοσύνθεση της (ομο)γλουταθειόνης κατά 40% χαμηλότερα στους βλαστούς μη εμβολιασμένων φυτών από ότι σε βλαστούς *fix<sup>+</sup>* φυτών (Εικόνα 3.11). Στους βλαστούς φυτών εμβολιασμένων με το μεταλλαγμένο στέλεχος *ΔnifH* η συσσώρευση μεταγραφημάτων του γονιδίου *Atps* που κωδικοποιεί για τη σουλφουρυλάση του ATP εμφανίζεται κατά 23% μειωμένη σε σχέση με

τους βλαστούς αζωτοδεσμευτικών φυτών, ενώ τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *Apr2* που κωδικοποιεί για την αναγωγή του APS στους βλαστούς φυτών που εμβολιάστηκαν είτε με το *ΔnifA* είτε με το *ΔnifH* είναι χαμηλότερα κατά 50% και 42%, αντίστοιχα, από ότι στους βλαστούς *fix<sup>+</sup>* φυτών (Εικόνα 3.11). Επιπλέον, τα σχετικά επίπεδα μεταγραφημάτων της *Sat4*, που κωδικοποιεί για μία μιτοχονδριακή Ο-ακετυλο-μεταφοράση της σερίνης, εμφανίζονται κατά 70% και 60% χαμηλότερα σε βλαστούς φυτών που εμβολιάστηκαν με τα ριζοβιακά στελέχη *ΔnifA* ή *ΔnifH*, αντίστοιχα σε σχέση με τους βλαστούς αζωτοδεσμευτικών φυτών (Εικόνα 3.11). Παρόμοιο πρότυπο έκφρασης παρουσιάζει και η πλαστιδιακή θειολολυάση της Ο-ακετυλοσερίνης *Oast13* τα μεταγραφήματα της οποίας συσσωρεύονται κατά 60% και 40% λιγότερο στους βλαστούς των *ΔnifA* και *ΔnifH* φυτών σε σύγκριση με τους βλαστούς φυτών που εμβολιάστηκαν με το ριζόβιο αγρίου τύπου. Αντίθετα, η Ο-ακετυλο-μεταφοράση της σερίνης *Sat1* και η θειολολυάση της Ο-ακετυλοσερίνης *Oast15* εκφράζονται 2 φορές περισσότερο στους βλαστούς *fix<sup>-</sup>* φυτών από ότι σε βλαστούς φυτών εμβολιασμένων με το *M. loti wt*, ενώ τα μεταγραφήματα της κυτταροπλασματικής θειολολυάσης της Ο-ακετυλοσερίνης *Oast12* εμφανίζονται 3 φορές περισσότερα στους βλαστούς και των δύο τύπων *fix<sup>-</sup>* φυτών από ότι στους βλαστούς αζωτοδεσμευτικών φυτών. Επιπλέον, στους βλαστούς φυτών που εμβολιάστηκαν με το *ΔnifA* στέλεχος παρατηρείται ότι τα σχετικά επίπεδα έκφρασης της αναγωγής του θειώδους *Sir* είναι 2.5 φορές υψηλότερα από ότι στους βλαστούς *fix<sup>+</sup>* φυτών (Εικόνα 3.11). Επίσης, στους βλαστούς *ΔnifA* φυτών τα σχετικά επίπεδα έκφρασης της συνθετάσης της γ-γλουταμυλκουστεΐνης *gcs1* και της συνθετάσης της γλουταθειόνης *Gshs* είναι 3.5 και 5 φορές υψηλότερα, αντίστοιχα, από τα επίπεδα έκφρασης στους βλαστούς φυτών εμβολιασμένων με το ριζόβιο αγρίου τύπου. Στα φύλλα, τα σχετικά επίπεδα μεταγραφημάτων του θειικού μεταφορέα *LjSultr3.3a* είναι σημαντικά χαμηλότερα τόσο στα μη εμβολιασμένα φυτά όσο και στα φυτά που εμβολιάστηκαν με τα μεταλλαγμένα ριζόβια *ΔnifA* και *ΔnifH* σε σύγκριση με τα αζωτοδεσμευτικά φυτά (Εικόνα 3.12). Τα επίπεδα mRNA του θειικού μεταφορέα εμφανίζονται 30% χαμηλότερα στα μη εμβολιασμένα φυτά, ενώ στα φύλλα φυτών που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος *ΔnifA* είναι 3.5 φορές υψηλότερα από ότι στα φύλλα *fix<sup>+</sup>* φυτών (Εικόνα 3.12). Στα φύλλα φυτών εμβολιασμένων με το στέλεχος *ΔnifA* τα σχετικά επίπεδα έκφρασης της αναγωγής του APS *Apr2* και της Ο-ακετυλο-μεταφοράσης της σερίνης *Sat3* είναι 1.6 και 2.1 φορές υψηλότερα από τα επίπεδα έκφρασης στα φύλλα αζωτοδεσμευτικών φυτών, αντίστοιχα (Εικόνα 3.12).



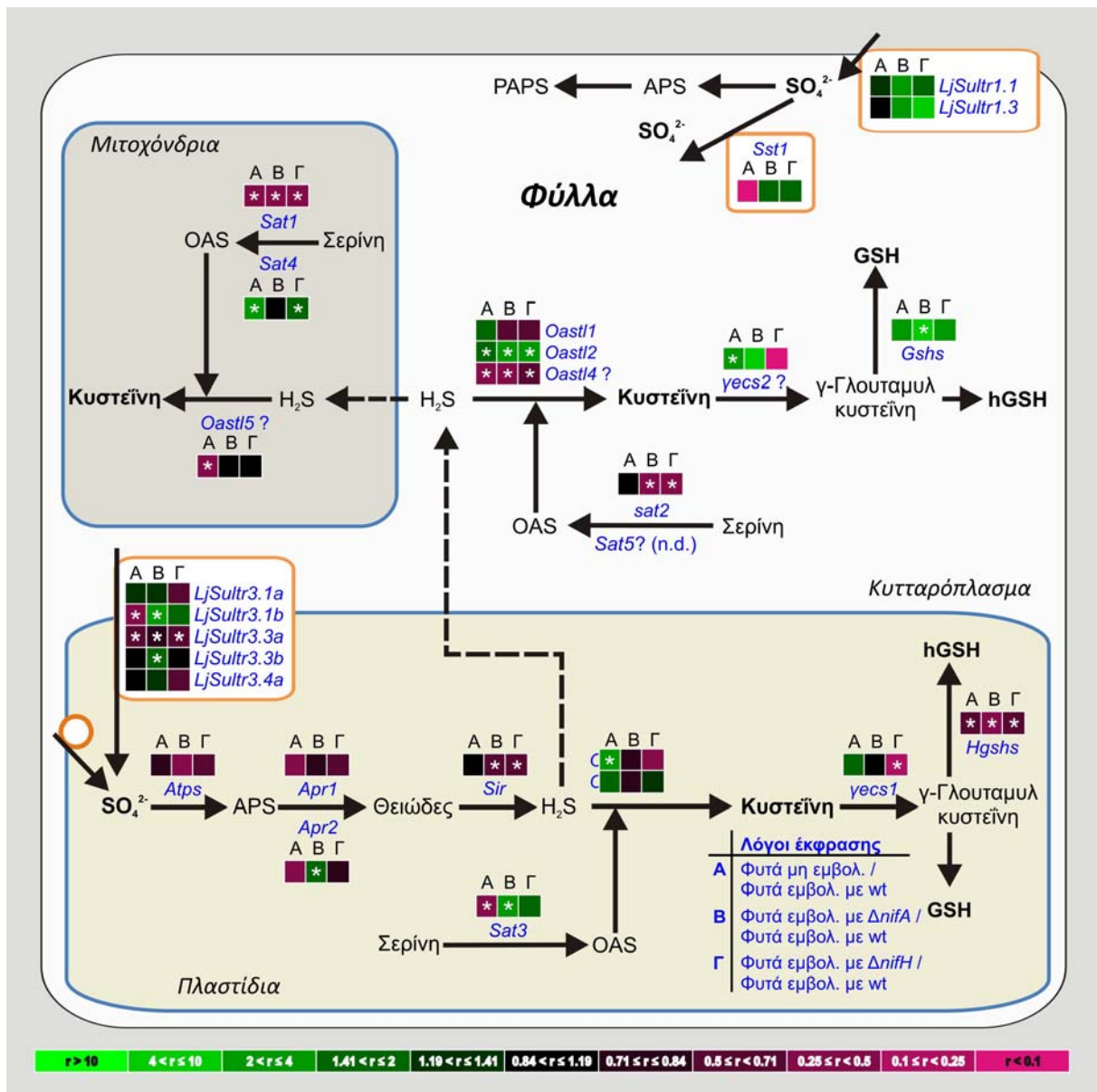
Αντίθετα, στα φύλλα φυτών μη εμβολιασμένων ή εμβολιασμένων με το ριζόβιο *ΔnifA* ή το *ΔnifH* η συσσώρευση μεταγραφημάτων δύο γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση κυστεΐνης, και συγκεκριμένα της μιτοχονδριακής Ο-ακετυλο-μεταφοράς της σερίνης *Sat1*



**Εικόνα 3.11:** Απεικόνιση μεταγραφικών αλλαγών γονιδίων που εμπλέκονται στην πρόσληψη, αναγωγή και αφομοίωση τωνθεικών στους βλαστούς του φυτού *L. jaronicus* κατά τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση με τη βοήθεια χρωματικού κώδικα.

(A) Χρωματική απεικόνιση των λόγων σχετικών επιπέδων έκφρασης γονιδίων του *L. jaronicus* σε βλαστούς μη εμβολιασμένων φυτών σε σύγκριση με τα επίπεδα έκφρασης βλαστών από φυτά εμβολιασμένα με το *M. loti* wt. (B, Γ) Χρωματική απεικόνιση των λόγων σχετικών επιπέδων έκφρασης γονιδίων σε βλαστούς φυτών εμβολιασμένων είτε με το στέλεχος *ΔnifA* είτε με το *ΔnifH*, αντίστοιχα, σε σύγκριση με τα επίπεδα έκφρασης σε βλαστούς φυτών εμβολιασμένων με το *M. loti* wt. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τρεις βιολογικές επαναλήψεις. Τα επίπεδα έκφρασης κανονικοποιήθηκαν με βάση τα μεταγραφήματα του σταθερά εκφραζόμενου γονιδίου της ουβικιτίνης.

και της κυτταροπλασματικής θειολολυάσης της Ο-ακετυλοσερίνης *Oast14* εμφανίζεται μειωμένη αντιπροσωπεύοντας μόνο το 30-50% και 30-55% της συσσώρευσης στα φύλλα φυτών εμβολιασμένων με το ριζόβιο αγρίου τύπου, αντίστοιχα (Εικόνα 3.12). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το ότι τα μεταγραφήματα της μιτοχονδριακής Ο-ακετυλο-μεταφοράσης της σερίνης *Sat4* είναι 2.2 φορές αφθονότερα στα φύλλα μη εμβολιασμένων φυτών από ότι στα φύλλα αζωτοδεσμευτικών φυτών. Επιπλέον, τα σχετικά επίπεδα έκφρασης της κυτταροπλασματικής θειολολυάσης της Ο-ακετυλοσερίνης *Oast12* εμφανίζονται κατά 1.7, 3.2 και 2.1 φορές υψηλότερα στα φύλλα φυτών μη εμβολιασμένων ή εμβολιασμένων με το ριζόβιο *ΔnifA* ή το *ΔnifH*, αντίστοιχα, σε σύγκριση με τα επίπεδα έκφρασης στα φύλλα *fix<sup>+</sup>* φυτών (Εικόνα 3.12). Στα φύλλα μη εμβολιασμένων φυτών η έκφραση της πλαστιδιακής θειολολυάσης της Ο-ακετυλοσερίνης *Oast13* είναι 2.7 υψηλότερη από την αντίστοιχη στα φύλλα φυτών που εμβολιάστηκαν με το *M. loti* wt. Αντίθετα, τα σχετικά επίπεδα μεταγραφημάτων της πλαστιδιακής Ο-ακετυλο-μεταφοράσης της σερίνης *Sat3* και της μιτοχονδριακής θειολολυάσης της Ο-ακετυλοσερίνης *Oast15* που παρατηρούνται στα φύλλα μη εμβολιασμένων φυτών αντιπροσωπεύουν μόνο το 26% και 44%, αντίστοιχα, των επιπέδων των φύλλων *fix<sup>+</sup>* φυτών. Στα φύλλα και των δύο τύπων *fix<sup>-</sup>* φυτών απαντώνται 35-50% και 55-65% λιγότερα μεταγραφήματα της αναγωγάσης του θειώδους *Sir* και της κυτταροπλασματικής Ο-ακετυλο-μεταφοράσης της σερίνης *Sat2*, αντίστοιχα, από ότι στα φύλλα αζωτοδεσμευτικών φυτών. Η συνθετάση της γ-γλυταμυλκουστεΐνης *gcs1* εμφανίζει 87% χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης στα φύλλα φυτών που εμβολιάστηκαν από το μεταλλαγμένο στέλεχος *ΔnifH* σε σύγκριση με τα φύλλα *fix<sup>+</sup>* φυτών (Εικόνα 3.12). Τέλος, η συσσώρευση μεταγραφημάτων του γονιδίου *Hgshs* που κωδικοποιεί για τη συνθετάση της ομογλουταθειόνης είναι 50% χαμηλότερη στα φύλλα μη εμβολιασμένων φυτών και φυτών εμβολιασμένων με το ριζόβιο *ΔnifA* ή το *ΔnifH* από ότι στα φύλλα αζωτοδεσμευτικών φυτών, ενώ τα σχετικά επίπεδα έκφρασης της συνθετάσης της γλουταθειόνης *gshs* στα φύλλα φυτών που εμβολιάστηκαν με το μεταλλαγμένο ριζόβιο *ΔnifA* είναι σημαντικά υψηλότερα από αυτά των φύλλων *fix<sup>+</sup>* φυτών (Εικόνα 3.12). Η έκφραση των υπόλοιπων γονιδίων που εξετάστηκαν δεν παρουσιάζει καμία στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στα μη συμβιωτικά όργανα του φυτού *L. japonicus* που είτε δεν εμβολιάστηκαν είτε εμβολιάστηκαν με το *M. loti* wt ή το *ΔnifA* ή το *ΔnifH* (πίνακας 3 του παραρτήματος Α και πίνακας 3 του παραρτήματος Β).



**Εικόνα 3.12:** Απεικόνιση μεταγραφικών αλλαγών γονιδίων που εμπλέκονται στην πρόσληψη, αναγωγή και αφομοίωση των θεικών στα φύλλα του φυτού *L. jaronicus* κατά τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση με τη βοήθεια χρωματικού κώδικα.

(A) Χρωματική απεικόνιση των λόγων σχετικών επιπέδων έκφρασης γονιδίων του *L. jaronicus* σε φύλλα μη εμβολιασμένων φυτών σε σύγκριση με τα επίπεδα έκφρασης φύλλων από φυτά εμβολιασμένα με το *M. loti* wt. (B, Γ) Χρωματική απεικόνιση των λόγων σχετικών επιπέδων έκφρασης γονιδίων σε φύλλα φυτών εμβολιασμένων είτε με το στέλεχος *ΔnifA* είτε με το *ΔnifH*, αντίστοιχα, σε σύγκριση με τα επίπεδα έκφρασης σε φύλλα φυτών εμβολιασμένων με το *M. loti* wt. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τρεις βιολογικές επαναλήψεις. Τα επίπεδα έκφρασης κανονικοποιήθηκαν με βάση τα μεταγραφήματα του σταθερά εκφραζόμενου γονιδίου της ουβικιτίνης.

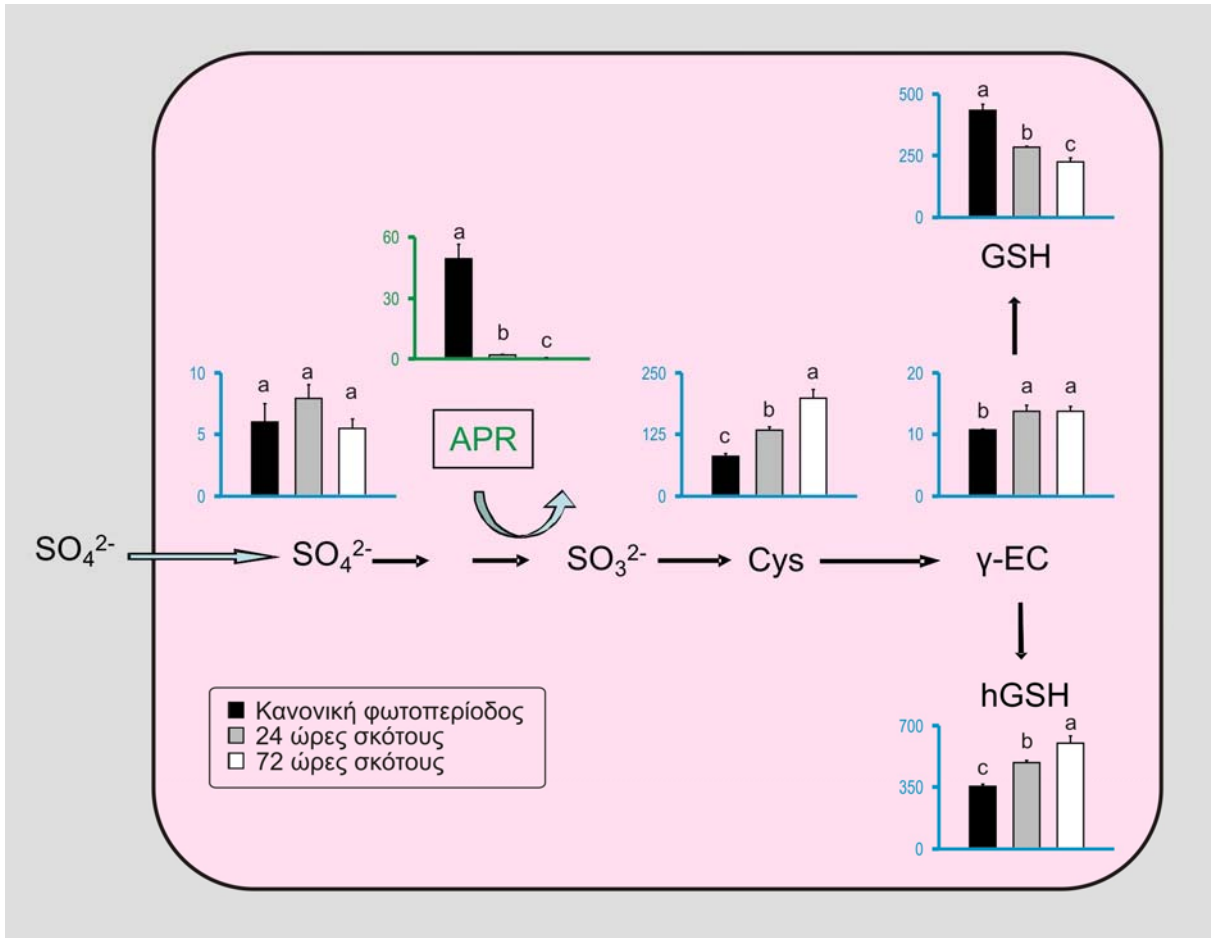
### 3.7 Μεταβολισμός του θείου στα φυμάτια κατά την έλλειψη άνθρακα

#### 3.7.1 Επίδραση της έλλειψης άνθρακα στη συγκέντρωση μεταβολιτών που περιέχουν θείο και στη δραστηριότητα της αναγωγής του APS

Η επίδραση της έλλειψης άνθρακα στο μεταβολισμό του θείου στα φυμάτια του φυτού *L. jaronicus* μελετήθηκε. Για το σκοπό αυτό αναπτύχθηκαν φυτά *L. jaronicus* που εμβολιάστηκαν με το ριζόβιο αγρίου τύπου (wt) *M. loti* R7A και κατά την έκτη εβδομάδα συλλέχθηκαν φυμάτια από φυτά που αναπτύχθηκαν κάτω από συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου ή από φυτά που παρέμειναν σε συνθήκες σκότους για 24 ή 72 ώρες. Η συλλογή φυματίων μετά το πέρας της σκοτεινής περιόδου πραγματοποιήθηκε χωρίς τα φυτά να εκτεθούν ξανά σε φως. Ακολούθησε ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης θειικών και θειολών με την τεχνική της ιοντικής χρωματογραφίας και της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πιεσης (HPLC), αντίστοιχα. Επιπλέον, μετρήθηκε η ενζυμική δραστηριότητα της αναγωγής του APS μέσω της μέτρησης παραγωγής πτητικού  $^{35}\text{S}$ -θειώδους που σχηματίζεται παρουσία 75  $\mu\text{M}$   $\text{AP}^{35}\text{S}$  και 4 mM DTE (Brunold and Suter, 1990). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε πέντε βιολογικές επαναλήψεις. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 3.13.

Η έλλειψη άνθρακα για 24 ή 72 ώρες δεν φαίνεται να επηρέασε σημαντικά τη συγκέντρωση θειικών στα φυμάτια. Αντίθετα, η δραστηριότητα της αναγωγής του APS παρουσιάζει δραματική μείωση από το πρώτο κιόλας εικοσιτετράωρο υπό συνθήκες σκότους εμφανίζοντας μόλις το 4% της ενζυμικής δραστηριότητας που εμφανίζουν τα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια φυτών που αναπτύσσονται κάτω από συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου (Εικόνα 3.13). Η δραστηριότητα της αναγωγής του APS μειώνεται περαιτέρω στα φυμάτια των φυτών που υποβλήθηκαν σε συνθήκες σκότους για 72 ώρες αντιπροσωπεύοντας μόλις το 1% της ενζυμικής δραστηριότητας που εμφανίζουν τα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια φυτών που αναπτύσσονται κάτω από συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου. Ωστόσο, οι θειόλες στα φυμάτια κατά την έλλειψη άνθρακα αυξάνονται με εξαίρεση τη γλουταθειόνη. Πιο συγκεκριμένα, η συσσώρευση κυστεΐνης στα φυμάτια των φυτών που βρίσκονται σε συνθήκες σκότους για 24 και 72 ώρες είναι 1.7 και 2.5 φορές υψηλότερη από ότι στα φυμάτια των φυτών που αναπτύσσονται σε συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου (Εικόνα 3.13). Η διακοπή παροχής άνθρακα στα φυμάτια για 24 ή 72 ώρες έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης της  $\gamma$ -γλουταμυλκυστεΐνης κατά σχεδόν 30% σε σύγκριση με τα φυμάτια των φυτών που εκτίθενται σε κανονική φωτοπερίοδο (Εικόνα 3.13). Στα φυμάτια των φυτών που υποβάλλονται σε συνθήκες σκότους για 24 ώρες, η συγκέντρωση της ομογλουταθειόνης αυξάνεται κατά 40% σε σύγκριση με τα

φυμάτια των φυτών που βρίσκονται κάτω από συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου (Εικόνα 3.13). Όταν οι συνθήκες σκότους παρατείνονται για άλλες 48 ώρες, η αύξηση της συγκέντρωσης ομογλουταθειόνης στα φυμάτια φτάνει το 70% σε σχέση με τα φυμάτια των φυτών κανονικής φωτοπεριόδου. Αντίθετα, η συγκέντρωση γλουταθειόνης στα φυμάτια μειώνεται κατά 35% κατά τη διακοπή παροχής άνθρακα για 24 ώρες σε σύγκριση με τα φυμάτια των φυτών που αναπτύσσονται κάτω από συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου (Εικόνα 3.13).



**Εικόνα 3.13:** Συγκέντρωση S-μεταβολιτών και ενζυμική δραστηριότητα της αναγωγάσης του APS κατά την έλλειψη άνθρακα.

Η συγκέντρωση θειικών και θειολών και η ενζυμική δραστηριότητα της αναγωγάσης του APS προσδιορίστηκαν σε φυμάτια που συλλέχθηκαν από φυτά *L. japonicus* ηλικίας έξι εβδομάδων που εμβολιάστηκαν με το *M. loti* αγρίου τύπου και αναπτύχθηκαν κάτω από συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου ή από φυτά που παρέμειναν σε συνθήκες σκότους για 24 ή 72 ώρες. Η συλλογή φυματίων μετά το πέρας της σκοτεινής περιόδου πραγματοποιήθηκε χωρίς τα φυτά να εκτεθούν ξανά σε φως. Η συγκέντρωση θειικών ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  FW) και θειολών ( $\text{nmol g}^{-1}$  FW) παρουσιάζεται με άξονες μπλε χρώματος, ενώ η ενζυμική δραστηριότητα της αναγωγάσης του APS (APR) ( $\text{nmol min}^{-1}$  g<sup>-1</sup> FW) επισημαίνεται με άξονες πράσινου χρώματος. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο πέντε ανεξάρτητων βιολογικών επαναλήψεων  $\pm$  S.E. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές επισημαίνονται με διαφορετικά γράμματα ( $P < 0.05$ ).

Η παραμονή των φυτών σε συνθήκες σκότους για επιπλέον 48 ώρες οδηγεί σε περαιτέρω μείωση της συγκέντρωσης της γλουταθειόνης που φτάνει το 50% αυτής που παρατηρείται σε φυμάτια φυτών που βρίσκονται σε συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου.

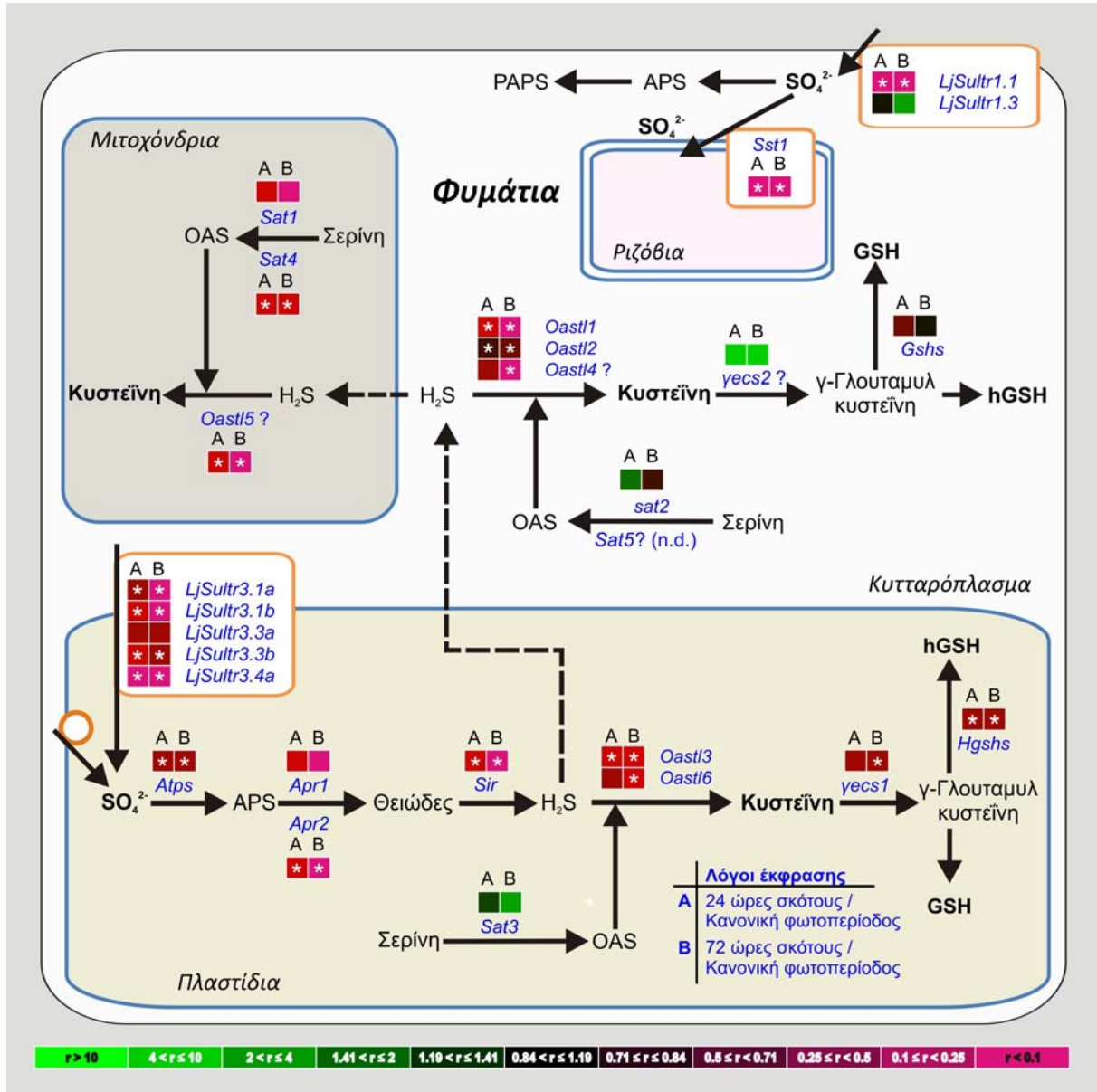
### **3.7.2 Μελέτη του μεταγραφικού προτύπου έκφρασης γονιδίων του *L. jaronicus* που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του θείου στα φυμάτια κατά την έλλειψη άνθρακα**

Το μεταγραφικό πρότυπο έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του θείου στα φυμάτια κατά την έλλειψη άνθρακα μελετήθηκε, ώστε να διαπιστωθεί αν οι αλλαγές που παρατηρούνται τόσο στις συγκεντρώσεις μεταβολιτών που περιέχουν θείο όσο και στην ενζυμική δραστηριότητα της αναγωγής του APS κατά την διακοπή παροχής άνθρακα στα φυμάτια υπαγορεύονται από αλλαγές σε μεταγραφικό επίπεδο. Για το σκοπό αυτό, αναπτύχθηκαν φυτά *L. jaronicus* που εμβολιάστηκαν με το ριζόβιο αγρίου τύπου (wt) *M. loti* R7A και την έκτη εβδομάδα συλλέχθηκαν φυμάτια από φυτά που αναπτύχθηκαν κάτω από συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου και από φυτά που παρέμειναν σε συνθήκες σκότους για 24 ή 72 ώρες. Η συλλογή φυματίων μετά το πέρας της σκοτεινής περιόδου πραγματοποιήθηκε χωρίς τα φυτά να εκτεθούν ξανά σε φως. Ακολούθησε απομόνωση ολικού RNA και παραγωγή συμπληρωματικού DNA (cDNA). Η μελέτη του προτύπου έκφρασης πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qRT-PCR) με χρήση των εξειδικευμένων εκκινήτων που σχεδιάστηκαν. Οι αντιδράσεις qRT-PCR πραγματοποιήθηκαν σε τρεις βιολογικές επαναλήψεις. Οι μεταγραφικές αλλαγές γονιδίων που εμπλέκονται στην πρόσληψη, αναγωγή και αφομοίωση των θεικών στα φυμάτια κάτω από συνθήκες έλλειψης άνθρακα παρουσιάζονται στην εικόνα 3.14. Οι λόγοι των σχετικών επιπέδων έκφρασης μεταξύ φυματίων που συλλέχθηκαν από φυτά που παρέμειναν σε συνθήκες σκότους για 24 ή 72 ώρες και φυματίων που συλλέχθηκαν από φυτά που αναπτύχθηκαν κάτω από συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου, καθώς και η στατιστική ανάλυση των δεδομένων παρουσιάζονται αναλυτικά στους πίνακες A.9 του παραρτήματος Α και στους πίνακες Β.6 του παραρτήματος Β, αντίστοιχα.

Στα φυμάτια κατά την διακοπή παροχής άνθρακα η έκφραση των περισσότερων γονιδίων που εμπλέκονται στην πρόσληψη, αναγωγή και αφομοίωση του θείου καταστέλλεται από το πρώτο κιόλας εικοσιτετράωρο συγκριτικά με φυμάτια των φυτών που αναπτύσσονται κάτω από συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου (Εικόνα 3.14). Η συσσώρευση μεταγραφημάτων όλων των μεταφορέων θεικών είναι 3-50 φορές χαμηλότερη στα φυμάτια που βρίσκονται υπό συνθήκες έλλειψης άνθρακα από αυτή των φυματίων φυτών

που βρίσκονται σε συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου, με εξαίρεση τον *LjSultr3.3a* και τον *LjSultr1.3* η συσσώρευση μεταγραφημάτων των οποίων δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά. Την πιο σημαντική μεταγραφική καταστολή παρουσιάζει ο συμβιωτικός μεταφορέας θειικών *Sst1* του οποίου τα σχετικά επίπεδα έκφρασης από  $2.06 \pm 0.09$  στα φυμάτια που τυγχάνουν κανονικής παροχής άνθρακα μειώνονται στα  $0.12 \pm 0.02$  και στα  $0.06 \pm 0.01$  στα φυμάτια των φυτών που παρέμειναν σε συνθήκες σκότους για 24 και 72 ώρες, αντίστοιχα (Εικόνα 3.14). Όσον αφορά στο μονοπάτι ενεργοποίησης και αναγωγής των θειικών, τα μεταγραφήματα της σουλφουρυλάσης του ATP, *Atps*, εμφανίζονται να είναι 2.5 φορές λιγότερα στα φυμάτια που διακόπηκε η παροχή άνθρακα για 24 ή 72 ώρες, ενώ τα επίπεδα mRNA της APS αναγωγάσης *Apr2* φαίνεται να είναι χαμηλότερα κατά 8 και 13 φορές στα φυμάτια φυτών που βρίσκονται σε συνθήκες σκότους για 24 και 72 ώρες, αντίστοιχα, σε σύγκριση με τα φυμάτια φυτών που αναπτύσσονται κάτω από συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου (Εικόνα 3.14). Χαμηλότερα εμφανίζονται και τα επίπεδα έκφρασης της αναγωγάσης του θειώδους *Sir* στα φυμάτια που διακόπηκε η παροχή άνθρακα για 24 ή 72 ώρες κατά 10 και 19 φορές, αντίστοιχα, σε σύγκριση με τα φυμάτια των φυτών που παρέμειναν σε συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η μεταγραφική καταστολή των περισσότερων γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση κυστεΐνης στα φυμάτια φυτών που παρέμειναν σε συνθήκες σκότους σε σύγκριση με τα φυμάτια φυτών που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου (Εικόνα 3.14). Πιο συγκεκριμένα, τα σχετικά επίπεδα έκφρασης 2 μιτοχονδριακών ισοτύπων της Ο-ακετυλο-μεταφοράσης της σερίνης, *Sat1* και *Sat4*, καθώς και όλων των ισοτύπων της θειολυάσης της Ο-ακετυλοσερίνης είναι σημαντικά χαμηλότερα στα φυμάτια που διακόπηκε η παροχή άνθρακα είτε για 24 είτε για 72 ώρες σε σχέση με τα φυμάτια των φυτών που βρίσκονται σε συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου. Αντίθετα, η συσσώρευση μεταγραφημάτων της πλαστιδιακής Ο-ακετυλο-μεταφοράσης της σερίνης, *Sat3* αυξάνεται κατά 2.5 φορές στα φυμάτια των φυτών που παρέμειναν σε συνθήκες σκότους για 72 ώρες. Πέρα από τη βιοσύνθεση κυστεΐνης, τα σχετικά επίπεδα της συνθετάσης της ομογλουταθειόνης *Hgshs* εμφανίζονται 65-70% χαμηλότερα στα φυμάτια όπου διακόπηκε η παροχή άνθρακα για 24 ή 72 ώρες σε σχέση με τα φυμάτια των φυτών που αναπτύσσονται κάτω από συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου (Εικόνα 3.14). Τα μόνα γονίδια μεταβολισμού του θείου που επάγονται στα φυμάτια κατά τη διακοπή παροχής άνθρακα είναι η πλαστιδιακή Ο-ακετυλο-μεταφοράση της σερίνης *Sat3* και η συνθετάση της γ-γλουταμυλκυστεΐνης *yecs2* των οποίων η συσσώρευση μεταγραφημάτων αυξάνεται κατά 2.5 και 8 φορές, αντίστοιχα, στα φυμάτια των φυτών που παρέμειναν σε συνθήκες σκότους για 72 ώρες σε σύγκριση με τα φυμάτια των φυτών που αναπτύσσονται σε συνθήκες

κανονικής φωτοπεριόδου (Εικόνα 3.14). Η έκφραση των υπόλοιπων γονιδίων που εξετάστηκαν δεν παρουσιάζει καμία στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους διαφορετικούς τύπους φυματίων (Πίνακας Α.9 του παραρτήματος Α και πίνακας Β.6 του παραρτήματος Β).



**Εικόνα 3.14:** Απεικόνιση μεταγραφικών αλλαγών γονιδίων που εμπλέκονται στην πρόσληψη, αναγωγή και αφομοίωση των θεικών στα φυμάτια του φυτού *L. jarrovi* κατά την έλλειψη άνθρακα με τη βοήθεια χρωματικού κώδικα.

(A, B) Χρωματική απεικόνιση των λόγων σχετικών επιπέδων έκφρασης γονιδίων σε φυμάτια φυτών εμβολιασμένων με το *M. loti* στέλεχος που υποβλήθηκαν σε συνθήκες σκότους για 24 και 72 ώρες, αντίστοιχα, σε σύγκριση με τα επίπεδα έκφρασης σε φυμάτια φυτών εμβολιασμένων με το *M. loti* στέλεχος που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τρεις βιολογικές επαναλήψεις. Τα επίπεδα έκφρασης κανονικοποιήθηκαν με βάση τα μεταγραφήματα του σταθερά εκφραζόμενου γονιδίου της ουβικιτίνης.



### 3.8 Υποκυτταρικός εντοπισμός της αναγωγάσης του APS, APR1

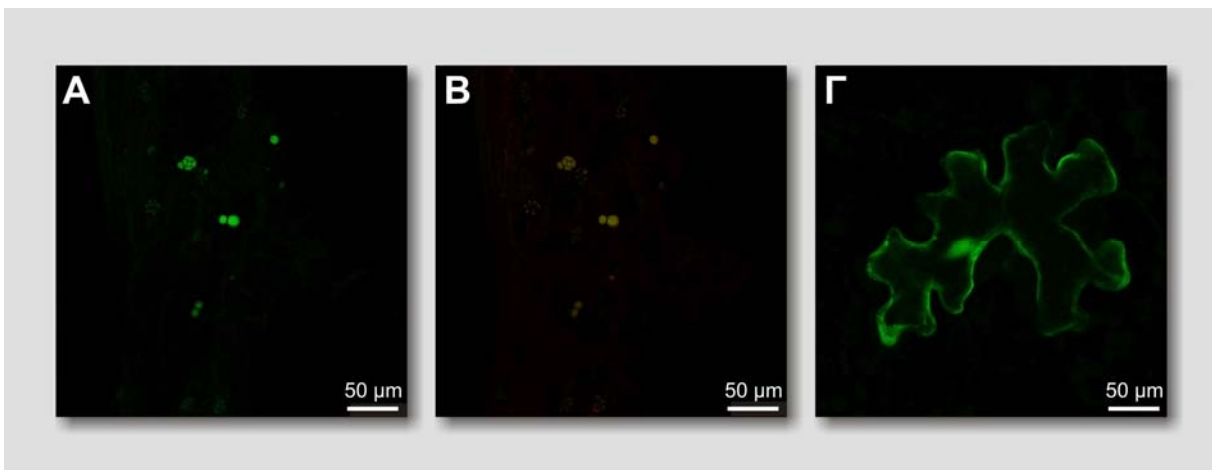
Ο υποκυτταρικός εντοπισμός της αναγωγάσης του APS, APR1 μελετήθηκε. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε παροδικός μετασχηματισμός επιδερμικών κυττάρων φύλλων *Arabidopsis* στα οποία εκφράστηκε η αναγωγάση του APS, APR1 του *L. jaronicus* ως χίμαιρα με την πράσινη πρωτεΐνη φθορισμού (Green Fluorescence Protein, GFP). Η επιλογή των φύλλων *Arabidopsis* βασίστηκε στο γεγονός η χρήση επίτοπων φθορισμού στο *L. jaronicus* παρουσιάζει ιδιαίτερες δυσκολίες εξαιτίας των υψηλών επιπέδων αυτοφθορισμού στα διάφορα όργανά του και ιδιαίτερα στη ρίζα και στα φυμάτια (Simon-Rosin et al., 2003), παράλληλα τα φύλλα του *L. jaronicus* είναι μικρά σε μέγεθος και με αυξημένο πάχος γεγονός που δεν επέτρεπε την διεξοδική παρατήρηση των μετασχηματισμένων κύτταρων στο μικροσκόπιο. Για την παροδική έκφραση της αναγωγάσης του APS, APR1 σε φυτικά κύτταρα χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pOL GFPS65C, ο οποίος οδηγεί στην έκφραση των γονιδίων τα οποία έχουν κλωνοποιηθεί σε σύντηξη με την GFP. Έτσι, δημιουργήθηκε η πλασμιδιακή κατασκευή GFP-APR1 με σκοπό τη σύντηξη της GFP στο άμινο τελικό άκρο της αναγωγάσης του APS, APR1. Η πλασμιδιακή κατασκευή ελέγχθηκε με αλληλούχιση ώστε να επιβεβαιωθεί ότι η αναγωγάση του APS, APR1 και η GFP βρίσκονται στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για αυτή την πλασμιδιακή κατασκευή παρουσιάζονται στον πίνακα Α.1 του παραρτήματος Α. Ο μετασχηματισμός των επιδερμικών κυττάρων *Arabidopsis* έγινε με τη μέθοδο της βιοβαλιστικής. Συγκεκριμένα, πλασμιδιακό DNA της κατασκευής GFP-APR1 χρησιμοποιήθηκε για την επικάλυψη μικροσφαιριδίων χρυσού παρουσία χλωριούχου ασβεστίου και σπερμιδίνης. Τα επικαλυμμένα με DNA σφαιρίδια με τη βοήθεια της συσκευής Biolistic PDS-1000/He (Biorad) επιταχύνθηκαν και εισχώρησαν στα επιδερμικά κύτταρα της κάτω επιφάνειας φύλλων *Arabidopsis*. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα παρατηρήθηκαν με συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης (confocal) μετά από περίπου 24 ώρες.

Από την παρατήρηση των μετασχηματισμένων φύλλων με την κατασκευή για την αναγωγάση του APS, APR1, η χιμαιρική πρωτεΐνη GFP-APR1 εντοπίστηκε στα πλαστίδια (Εικόνες 3.15 Α και 3.15 Β), γεγονός που είναι σύμφωνο με την *in silico* πρόβλεψη υποκυτταρικού εντοπισμού (Παράγραφος 3.6.1). Για τον εντοπισμό της θέσης των πλαστιδίων στο κύτταρο χρησιμοποιήθηκε ο αυτοφθορισμός της χλωροφύλλης (Εικόνα 3.15 Β). Εκτός από το μετασχηματισμό με την κατασκευή GFP-APR1, πραγματοποιήθηκε και ένας μετασχηματισμός με το μητρικό φορέα pOL GFPS65C που οδηγεί στην έκφραση της GFP χωρίς αυτή να είναι συνδεδεμένη με κάποια πρωτεΐνη. Σε αυτή τη περίπτωση η GFP

εντοπίζεται στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα (Εικόνα 3.15 Γ), γεγονός σύμφωνο με την προϋπάρχουσα βιβλιογραφία που αφορά στην GFP.

### 3.9 *In situ* εντοπισμός των μεταγραφημάτων των ισοτύπων αναγωγής του APS, *Apr1* και *Apr2*, σε φυμάτια του *L. jaronicus*

Για το χρονικό και χωροταξικό εντοπισμό των μεταγραφημάτων των ισοτύπων αναγωγής του APS, *Apr1* και *Apr2*, στα φυμάτια του *L. jaronicus* χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του RNA-RNA *in situ* υβριδισμού. Για το σκοπό αυτό συλλέχθηκαν προσεκτικά φυμάτια 14, 21 και 28 ημερών και εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα μονιμοποίησης. Τα φυμάτια αφυδατώθηκαν, εγκλείστηκαν σε παραφίνη και στη συνέχεια ελήφθησαν τομές πάχους 7μm, οι οποίες μεταφέρθηκαν σε κατάλληλα επεξεργασμένες αντικειμενοφόρους. Η υβριδοποίηση των τομών έγινε με σημασμένο αντιπληροφοριακό RNA, το οποίο προέκυψε με *in vitro* μεταγραφή από τους cDNA κλώνους pBSK-*Apr1* και pBSK-*Apr2* που κωδικοποιούν αντίστοιχα για τις *Apr1* και *Apr2*, με τη χρήση της κατάλληλης, κάθε φορά, RNA πολυμεράσης. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή αυτών των κλώνων παρουσιάζονται στον πίνακα A.1 του παραρτήματος A. Η σήμανση του RNA έγινε με τη χρήση ουριδινό-τριφωσφωρικών νουκλεοτιδίων σημασμένων με διγοξιγενίνη (DIG-11-rUTP). Η ανίχνευση του σήματος υβριδισμού έγινε με τη χρήση αντι-DIG αντισωμάτων τα οποία φέρουν δεσμευμένο το ένζυμο της αλκαλικής φωσφατάσης. Η αλκαλική φωσφατάση καταλύει το σχηματισμό χρωμοφόρου ιζήματος, παρουσία του υποστρώματος NBT/BCIP. Το

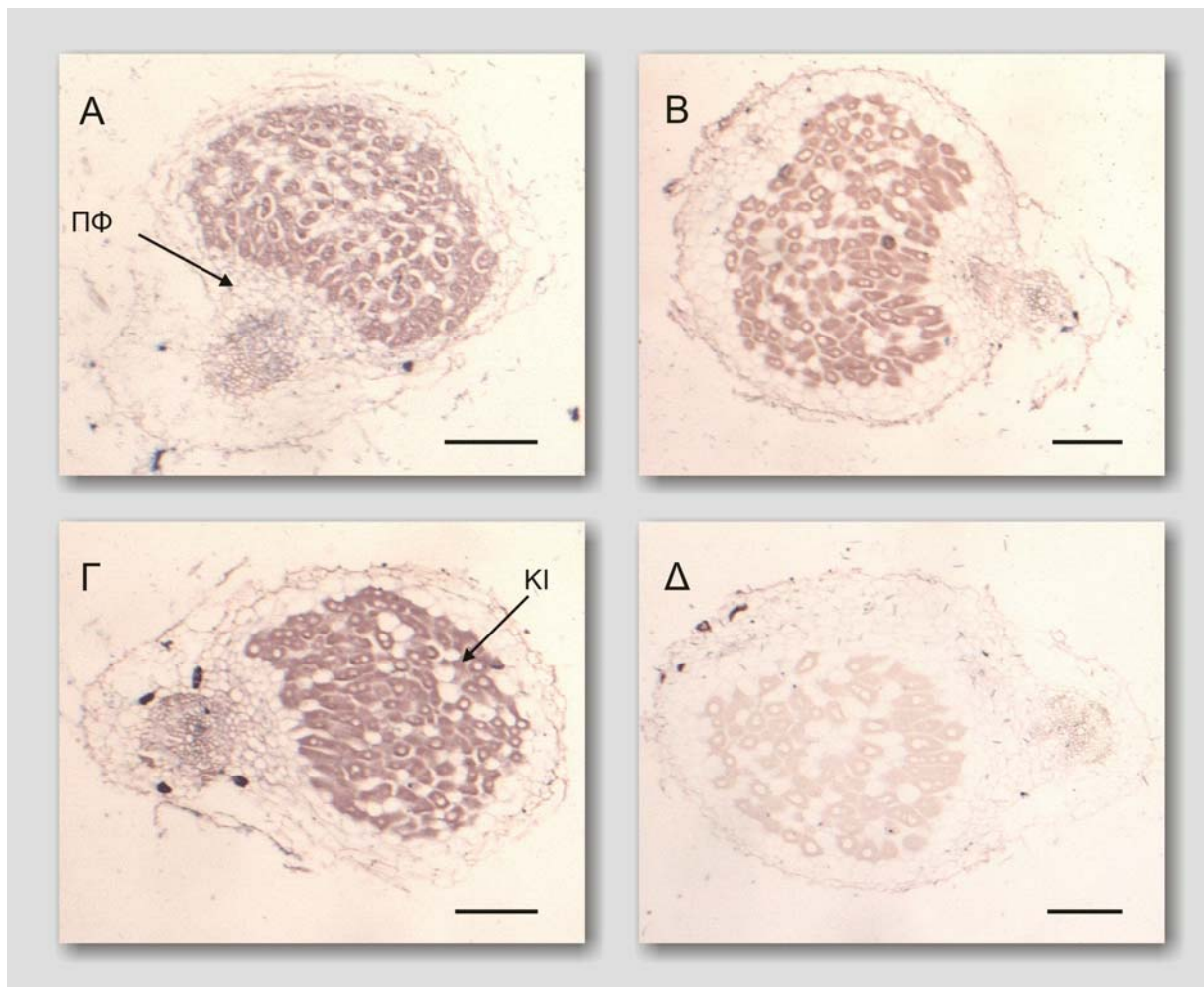


**Εικόνα 3.15:** Υποκυτταρικός εντοπισμός αναγωγής του APS, APR1.

Υποκυτταρικός εντοπισμός αναγωγής του APS, APR1 σε παροδικά μετασηματισμένα επιδερμικά κύτταρα φύλλων *Arabidopsis* σε παροδικά μετασηματισμένα επιδερμικά κύτταρα φύλλων *Arabidopsis*. (A) Η GFP-APR1 εντοπίζεται κυρίως στα πλαστίδια των μετασηματισμένων κυττάρων. (B) Αλληλοεπικάλυψη του φθορισμού της GFP-APR1 με τον αυτοφθορισμό της χλωροφύλλης. (Γ) Η GFP εντοπίζεται στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα των μετασηματισμένων κυττάρων. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν 50 μm.

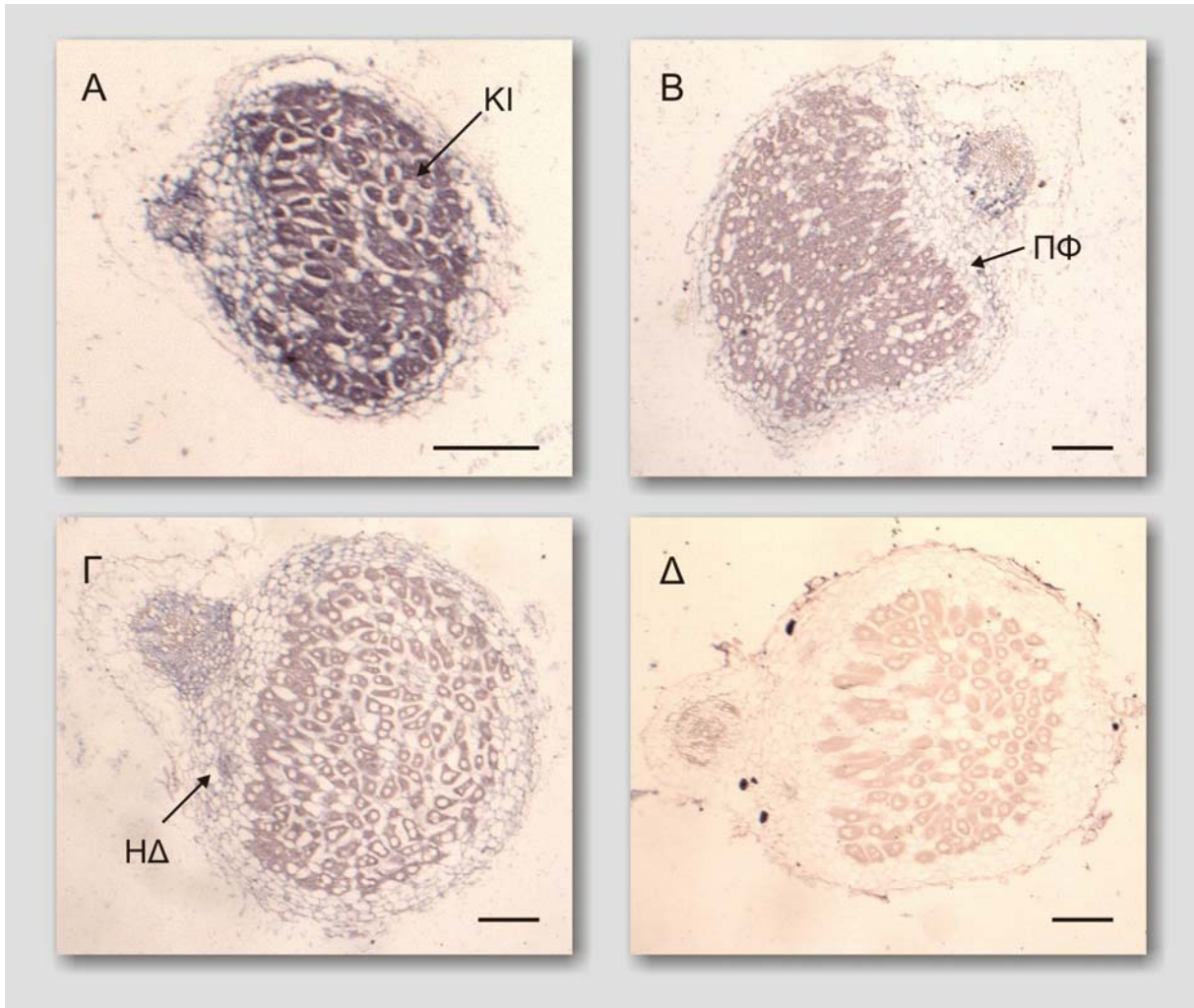
σήμα του υβριδισμού εμφανίζεται ως μπλε-μωβ ίζημα. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν τομές οι οποίες υβριδίστηκαν με πληροφοριακό RNA.

Τα μεταγραφήματα της αναγωγής του APS, *Apr1*, εντοπίζονται στον κεντρικό ιστό και στο παρέγχυμα του νεαρού φυματίου 14 ημέρες μετά τον εμβολιασμό (Εικόνα 3.16 Α). Στα πλήρως λειτουργικά φυμάτια 21 ημέρες μετά τον εμβολιασμό το σήμα υβριδισμού περιορίζεται στον κεντρικό ιστό του φυματίου (Εικόνα 3.16 Β). Ομοίως, στο τελευταίο αναπτυξιακό στάδιο του φυματίου 28 ημέρες μετά τον εμβολιασμό το σήμα υβριδισμού εμφανίζεται ομοιόμορφα κατανεμημένο στον κεντρικό ιστό του φυματίου (Εικόνα 3.16 Γ).



**Εικόνα 3.16:** In situ χώρο-χρονικός εντοπισμός των μεταγραφημάτων της αναγωγής του APS, *Apr1*.

*In situ* RNA-RNA υβριδισμός για την ανίχνευση των μεταγραφημάτων της αναγωγής του APS, *Apr1* σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια του φυματίου του *L. jaronicus* που σχηματίστηκαν από το *M. loti* αγρίου τύπου. (Α, Β, Γ) Τομές φυματίων 14, 21 και 28 ημέρες μετά τον εμβολιασμό, αντίστοιχα, που έχουν υβριδιστεί με αντιπληροφοριακό RNA της αναγωγής του APS, *Apr1*. (Δ) Τομή φυματίου που έχει υβριδιστεί με πληροφοριακό RNA και χρησιμοποιείται ως μάρτυρας. ΠΦ: Παρέγχυμα του φυματίου, ΚΙ: κεντρικός ιστός. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν 200 μm.



**Εικόνα 3.17:** In situ χώρο-χρονικός εντοπισμός των μεταγραφημάτων της αναγωγής του APS, Apr2.

In situ RNA-RNA υβριδισμός για την ανίχνευση των μεταγραφημάτων της αναγωγής του APS, Apr2 σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια του φυματίου του *L. japonicus* που σχηματίστηκαν από το *M. loti* αγρίου τύπου. (A, B, Γ) Τομές φυματίων 14, 21 και 28 ημέρες μετά τον εμβολιασμό, αντίστοιχα, που έχουν υβριδιστεί με αντιπληροφοριακό RNA της αναγωγής του APS, Apr2. (Δ) Τομή φυματίου που έχει υβριδιστεί με πληροφοριακό RNA και χρησιμοποιείται ως μάρτυρας. Το σήμα υβριδισμού εμφανίζεται ως μπλε-μωβ ίζημα. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν 200 μm. ΠΦ: Παρέγχυμα του φυματίου, ΗΔ: ηθμαγγειώδεις δεσμίδες, ΚΙ: κεντρικός ιστός.

Στα νεαρά φυμάτια 14 ημέρες μετά τον εμβολιασμό, το σήμα υβριδισμού των μεταγραφημάτων της αναγωγής του APS, Apr2, εμφανίζεται ιδιαίτερα έντονο και ομοιόμορφα κατανομημένο όλους τους ιστούς του αναπτυσσόμενου φυματίου, δηλαδή στον κεντρικό ιστό, τις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και το παρέγχυμα του φυματίου (Εικόνα 3.17 A). Στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια 21 ημέρες μετά τον εμβολιασμό το σήμα υβριδισμού παρατηρείται και πάλι σε όλους τους ιστούς του φυματίου (Εικόνα 3.17 B). Τέλος, στα ώριμα φυμάτια 28 ημέρες μετά τον εμβολιασμό το σήμα υβριδισμού

εμφανίζεται ομοιόμορφα κατανεμημένο στον παρέγχυμα του φυματίου, τις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και τον κεντρικό ιστό του φυματίου (Εικόνα 3.17 Γ).

Σε όλους τους παραπάνω υβριδισμούς ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν επιμήκεις τομές φυματίων, στις οποίες χρησιμοποιήθηκε πληροφοριακό RNA, που μεταγράφηκε από τους αντίστοιχους κλώνους της *Apr1* ή *Apr2* (Εικόνες 3.16 Δ και 3.17 Δ). Στην περίπτωση του πληροφοριακού RNA δεν εμφανίστηκε εξειδικευμένο σήμα σε καμία ομάδα κυττάρων, επιβεβαιώνοντας ότι το σήμα που εμφανίστηκε στις παραπάνω περιπτώσεις, οφείλεται μόνο στην ύπαρξη των mRNA των αντίστοιχων γονιδίων.

### 3.10 Συγκριτική ανάλυση μεταβολομικού προτύπου κατά τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση

Μεταβολομική ανάλυση σε φυμάτια και μη συμβιωτικά όργανα του φυτού *L. jaronicus* πραγματοποιήθηκε με σκοπό να διερευνηθούν συστηματικές αλλαγές που παρατηρούνται κατά την εγκαθίδρυση της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης. Για το σκοπό αυτό αναπτύχθηκαν φυτά *L. jaronicus* που είτε δεν εμβολιάστηκαν είτε εμβολιάστηκαν με το ριζόβιο αγρίου τύπου ή το μεταλλαγμένο στέλεχος *ΔnifA* ή το *ΔnifH*. Συλλέχθηκαν φυμάτια, ρίζες, βλαστοί και φύλλα από τα οποία εκχυλίστηκαν οι μεταβολίτες. Ακολούθησε παραγωγοποίηση των δειγμάτων και το μεταβολομικό πρότυπο κάθε δείγματος αναλύθηκε με την βοήθεια της αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών (GC-MS). Η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων έγινε με βάση την τιμή του εμβαδού της καμπύλης του κάθε μεταβολίτη στο χρωματογράφημα. Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε ως προς το φρέσκο βάρος του κάθε δείγματος και ως προς το μεταβολίτη αναφοράς (ριβιτόλη), όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.16.3. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε πέντε βιολογικές επαναλήψεις.

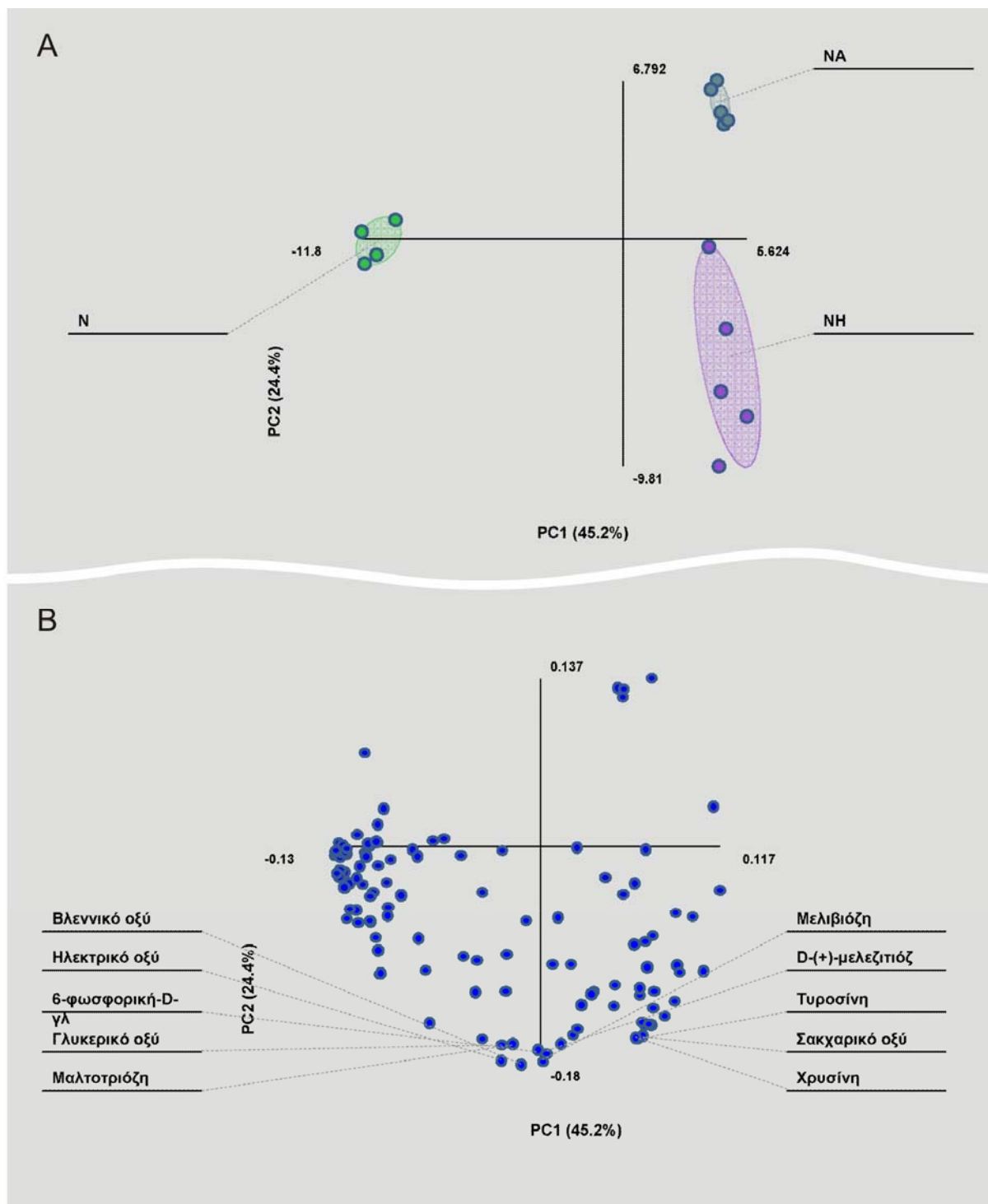
#### 3.10.1 Συγκριτική ανάλυση μεταβολομικού προτύπου αζωτοδεσμευτικών και *fix* φυματίων

Το μεταβολομικό πρότυπο αζωτοδεσμευτικών φυματίων που σχηματίστηκαν από το ριζόβιο αγρίου τύπου, καθώς και μη λειτουργικών φυματίων που σχηματίστηκαν από τα μεταλλαγμένα στελέχη *ΔnifA* και *ΔnifH* μελετήθηκε με την βοήθεια της αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών (GC-MS). Η σχετική απόκριση του κάθε μεταβολίτη υπολογίστηκε με βάση το φρέσκο βάρος του κάθε δείγματος και τη ριβιτόλη ως μεταβολίτη αναφοράς (Παράγραφος 2.16.3). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε πέντε βιολογικές επαναλήψεις και οι μέσοι όροι των επιπέδων των μεταβολιτών παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2 και τον Πίνακα A.10 του παραρτήματος A. Με σκοπό τη συγκριτική ανάλυση του μεταβολομικού προτύπου των φυματίων, υπολογίστηκαν οι λόγοι των

επιπέδων των μεταβολιτών μεταξύ των διαφορετικών τύπων φυματίων (Πίνακας 3.2 και πίνακας A.14). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) (Πίνακας 3.2) και έλεγχος δοκιμών μέσω της δοκιμασίας Bonferroni (Παράρτημα Β, πίνακας Β.10). Τέλος, πραγματοποιήθηκε πολυμεταβλητή ανάλυση με τη μέθοδο των κύριων συνιστωσών (PCA) για την ομαδοποίηση των δειγμάτων και τον εντοπισμό των μεταβολιτών που παραλλάσσουν σημαντικά τους διαφορετικούς τύπους των φυματίων (Εικόνα 3.18 και εικόνες A.1 και A.2 του παραρτήματος Α).

Κατά τη μεταβολομική ανάλυση των αζωτοδεσμευτικών φυματίων που σχηματίστηκαν από το ριζόβιο άγριου τύπου και των μη λειτουργικών φυματίων που σχηματίστηκαν από τα μεταλλαγμένα στελέχη *ΔnifA* και *ΔnifH* ανιχνεύτηκαν 121 μεταβολίτες, από τους οποίους οι 86 ήταν κοινοί και στους τρεις τύπους φυματίων (Πίνακας 3.2). Συγκεκριμένα, βρέθηκαν 109, 101 και 105 μεταβολίτες στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια και στα φυμάτια *ΔnifA* και *ΔnifH*, αντίστοιχα. Δώδεκα μεταβολίτες ανιχνεύτηκαν μόνο στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια και συγκεκριμένα το 2-φουροϊκό οξύ, το 2-υδροκινναμωμικό οξύ, το μανδελικό οξύ, το πικολονικό οξύ, το DL-2-αμινο-3-φωσφοπροπιονικό οξύ, το Οροτικό οξύ, το 3-φωσφογλυκερικό, το 3-φωσφογλυκερικό οξύ, η 5'-μονοφωσφορική κυτινδίνη, η Ο-φωσφο-L-θρεονίνη, το 2,3-διϋδροξυδιφαινύλιο και η φλωροβενζοφαινόνη. Αντίθετα, μόνο στα μη λειτουργικά φυμάτια, *ΔnifA* και *ΔnifH*, ανιχνεύτηκαν οι εξής μεταβολίτες: η λακτόζη, η ακετόλη, το μεθυλμηλονικό οξύ, το trans-3-εξενοδιοϊκό οξύ, το 2-φαινυλακεταμίδιο, το 3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρικό οξύ, το 4-υδροξυβενζυλο κυάνιο, το 4-υδροξυμανδελονιτρίλιο, η 5-υδροξυ-L-τρυπτοφάνη, η 5-φωσφορική ριβουλόζη, και η κωνιφερυλοαλκοόλη (Πίνακας 3.2).

Η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) που πραγματοποιήθηκε ανέδειξε 89 μεταβολίτες που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ( $P < 0.05$ , Πίνακας 3.2). Σημαντικές διαφορές παρατηρούνται στα αμινοξέα. Τα επίπεδα του ασπαρτικού οξέος, της β-αλανίνης, της L-αλανίνης, της L-γλουταμίνης, της L-ιστιδίνης, της L-λυσίνης, της L-προλίνης της L-θρεονίνης και της L-βαλίνης εμφανίζονται σημαντικά μειωμένα και στους δύο τύπους *fix<sup>-</sup>* φυματίων σε σύγκριση με τα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια. Στα φυμάτια που σχηματίστηκαν από το μεταλλαγμένο στέλεχος *ΔnifA* παρατηρούνται, επίσης, μειωμένα επίπεδα της L-σερίνης και της L-ισολευκίνης από ότι στα *fix<sup>+</sup>* φυμάτια. Αντίθετα, στα φυμάτια που φέρουν τα μεταλλαγμένα βακτηριοειδή *ΔnifH* παρατηρείται σημαντική αύξηση στα επίπεδα της L-μεθειονίνης, της L-τρυπτοφάνης και της τυροσίνης σε σύγκριση με τα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια.



**Εικόνα 3.18:** Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) των μεταβολομικών προτύπων φυματίων *L. jarrowii* που σχηματίστηκαν είτε από το αζωτοδεσμευτικό ριζόβιο άγριου τύπου είτε από τα *fix* στελέχη *ΔnifA* ή *ΔnifH*.

Για την ανάλυση κύριων συνιστωσών χρησιμοποιήθηκαν μετρήσεις από πέντε ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις για κάθε τύπο φυματίου. **(Α)** Διάγραμμα των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών που αντιπροσωπεύουν το 69.6% της συνολικής παραλλακτικότητας που παρατηρείται στο μεταβολομικό πρότυπο των διαφορετικών τύπων φυματίων. **(Β)** Διάγραμμα των βαρών (loadings) των συνιστωσών που δείχνουν τη μεγαλύτερη διακύμανση στους διαφορετικούς τύπους φυματίων.

**Πίνακας 3.2:** Μεταβολίτες που ανιχνεύονται σε φυμάτια *L. jaronicus* που σχηματίστηκαν είτε από το αζωτοδεσμευτικό ριζόβιο άγριου τύπου είτε από τα *fix*<sup>-</sup> στελέχη *ΔnifA* ή *ΔnifH*.

Για κάθε μεταβολίτη παρουσιάζεται η αναλογία μάζας προς φορτίο (m/z), ο χρόνος έκλουσης (RT), ο μέσος όρος της σχετικής απόκρισης πέντε ανεξάρτητων βιολογικών επαναλήψεων, καθώς και ο λόγος της σχετικής απόκρισης σε *fix*<sup>-</sup> φυμάτια σχηματισμένα είτε από το στέλεχος *ΔnifA* (NA) είτε από το *ΔnifH* (NH), ως προς τη σχετική απόκριση στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια που σχηματίστηκαν από το *M. loti* άγριου τύπου (N). Οι λόγοι σχετικής απόκρισης που αντιπροσωπεύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P < 0.05$ ) επισημαίνονται με έντονη γραφή, ενώ οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των *fix*<sup>-</sup> φυματίων *ΔnifA* και *ΔnifH* επισημαίνονται με διαφορετικά γράμματα. Η τιμή  $P$  αντιπροσωπεύει το επίπεδο σημαντικότητας μεταξύ των σχετικών αποκρίσεων για κάθε μεταβολίτη (ANOVA), όταν τουλάχιστον δύο μέσοι όροι σχετικών αποκρίσεων είναι  $>0$ .

Μεταβολίτης	m/z	RT	N	NA	NH	NA/N	NH/N	P
<b>Αμινοξέα</b>								
L-σερίνη	204	13.696	1.006	0.539	0.693	<b>0.536</b>	0.689	<b>0.046</b>
Ασπαρτικό οξύ	232	17.622	2.218	0.602	1.018	<b>0.271</b>	<b>0.459</b>	<b>0.000</b>
β-αλανίνη	248	15.211	0.183	0.031	0.116	<b>0.172 a</b>	<b>0.632 b</b>	<b>0.000</b>
Κυκλολευκίνη	156	13.545	0.316	0.161	0.339	0.508	1.073	0.745
L-ισολευκίνη	158	11.883	0.254	0.119	0.137	<b>0.466</b>	0.537	<b>0.020</b>
L-αλανίνη	116	7.235	1.434	0.325	0.438	<b>0.227</b>	<b>0.305</b>	<b>0.001</b>
L-ασπαραγίνη	231	21.044	6.137	0.221	0.747	<b>0.036</b>	<b>0.122</b>	<b>0.000</b>
L-γλουταμικό οξύ	246	19.868	3.075	1.725	4.303	0.561	1.399	0.328
L-γλουταμίνη	156	23.189	0.784	0.064	0.070	<b>0.082</b>	<b>0.089</b>	<b>0.000</b>
L-ιστιδίνη	154	26.191	0.303	0.001	0.005	<b>0.004</b>	<b>0.018</b>	<b>0.000</b>
L-ομοσερίνη	218	15.902	0.174	0.079	0.213	0.457	1.227	0.050
L-λυσίνη	317	26.244	0.771	0.082	0.198	<b>0.106</b>	<b>0.257</b>	<b>0.002</b>
L-μεθειονίνη	176	17.415	0.008	0.014	0.055	1.773 a	<b>6.863 b</b>	<b>0.000</b>
L-προλίνη	142	11.894	0.268	0.082	0.108	<b>0.308</b>	<b>0.404</b>	<b>0.000</b>
L-θρεονίνη	218	14.389	0.591	0.201	0.243	<b>0.339</b>	<b>0.410</b>	<b>0.000</b>
L-τροπτοφάνη	202	31.641	0.263	0.436	1.548	1.656 a	<b>5.883 b</b>	<b>0.000</b>
L-βαλίνη	144	9.907	0.320	0.138	0.207	<b>0.431</b>	0.647	<b>0.038</b>
Τυροσίνη	218	26.534	0.330	0.389	0.808	1.177 a	<b>2.444 b</b>	<b>0.000</b>
<b>Σάκχαρα</b>								
Κυτταροβιόζη	361	37.768	0.022	0.018	0.065	0.820	2.943	0.076
D-(+) τρεχαλόζη	361	40.480	0.508	0.181	0.490	0.355	0.965	<b>0.048</b>
D-(+)-μελεζιτόζη	361	50.441	1.105	0.212	2.607	0.192 a	<b>2.360 b</b>	<b>0.000</b>
D-αλλόζη	319	26.077	0.046	0.040	0.308	0.853	6.639	<b>0.035</b>
D-γλυκόζη	319	26.164	2.349	1.428	4.120	0.608 a	1.753 b	<b>0.040</b>
D-λυσόζη	262	21.228	0.080	0.095	0.211	1.178 a	<b>2.619 b</b>	<b>0.002</b>
Φρουκτόζη	307	25.688	1.815	0.390	0.718	0.215	0.395	0.400
Ισομαλτόζη	361	41.763	0.341	0.432	0.824	1.269	2.418	0.158
Λακτόζη	361	37.843	n.d.	0.036	0.096	s.p.	<b>s.p.</b>	<b>0.019</b>
Μαλτόζη	361	40.655	0.436	0.333	0.533	0.763	1.222	0.705
Μαλτοτριόζη	361	49.168	0.042	n.d.	0.079	n.d. a	1.897 b	<b>0.002</b>
Μελιβιόζη	361	40.955	0.538	0.333	0.827	0.620 a	<b>1.536 b</b>	<b>0.000</b>
Παλατινόζη	361	41.090	0.333	0.090	0.624	0.271	1.872	0.170



Μεταβολίτης	m/z	RT	N	NA	NH	NA/N	NH/N	P
Ραφινόζη	87	49.005	0.224	0.090	0.421	0.400 a	<b>1.879 b</b>	<b>0.002</b>
Σακχαρόζη	361	39.060	25.979	35.155	44.539	1.353	1.714	0.736
Ταγκατόζη	217	25.652	0.044	0.249	0.445	5.658	<b>10.111</b>	<b>0.003</b>
Πολυόλες								
Ακετόλη	219	18.567	n.d.	0.283	0.052	s.p. a	s.p. b	<b>0.000</b>
D-μαννιτόλη	319	26.784	11.598	3.514	4.946	<b>0.303</b>	<b>0.426</b>	<b>0.000</b>
D-θρεϊτόλη	217	17.550	0.134	0.010	0.156	0.073	1.167	0.223
Γαλακτινόλη	204	43.854	0.117	0.104	0.645	0.888 a	<b>5.522 b</b>	<b>0.000</b>
Μυο-ινοσιτόλη	432	29.727	10.927	14.672	32.112	1.343 a	<b>2.939 b</b>	<b>0.000</b>
Παλατινιτόλη	361	41.590	0.056	0.016	0.032	<b>0.292</b>	0.571	<b>0.020</b>
Ονονιτόλη	217	27.183	37.411	16.021	31.950	0.428	0.854	0.144
Πινιτόλη	260	24.782	126.824	182.537	178.799	1.439	1.410	0.533
Οργανικά οξέα								
2-φουροϊκό οξύ	125	7.822	0.013	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<b>0.011</b>
2-υδροκινναμωμικό οξύ	293	21.673	0.085	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<b>0.016</b>
2-ισοπροπυλμηλικό οξύ	147	18.931	0.160	0.124	0.441	0.778 a	<b>2.759 b</b>	<b>0.001</b>
4-γουανιδοβουτυρικό οξύ	174	17.698	2.164	0.248	0.463	<b>0.115</b>	<b>0.214</b>	<b>0.000</b>
4-υδροκινναμωμικό οξύ	293	26.346	0.167	0.016	0.055	<b>0.094</b>	<b>0.331</b>	<b>0.000</b>
6-υδροξυνικοτινικό οξύ	268	18.570	0.174	0.003	0.072	0.019	0.413	0.054
α-κετογλουταρικό οξύ	147	18.875	0.147	n.d.	0.168	n.d.	1.143	0.264
Κιτραμηλικό οξύ	147	16.456	15.623	3.826	2.743	<b>0.245</b>	<b>0.176</b>	<b>0.004</b>
Κιτρικό οξύ	347	24.395	6.647	5.284	14.368	0.795	2.162	0.135
D-μηλικό οξύ	147	16.893	13.022	4.063	12.826	<b>0.312 a</b>	0.985 b	<b>0.007</b>
Γαλακτουρονικό οξύ	333	24.550	0.034	0.075	n.d.	2.225	n.d.	0.103
Γλυκοεπτονικό οξύ	217	31.134	5.772	0.038	0.185	0.007	0.032	0.120
Γλυκονικό οξύ	333	27.476	0.762	0.142	0.357	<b>0.186</b>	<b>0.468</b>	<b>0.000</b>
Γλυκερικό οξύ	189	12.940	0.228	0.071	0.352	0.310 a	1.545 b	<b>0.001</b>
Ιμινοδιοξικό οξύ	232	18.301	0.006	0.001	n.d.	<b>0.088</b>	n.d.	<b>0.002</b>
L-γαλακτικό οξύ	147	6.432	3.637	3.897	5.881	1.072	1.617	0.513
Λακτοβιονικό οξύ	217	40.453	0.024	0.009	0.016	0.363	0.681	0.642
Μηλεινάμικό οξύ	244	17.411	0.219	0.009	0.133	<b>0.039</b>	0.606	<b>0.007</b>
Μηλεινικό οξύ	147	12.083	0.313	0.060	0.149	<b>0.192</b>	0.476	<b>0.013</b>
Μηλονικό οξύ	147	9.500	0.993	0.090	0.421	<b>0.090</b>	<b>0.423</b>	<b>0.002</b>
Μανδελικό οξύ	179	16.460	0.011	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.058
Μεθυλμηλονικό οξύ	147	9.822	n.d.	0.179	0.011	s.p. a	s.p. b	<b>0.002</b>
Βλεννικό οξύ	333	28.987	0.710	0.406	1.032	<b>0.572 a</b>	<b>1.453 b</b>	<b>0.000</b>
Οξαλικό οξύ	147	7.870	0.456	0.037	0.100	<b>0.080</b>	<b>0.220</b>	<b>0.000</b>
Φαινυλοπυροσταφυλικό οξύ	116	19.002	0.201	n.d.	0.003	n.d.	<b>0.013</b>	<b>0.001</b>
Πικολονικό οξύ	180	12.461	0.023	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<b>0.022</b>
Πιπεκολικό οξύ	156	13.564	0.542	0.325	0.714	0.600	1.318	0.394
Πυροσταφυλικό οξύ	174	6.214	0.071	0.080	0.173	1.133 a	<b>2.443 b</b>	<b>0.000</b>
Σακχαρικό οξύ	333	28.402	0.804	0.785	1.593	0.976 a	<b>1.981 b</b>	<b>0.000</b>

Μεταβολίτης	m/z	RT	N	NA	NH	NA/N	NH/N	P
Σικιμικό οξύ	204	24.205	0.214	0.008	0.027	<b>0.039</b>	<b>0.125</b>	<b>0.000</b>
Ηλεκτρικό οξύ	148	12.313	1.799	0.762	2.085	<b>0.424 a</b>	1.159 b	<b>0.000</b>
trans-3-εξενοδιοϊκό οξύ	73	15.512	n.d.	0.038	0.056	s.p.	s.p.	0.090
trans-ακονιτικό οξύ	229	22.730	0.088	0.019	0.057	0.215	0.649	0.386
Αζωτούχες ενώσεις								
1-μεθυλ-νικοτιναμίδη	179	15.974	0.029	0.003	0.017	<b>0.107</b>	0.591	<b>0.009</b>
2-φαινυλακεταμίδιο	92	15.728	n.d.	0.017	0.036	s.p.	<b>s.p.</b>	<b>0.002</b>
3,5-διυδροξυφαινυλογλυκίνη	355	26.344	0.058	n.d.	0.006	<b>n.d.</b>	<b>0.102</b>	<b>0.001</b>
3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρικό οξύ	247	19.497	n.d.	0.034	0.120	s.p. a	<b>s.p. b</b>	<b>0.000</b>
4-υδροξυβενζυλο κυάνιο	190	17.117	n.d.	0.004	0.009	s.p.	s.p.	0.066
4-υδροξυμανδελονιτρίλιο	223	16.600	n.d.	0.002	0.014	s.p.	s.p.	0.063
5-αμινοϊμιδαζολο-4-καρβοξαμίδιο	237	23.929	0.044	n.d.	0.005	<b>n.d.</b>	0.111	<b>0.024</b>
5'-δεοξυ-5'-(μεθυλθειο)αδενοσίνη	236	40.530	0.387	0.003	0.009	<b>0.007</b>	<b>0.022</b>	<b>0.000</b>
5-υδροξυ-L-τρυπτοφάνη	290	34.483	n.d.	0.001	0.007	s.p. a	<b>s.p. b</b>	<b>0.004</b>
Αδενίνη	264	24.964	0.070	0.024	0.057	<b>0.347 a</b>	0.806 b	<b>0.003</b>
Αδενοσίνη	236	38.433	0.318	0.046	0.155	<b>0.145 a</b>	<b>0.489 b</b>	<b>0.000</b>
β-κυανο-L-αλανίνη	141	13.876	0.896	0.013	0.029	<b>0.015</b>	<b>0.033</b>	<b>0.000</b>
DL-2-αμινο-3-φωσφοπροπιονικό οξύ	340	23.698	0.005	n.d.	n.d.	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>0.001</b>
D-λυξοζαμίνη	217	21.227	0.040	0.093	0.106	2.328	2.648	0.263
Υποξανθίνη	265	23.716	0.008	n.d.	0.002	<b>n.d.</b>	<b>0.223</b>	<b>0.007</b>
L-νορλευκίνη	158	11.325	0.082	0.041	0.050	0.499	0.616	0.657
N-μεθυλγλουταμικό οξύ	260	21.298	0.257	0.022	0.022	<b>0.087</b>	<b>0.085</b>	<b>0.000</b>
Οροτικό οξύ	254	22.674	0.032	n.d.	n.d.	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>0.002</b>
Παντοθενικό οξύ	291	27.664	0.054	0.008	0.023	<b>0.153</b>	0.423	<b>0.008</b>
Φαινυλαιθυλαμίνη	174	18.324	0.023	0.071	0.058	<b>3.053</b>	2.496	<b>0.037</b>
Πουτρεσκίνη	174	22.345	0.145	0.035	0.054	<b>0.239</b>	<b>0.372</b>	<b>0.000</b>
Σπερμιδίνη	174	32.267	0.122	0.040	0.032	<b>0.330</b>	<b>0.262</b>	<b>0.000</b>
Ουρακίλη	241	12.975	0.208	0.067	0.078	<b>0.320</b>	<b>0.376</b>	<b>0.003</b>
Ουρία	147	10.280	0.183	0.168	0.257	0.922	1.410	0.832
Φωσφορικές ενώσεις								
3-φωσφογλυκερικό	357	23.773	0.049	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.286
3-φωσφογλυκερικό οξύ	387	24.186	0.072	n.d.	n.d.	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>0.011</b>
6-φωσφογλυκονικό οξύ	387	35.051	0.165	0.015	0.051	<b>0.094</b>	0.309	<b>0.024</b>
5'-μονοφωσφορική αδενοσίνη	315	44.459	0.299	0.000	0.005	<b>0.0003</b>	<b>0.018</b>	<b>0.002</b>
5'-μονοφωσφορική κυτινίνη	299	28.329	0.022	n.d.	n.d.	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>0.018</b>
6-φωσφορική-D-γλυκόζη	387	33.979	1.109	0.320	2.062	0.288 a	1.860 b	<b>0.010</b>
1-φωσφορική γλυκερόλη	357	23.245	0.392	0.135	0.370	<b>0.344 a</b>	0.944 b	<b>0.000</b>
Ο-φωσφοκολαμίνη	299	23.494	0.100	0.099	0.181	0.988 a	<b>1.815 b</b>	<b>0.017</b>
Ο-φωσφο-L-θρεονίνη	370	24.501	0.073	n.d.	n.d.	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>0.001</b>

Μεταβολίτης	m/z	RT	N	NA	NH	NA/N	NH/N	P
Φωσφορικό οξύ	299	11.440	7.462	4.856	1.356	0.651 a	<b>0.182 b</b>	<b>0.001</b>
5-φωσφορική ριβουλόζη	357	30.442	n.d.	0.020	0.043	s.p.	<b>s.p.</b>	<b>0.003</b>
Άλλες ενώσεις								
2,3-διϋδροξυδιφαινύλιο	330	23.908	0.021	n.d.	n.d.	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>0.011</b>
Αρβουτίνη	254	37.925	0.006	0.005	0.033	0.908 a	<b>5.485 b</b>	<b>0.016</b>
Καρβαμικό οξύ (ουρεθάνη)	146	4.586	0.117	0.032	n.d.	0.270	<b>n.d.</b>	<b>0.036</b>
Κατεχίνη	368	41.996	0.002	0.019	0.022	<b>8.290</b>	<b>9.655</b>	<b>0.001</b>
Χρυσίνη	383	38.002	n.d.	n.d.	0.006	n.d. a	<b>s.p. b</b>	<b>0.000</b>
Κονιφερυλοαλκοόλη	324	26.396	n.d.	0.003	0.006	s.p.	s.p.	0.080
Δεϋδροασκορβικό οξύ	173	24.923	0.018	0.058	n.d.	3.232 a	n.d. b	<b>0.023</b>
Γλυκονικό οξύ λακτόνη	275	25.784	0.313	1.507	3.119	<b>4.810 a</b>	<b>9.952 b</b>	<b>0.000</b>
Λογανίνη	361	41.758	0.165	0.112	0.120	0.681	0.730	0.534
Φαινυλακεταλδεΐδη	117	7.926	0.017	n.d.	0.001	<b>n.d.</b>	0.083	<b>0.024</b>
Φλωροβενζοφαινόνη	431	32.027	0.126	n.d.	n.d.	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>0.003</b>

Όσον αφορά στα σάκχαρα, σημαντικές διαφορές παρατηρούνται μόνο στα *fix<sup>-</sup>* φυμάτια που σχηματίστηκαν από το μεταλλαγμένο στέλεχος *ΔnifH* σε σχέση με τα *fix<sup>+</sup>* φυμάτια. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα της D-(+)-μελεζιτόζης, της D-λυξόζης, της μελιβιόζης, της ραφινόζης και της ταγκατόζης εμφανίζονται αυξημένα στα *ΔnifH* φυμάτια σε σύγκριση με τα φυμάτια που σχηματίστηκαν από το άγριου τύπου ριζόβιο (Πίνακας 3.2).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι και στους δύο τύπους *fix<sup>-</sup>* φυματίων που είτε σχηματίστηκαν από το μεταλλαγμένο στέλεχος *ΔnifA* είτε από το *ΔnifH*, τα επίπεδα D-μαννιτόλης είναι 60-70% χαμηλότερα από ότι στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια (Πίνακας 3.2). Στα φυμάτια που φέρουν το μεταλλαγμένο στέλεχος *ΔnifA* παρατηρείται μείωση και στα επίπεδα της παλατινιτόλης, ενώ στα φυμάτια που φέρουν το μεταλλαγμένο βακτηριοειδές *ΔnifH*, τα επίπεδα της γαλακτινόλης και της μυο-ινοσιτόλης είναι υψηλότερα από αυτά των *fix<sup>+</sup>* φυματίων.

Στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρούνται και στα επίπεδα πολλών οργανικών οξέων. Τα επίπεδα του 4-γουανιδοβουτυρικού οξέος, του 4-υδροκινναμωμικού οξέος, του κιτραμηλικού οξέος, του γλυκονικού οξέος, του μηλονικού οξέος, του οξαλικού οξέος, καθώς και του σακχαρικού οξέος είναι χαμηλότερα και στους δύο τύπους *fix<sup>-</sup>* φυματίων από ότι στα φυμάτια που σχηματίστηκαν από το άγριου τύπου ριζόβιο (Πίνακας 3.2). Επιπλέον, τα επίπεδα του D-μηλικού οξέος, του ιμινοδιοξικού οξέος, του μηλεϊνικού, του μηλεϊνικού οξέος, του βλεννικού οξέος και του ηλεκτρικού οξέος είναι σημαντικά χαμηλότερα στα *fix<sup>-</sup>* φυμάτια που φέρουν μη διαφοροποιημένα ριζόβια *ΔnifA* από ότι στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια. Στα *fix<sup>-</sup>* φυμάτια που σχηματίστηκαν από το στέλεχος *ΔnifH*, τα επίπεδα του φαινολοπυροσταφυλικού οξέος είναι χαμηλότερα από ότι στα *fix<sup>+</sup>* φυμάτια,

ενώ τα επίπεδα του 2-ισοπροπυλμηλικού οξέος, του βλεννικού οξέος, του πυροσταφυλικού οξέος, καθώς και του σακχαρικού οξέος εμφανίζονται σημαντικά υψηλότερα από αυτά των αζωτοδμευτικών φυματίων.

Πολλές αζωτούχες ενώσεις παρουσιάζουν χαμηλότερα επίπεδα και στους δύο τύπους μη λειτουργικών φυματίων σε σύγκριση με τα φυμάτια που σχηματίστηκαν από το άγριου τύπου ριζόβιο. Τέτοιες ενώσεις είναι η 5'-δεοξυ-5'-(μεθυλθειο)αδενοσίνη, η αδενοσίνη, η β-κυανο-L-αλανίνη, το μεθυλγλουταμικό οξύ, η πουτρεσκίνη, η σπερμιδίνη, και η ουρακίλη (Πίνακας 3.2). Στα φυμάτια που φέρουν το μεταλλαγμένο στέλεχος *ΔnifA* χαμηλότερα επίπεδα παρατηρούνται και για την 1-μεθυλ-νικοτιναμίδη, την αδενίνη και το παντοθενικό οξύ, ενώ τα επίπεδα της φαινυλαιθυλαμίνης είναι σημαντικά υψηλότερα σε σύγκριση με τα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια. Τέλος, τα επίπεδα της 3,5-διυδροξυφαινυλογλυκίνης και της υποξανθίνης εμφανίζονται σημαντικά χαμηλότερα από αυτά των *fix<sup>+</sup>* φυματίων.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα επίπεδα της 5'-μονοφωσφορικής αδενοσίνης και στους δύο τύπους των μη λειτουργικών φυματίων είναι λιγότερο από το 2% των επιπέδων που παρατηρούνται στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια (Πίνακας 3.2). Μειωμένα επίπεδα παρατηρούνται, επίσης, για το 6-φωσφογλυκονικό οξύ και την 1-φωσφορική γλυκερόλη στα φυμάτια που φέρουν το μεταλλαγμένο στέλεχος *ΔnifA* και για το φωσφορικό οξύ στα φυμάτια που σχηματίστηκαν από το στέλεχος *ΔnifH* σε σύγκριση με τα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια. Τέλος, τα επίπεδα της Ο-φωσφοκολαμίνης εμφανίζονται σημαντικά υψηλότερα στα φυμάτια που φέρουν μη λειτουργικά βακτηριοειδή *ΔnifH* από ότι στα *fix<sup>+</sup>* φυμάτια.

Στα *fix<sup>-</sup>* φυμάτια που είτε σχηματίστηκαν από το μεταλλαγμένο στέλεχος *ΔnifA* είτε από το *ΔnifH*, τα επίπεδα της κατεχίνης και του γλυκονικού οξέος λακτόνης είναι υψηλότερα από αυτά των αζωτοδμευτικών φυματίων (Πίνακας 3.2). Στα φυμάτια που φέρουν τα *fix<sup>-</sup>* βακτηριοειδή *ΔnifH* υψηλότερα επίπεδα εμφανίζει και η αρβουτίνη σε σύγκριση με τα φυμάτια που σχηματίστηκαν από το ριζόβιο άγριου τύπου.

Η ανάλυση των κύριων συνιστωσών αναδεικνύει την έντονη διαφοροποίηση των επιπέδων των μεταβολιτών στους διαφορετικούς τύπους φυματίων (Εικόνα 3.18). Η πρώτη συνιστώσα εξηγεί το 45.2% της παραλλακτικότητας, ενώ η δεύτερη συνιστώσα εξηγεί το 24.4% και επιτυγχάνουν τον έντονο διαχωρισμό των φυματίων είτε φέρουν τα αζωτοδεσμευτικά βακτηριοειδή άγριου τύπου είτε τα μεταλλαγμένα ριζόβια *ΔnifA* είτε τα *fix<sup>-</sup>* βακτηριοειδή *ΔnifH*. Επιπλέον, σύμφωνα με την ανάλυση των κύριων συνιστωσών, οι δέκα μεταβολίτες που επηρεάζουν περισσότερο το διαχωρισμό των διαφόρων τύπων

φυματίων είναι το βλεννικό οξύ, το ηλεκτρικό οξύ, η 6-φωσφορική-D-γλυκόζη, η μαλτοτριόζη, η μελιβιόζη, η τυροσίνη, το σακχαρικό οξύ και η χρυσίνη.

### 3.10.2 Συγκριτική ανάλυση μεταβολομικού προτύπου ριζών *L. jaronicus* κατά τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση του μεταβολομικού προτύπου ριζών *L. jaronicus* που είτε δεν εμβολιάστηκαν είτε εμβολιάστηκαν με το άγριου τύπου ριζόβιο ή με το μεταλλαγμένο *fix<sup>-</sup>* στέλεχος *ΔnifH* με την βοήθεια της αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών (GC-MS). Η σχετική απόκριση του κάθε μεταβολίτη υπολογίστηκε με βάση το φρέσκο βάρος του κάθε δείγματος και τη ριβιτόλη ως μεταβολίτη αναφοράς (Παράγραφος 2.16.3). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε πέντε βιολογικές επαναλήψεις και οι μέσοι όροι των επιπέδων των μεταβολιτών παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3 και τον Πίνακα A.11 του παραρτήματος Α. Με σκοπό τη συγκριτική ανάλυση του μεταβολομικού προτύπου των ριζών, υπολογίστηκαν οι λόγοι των επιπέδων των μεταβολιτών μεταξύ των διαφορετικών τύπων ριζών (Πίνακας 3.3 και πίνακας A.15). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) (Πίνακας 3.3) και έλεγχος δοκιμών μέσω της δοκιμασίας Bonferroni (Πίνακας B.8). Τέλος, πραγματοποιήθηκε πολυμεταβλητή ανάλυση με τη μέθοδο των κύριων συνιστωσών (PCA) για την ομαδοποίηση των δειγμάτων και τον εντοπισμό των μεταβολιτών που παραλλάσσουν σημαντικά τους διαφορετικούς τύπους των φυματίων (Εικόνα 3.19 και εικόνες A.3 και A.4 του παραρτήματος Α).

Κατά τη μεταβολομική ανάλυση των ριζών αζωτοδεσμευτικών, *fix<sup>-</sup>* και μη εμβολιασμένων φυτών ανιχνεύτηκαν συνολικά 101 μεταβολίτες, από τους οποίους οι 80 ήταν κοινοί και στους τρεις τύπους ριζών και 69 παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σύμφωνα με την ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) που πραγματοποιήθηκε ( $P < 0.05$ , Πίνακας 3.3). Συγκεκριμένα, βρέθηκαν 95, 94 και 88 μεταβολίτες στις ρίζες αζωτοδεσμευτικών, *fix<sup>-</sup>* και μη εμβολιασμένων φυτών, αντίστοιχα.

Τα επίπεδα των περισσότερων αμινοξέων και συγκεκριμένα της L-σερίνης, του ασπαρτικού οξέος, της β-αλανίνης, της L-αλανίνης, της L-ασπαραγίνης, της L-γλουταμίνης, της L-ιστιδίνης, της L-λυσίνης, της L-ομοσερίνης, της L-λυσίνης, της L-θρεονίνης και της L-βαλίνης εμφανίζονται σημαντικά χαμηλότερα στις ρίζες τόσο των *fix<sup>-</sup>* όσο και των μη εμβολιασμένων φυτών σε σύγκριση τις ρίζες των αζωτοδεσμευτικών φυτών (Πίνακας 3.3). Οι μη εμβολιασμένες ρίζες παρουσιάζουν χαμηλότερα επίπεδα L-μεθειονίνης και τυροσίνης από αυτά των ριζών *fix<sup>+</sup>* φυτών. Αντίθετα, στις ρίζες που εμβολιάστηκαν με το μεταλλαγμένο ριζόβιο *ΔnifH* παρατηρούνται σημαντικά υψηλότερα επίπεδα L-τρυπτοφάνης σε σύγκριση με τις ρίζες αζωτοδεσμευτικών φυτών.

**Πίνακας 3.3:** Μεταβολίτες που ανιχνεύονται σε ρίζες *L. jaronicus* που είτε δεν εμβολιάστηκαν είτε εμβολιάστηκαν από το αζωτοδεσμευτικό ριζόβιο άγριου τύπου είτε με το *fix* στέλεχος *ΔnifH*.

Για κάθε μεταβολίτη παρουσιάζεται η αναλογία μάζας προς φορτίο ( $m/z$ ), ο χρόνος έκλουσης (RT), ο μέσος όρος της σχετικής απόκρισης πέντε ανεξάρτητων βιολογικών επαναλήψεων, καθώς και ο λόγος της σχετικής απόκρισης σε μη εμβολιασμένες ρίζες (RU) και σε ρίζες εμβολιασμένες με το στέλεχος *ΔnifH* (RH), ως προς τη σχετική απόκριση σε ρίζες που εμβολιάστηκαν με το *M. loti* άγριου τύπου (R). Οι λόγοι σχετικής απόκρισης που αντιπροσωπεύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P < 0.05$ ) επισημαίνονται με έντονη γραφή, ενώ οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ ριζών των μη εμβολιασμένων και των *fix* φυτών επισημαίνονται με διαφορετικά γράμματα. Η τιμή  $P$  αντιπροσωπεύει το επίπεδο σημαντικότητας μεταξύ των σχετικών αποκρίσεων για κάθε μεταβολίτη (ANOVA), όταν τουλάχιστον δύο μέσοι όροι σχετικών αποκρίσεων είναι  $>0$ .

Μεταβολίτης	$m/z$	RT	R	RU	RH	RU/R	RH/R	$P$
<b>Αμινοξέα</b>								
L-σερίνη	204	13.696	1.428	0.489	0.554	<b>0.343</b>	<b>0.388</b>	<b>0.002</b>
Ασπαρτικό οξύ	232	17.622	1.488	0.486	0.397	<b>0.327</b>	<b>0.267</b>	<b>0.000</b>
β-αλανίνη	248	15.211	0.170	0.061	0.060	<b>0.357</b>	<b>0.352</b>	<b>0.000</b>
Κυκλολευκίνη	156	13.545	0.045	0.010	n.d.	0.229	n.d.	0.063
L-ισολευκίνη	158	11.883	0.113	0.054	0.056	0.481	0.497	0.173
L-αλανίνη	116	7.235	0.467	0.114	0.025	<b>0.244</b>	<b>0.053</b>	<b>0.000</b>
L-ασπαραγίνη	231	21.044	3.591	1.756	0.241	<b>0.489 a</b>	<b>0.067 b</b>	<b>0.000</b>
L-γλουταμικό οξύ	246	19.868	1.717	0.647	0.651	0.377	0.379	0.073
L-γλουταμίνη	156	23.189	0.324	0.032	0.081	<b>0.098</b>	<b>0.249</b>	<b>0.000</b>
L-ιστιδίνη	154	26.191	0.025	0.003	0.001	<b>0.102</b>	<b>0.043</b>	<b>0.010</b>
L-ομοσερίνη	218	15.902	0.066	0.031	0.020	<b>0.471</b>	<b>0.307</b>	<b>0.000</b>
L-λευκίνη	158	11.300	0.038	0.006	n.d.	0.162	n.d.	0.087
L-λυσίνη	317	26.244	0.096	0.051	0.046	<b>0.529</b>	<b>0.477</b>	<b>0.012</b>
L-μεθειονίνη	176	17.415	0.013	0.002	0.006	<b>0.169</b>	0.468	<b>0.020</b>
L-ορνιθίνη	174	24.154	0.133	0.137	0.045	1.035	0.336	0.064
L-προλίνη	142	11.894	0.106	0.036	0.030	0.343	0.286	0.059
L-θρεονίνη	218	14.389	0.488	0.139	0.187	<b>0.285</b>	<b>0.382</b>	<b>0.001</b>
L-τρυπτοφάνη	202	31.641	0.093	0.041	0.345	0.439 a	<b>3.698 b</b>	<b>0.000</b>
L-βαλίνη	144	9.907	0.122	0.057	0.037	<b>0.468</b>	<b>0.305</b>	<b>0.001</b>
Τυροσίνη	218	26.534	0.146	0.048	0.097	<b>0.331</b>	0.663	<b>0.005</b>
<b>Σάκχαρα</b>								
Κυτταροβιόζη	361	37.768	0.006	0.004	0.008	0.738	1.457	0.149
D-(+) τρεχαλόζη	361	40.480	0.228	0.008	0.111	<b>0.033</b>	0.488	<b>0.002</b>
D-(+)-μελεζιτόζη	361	50.441	0.001	n.d.	0.020	n.d. a	<b>13.843 b</b>	<b>0.000</b>
D-αλλόζη	319	26.077	0.224	0.036	0.301	<b>0.162 a</b>	1.345 b	<b>0.004</b>
D-γλυκόζη	319	26.164	4.565	0.291	2.896	<b>0.064</b>	0.634	<b>0.003</b>
D-λυσόζη	262	21.228	0.099	0.017	0.086	<b>0.167 a</b>	0.871 b	<b>0.001</b>
Φρουκτόζη	307	25.688	5.969	0.174	2.365	<b>0.029 a</b>	<b>0.396 b</b>	<b>0.000</b>
Μαλτόζη	361	40.655	1.155	0.297	0.968	0.257	0.838	<b>0.042</b>
Μελιβιόζη	361	40.955	0.288	0.067	0.284	<b>0.233 a</b>	0.985 b	<b>0.002</b>
Ραφινόζη	87	49.005	0.177	0.010	0.102	<b>0.058 a</b>	0.575 b	<b>0.000</b>
Άνυδρη μονοϋδρική σε-δοεππουλόζη	204	26.899	0.226	0.005	0.006	<b>0.024</b>	<b>0.025</b>	<b>0.000</b>
Σοφορόζη	319	40.391	0.001	0.002	n.d.	2.941	n.d.	0.083
Σακχαρόζη	361	39.060	29.098	8.607	3.844	<b>0.296</b>	<b>0.132</b>	<b>0.000</b>

Μεταβολίτης	m/z	RT	R	RU	RH	RU/R	RH/R	P
Ταγκατόζη	217	25.652	n.d.	0.121	0.016	s.p. a	s.p. b	<b>0.000</b>
<b>Πολυόλες</b>								
Ακετόλη	219	18.567	0.093	0.013	0.028	<b>0.137</b>	0.304	<b>0.031</b>
D-μαννιτόλη	319	26.784	15.940	0.050	6.985	<b>0.003</b> a	<b>0.438</b> b	<b>0.000</b>
D-σορβιτόλη	319	26.785	5.650	0.014	n.d.	0.003	n.d.	0.109
Γαλακτινόλη	204	43.854	0.261	0.008	0.211	<b>0.030</b> a	0.810 b	<b>0.000</b>
Μυο-ινοσιτόλη	432	29.727	9.589	0.505	11.146	<b>0.053</b> a	1.162	<b>0.000</b>
Παλατινιτόλη	361	41.590	0.012	0.000	0.005	<b>0.039</b>	0.439	<b>0.035</b>
Ονονιτόλη	217	27.183	3.884	6.663	22.605	1.715	5.819	0.178
Πινιτόλη	260	24.782	63.177	91.620	236.187	1.450	3.739	0.166
<b>Οργανικά οξέα</b>								
2-ισοπροπυλμηλικό οξύ	147	18.931	0.113	0.021	0.105	<b>0.188</b> a	0.930 b	<b>0.001</b>
4-γουανιδοβουτυρικό οξύ	174	17.698	1.454	0.211	0.439	<b>0.145</b>	<b>0.302</b>	<b>0.000</b>
4-υδροκινναμωμικό οξύ	293	26.346	0.051	0.019	0.029	<b>0.374</b>	<b>0.575</b>	<b>0.002</b>
6-υδροξυνικοτινικό οξύ	268	18.570	0.009	n.d.	0.004	<b>n.d.</b>	0.433	<b>0.032</b>
α-κετογλουταρικό οξύ	147	18.875	0.157	n.d.	0.059	<b>n.d.</b>	<b>0.377</b>	<b>0.002</b>
Κιτρακονικό οξύ	147	13.315	0.587	0.058	0.273	<b>0.099</b> a	<b>0.466</b> b	<b>0.000</b>
Κιτραμηλικό οξύ	147	16.456	2.382	0.905	1.371	0.380	0.576	0.073
Κιτρικό οξύ	347	24.395	1.491	2.048	1.730	1.373	1.160	0.518
D-μηλικό οξύ	147	16.893	9.527	0.727	6.495	<b>0.076</b>	0.682	<b>0.004</b>
Γαλακτουρονικό οξύ	333	24.550	0.041	0.030	0.122	0.746	3.003	0.065
Γαλλικό οξύ	458	27.005	0.000	0.001	0.001	2.293	4.668	0.300
Γλυκοεπτονικό οξύ	217	31.134	7.861	n.d.	2.071	<b>n.d.</b>	<b>0.263</b>	<b>0.005</b>
Γλυκονικό οξύ	333	27.476	0.217	0.102	0.148	<b>0.471</b>	0.681	<b>0.015</b>
Γλυκερικό οξύ	189	12.940	0.064	0.007	0.042	0.104	0.666	0.065
Ιμινοδιοξικό οξύ	232	18.301	0.015	n.d.	n.d.	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>0.000</b>
L-γαλακτικό οξύ	147	6.432	4.946	2.007	3.922	0.406	0.793	0.415
Λακτοβιονικό οξύ	217	40.453	0.003	0.001	0.038	0.431	12.017	0.411
Μηλεϊναμικό οξύ	244	17.411	0.001	n.d.	0.008	n.d. a	<b>12.319</b> b	<b>0.002</b>
Μηλεϊνικό οξύ	147	12.083	0.290	0.054	0.074	<b>0.185</b>	<b>0.256</b>	<b>0.003</b>
Μηλονικό οξύ	147	9.500	0.110	0.007	0.062	<b>0.060</b>	0.567	<b>0.005</b>
Μεθυλμηλονικό οξύ	147	9.822	n.d.	n.d.	0.007	n.d. a	s.p. b	<b>0.024</b>
Βλεννικό οξύ	333	28.987	0.321	0.081	0.325	<b>0.253</b> a	1.012 b	<b>0.001</b>
Φαινυλοπυροσταφυλικό οξύ	116	19.002	0.004	n.d.	0.002	n.d.	0.485	0.138
Σακχαρικό οξύ	333	28.402	0.967	0.321	0.739	<b>0.332</b> a	0.764 b	<b>0.001</b>
Ηλεκτρικό οξύ	148	12.313	1.706	0.197	0.795	<b>0.115</b> a	<b>0.466</b> b	<b>0.000</b>
Τρυγικό οξύ	147	19.707	0.008	0.000	0.316	0.047 a	<b>39.586</b> b	<b>0.021</b>
trans-ακονιτικό οξύ	229	22.730	0.249	0.002	0.120	<b>0.008</b> a	<b>0.483</b> b	<b>0.000</b>
<b>Αζωτούχες ενώσεις</b>								
1-μεθυλ-νικοτιναμίδη	179	15.974	0.001	n.d.	0.001	n.d.	0.948	0.439
3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρικό οξύ	247	19.497	0.078	0.293	0.050	<b>3.741</b> a	0.643 b	<b>0.000</b>
Αδενίνη	264	24.964	0.021	0.009	0.010	<b>0.444</b>	<b>0.481</b>	<b>0.000</b>
Αδενοσίνη	236	38.433	0.160	n.d.	0.068	<b>n.d.</b>	0.423	<b>0.002</b>
Αλλαντοΐνη	331	25.705	n.d.	0.027	n.d.	s.p. a	n.d. b	<b>0.001</b>

Μεταβολίτης	m/z	RT	R	RU	RH	RU/R	RH/R	P
β-κυανο-L-αλανίνη	141	13.876	0.550	0.370	0.037	<b>0.672 a</b>	<b>0.066 b</b>	<b>0.000</b>
D-λυξοζαμίνη	217	21.227	0.047	0.013	0.072	0.267	1.531	0.208
L-νορλευκίνη	158	11.325	0.032	0.013	0.008	0.419	0.257	0.181
N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνη	319	30.263	0.251	0.120	0.349	0.477	1.388	0.078
N-μεθυλγλουταμικό οξύ	260	21.298	0.026	0.008	0.001	<b>0.323</b>	<b>0.033</b>	<b>0.003</b>
Παντοθενικό οξύ	291	27.664	0.031	0.003	0.008	<b>0.084</b>	<b>0.260</b>	<b>0.000</b>
Φαινυλαιθυλαμίνη	174	18.324	0.077	0.011	0.141	<b>0.137 a</b>	<b>1.833 b</b>	<b>0.000</b>
Πουτρεσκίνη	174	22.345	0.058	0.022	0.022	<b>0.382</b>	<b>0.386</b>	<b>0.000</b>
Σπερμιδίνη	174	32.267	0.060	0.014	0.009	<b>0.237</b>	<b>0.156</b>	<b>0.000</b>
Σφιγγοσίνη	204	36.123	0.001	0.001	0.004	1.641	8.539	0.514
Ουρία	147	10.280	0.345	0.355	0.428	1.028	1.241	0.952
Φωσφορικές ενώσεις								
6-φωσφογλυκονικό οξύ	387	35.051	0.008	0.003	0.002	0.358	0.218	0.189
6-φωσφορική-D-γλυκόζη	387	33.979	0.240	0.114	0.375	0.475 a	1.562 b	<b>0.004</b>
1-φωσφορική γλυκερόλη	357	23.245	0.171	0.032	0.153	<b>0.189 a</b>	0.892 b	<b>0.001</b>
O-φωσφοκολαμίνη	299	23.494	n.d.	0.008	0.017	s.p.	s.p.	0.141
Φωσφορικό οξύ	299	11.440	1.185	1.847	5.987	1.558	5.053	0.166
5-φωσφορική ριβουλόζη	357	30.442	0.009	0.001	0.010	0.082	1.105	0.123
Άλλες ενώσεις								
2,3-διϋδροξυδιφαινύλιο	330	23.908	n.d.	0.036	n.d.	<b>s.p. a</b>	n.d. b	<b>0.000</b>
Αρβουτίνη	254	37.925	0.003	0.002	0.009	0.594 a	3.112 b	<b>0.032</b>
Καρβαμικό οξύ (ουρεθάνη)	146	4.586	0.056	0.008	0.025	<b>0.139</b>	<b>0.443</b>	<b>0.002</b>
Κατεχίνη	368	41.996	0.018	0.014	0.055	0.769 a	3.061 b	<b>0.022</b>
Χρυσίνη	383	38.002	0.000	n.d.	0.001	n.d.	3.140	0.058
Κονιφερυλοαλκοόλη	324	26.396	0.002	n.d.	0.003	n.d.	1.234	0.257
Δεϋδροασκορβικό οξύ	173	24.923	0.028	0.005	0.004	<b>0.179</b>	<b>0.127</b>	<b>0.000</b>
Γλυκονικό οξύ λακτόνη	275	25.784	0.461	0.094	0.194	<b>0.203</b>	0.421	<b>0.030</b>
Λογανίνη	361	41.758	0.008	0.000	0.005	0.018	0.554	0.059
Ριβονικό οξύ-γ-λακτόνη	147	20.162	n.d.	n.d.	0.020	n.d. a	<b>s.p. b</b>	<b>0.004</b>

Στις ρίζες των μη εμβολιασμένων και των *fix* φυτών, η συγκέντρωση της φρουκτόζης, της άνυδρης μονοϋδρικής σεδοεπτουλόζης και της σακχαρόζης εμφανίζεται σημαντικά χαμηλότερη από τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις που παρατηρούνται στις ρίζες που εμβολιάστηκαν με το ριζόβιο άγριου τύπου (Πίνακας 3.3). Επιπρόσθετα, τα περισσότερα σάκχαρα που ανιχνεύονται στις μη εμβολιασμένες ρίζες εμφανίζονται σε σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα από ότι στις ρίζες των *fix* φυτών. Ανάμεσα τους διακρίνονται η D-(+) τρεχαλόζη, η D-αλλόζη, η D-γλυκόζη, η D-λυξόζη, η μελιβιόζη και η ραφινόζη. Αύξηση της συγκέντρωσης της D-(+)-μελεζιτόζης παρατηρείται μόνο στις ρίζες των *fix* φυτών σε σύγκριση με τις ρίζες των αζωτοδυσμετρικών φυτών.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι τα επίπεδα D-μαννιτόλης είναι κατά 55% χαμηλότερα στις ρίζες των *fix* φυτών σε σύγκριση με τις ρίζες των αζωτοδυσμετρικών φυτών, ενώ οι στις μη εμβολιασμένες ρίζες η D-μαννιτόλη ανιχνεύεται σε ελάχιστες



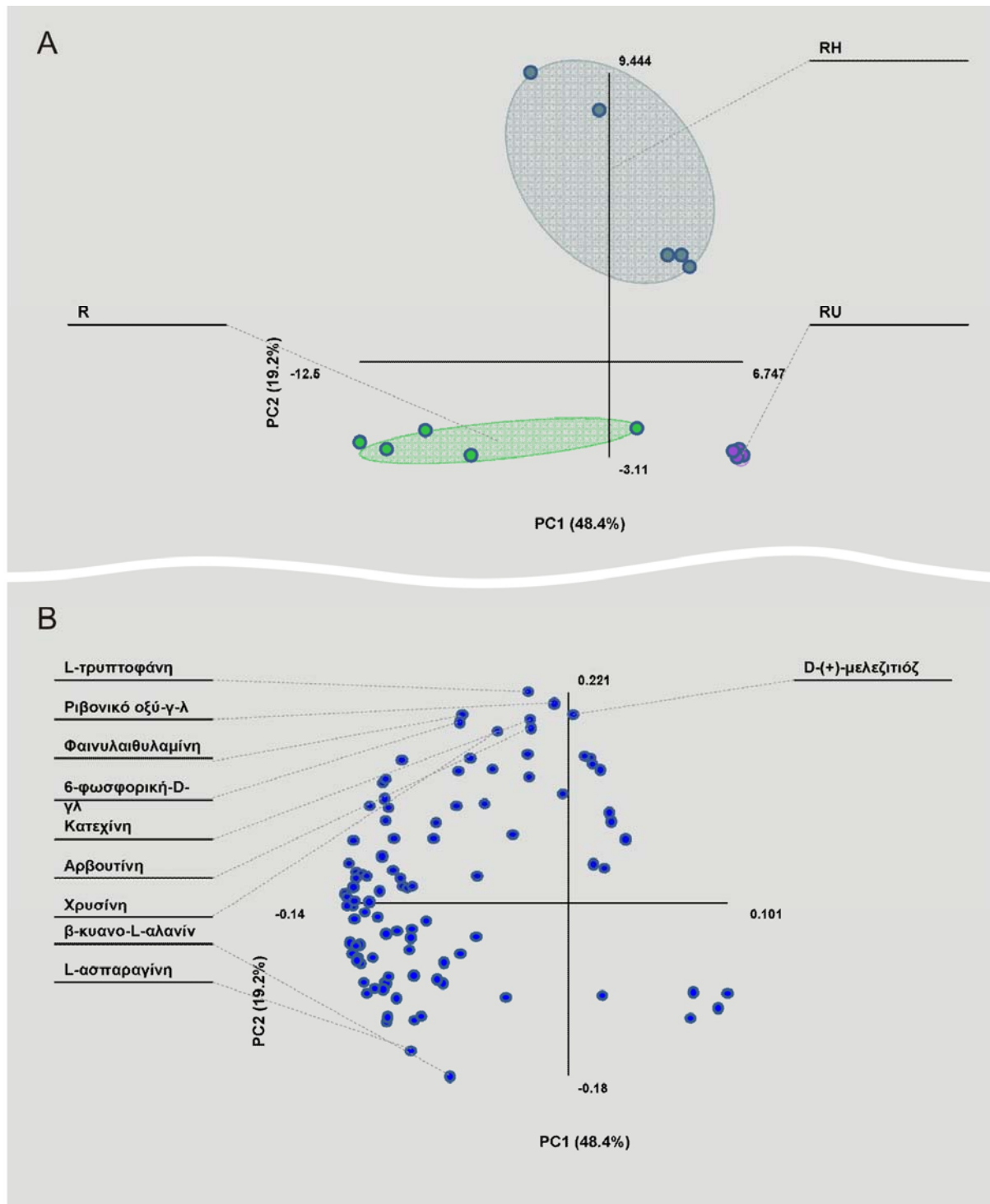
ποσότητες. Επιπλέον, σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα ορισμένων πολυολών, όπως της ακετόλης, της γαλακτινόλης, της μυο-ινοσιτόλης και της παλατινόλης εμφανίζονται στις μη εμβολιασμένες ρίζες σε σύγκριση με τις ρίζες που εμβολιάστηκαν με το ριζόβιο άγριου τύπου.

Πολλά οργανικά οξέα εμφανίζουν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα στις ρίζες τόσο των μη εμβολιασμένων φυτών όσο και των *fix<sup>-</sup>* φυτών σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα των ριζών των αζωτοδεσμευτικών φυτών. Αυτά είναι το 4-γουανιδοβουτυρικό οξύ, το 4-υδροκιναμωμικό οξύ, το κιτρακονικό οξύ, το μηλεϊνικό οξύ, το ηλεκτρικό οξύ και το trans-ακονιτικό οξύ. Στις μη εμβολιασμένες ρίζες, το 2-ισοπροπυλμηλικό οξύ, το D-μηλικό οξύ, το γλυκονικό οξύ, το μηλονικό οξύ, το βλεννικό οξύ και το σακχαρικό οξύ παρουσιάζουν χαμηλότερα επίπεδα από ότι στις ρίζες των *fix<sup>+</sup>* φυτών. Το α-κετογλουταρικό οξύ και το γλυκοεπτονικό οξύ δεν ανιχνεύονται στις μη εμβολιασμένες ρίζες, ενώ στις ρίζες των *fix<sup>-</sup>* φυτών συσσωρεύονται σε χαμηλότερα επίπεδα από ότι στις ρίζες των αζωτοδεσμευτικών φυτών. Αντίθετα, η συγκέντρωση του μηλεϊναμικό οξέος και του τρυγικού οξέος στις ρίζες των *fix<sup>-</sup>* φυτών είναι σημαντικά υψηλότερη από αυτή που παρατηρείται στις ρίζες των αζωτοδεσμευτικών φυτών.

Σημαντικές διαφορές παρατηρούνται και στη συγκέντρωση πολλών αζωτούχων ενώσεων στις ρίζες των διαφορετικών τύπων φυτών. Τόσο στις μη εμβολιασμένες ρίζες όσο και στις ρίζες που εμβολιάστηκαν με το μεταλλαγμένο στέλεχος *ΔnifH*, τα επίπεδα της αδενίνης, της β-κυανο-L-αλανίνης, του N-μεθυλγλουταμικού οξέος, του παντοθενικού οξέος, της πουτρεσκίνης και της σπερμιδίνης είναι χαμηλότερα από τα αντίστοιχα επίπεδα ριζών που εμβολιάστηκαν με το αζωτοδεσμευτικό ριζόβιο. Υψηλότερα επίπεδα παρουσιάζουν το 3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρικό οξύ στις ρίζες μη εμβολιασμένων φυτών και η φαινυλαιθυλαμίνη στις ρίζες *fix<sup>-</sup>* φυτών από ότι στις ρίζες αζωτοδεσμευτικών φυτών.

Η μόνη φωσφορική ένωση που παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά είναι η 1-φωσφορική γλυκερόλη της οποίας η συγκέντρωση στις μη εμβολιασμένες ρίζες είναι χαμηλότερη από αυτή των ριζών αζωτοδεσμευτικών φυτών. Τέλος, στις μη εμβολιασμένες ρίζες και στις ρίζες που εμβολιάστηκαν με το μεταλλαγμένο ριζόβιο *ΔnifH*, το καρβαμικό οξύ και το δεϋδροασκορβικό οξύ συσσωρεύονται σε χαμηλότερα επίπεδα από ότι στις ρίζες *fix<sup>+</sup>* φυτών.

Η ανάλυση των κύριων συνιστωσών αναδεικνύει την έντονη διαφοροποίηση των επιπέδων των μεταβολιτών στις ρίζες των διαφορετικών τύπων φυτών (Εικόνα 3.19). Η πρώτη



**Εικόνα 3.19:** Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) των μεταβολομικών προτύπων ριζών *L. jaramicensis* που είτε δεν εμβολιάστηκαν είτε εμβολιάστηκαν από το αζωτοδεσμευτικό ριζόβιο άγριου τύπου είτε με το *fix* στέλεχος *ΔnifH*.

Για την ανάλυση κύριων συνιστωσών χρησιμοποιήθηκαν μετρήσεις από πέντε ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις για κάθε τύπο ρίζας. **(Α)** Διάγραμμα των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών που αντιπροσωπεύουν το 67.6% της συνολικής παραλλακτικότητας που παρατηρείται στο μεταβολομικό πρότυπο των διαφορετικών τύπων ριζών. **(Β)** Διάγραμμα των βαρών (loadings) των συνιστωσών που δείχνουν τη μεγαλύτερη διακύμανση στους διαφορετικούς τύπους ριζών.

συνιστώσα εξηγεί το 48.4% της παραλλακτικότητας, ενώ η δεύτερη συνιστώσα εξηγεί το 19.2% και επιτυγχάνουν τον έντονο διαχωρισμό των ριζών που εμβολιάστηκαν με το ριζόβιο άγριου τύπου από τις ρίζες που εμβολιάστηκαν με το μεταλλαγμένο στέλεχος και από τις μη εμβολιασμένες ρίζες. Επιπλέον, από την ανάλυση των κύριων συνιστωσών προκύπτει ότι η L-τρυπτοφάνη, η L-ασπαράγινη, η β-κυανο-L-αλανίνη, η 6-φωσφορική-D-γλυκόζη, η D-(+)-μελεζιτόζη, το ριβονικό οξύ-γ-λακτόνη, η φαινυλαιθυλαμίνη, η κατεχίνη, η αρβουτίνη και η χρυσίνη είναι οι δέκα μεταβολίτες που επηρεάζουν περισσότερο το διαχωρισμό των ριζών των διαφορετικών τύπων φυτών.

### **3.10.3 Συγκριτική ανάλυση μεταβολομικού προτύπου βλαστών *L. jaronicus* κατά τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση**

Το μεταβολομικό πρότυπο βλαστών φυτών *L. jaronicus* που είτε δεν εμβολιάστηκαν είτε εμβολιάστηκαν με το *M. loti* άγριου τύπου ή με το μεταλλαγμένο *fix<sup>-</sup>* ριζόβιο *ΔnifH* αναλύθηκε σε σύστημα αέριου χρωματογράφου συζευγμένου με σύστημα φασματομετρίας μαζών (GC-MS). Η σχετική απόκριση του κάθε μεταβολίτη υπολογίστηκε με βάση το φρέσκο βάρος του κάθε δείγματος και τη ριβιτόλη ως μεταβολίτη αναφοράς (Παράγραφος 2.16.3). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε πέντε βιολογικές επαναλήψεις και οι μέσοι όροι των επιπέδων των μεταβολιτών παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.4 και τον Πίνακα A.12 του παραρτήματος Α. Με σκοπό τη συγκριτική ανάλυση του μεταβολομικού προτύπου των φυματίων, υπολογίστηκαν οι λόγοι των επιπέδων των μεταβολιτών μεταξύ των διαφορετικών τύπων ριζών (Πίνακας 3.4 και πίνακας A.16). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) (Πίνακας 3.4) και έλεγχος δοκιμών μέσω της δοκιμασίας Bonferroni (Πίνακας B.9). Τέλος, πραγματοποιήθηκε πολυμεταβλητή ανάλυση με τη μέθοδο των κύριων συνιστωσών (PCA) για την ομαδοποίηση των δειγμάτων και τον εντοπισμό των μεταβολιτών που παραλλάσσουν σημαντικά τους διαφορετικούς τύπους των φυματίων (Εικόνα 3.20 και εικόνες A.5 και A.6 του παραρτήματος Α).

Κατά τη μεταβολομική ανάλυση των βλαστών αζωτοδεσμευτικών, *fix<sup>-</sup>* και μη εμβολιασμένων φυτών ανιχνεύτηκαν συνολικά 109 μεταβολίτες, από τους οποίους οι 95 ήταν κοινοί και στους τρεις τύπους βλαστών και 65 παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σύμφωνα με την ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) που πραγματοποιήθηκε ( $P < 0.05$ , Πίνακας 3.4). Συγκεκριμένα, βρέθηκαν 101, 104 και 103 μεταβολίτες στους βλαστούς αζωτοδεσμευτικών, *fix<sup>-</sup>* και μη εμβολιασμένων φυτών, αντίστοιχα.

**Πίνακας 3.4:** Μεταβολίτες που ανιχνεύονται σε βλαστούς φυτών *L. jaronicus* που είτε δεν εμβολιάστηκαν είτε εμβολιάστηκαν από το αζωτοδεσμευτικό ριζόβιο άγριου τύπου είτε με το *fix* στέλεχος *ΔnifH*.

Για κάθε μεταβολίτη παρουσιάζεται η αναλογία μάζας προς φορτίο ( $m/z$ ), ο χρόνος έκλουσης (RT), ο μέσος όρος της σχετικής απόκρισης πέντε ανεξάρτητων βιολογικών επαναλήψεων, καθώς και ο λόγος της σχετικής απόκρισης σε βλαστούς μη εμβολιασμένων φυτών (SU) και σε βλαστούς φυτών εμβολιασμένων με το στέλεχος *ΔnifH* (SH), ως προς τη σχετική απόκριση σε βλαστούς φυτών που εμβολιάστηκαν με το *M. loti* άγριου τύπου (S). Οι λόγοι σχετικής απόκρισης που αντιπροσωπεύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P < 0.05$ ) επισημαίνονται με έντονη γραφή, ενώ οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ βλαστών των μη εμβολιασμένων και των *fix* φυτών επισημαίνονται με διαφορετικά γράμματα. Η τιμή  $P$  αντιπροσωπεύει το επίπεδο σημαντικότητας μεταξύ των σχετικών αποκρίσεων για κάθε μεταβολίτη (ANOVA), όταν τουλάχιστον δύο μέσοι όροι σχετικών αποκρίσεων είναι  $>0$ .

Μεταβολίτης	$m/z$	RT	S	SU	SH	SU/S	SH/S	$P$
<b>Αμινοξέα</b>								
L-σερίνη	204	13.696	11.759	15.235	1.820	<b>1.296</b> a	<b>0.155</b> b	<b>0.000</b>
Ασπαρτικό οξύ	232	17.622	19.004	29.074	1.552	<b>1.530</b> a	<b>0.082</b> b	<b>0.000</b>
β-αλανίνη	248	15.211	0.532	1.038	0.117	<b>1.949</b> a	<b>0.220</b> b	<b>0.000</b>
L-ισολευκίνη	158	11.883	1.068	0.789	0.711	0.739	0.666	0.634
Γλυκίνη	174	12.140	7.913	0.641	4.756	0.081	0.601	0.094
L-αλανίνη	116	7.235	4.493	2.657	0.342	<b>0.591</b> a	<b>0.076</b> b	<b>0.000</b>
L-ασπαραγίνη	231	21.044	33.371	23.384	0.146	<b>0.701</b> a	<b>0.004</b> b	<b>0.000</b>
L-γλουταμικό οξύ	246	19.868	23.483	29.341	3.304	1.249 a	<b>0.141</b> b	<b>0.000</b>
L-γλουταμίνη	156	23.189	1.339	1.674	n.d.	1.250 a	n.d. b	<b>0.000</b>
L-ομοσερίνη	218	15.902	0.106	0.233	0.069	<b>2.195</b> a	0.653 b	<b>0.000</b>
L-λυσίνη	317	26.244	0.204	0.364	0.675	1.788 a	<b>3.312</b> b	<b>0.001</b>
L-μεθειονίνη	176	17.415	0.010	0.024	0.020	2.416	1.992	0.600
L-προλίνη	142	11.894	0.876	0.580	0.380	0.662	0.434	0.179
L-θρεονίνη	218	14.389	4.391	5.392	0.691	1.228 a	<b>0.157</b> b	<b>0.000</b>
L-τρυπτοφάνη	202	31.641	0.040	0.140	3.631	3.510 a	<b>91.241</b> b	<b>0.000</b>
L-βαλίνη	144	9.907	0.479	0.625	0.270	1.306 a	<b>0.564</b> b	<b>0.001</b>
Τυροσίνη	218	26.534	0.361	0.530	0.451	<b>1.466</b>	1.250	<b>0.043</b>
<b>Σάκχαρα</b>								
D-(+) αλτροζή	205	26.461	n.d.	0.049	0.694	s.p. a	<b>s.p.</b> b	<b>0.002</b>
Κυτταροβιόζη	361	37.768	0.037	0.231	0.032	6.290	0.883	<b>0.048</b>
D-(+) τρεχαλόζη	361	40.480	1.122	0.587	1.828	<b>0.523</b> a	<b>1.629</b> b	<b>0.000</b>
D-αλλόζη	319	26.077	0.791	0.561	1.724	0.709	2.178	0.418
D-γλυκόζη	319	26.164	27.317	4.346	52.417	0.159 a	1.919 b	<b>0.001</b>
D-λυσόζη	262	21.228	0.530	0.374	0.641	0.706	1.209	0.272
Φρουκτόζη	307	25.688	34.115	2.524	63.703	<b>0.074</b> a	<b>1.867</b> b	<b>0.000</b>
Ισομαλτόζη	361	41.763	0.129	0.203	0.168	1.578	1.305	0.656
Λακτόζη	361	37.843	0.031	0.126	0.100	4.004	3.194	0.118
Λακτουλόζη	204	36.931	0.030	0.010	0.099	0.330 a	3.282 b	<b>0.013</b>
Μαλτόζη	361	40.655	0.079	0.065	0.736	0.826 a	<b>9.282</b> b	<b>0.002</b>
Μαλτοτριόζη	361	49.168	n.d.	n.d.	0.013	n.d.	s.p.	<b>0.047</b>

Μεταβολίτης	m/z	RT	S	SU	SH	SU/S	SH/S	P
Μελιβιόζη	361	40.955	0.405	0.314	0.331	0.774	0.815	0.554
Ραφινόζη	87	49.005	1.387	1.725	1.735	1.244	1.251	0.434
Άνυδρη μονοϋδρική σεδοεπτουλόζη	204	26.899	0.410	0.336	0.463	0.820	1.130	0.918
Σοφορόζη	319	40.391	0.001	0.018	0.009	<b>14.235 a</b>	<b>7.030 b</b>	<b>0.000</b>
Σακχαρόζη	361	39.060	214.306	136.881	151.322	0.639	0.706	0.148
Ταγκατόζη	217	25.652	0.075	1.392	0.103	<b>18.656 a</b>	1.381 b	<b>0.001</b>
Πολυόλες								
Ακετόλη	219	18.567	0.262	0.074	0.899	0.284 a	<b>3.434 b</b>	<b>0.000</b>
D-μαννιτόλη	319	26.784	24.276	0.300	30.386	<b>0.012 a</b>	1.252 b	<b>0.000</b>
D-θρεϊτόλη	217	17.550	n.d.	0.015	0.063	s.p. a	s.p. b	<b>0.006</b>
Γαλακτινόλη	204	43.854	1.304	0.946	3.064	0.726 a	<b>2.350 b</b>	<b>0.000</b>
Μαλιτιτόλη	361	40.701	0.113	0.019	0.188	0.167	1.664	0.571
Μυο-ινοσιτόλη	432	29.727	86.508	42.859	64.491	<b>0.495 a</b>	<b>0.745 b</b>	<b>0.000</b>
Παλατινιτόλη	361	41.590	n.d.	0.007	0.010	s.p.	s.p.	0.496
Ονονιτόλη	217	27.183	36.220	23.356	154.945	0.645 a	<b>4.278 b</b>	<b>0.000</b>
Πινιτόλη	260	24.782	1752.995	1653.604	5196.624	0.943 a	<b>2.964 b</b>	<b>0.001</b>
Οργανικά οξέα								
2-ισοπροπυλμηλικό οξύ	147	18.931	4.183	2.128	2.236	<b>0.509</b>	<b>0.534</b>	<b>0.011</b>
3-υδροκινναμωμικό οξύ	293	23.371	3.230	2.801	2.810	0.867	0.870	0.100
4-γουανιδιοβουτυρικό οξύ	174	17.698	2.733	1.209	0.742	<b>0.442</b>	<b>0.271</b>	<b>0.003</b>
4-υδροκινναμωμικό οξύ	293	26.346	4.848	4.493	3.856	0.927	<b>0.795</b>	<b>0.028</b>
6-υδροξυνικοτινικό οξύ	268	18.570	0.294	n.d.	0.125	<b>n.d. a</b>	<b>0.425 b</b>	<b>0.000</b>
Κιτραμηλικό οξύ	147	16.456	185.361	118.979	180.868	0.642	0.976	0.196
Κιτρικό οξύ	347	24.395	75.433	45.911	73.184	0.609	0.970	0.330
D-μηλικό οξύ	147	16.893	111.656	58.619	106.152	0.525	0.951	0.232
Φερουλικό οξύ	338	29.264	1.421	1.452	1.181	1.021	0.831	0.065
Φουμαρικό οξύ	245	13.148	5.553	4.001	3.577	<b>0.720</b>	<b>0.644</b>	<b>0.001</b>
Γαλακτουρονικό οξύ	333	24.550	1.981	0.980	2.600	0.495	1.313	<b>0.049</b>
Γλυκοεπτονικό οξύ	217	31.134	168.612	136.506	162.340	<b>0.810 a</b>	0.963 b	<b>0.001</b>
Γλυκονικό οξύ	333	27.476	1.206	0.914	0.794	0.758	0.659	0.730
Γλυκερικό οξύ	189	12.940	0.253	0.196	0.218	0.778	0.864	0.916
Ιμινοδιοξικό οξύ	232	18.301	0.054	0.028	n.d.	0.511	<b>n.d.</b>	<b>0.001</b>
L-γαλακτικό οξύ	147	6.432	4.498	8.714	5.184	1.937	1.153	0.173
Λακτοβιονικό οξύ	217	40.453	2.755	1.252	5.280	<b>0.454 a</b>	<b>1.917 b</b>	<b>0.000</b>
Μηλεϊναμικό οξύ	244	17.411	0.207	0.043	0.035	<b>0.208</b>	<b>0.169</b>	<b>0.008</b>
Μηλεϊνικό οξύ	147	12.083	3.060	1.472	1.784	0.481	0.583	0.219
Μηλονικό οξύ	147	9.500	19.374	8.201	10.271	<b>0.423</b>	<b>0.530</b>	<b>0.001</b>
Μεθυλμηλονικό οξύ	147	9.822	0.015	n.d.	0.032	<b>n.d. a</b>	2.209 b	<b>0.012</b>
Βλεννικό οξύ	333	28.987	0.513	0.998	1.550	<b>1.945 a</b>	<b>3.023 b</b>	<b>0.000</b>
Σακχαρικό οξύ	333	28.402	2.954	4.929	6.304	<b>1.669 a</b>	<b>2.134 b</b>	<b>0.000</b>

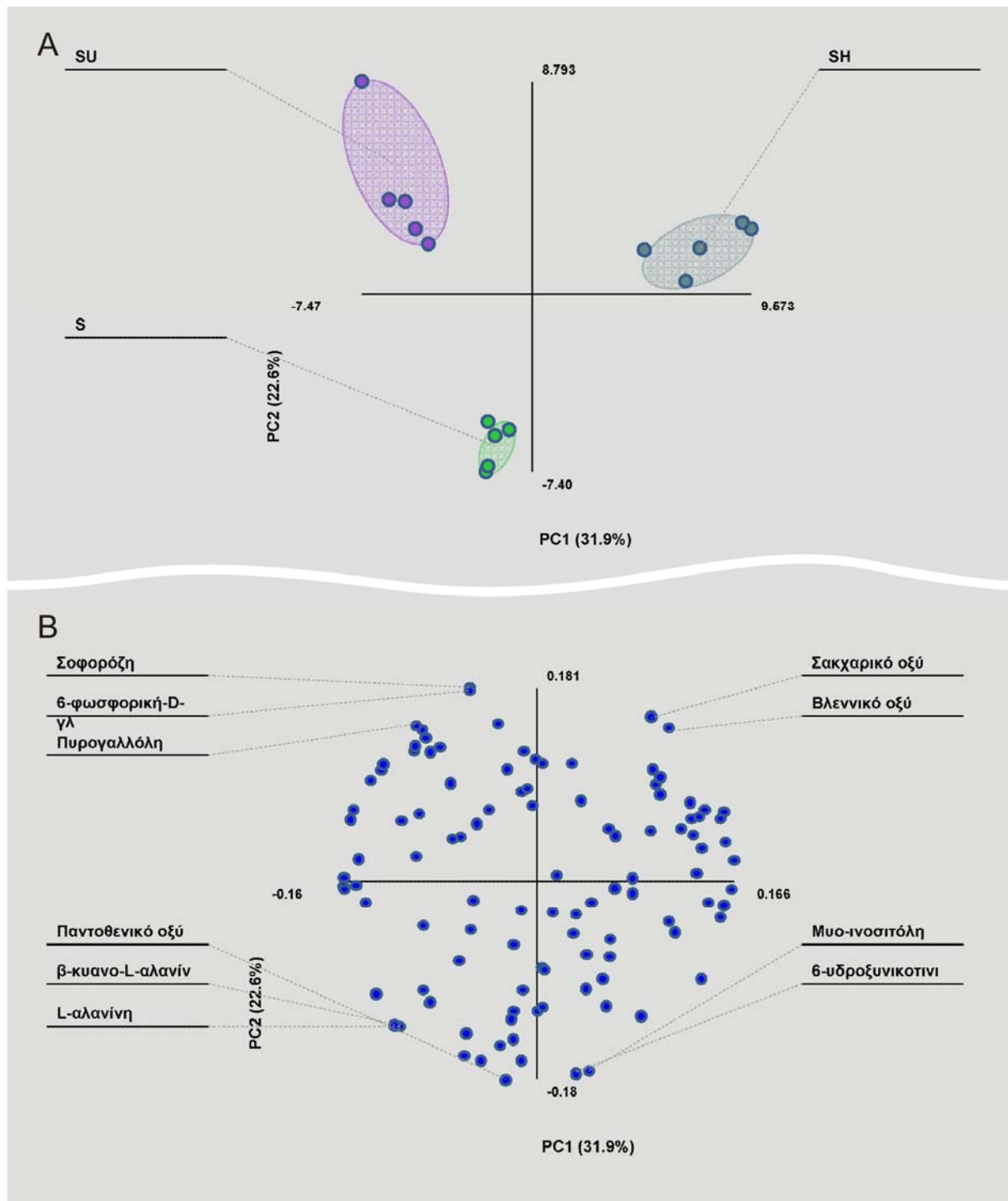
Μεταβολίτης	m/z	RT	S	SU	SH	SU/S	SH/S	P
Σικιμικό οξύ	204	24.205	0.431	0.504	0.387	1.168	0.898	0.054
Ηλεκτρικό οξύ	148	12.313	10.790	12.492	11.028	1.158	1.022	0.217
Τρυγικό οξύ	147	19.707	n.d.	n.d.	0.174	n.d. a	s.p. b	<b>0.000</b>
Ταρτρονικό οξύ	147	14.510	0.221	0.054	0.109	0.242	0.493	0.110
trans-ακονιτικό οξύ	229	22.730	0.261	0.317	0.223	1.216	0.854	0.087
Αζωτούχες ενώσεις								
L-πυρογλουταμικό οξύ	156	17.487	1.539	2.309	0.450	1.500	0.293	0.490
1-μεθυλ-νικοτιναμίδη	179	15.974	0.001	0.002	0.006	2.079	8.011	0.110
3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρικό οξύ	247	19.497	0.246	0.330	0.264	1.343	1.073	0.276
5'-δεοξυ-5'-(μεθυλθειο)αδενοσίνη	236	40.530	0.010	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<b>0.017</b>
Αδενίνη	264	24.964	0.030	0.040	0.028	1.364	0.939	0.191
Αδενοσίνη	236	38.433	0.333	0.049	0.364	0.148	1.094	0.261
Αλλαντοΐνη	331	25.705	0.142	0.607	n.d.	<b>4.260</b> a	n.d. b	<b>0.000</b>
β-κυανο-L-αλανίνη	141	13.876	4.429	2.528	0.061	<b>0.571</b> a	<b>0.014</b>	<b>0.000</b>
D-λυσζοζαμίνη	217	21.227	0.091	0.288	0.602	3.179	<b>6.646</b>	<b>0.023</b>
gly-pro	174	27.403	0.014	0.008	0.010	0.561	0.721	0.471
L-νορλευκίνη	158	11.325	0.143	0.117	0.054	0.820	0.377	0.358
N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνη	319	30.263	2.341	2.639	3.057	1.127	1.306	0.499
N-μεθυλγλουταμικό οξύ	260	21.298	0.090	0.217	0.002	<b>2.412</b> a	<b>0.021</b> b	<b>0.000</b>
Παντοθενικό οξύ	291	27.664	0.470	0.060	0.087	<b>0.128</b>	<b>0.185</b>	<b>0.000</b>
Φαινυλαιθυλαμίνη	174	18.324	0.434	0.508	1.255	1.170 a	<b>2.890</b> b	<b>0.003</b>
Πουτρεσκίνη	174	22.345	0.202	0.084	0.063	<b>0.417</b>	<b>0.310</b>	<b>0.000</b>
Σπερμιδίνη	174	32.267	0.141	0.065	0.013	<b>0.458</b>	<b>0.089</b>	<b>0.001</b>
Σφιγγοσίνη	204	36.123	0.008	0.002	0.009	0.309	1.103	0.693
Ουρία	147	10.280	0.119	0.466	0.140	<b>3.904</b> a	1.176 b	<b>0.009</b>
Φωσφορικές ενώσεις								
6-φωσφογλυκονικό οξύ	387	35.051	n.d.	0.075	0.009	s.p. a	s.p. b	<b>0.003</b>
6-φωσφορική-D-γλυκόζη	387	33.979	0.914	2.246	1.518	<b>2.458</b> a	<b>1.661</b> b	<b>0.000</b>
1-φωσφορική γλυκερόλη	357	23.245	0.097	0.378	0.139	<b>3.907</b> a	1.433 b	<b>0.000</b>
Φωσφορικό οξύ	299	11.440	30.965	74.410	57.674	2.403	1.863	0.051
Άλλες ενώσεις								
2,3-διϋδροξυδιφαινύλιο	330	23.908	0.011	0.103	n.d.	<b>9.187</b> a	n.d. b	<b>0.000</b>
Καρβαμικό οξύ (ουρεθάνη)	146	4.586	6.079	0.104	11.756	0.017	1.934	0.359
Κατεχίνη	368	41.996	0.004	0.022	0.331	5.832 a	<b>85.964</b> b	<b>0.000</b>
Κονιφερυλοαλκοόλη	324	26.396	n.d.	0.037	0.054	s.p.	s.p.	0.174
Δεϋδροασκορβικό οξύ	173	24.923	0.115	0.208	0.566	1.805	4.924	0.268

Μεταβολίτης	m/z	RT	S	SU	SH	SU/S	SH/S	P
Γλυκονικό οξύ λακτόνη	275	25.784	6.842	9.334	5.668	1.364 a	0.828 b	<b>0.034</b>
Λογανίνη	361	41.758	0.040	0.089	0.078	2.201	1.927	0.133
μεθυλο-β-D-γαλακτοπυρανοσίδιο	204	26.103	1.037	2.730	1.177	<b>2.632</b> a	1.135 b	<b>0.007</b>
φαινυλ-β-γλυκοπυρανοσίδιο	361	33.604	0.074	0.089	0.049	1.193	0.660	0.675
Φλωρογλυκινόλη	342	20.411	0.059	0.034	0.055	0.583	0.941	0.720
Πυρογαλλόλη	239	18.016	0.013	0.355	0.065	<b>26.634</b> a	4.845 b	<b>0.000</b>
Ριβονικό οξύ-γ-λακτόνη	147	20.162	n.d.	0.081	0.223	s.p.	<b>s.p.</b>	<b>0.008</b>
Συναπυλαλκοόλη	354	29.191	0.010	0.027	0.021	2.777	2.139	0.265
Ταξιφολίνη	368	42.039	0.003	n.d.	0.002	<b>n.d.</b>	0.701	<b>0.010</b>

Η συγκέντρωση των αμινοξέων L-αλανίνη και L-ασπαράγινη είναι χαμηλότερη στους βλαστούς των μη εμβολιασμένων και των *fix<sup>-</sup>* φυτών από ότι στις ρίζες των αζωτοδεσμευτικών φυτών (Πίνακας 3.4). Αντίθετα, η συγκέντρωση της L-σερίνης, του ασπαρτικού οξέος, της β-αλανίνης, της L-ομοσερίνης και της τυροσίνης στους βλαστούς των μη εμβολιασμένων φυτών είναι υψηλότερη από τους βλαστούς των *fix<sup>+</sup>* φυτών. Στους βλαστούς των φυτών που εμβολιάστηκαν με το μεταλλαγμένο στέλεχος *ΔnifH* τα επίπεδα L-σερίνης, ασπαρτικού οξέος, β-αλανίνης, L-γλουταμικού οξέος, L-θρεονίνης και L-βαλίνης εμφανίζονται χαμηλότερα, ενώ τα επίπεδα της L-λυσίνης και της L-τρυπτοφάνης είναι σημαντικά υψηλότερα από αυτά των βλαστών των αζωτοδεσμευτικών φυτών.

Στους βλαστούς των μη εμβολιασμένων φυτών τα επίπεδα της D-(+) τρεχαλόζης και της φρουκτόζης είναι σημαντικά χαμηλότερα, ενώ τα επίπεδα της σοφορόζης και της ταγκατόζης είναι σημαντικά υψηλότερα από αυτά των *fix<sup>+</sup>* φυτών (Πίνακας 3.4). Στους βλαστούς των *fix<sup>-</sup>* φυτών παρατηρούνται υψηλότερα επίπεδα της D-(+) τρεχαλόζης, της φρουκτόζης, της μαλτόζης και της σοφορόζης σε σύγκριση με τους βλαστούς των αζωτοδεσμευτικών φυτών.

Στους βλαστούς τόσο των μη εμβολιασμένων όσο και των *fix<sup>-</sup>* φυτών η συγκέντρωση της μυο-ινοσιτόλης παρουσιάζεται χαμηλότερη από αυτή των αζωτοδεσμευτικών φυτών (Πίνακας 3.4). Επιπλέον, η D-μαννιτόλη συσσωρεύεται σε σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα στους βλαστούς των μη εμβολιασμένων φυτών από ότι στους βλαστούς των *fix<sup>+</sup>* φυτών. Αντίθετα, στους βλαστούς των φυτών που εμβολιάστηκαν με το μεταλλαγμένο στέλεχος *ΔnifH* η συγκέντρωση της ακετόλης, της γαλακτινόλης, της ονονιτόλης και της πινιτόλης εμφανίζεται ιδιαίτερα υψηλή σε σύγκριση με αυτή που παρατηρείται στους βλαστούς των *fix<sup>+</sup>* φυτών.



**Εικόνα 3.20:** Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) των μεταβολομικών προτύπων βλαστών φυτών *L. jaronicus* που είτε δεν εμβολιάστηκαν είτε εμβολιάστηκαν από το αζωτοδεσμευτικό ριζόβιο άγριου τύπου είτε με το *fix* στέλεχος *ΔnifH*.

Για την ανάλυση κύριων συνιστωσών χρησιμοποιήθηκαν μετρήσεις από πέντε ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις για κάθε τύπο βλαστού. **(Α)** Διάγραμμα των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών που αντιπροσωπεύουν το 54.5% της συνολικής παραλλακτικότητας που παρατηρείται στο μεταβολομικό πρότυπο των διαφορετικών τύπων βλαστών. **(Β)** Διάγραμμα των βαρών (loadings) των συνιστωσών που δείχνουν τη μεγαλύτερη διακύμανση στους διαφορετικούς τύπους βλαστών.



Στους βλαστούς των μη εμβολιασμένων και των *fix<sup>-</sup>* φυτών το βλεννικό οξύ και το σακχαρικό οξύ συσσωρεύονται σε υψηλότερα επίπεδα, ενώ το 2-ισοπροπυλμηλικό οξύ, το 4-γουανιδοβουτυρικό οξύ, το φουμαρικό οξύ, το μηλεϊναμικό οξύ και το μηλονικό οξύ συσσωρεύονται σε χαμηλότερα επίπεδα σε σύγκριση με τους βλαστούς των αζωτοδεσμευτικών φυτών (Πίνακας 3.4). Επιπλέον, στους βλαστούς των μη εμβολιασμένων φυτών η συγκέντρωση του γλυκοεπτονικού οξέος είναι χαμηλότερη από αυτή των *fix<sup>+</sup>* φυτών. Στους βλαστούς των *fix<sup>-</sup>* φυτών, τα επίπεδα του 4-υδροκινναμωμικού οξέος και του 6-υδροξυνικοτινικού οξέος εμφανίζονται χαμηλότερα, ενώ του λακτοβιονικού οξέος υψηλότερα από αυτά των βλαστών αζωτοδεσμευτικών φυτών.

Η συγκέντρωση πολλών αζωτούχων ενώσεων και συγκεκριμένα της β-κυανο-L-αλανίνης, του παντοθενικού οξέος, της πουτρεσκίνης και της σπερμιδίνης στους βλαστούς των μη εμβολιασμένων και των *fix<sup>-</sup>* φυτών είναι σημαντικά χαμηλότερη από αυτή που παρατηρείται στους βλαστούς των αζωτοδεσμευτικών φυτών (Πίνακας 3.4). Η αλλαντοΐνη, το N-μεθυλγλουταμικό οξύ και η ουρία συσσωρεύονται σε υψηλότερα επίπεδα στους βλαστούς των μη εμβολιασμένων φυτών σε σύγκριση με τους βλαστούς των *fix<sup>+</sup>* φυτών. Στους βλαστούς των *fix<sup>-</sup>* φυτών η D-λυξοζαμίνη και το παντοθενικό οξύ εμφανίζουν η υψηλότερα επίπεδα, ενώ το N-μεθυλγλουταμικό οξύ χαμηλότερα επίπεδα από ότι στους βλαστούς των αζωτοδεσμευτικών φυτών.

Η συγκέντρωση της 6-φωσφορικής-D-γλυκόζης εμφανίζεται σημαντικά υψηλότερη στους βλαστούς τόσο των μη εμβολιασμένων όσο και των *fix<sup>-</sup>* φυτών σε σύγκριση με τους βλαστούς των αζωτοδεσμευτικών φυτών (Πίνακας 3.4). Στους βλαστούς των μη εμβολιασμένων φυτών η 1-φωσφορική γλυκερόλη συσσωρεύεται επίσης σε υψηλότερα επίπεδα από ότι στους βλαστούς των *fix<sup>+</sup>* φυτών.

Στους βλαστούς των μη εμβολιασμένων φυτών 2,3-διϋδροξυδιφαινύλιο, το μεθυλο-β-D-γαλακτοπυρανοσίδιο καθώς και η πυρογαλλόλη συσσωρεύονται σε υψηλότερα επίπεδα από ότι στους βλαστούς των *fix<sup>+</sup>* φυτών (Πίνακας 3.4). Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζει η ιδιαίτερα υψηλή συγκέντρωση της κατεχίνης που παρατηρείται στους βλαστούς των *fix<sup>-</sup>* φυτών σε σύγκριση με τους βλαστούς των αζωτοδεσμευτικών φυτών.

Η ανάλυση των κυρίων συνιστωσών που πραγματοποιήθηκε αναδεικνύει την έντονη διαφοροποίηση των επιπέδων των μεταβολιτών στους βλαστούς των διαφορετικών τύπων φυτών (Εικόνα 3.20). Η πρώτη συνιστώσα εξηγεί το 31.9% της παραλλακτικότητας, ενώ η δεύτερη συνιστώσα εξηγεί το 22.6% και επιτυγχάνουν τον έντονο διαχωρισμό των βλαστών φυτών που εμβολιάστηκαν με το ριζόβιο άγριου τύπου από τους βλαστούς φυτών που

εμβολιάστηκαν με το μεταλλαγμένο στέλεχος *ΔnifH* και από τους βλαστούς μη εμβολιασμένων φυτών. Επιπλέον, σύμφωνα με την ανάλυση των κύριων συνιστωσών, οι δέκα μεταβολίτες που επηρεάζουν περισσότερο το διαχωρισμό των βλαστών των διαφόρων τύπων φυτών είναι η σοφορόζη, η 6-φωσφορική D-γλυκόζη, η πυρογαλλόλη, το παντοθενικό οξύ, η β-κυανο-L-αλανίνη, η L-αλανίνη, το σακχαρικό οξύ, το βλεννικό οξύ, η μυο-ινοσιτολη και 6-υδροξυνικοτινικό οξύ.

#### **3.10.4 Συγκριτική ανάλυση μεταβολομικού προτύπου φύλλων *L. jaronicus* κατά τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση**

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση του μεταβολομικού προτύπου φύλλων φυτών *L. jaronicus* που είτε δεν εμβολιάστηκαν είτε εμβολιάστηκαν με το άγριου τύπου ριζόβιο ή με το μεταλλαγμένο *fix<sup>-</sup>* στέλεχος *ΔnifH* με την βοήθεια της αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών (GC-MS). Η σχετική απόκριση του κάθε μεταβολίτη υπολογίστηκε με βάση το φρέσκο βάρος του κάθε δείγματος και τη ριβιτόλη ως μεταβολίτη αναφοράς (Παράγραφος 2.16.3). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε πέντε βιολογικές επαναλήψεις και οι μέσοι όροι των επιπέδων των μεταβολιτών παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.5 και τον Πίνακα A.13 του παραρτήματος Α. Με σκοπό τη συγκριτική ανάλυση του μεταβολομικού προτύπου των φυματίων, υπολογίστηκαν οι λόγοι των επιπέδων των μεταβολιτών μεταξύ των διαφορετικών τύπων ριζών (Πίνακας 3.5 και πίνακας A.17). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) (Πίνακας 3.5) και έλεγχος δοκιμών μέσω της δοκιμασίας Bonferroni (Παράρτημα Β, πίνακας Β.10). Τέλος, πραγματοποιήθηκε πολυμεταβλητή ανάλυση με τη μέθοδο των κύριων συνιστωσών (PCA) για την ομαδοποίηση των δειγμάτων και τον εντοπισμό των μεταβολιτών που παραλλάσουν σημαντικά τους διαφορετικούς τύπους των φυματίων (Εικόνα 3.21 και εικόνες A.7 και A.8 του παραρτήματος Α).

Κατά τη μεταβολομική ανάλυση των ριζών αζωτοδεσμευτικών, *fix<sup>-</sup>* και μη εμβολιασμένων φυτών ανιχνεύτηκαν συνολικά 110 μεταβολίτες, από τους οποίους οι 80 ήταν κοινοί και στους τρεις τύπους ριζών και 66 παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σύμφωνα με την ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) που πραγματοποιήθηκε ( $P < 0.05$ , Πίνακας 3.5). Συγκεκριμένα, βρέθηκαν 101, 103 και 101 μεταβολίτες στις ρίζες αζωτοδεσμευτικών, *fix<sup>-</sup>* και μη εμβολιασμένων φυτών, αντίστοιχα.

**Πίνακας 3.5:** Μεταβολίτες που ανιχνεύονται σε φύλλα φυτών *L. jaronicus* που είτε δεν εμβολιάστηκαν είτε εμβολιάστηκαν από το αζωτοδεσμευτικό ριζόβιο άγριου τύπου είτε με το *fix* στέλεχος *ΔnifH*.

Για κάθε μεταβολίτη παρουσιάζεται η αναλογία μάζας προς φορτίο ( $m/z$ ), ο χρόνος έκλουσης (RT), ο μέσος όρος της σχετικής απόκρισης πέντε ανεξάρτητων βιολογικών επαναλήψεων, καθώς και ο λόγος της σχετικής απόκρισης σε φύλλα μη εμβολιασμένων φυτών (LU) και σε φύλλα φυτών εμβολιασμένων με το στέλεχος *ΔnifH* (LH), ως προς τη σχετική απόκριση σε φύλλα φυτών που εμβολιάστηκαν με το *M. loti* άγριου τύπου (L). Οι λόγοι σχετικής απόκρισης που αντιπροσωπεύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P < 0.05$ ) επισημαίνονται με έντονη γραφή, ενώ οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ φύλλων των μη εμβολιασμένων και των *fix* φυτών επισημαίνονται με διαφορετικά γράμματα. Η τιμή  $P$  αντιπροσωπεύει το επίπεδο σημαντικότητας μεταξύ των σχετικών αποκρίσεων για κάθε μεταβολίτη (ANOVA), όταν τουλάχιστον δύο μέσοι όροι σχετικών αποκρίσεων είναι  $>0$ .

Μεταβολίτης	$m/z$	RT	L	LU	LH	LU/L	LH/L	$P$
<b>Αμινοξέα</b>								
L-σερίνη	204	13.696	7.215	16.507	1.884	<b>2.288</b> a	<b>0.261</b> b	<b>0.000</b>
Ασπαρτικό οξύ	232	17.622	15.346	19.121	2.600	<b>1.246</b> a	<b>0.169</b> b	<b>0.000</b>
β-αλανίνη	248	15.211	0.471	0.293	0.074	0.622	<b>0.158</b>	<b>0.001</b>
L-ισολευκίνη	158	11.883	0.893	0.522	0.913	0.584	1.023	0.429
Γλυκίνη	174	12.140	4.531	0.671	4.424	0.148	0.976	0.157
L-αλανίνη	116	7.235	7.651	5.300	1.384	<b>0.693</b> a	<b>0.181</b> b	<b>0.000</b>
L-ασπαραγίνη	231	21.044	12.787	26.206	0.496	<b>2.049</b> a	<b>0.039</b> b	<b>0.000</b>
L-γλουταμικό οξύ	246	19.868	27.735	16.978	10.607	0.612	<b>0.382</b>	<b>0.023</b>
L-γλουταμίνη	156	23.189	1.359	1.549	0.016	1.140 a	<b>0.012</b> b	<b>0.000</b>
L-ομοσερίνη	218	15.902	0.056	0.125	0.024	<b>2.224</b> a	0.436 b	<b>0.001</b>
L-λυσίνη	317	26.244	0.128	0.145	0.151	1.131	1.179	0.773
L-προλίνη	142	11.894	2.139	1.759	1.310	0.823	0.612	0.131
L-θρεονίνη	218	14.389	3.441	3.655	0.768	1.062 a	<b>0.223</b> b	<b>0.000</b>
L-τροπτοφάνη	202	31.641	0.094	0.052	0.993	0.555 a	<b>10.554</b> b	<b>0.000</b>
L-βαλίνη	144	9.907	0.722	0.489	0.648	<b>0.677</b>	0.897	<b>0.037</b>
Τυροσίνη	218	26.534	0.064	0.132	0.283	2.068	4.422	0.066
<b>Σάκχαρα</b>								
D-(+) αλτρόζη	205	26.461	n.d.	0.039	0.395	s.p.	s.p.	<b>0.033</b>
Κυτταροβιόζη	361	37.768	0.302	0.102	0.507	0.338 a	<b>1.681</b> b	<b>0.001</b>
D-(+) τρεχαλόζη	361	40.480	0.613	0.467	1.023	0.763 a	<b>1.670</b> b	<b>0.003</b>
D-αλλόζη	319	26.077	0.207	0.742	3.201	3.576 a	<b>15.438</b> b	<b>0.008</b>
D-γλυκόζη	319	26.164	34.096	5.407	55.266	0.159 a	1.621 b	<b>0.022</b>
D-λυσόζη	262	21.228	0.383	0.405	0.551	1.057	1.437	0.149
Φρουκτόζη	307	25.688	50.358	20.845	46.454	<b>0.414</b> a	0.922 b	<b>0.000</b>
Ισομαλτόζη	361	41.763	0.017	0.045	0.100	2.702	<b>5.989</b>	<b>0.040</b>
Λακτόζη	361	37.843	0.147	0.178	0.241	1.210	1.639	0.576
Λακτουλόζη	204	36.931	0.861	0.159	1.035	0.185	1.202	0.091
Μαλτόζη	361	40.655	0.085	0.424	1.213	4.984 a	<b>14.278</b> b	<b>0.005</b>
Μελιβιόζη	361	40.955	1.220	1.058	1.201	0.867	0.984	0.833

Μεταβολίτης	m/z	RT	L	LU	LH	LU/L	LH/L	P
Ραφινόζη	87	49.005	0.218	0.076	0.454	0.347 a	<b>2.089 b</b>	<b>0.000</b>
Ριβόζη	217	21.557	0.078	0.080	n.d.	1.025	n.d.	0.150
Άνυδρη μονοϋδρική σεδοεπτουλόζη	204	26.899	1.225	n.d.	1.430	<b>n.d. a</b>	1.168 b	<b>0.013</b>
Σοφορόζη	319	40.391	0.055	0.073	0.083	1.331	1.512	0.282
Σακχαρόζη	361	39.060	155.460	197.597	173.172	<b>1.271</b>	1.114	<b>0.029</b>
Ταγκατόζη	217	25.652	1.454	0.682	0.191	0.469	<b>0.131</b>	<b>0.010</b>
Πολυόλες								
Ακετόλη	219	18.567	0.383	0.185	0.864	0.482 a	<b>2.255 b</b>	<b>0.000</b>
D-μαννιτόλη	319	26.784	56.396	0.093	43.673	<b>0.002 a</b>	<b>0.774 b</b>	<b>0.000</b>
D-θρεϊτόλη	217	17.550	0.699	0.186	0.449	<b>0.266</b>	0.643	<b>0.028</b>
Γαλακτινόλη	204	43.854	0.166	0.078	1.274	0.469 a	<b>7.684 b</b>	<b>0.000</b>
Γλυκερόλη	147	11.489	2.471	0.918	3.470	0.372	1.405	0.072
Μυο-ινοσιτόλη	432	29.727	116.280	95.871	152.486	0.824	1.311	0.113
Παλατινιτόλη	361	41.590	0.083	0.047	0.061	0.568	0.730	0.236
Ονονιτόλη	217	27.183	29.753	68.576	146.397	2.305	<b>4.920</b>	<b>0.020</b>
Πινιτόλη	260	24.782	540.686	1967.332	4183.373	3.639 a	<b>7.737 b</b>	<b>0.000</b>
Οργανικά οξέα								
2-ισοπροπυλμηλικό οξύ	147	18.931	1.798	1.375	1.502	0.765	0.836	0.397
3-υδροκινναμωμικό οξύ	293	23.371	5.613	4.976	5.174	0.887	0.922	0.234
4-γουανιδοβουτυρικό οξύ	174	17.698	2.818	1.201	0.694	<b>0.426</b>	<b>0.246</b>	<b>0.000</b>
4-υδροκινναμωμικό οξύ	293	26.346	7.605	8.396	8.082	1.104	1.063	0.169
6-υδροξυνικοτινικό οξύ	268	18.570	0.043	n.d.	0.061	n.d.	1.421	0.114
Κιτρακονικό οξύ	147	13.315	0.281	0.165	0.733	0.589 a	<b>2.611 b</b>	<b>0.000</b>
Κιτραμηλικό οξύ	147	16.456	61.051	51.929	109.569	0.851 a	<b>1.795 b</b>	<b>0.000</b>
Κιτρικό οξύ	347	24.395	75.395	157.912	160.000	<b>2.094</b>	<b>2.122</b>	<b>0.000</b>
D-μηλικό οξύ	147	16.893	61.686	39.882	50.796	0.647	0.823	0.397
Φερουλικό οξύ	338	29.264	1.471	1.706	1.585	1.160	1.078	0.145
Φουμαρικό οξύ	245	13.148	6.375	4.979	4.061	<b>0.781</b>	<b>0.637</b>	<b>0.000</b>
Γαλακτουρονικό οξύ	333	24.550	2.111	1.366	0.409	0.647	<b>0.194</b>	<b>0.005</b>
Γλυκοεπτονικό οξύ	217	31.134	156.392	185.962	173.718	1.189	1.111	0.884
Γλυκονικό οξύ	333	27.476	2.069	3.609	7.492	1.744	<b>3.620</b>	<b>0.025</b>
Γλυκερικό οξύ	189	12.940	1.095	2.158	0.781	<b>1.971 a</b>	0.714 b	<b>0.001</b>
Γλυκολικό οξύ	147	6.695	1.113	0.878	0.691	<b>0.788</b>	<b>0.620</b>	<b>0.000</b>
Γουανιδοηλεκτρικό οξύ	444	27.151	0.011	0.003	n.d.	0.319	<b>n.d.</b>	<b>0.044</b>
Ιμινοδιοξικό οξύ	232	18.301	0.215	0.248	0.070	1.151 a	<b>0.325 b</b>	<b>0.000</b>
L-γαλακτικό οξύ	147	6.432	4.611	11.824	10.586	<b>2.565</b>	2.296	<b>0.026</b>
Λακτοβιονικό οξύ	217	40.453	0.417	0.236	0.513	<b>0.566 a</b>	1.231 b	<b>0.001</b>
Μηλειναμικό οξύ	244	17.411	0.519	0.116	0.076	<b>0.224</b>	<b>0.146</b>	<b>0.000</b>

Μεταβολίτης	m/z	RT	L	LU	LH	LU/L	LH/L	P
Μηλεϊνικό οξύ	147	12.083	0.962	0.695	1.526	0.723	1.587	0.530
Μηλονικό οξύ	147	9.500	15.005	11.663	24.315	0.777	1.620	0.205
Μεθυλμηλονικό οξύ	147	9.822	0.014	0.024	0.075	1.688	5.231	0.070
Βλεννικό οξύ	333	28.987	0.669	0.794	0.834	1.187	1.248	0.195
Νικωτινικό οξύ	180	11.660	0.009	0.022	0.017	2.400	1.849	0.330
Πυτεκολικό οξύ	156	13.564	0.121	10.506	0.043	<b>86.524</b> a	0.358 b	<b>0.000</b>
Σακχαρικό οξύ	333	28.402	35.112	43.857	54.249	1.249	<b>1.545</b>	<b>0.015</b>
Σικιμικό οξύ	204	24.205	0.498	0.300	0.149	0.603	<b>0.298</b>	<b>0.007</b>
Ηλεκτρικό οξύ	148	12.313	7.568	9.391	10.817	1.241	1.429	0.199
Τρυγικό οξύ	147	19.707	0.066	n.d.	0.335	n.d. a	<b>5.068</b> b	<b>0.000</b>
Ταρτρικό οξύ	147	14.510	0.359	0.157	0.203	0.438	0.567	<b>0.048</b>
trans-ακονιτικό οξύ	229	22.730	0.326	0.414	0.805	1.269 a	<b>2.471</b> b	<b>0.000</b>
Αζωτούχες ενώσεις								
L-πυρογλουταμικό οξύ	156	17.487	0.989	4.351	1.149	4.399	1.162	0.105
1-μεθυλδαντοΐνη	171	12.504	0.092	0.002	n.d.	<b>0.019</b>	n.d.	<b>0.001</b>
3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρικό οξύ	247	19.497	0.209	0.245	0.213	1.173	1.018	0.735
5-αμινοβαλερικό οξύ	174	19.936	n.d.	0.647	n.d.	s.p.	n.d.	<b>0.025</b>
5'-δεοξυ-5'-(μεθυλθειο)αδενοσίνη	236	40.530	0.017	n.d.	n.d.	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>0.000</b>
Αδενοσίνη	236	38.433	0.738	0.005	0.892	0.006	1.209	0.236
Αλλαντοΐνη	331	25.705	n.d.	0.324	n.d.	s.p.	n.d.	<b>0.032</b>
β-κυανο-L-αλανίνη	141	13.876	1.215	2.332	0.014	<b>1.919</b> a	<b>0.012</b> b	<b>0.000</b>
Biuret	344	22.043	n.d.	n.d.	0.007	n.d.	s.p.	0.066
D-λυσζοζαμίνη	217	21.227	0.237	0.418	0.294	1.761	1.240	0.289
L-νορλευκίνη	158	11.325	0.182	0.098	0.220	0.540	1.212	0.348
N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνη	319	30.263	8.420	6.747	9.963	<b>0.801</b> a	<b>1.183</b> b	<b>0.000</b>
N-μεθυλαλανίνη	130	8.856	0.039	0.025	n.d.	0.637 a	n.d. b	<b>0.001</b>
N-μεθυλγλουταμικό οξύ	260	21.298	0.123	0.144	n.d.	1.174 a	n.d. b	<b>0.000</b>
Παντοθενικό οξύ	291	27.664	0.330	0.025	0.059	<b>0.076</b> a	<b>0.179</b> b	<b>0.000</b>
Πουτρεσκίνη	174	22.345	0.232	0.204	0.072	0.880 a	<b>0.310</b> b	<b>0.000</b>
Σπερμιδίνη	174	32.267	0.406	0.560	0.075	1.381 a	<b>0.186</b> b	<b>0.000</b>
trans-4-υδροξυ-L-προλίνη	230	17.738	0.022	0.091	0.008	4.076 a	0.349 b	<b>0.028</b>
Ουρία	147	10.280	0.175	0.575	0.079	3.291	0.454	0.074
Φωσφορικές ενώσεις								
6-φωσφογλυκονικό οξύ	387	35.051	0.072	0.147	0.071	2.056	0.993	0.330
6-φωσφορική-D-γλυκόζη	387	33.979	1.146	1.946	1.471	<b>1.698</b>	1.283	<b>0.011</b>
1-φωσφορική γλυκερόλη	357	23.245	0.274	0.465	0.322	<b>1.698</b> a	1.176 b	<b>0.007</b>
Φωσφορικό οξύ	299	11.440	8.348	45.654	17.052	<b>5.469</b> a	2.043 b	<b>0.001</b>

Μεταβολίτης	m/z	RT	L	LU	LH	LU/L	LH/L	P
<b>Άλλες ενώσεις</b>								
2,3-διϋδροξυδιφαινύλιο	330	23.908	n.d.	0.105	n.d.	s.p. a	n.d. b	<b>0.016</b>
Καρβαμικό οξύ (ουρεθάνη)	146	4.586	6.039	5.263	27.207	0.872	4.505	<b>0.044</b>
Κατεχίνη	368	41.996	n.d.	n.d.	0.012	n.d. a	s.p. b	<b>0.002</b>
Χρυσίνη	383	38.002	n.d.	0.003	0.003	s.p.	s.p.	0.245
Δεϋδροασκορβικό οξύ	173	24.923	n.d.	0.404	0.521	s.p.	s.p.	0.400
Γλυκονικό οξύ λακτόνη	275	25.784	6.635	4.889	5.245	0.737	0.791	0.243
L-ασκορβικό οξύ	332	26.988	n.d.	n.d.	0.492	n.d.	s.p.	0.075
μεθυλο-β-D-γαλακτοπυρανοσίδιο	204	26.103	3.659	2.680	3.592	0.733	0.982	0.535
φαινυλ-β-γλυκοπυρανοσίδιο	361	33.604	0.233	0.280	0.419	1.204	1.798	0.426
Φλωρογλυκινόλη	342	20.411	0.135	0.195	0.166	1.446	1.227	0.694
Ριβονικό οξύ-γ-λακτόνη	147	20.162	0.023	0.106	0.291	4.616	12.670	0.229

Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι η L-σερίνη, το ασπαρτικό οξύ, η L-ασπαραγίνη και η L-ομοσερίνη συσσωρεύονται σε υψηλότερα επίπεδα στα φύλλα των μη εμβολιασμένων φυτών σε σύγκριση με τα φύλλα των αζωτοδεσμευτικών φυτών (Πίνακας 3.5). Αντίθετα, η συγκέντρωση της L-αλανίνης και της L-βαλίνης στα φύλλα των μη εμβολιασμένων φυτών είναι υψηλότερη από ότι στα φύλλα των *fix<sup>+</sup>* φυτών. Στα φύλλα φυτών που φέρουν μη λειτουργικά φυμάτια τα επίπεδα της L-σερίνης, του ασπαρτικού οξέος, της β-αλανίνης, της L-αλανίνης, της L-ασπαραγίνης, του L-γλουταμικού οξέος, της L-γλουταμίνης και της L-θρεονίνης εμφανίζονται χαμηλότερα από αυτά που παρατηρούνται στα φύλλα των *fix<sup>+</sup>* φυτών. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι τα φύλλα των *fix<sup>-</sup>* φυτών, όπως και τα υπόλοιπα όργανα των φυτών αυτών, έχουν σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση L-τρυπτοφάνης σε σύγκριση με τα φύλλα των αζωτοδεσμευτικών φυτών.

Η συγκέντρωση της φρουκτόζης στα φύλλα μη εμβολιασμένων φυτών και της ταγκατόζης στα φύλλα των *fix<sup>-</sup>* φυτών είναι χαμηλότερη από αυτή των φύλλων των *fix<sup>+</sup>* φυτών (Πίνακας 3.5). Αντίθετα, στα φυτά που φέρουν μη λειτουργικά φυμάτια η κυτταροβιόζη, η D-(+)τρεχαλόζη, η D-αλλόζη, η ισομαλτόζη, η μαλτόζη και η ραφινόζη συσσωρεύονται σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα σε σύγκριση με τα φύλλα των αζωτοδεσμευτικών φυτών.

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα της D-μαννιτόλης στα φύλλα των μη εμβολιασμένων φυτών, όπως και στα υπόλοιπα όργανα των ίδιων φυτών (Πίνακας 3.5). Η συγκέντρωση της D-μαννιτόλης εμφανίζεται χαμηλότερη και στα φύλλα των *fix<sup>-</sup>* φυτών σε σύγκριση με τα φύλλα των αζωτοδεσμευτικών φυτών. Αντίθετα, η ακετόλη, η γαλακτινόλη,

η ονονιτόλη και η πινιτόλη συσσωρεύονται σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα στα φύλλα των *fix<sup>-</sup>* φυτών από ότι στα φύλλα των αζωτοδεσμευτικών φυτών.

Στα φύλλα τόσο μη εμβολιασμένων όσο και *fix<sup>-</sup>* φυτών ανιχνεύονται χαμηλότερα επίπεδα 4-γουανιδοβουτυρικού οξέος, φουμαρικού οξέος, γλυκολικού οξέος και μηλεϊνάμικου οξέος σε σύγκριση με τα φύλλα των αζωτοδεσμευτικών φυτών (Πίνακας 3.5). Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι τα φύλλα των μη εμβολιασμένων και των *fix<sup>-</sup>* φυτών συσσωρεύουν υψηλότερα επίπεδα κιτρικού οξέος από τα φύλλα των αζωτοδεσμευτικών φυτών. Στα φύλλα μη εμβολιασμένων φυτών εντοπίζονται επίσης υψηλότερα επίπεδα γλυκερικού, L-γαλακτικού και πιπεκολινικού οξέος σε σύγκριση με τα φύλλα των *fix<sup>+</sup>* φυτών. Υψηλότερα επίπεδα πολλών οργανικών οξέων παρατηρούνται και στα φύλλα φυτών που φέρουν μη λειτουργικά φυμάτια από τα αντίστοιχα φύλλων *fix<sup>+</sup>* φυτών. Τέτοια είναι το κιτρακονικό, το κιτραμηλικό, το γλυκονικό, το σακχαρικό, το τρυγικό και το trans-ακονιτικό οξύ. Αντίθετα, η συγκέντρωση του γαλακτουρονικού, του ιμινοδιοξικού και του σικιμικού οξέος στα φύλλα των *fix<sup>-</sup>* φυτών εμφανίζεται σημαντικά χαμηλότερη από αυτή που παρατηρείται στα φύλλα των αζωτοδεσμευτικών φυτών.

Στα φύλλα μη εμβολιασμένων φυτών ανιχνεύονται χαμηλότερα επίπεδα 1-μεθυλδαντοΐνης, N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνης και παντοθενικού οξέος από ότι στα φύλλα των *fix<sup>+</sup>* φυτών (Πίνακας 3.5). Αντίθετα, η συγκέντρωση της β-κυανο-L-αλανίνης στα φύλλα των μη εμβολιασμένων φυτών και της N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνης στα φύλλα των *fix<sup>-</sup>* φυτών είναι υψηλότερη από αυτή που παρατηρείται στα φύλλα των αζωτοδεσμευτικών φυτών. Τα επίπεδα της β-κυανο-L-αλανίνης, του παντοθενικού οξέος, της πουτρεσκίνης και της σπερμιδίνης εμφανίζονται σημαντικά χαμηλότερα στα φύλλα *fix<sup>-</sup>* φυτών από αυτά των φύλλων αζωτοδεσμευτικών φυτών. Στα φύλλα των μη εμβολιασμένων φυτών η 6-φωσφορική-D-γλυκόζη, η 1-φωσφορική γλυκερόλη και το φωσφορικό οξύ συσσωρεύονται σε υψηλότερα επίπεδα από αυτά που παρατηρούνται στα φύλλα των *fix<sup>+</sup>* φυτών (Πίνακας 3.5).



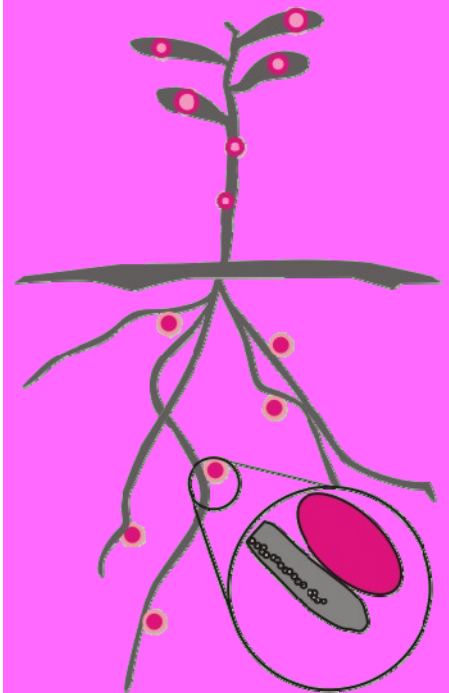


Η ανάλυση των κύριων συνιστωσών αναδεικνύει την έντονη διαφοροποίηση των επιπέδων των μεταβολιτών στα φύλλα των διαφορετικών τύπων φυτών (Εικόνα 3.21). Η πρώτη συνιστώσα εξηγεί το 32.2% της παραλλακτικότητας, ενώ η δεύτερη συνιστώσα εξηγεί το 18.4% και επιτυγχάνουν τον έντονο διαχωρισμό των φύλλων φυτών που εμβολιάστηκαν με το ριζόβιο άγριου τύπου από τα φύλλα των φυτών που εμβολιάστηκαν με το μεταλλαγμένο στέλεχος και από τα φύλλα των μη εμβολιασμένων φυτών. Επιπλέον, από την ανάλυση των κύριων συνιστωσών προκύπτει ότι η L-σερίνη, το πιπεκολικό οξύ, το φωσφορικό οξύ, το παντοθενικό οξύ, το μηλεϊναμικό οξύ, η 1-μεθυλδαντοΐνη, το 4-γουανιδοβουτυρικό οξύ, το κιτρικό οξύ, η D-μαννιτόλη και η φρουκτόζη είναι οι δέκα μεταβολίτες που επηρεάζουν περισσότερο το διαχωρισμό των φύλλων των διαφορετικών τύπων φυτών.

# 4

Κεφάλαιο

Συζήτηση



## 4 Συζήτηση

### 4.1 Ο μεταβολισμός του θείου κατά τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση

Είναι καλά τεκμηριωμένο ότι η πρόσληψη, η αφομοίωση και ο μεταβολισμός του αζώτου και του θείου είναι διεργασίες οι οποίες στα ανώτερα φυτά είναι στενά συνδεδεμένες μεταξύ τους (Koprivona et al., 2000; Hesse et al., 2004; Kopriva and Rennenberg, 2004; Davidian and Kopriva, 2010). Η πρόσληψη των θειικών συντονίζεται από την πρόσληψη/διαθεσιμότητα του αζώτου και του άνθρακα. Σε συνθήκες χαμηλής διαθεσιμότητας αζώτου, η πρόσληψη θειικών μειώνεται δραστικά (Smith, 1980; Clarkson et al., 1989; Davidian and Kopriva, 2010). Η αναγωγή των θειικών ενσωματώνεται στον μεταβολισμό αζώτου, αφού καταστέλλεται κατά την έλλειψη αζώτου (Koprivona et al., 2000; Vauclare et al., 2002; Davidian and Kopriva, 2010). Επιπρόσθετα, ο σκελετός άνθρακα και το άζωτο που απαιτούνται για τη βιοσύνθεση κυστεΐνης προέρχονται από τη σερίνη (Ho and Saito, 2001), ένα προϊόν της αναγωγής και αφομοίωσης του αζώτου (Kopriva and Rennenberg, 2004). Πληθώρα μελετών έχουν αναδείξει τη σημασία της πρόσληψης και του μεταβολισμού του θείου στην εγκαθίδρυση και λειτουργία της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης. Στο *L. japonicus*, η δραστηριότητα του συμβιωτικού μεταφορέα θειικών SST1 εμπλέκεται στη μεταφορά των θειικών από το κυτταρόπλασμα του φυτικού κυττάρου στα ενδοκυττάρια βακτηριοειδή, όπου το θρεπτικό στοιχείο είναι απαραίτητο για τη βιοσύνθεση πρωτεϊνών και συμπαραγόντων, συμπεριλαμβανομένου της νιτρογενάσης (Krusell et al., 2005). Επιπλέον, ο σημαντικός ρόλος της γλουταθειόνης που συντίθεται είτε από το φυτό είτε από τα βακτήρια και της ομογλουταθειόνης που παράγεται αποκλειστικά από το φυτό στη συμβιωτική αζωτοδέσμευση, το σχηματισμό του φυματίου και τη γήρανση του φυματίου έχει αποδειχτεί σε πολλές ερευνητικές εργασίες (Frendo et al., 2013; El Msehli et al., 2011; Becana et al., 2010; Chang et al., 2009; Muglia et al., 2008; Bianucci et al., 2008; Harrison et al., 2005; Krusell et al., 2005; Matamoros et al., 1999b, 2003). Γενετικές μελέτες που χρησιμοποίησαν μεταλλαγμένα, αυξοτροφικά ως προς την κυστεΐνη και τη μεθειονίνη, στελέχη *S. meliloti* Rmd201 έδειξαν ότι ο εμβολιασμός του *M. truncatula* με αυξότροφα μεθειονίνης οδηγεί σε ανάπτυξη μη λειτουργικών *fix<sup>-</sup>* φυματίων, ενώ με τον εμβολιασμό με αυξότροφα κυστεΐνης αναπτύσσονται αζωτοδεσμευτικά φυμάτια (Abbas et al., 2002). Εν τούτοις, λίγα γνωρίζουμε μέχρι σήμερα για τους ακριβείς μοριακούς και βιοχημικούς μηχανισμούς που διέπουν την πρόσληψη, αναγωγή και μεταβολισμό του θείου κατά τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση, όπου τα φυμάτια αποτελούν μία νέα ισχυρή πηγή αφομοιωμένου αζώτου για το φυτό.

#### 4.1.1 Τα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια αντιπροσωπεύουν μία νέα ισχυρή πηγή αφομοιωμένου θείου

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση των  $^{35}\text{S}$ -ροών, τη δραστικότητα της αναγωγάσης του APS και τις συγκεντρώσεις των S-μεταβολιτών σε συνδυασμό με την τρανσκριπτομική ανάλυση υποδεικνύουν σαφώς ότι όλες οι πτυχές της πρόσληψης, αφομοίωσης και μεταβολισμού του θείου ενισχύονται ιδιαίτερα στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια. Επιπλέον, για να διαπιστωθεί εάν αυτή η ισχυρή ενίσχυση της αφομοίωσης και του μεταβολισμού του θείου στα φυμάτια συνδέεται με την ενεργή συμβιωτική αζωτοδέσμευση ή εάν απλά σχετίζεται με το σχηματισμό φυματίου, κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν και τα μεταλλαγμένα ριζοβιακά στελέχη *M. loti* *ΔnifA* και *ΔnifH*. Ο εμβολιασμός φυτών *L. jaronicus* με τα εν λόγω μεταλλαγμένα στελέχη οδηγεί στο σχηματισμό μη λειτουργικών φυματίων που στερούνται της ενζυμικής δραστικότητας της νιτρογενάσης. Η ανάπτυξη του φυματίου από το στέλεχος *ΔnifH* είναι φυσιολογική, σε αντίθεση με στέλεχος *ΔnifA* το οποίο αδυνατεί να διαφοροποιηθεί σε βακτηριοειδές εντός του φυματίου (Fotelli et al., 2011). Η εικόνα που προκύπτει από τις αντίστοιχες αναλύσεις στα *fix*<sup>-</sup> φυμάτια αποκαλύπτει ότι η ενισχυμένη αφομοίωση και μεταβολισμός του θείου στα φυμάτια συνδέεται άρρηκτα με τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση. Τα κύρια σημεία της πρόσληψης και του μεταβολισμού του θείου που επάγονται στα φυμάτια και ελέγχονται από την ενεργή συμβιωτική αζωτοδέσμευση συνοψίζονται στην εικόνα 4.1.

Πολλά μεταγραφήματα που εμπλέκονται στην πρόσληψη και το μεταβολισμό του θείου επάγονται σημαντικά στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια (Εικόνα 3.8). Ανάμεσα τους διακρίνονται, τα μεταγραφήματα των μεταφορέων θειικών *Sst1*, *LjSultr3.1b*, *LjSultr3.3b*, και *LjSultr1.1* που αυξάνονται σημαντικά σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια των αζωτοδεσμευτικών φυματίων σε σύγκριση με τις ρίζες των αντίστοιχων φυτών. Ο μεταφορέας θειικών *Sst1*, που είναι μέλος της οικογένειας *Sultr3*, όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες (Krusell et al., 2005) εκφράζεται με εξειδικευμένο τρόπο στα φυμάτια παρουσιάζοντας 25 φορές υψηλότερα επίπεδα μεταγραφημάτων σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια του φυματίου σε σύγκριση με τις αντίστοιχες ρίζες. Ο *SST1*, που πιθανά εδράζει στη μεμβράνη του συμβιοσώματος των φυματίων του *L. jaronicus* (Wienkoop and Saalbach, 2003), έχει ένα κρίσιμο ρόλο στη συμβιωτική αζωτοδέσμευση, καθώς φυτά μεταλλαγμένα ως προς το *Sst1* αναπτύσσουν *fix*<sup>-</sup> φυμάτια (Krusell et al., 2005). Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, έχει προταθεί ότι ο *SST1* συμμετέχει στη μεταφορά θειικών από κυτταρόπλασμα του φυτικού κυττάρου στα βακτηριοειδή, όπου το εν λόγω θρεπτικό στοιχείο είναι απαραίτητο για την πρωτεϊνική σύνθεση του βακτηρίου και για άλλες λειτουργίες. Επομένως, στη συμβίωση

μεταξύ του *L. japonicus* και του *M. loti*, τα θειικά φαίνεται να αποτελούν μία σημαντική πηγή θείου για τα βακτηριοειδή και ο ρόλος αυτός πιθανά δεν μπορεί να αναπληρωθεί άλλους μεταβολίτες που περιέχουν θείο (Krusell et al., 2005). Στο *A. thaliana* έχει προταθεί ότι ο *AtSultr1;1* είναι ο βασικός υπεύθυνος για την αρχική πρόσληψη θειικών ιόντων από τη ριζόσφαιρα και η έκφρασή του ρυθμίζεται κυρίως από τη διαθεσιμότητα των θειικών (Saito, 2000; Takahashi et al., 1997). Έχει δειχθεί ότι πολλά μέλη της οικογένειας *SULTR3* ελέγχουν τη μεταφορά θειικών στους αναπτυσσόμενους σπόρους του *A. thaliana* (Davidian and Kopriva, 2010; Zuber et al., 2010) και των αναπτυσσόμενων εμβρύων του ρεβιθιού (*C. arietinum*) (Davidian and Kopriva, 2010; Tabe et al., 2003). Η επαγωγή που παρατηρείται σε πολλούς μεταφορείς θειικών που συμμετέχουν τόσο στην πρόσληψη θειικών από τα κύτταρα του φυματίου όσο και στην παροχή θειικών στα βακτηριοειδή υποδεικνύει τη μεταγραφική επαγωγή του δικτύου μεταφοράς θειικών μεταξύ των δύο συμβιωτών. Αντίθετα, τα μεταγραφήματα της αναγωγής του APS ενισχύονται στα νεαρά φυμάτια στις 14 ημέρες μετά τον εμβολιασμό (*Apr2*), ενώ στα ώριμα φυμάτια μειώνονται (*Apr1*) σε σύγκριση με τις αντίστοιχες ρίζες. Επομένως, η πενταπλάσια ενζυμική δραστηριότητα της αναγωγής του APS που παρατηρείται στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια σε σχέση με τις ρίζες δε συνδέεται με τη μεταγραφική ενεργοποίηση των αντίστοιχων γονιδίων. Εξάλλου σε προηγούμενες μελέτες έχει επαρκώς τεκμηριωθεί ότι η δραστηριότητα της αναγωγής του APS ρυθμίζεται μετα-μεταφραστικά (Davidian and Kopriva, 2010; Bick et al., 2001; Kopriva and Koprivova, 2004; Koprivova et al., 2008; Takahashi et al., 2011).

Τα αποτελέσματα της γονιδιακής έκφρασης αποκαλύπτουν ότι τα φυμάτια αντιπροσωπεύουν μία νέα ισχυρή πηγή για τη βιοσύνθεση κυστεΐνης, κάτι που ενισχύεται και από τις αναλύσεις των <sup>35</sup>S-ροών και των συγκεντρώσεων των μεταβολιτών. Η έκφραση της μιτοχονδριακής Ο-ακετυλο-μεταφοράσης της σερίνης *Sat4* επάγεται ισχυρά στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια, ειδικά κατά τα πρώιμα στάδια ανάπτυξης. Είναι καλά τεκμηριωμένο ότι στο *A. thaliana* η μιτοχονδριακή Ο-ακετυλο-μεταφοράση της σερίνης παίζει το σπουδαιότερο ρόλο στο σχηματισμό της Ο-ακετυλοσερίνης (Rennenberg and Herschbach, 2014; Krueger et al., 2009; Heeg et al., 2008; Haas et al., 2008; Watanabe et al., 2008a; Takahashi et al., 2011), ενώ ο κύριος τρόπος σύνθεσης κυστεΐνης θεωρείται το κυτταρόπλασμα (Rennenberg and Herschbach, 2014; Krueger et al., 2009; Heeg et al., 2008; Watanabe et al., 2008a). Σε συμφωνία με αυτό το μοντέλο, τα επίπεδα μεταγραφημάτων της κυτταροπλασματικής θειολολυάσης της Ο-ακετυλοσερίνης *Oast12*, που αποτελεί έναν από τους επικρατέστερους ισότυπους θειολολυάσης της Ο-ακετυλοσερίνης στα φυμάτια, και της κυτταροπλασματικής θειολολυάσης της Ο-ακετυλοσερίνης *Oast14*, επάγονται

σημαντικά στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια όλων των αναπτυξιακών σταδίων σε σύγκριση με τις γεινιάζουσες ρίζες. Η πλαστιδιακή βιοσύνθεση κυστεΐνης ενισχύεται μεταγραφικά στα φυμάτια, αφού η Ο-ακετυλο-μεταφοράση της σερίνης *Sat3* επάγεται στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια και η θειολολυάση της Ο-ακετυλοσερίνης *Oast13* επάγεται στα νεαρά φυμάτια. Το γονίδιο *Oast15* που εμφανίζει μεγάλη ομολογία με μία μιτοχονδριακή πρωτεΐνη με δραστικότητα συνθάσης της β-κυανοαλανίνης και θειολολυάσης της Ο-ακετυλοσερίνης παρουσιάζει υψηλή έκφραση στα ώριμα φυμάτια στις 21 και 28 ημέρες μετά τον εμβολιασμό. Προηγούμενες μελέτες αναφέρουν ότι η συνθάση της β-κυανοαλανίνης μπορεί να αντικαταστήσει τη θειολολυάση της Ο-ακετυλοσερίνης στα μιτοχόνδρια, τουλάχιστον στο σπανάκι (Warrilow and Hawkesford, 2000), παρόλα αυτά ο ρόλος της στη βιοσύνθεση κυστεΐνης δεν είναι ξεκάθαρος. Το μόνο γονίδιο βιοσύνθεσης κυστεΐνης που καταστέλλεται στα φυμάτια σε σύγκριση με τις ρίζες είναι η καυτταροπλασματική Ο-ακετυλο-μεταφοράση της σερίνης *Sat2*. Είναι γνωστό ότι η καυτταροπλασματική SAT παρεμποδίζεται από την κυστεΐνη στις φυσιολογικές συγκεντρώσεις (Saito, 2000; Noji et al., 1998), υποδηλώνοντας ότι η συνεισφορά αυτού του ισότυπου στη βιοσύνθεση κυστεΐνης είναι πιθανά χαμηλότερη στα πλούσια σε κυστεΐνη φυμάτια. Η ταυτόχρονη επαγωγή πολλών ισότυπων Ο-ακετυλο-μεταφοράσης της σερίνης και θειολολυάσης της Ο-ακετυλοσερίνης έρχεται σε συμφωνία με τη ρύθμιση των δραστηριοτήτων τους μέσω του σχηματισμού του συμπλόκου της συνθάσης κυστεΐνης (Wirtz et al., 2010). Τέλος, η μεταγραφή της συνθετάσης της γ-γλουταμυλκυστεΐνης *yecs2* και της συνθετάσης της γλουταθειόνης *Gshs* επάγεται στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια. Αντίθετα, ο κυρίαρχος ισότυπος συνθετάσης της γ-γλουταμυλκυστεΐνης *yecs1* στα νεαρά φυμάτια επιδεικνύει παρόμοια επίπεδα έκφρασης με αυτά των ριζών και καταστέλλεται στα μεταγενέστερα στάδια ανάπτυξης. RNAi σειρές του *M. truncatula* ως προς το γονίδιο *MtyECS* αναπτύσσουν μικρότερα φυμάτια με χαμηλότερη συγκέντρωση (ομο)γλουταθειόνης και χαμηλότερη δραστικότητα αναγωγής ακετυλενίου ανά φυμάτιο σε σύγκριση με τα φυτά-μάρτυρες υποδεικνύοντας ένα κρίσιμο ρόλο στην αποδοτικότητα της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης, καθώς και στο σχηματισμό του φυματίου (El Msehli et al., 2011).

Η μεταγραφική ενεργοποίηση της πρόσληψης και της αφομοίωσης του θείου σε συνδυασμό με την υψηλή δραστικότητα της αναγωγής του APS στα φυμάτια οδηγούν σε πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις θειολών στα φυμάτια σε σύγκριση με τα υπόλοιπα όργανα του *L. jaronicus*. Το θείο είναι ένα πολύ σημαντικό στοιχείο για πολλά μόρια που εμπλέκονται στη συμβιωτική αζωτοδέσμευση, συμπεριλαμβανομένου πρωτεϊνών και

πρωτεϊνικών συμπαραγόντων. Τα βακτηριοειδή ευθύνονται για περίπου τη μισή ποσότητα ολικών πρωτεϊνών των φυματίων (Gaude et al., 2004). Οι δομικές υπομονάδες της νιτρογενάσης, NifH, NifD, και NifK είναι από τις πιο άφθονες πρωτεΐνες στα βακτηριοειδή. Κάθε ενεργό σύμπλοκο νιτρογενάσης αποτελείται από δύο υπομονάδες NifH, μία υπομονάδα NifD και μία υπομονάδα NifK και στο σύμπλοκο του *M. loti* απαντώνται συνολικά 75 αμινοξέα που περιέχουν θείο. Επίσης, κάθε σύμπλοκο νιτρογενάσης περιέχει τέσσερα σιδηρο-θείο σύμπλοκα ([4Fe-4S], [8Fe-7S], [4Fe-3S], και [3Fe-Mo-3S]), τα οποία δρουν ως αγωγοί για τη ροή ηλεκτρονίων προς το μοριακό άζωτο και την αναγωγή αυτού (Dos santos et al 2004). Είναι γνωστό ότι η κυστεΐνη συμμετέχει στην εγκαθίδρυση της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης. Έχει δειχθεί ότι το ένζυμο NifS, που έχει δράση αποσουλφουράση της κυστεΐνης (Zheng et al., 1993; Johnson et al., 2005) και συσσωρεύεται μόνο σε αζωτοδεσμευτικές συνθήκες, χρησιμοποιεί L-κυστεΐνη για την εξειδικευμένη κινητοποίηση του θείου με σκοπό την ωρίμανση της νιτρογενάσης (Johnson et al., 2005). Επιπρόσθετα, η κυστεΐνη είναι η θειόλη που εμπλέκεται στη σύνθεση της γ-γλουταμυλκυστεΐνης, που αποτελεί πρόδρομο για τη βιοσύνθεση της γλουταθειόνης και της ομογλουταθειόνης (Takahashi et al., 2011). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης καταδεικνύουν ότι τα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια αποτελούν τον κύριο τόπο της συσσώρευσης κυστεΐνης στα φυτά *L. jaronicus*. Η παρατήρηση αυτή είναι σε συμφωνία με τη μελέτη των Matamoros et al., (1999b) όπου αναφέρεται ότι τα φυμάτια στο μπιζέλι, τα κουκιά, τη μηδική, τη σόγια και τα μαυρομάτικα είναι επίσης πλούσια σε κυστεΐνη. Η υψηλή συγκέντρωση κυστεΐνης πιθανόν να τροφοδότησε τη συσσώρευση και άλλων θειολών στα φυμάτια του *L. jaronicus*, συμπεριλαμβανομένου της γ-γλουταμυλκυστεΐνης, της γλουταθειόνης και της ομογλουταθειόνης (Εικόνα 3.3). Είναι καλά τεκμηριωμένο ότι η συγκέντρωση γλουταθειόνης και ομογλουταθειόνης στα φυμάτια παίζει σημαντικό ρόλο στη συμβιωτική αζωτοδέσμευση και στο σχηματισμό και τη γήρανση του φυματίου (Muglia et al., 2008; Matamoros et al., 1999b, 2003; Bianucci et al., 2008; El Msehli et al., 2011; Harrison et al., 2005; Chang et al., 2009; Becana et al., 2010; Frendo et al., 2013).





σε περίσσεια παρατηρείται καταστολή της πρόσληψης του θείου (Herschbach and Rennenberg, 1994; Zhao et al., 1999; Hesse et al., 2004; Vauclaire et al., 2002). Παράλληλα, οι μειωμένες αυτές τιμές που εμφανίζονται στα φυμάτια αντανακλούν στον εξειδικευμένο ρόλο των ριζών στην πρόσληψη των θεικών από το θρεπτικό μέσο. Στις προαναφερθείσες μελέτες έχει δειχθεί ότι η περίσσεια θειολών καταστέλλει επίσης τη δραστικότητα της αναγωγής του APS και την αφομοίωση του θείου μέσω της μειωμένης  $^{35}\text{S}$ -ροής στα αποθέματα θειολών (Herschbach and Rennenberg, 1994; Zhao et al., 1999; Hesse et al., 2004; Vauclaire et al., 2002). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι τα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια αποτελούν ένα κύριο τόπο αναγωγής και αφομοίωσης θεικών. Εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερη δραστικότητα αναγωγής του APS και ροές προς κυστεΐνη και γλουταθειόνη συγκριτικά με τις ρίζες, παρά την υψηλή τους περιεκτικότητα σε θειόλες. Το εύρημα αυτό μπορεί να αποδοθεί σε διαφορετικούς βιοχημικούς μηχανισμούς που ελέγχουν την πρόσληψη και την αφομοίωση του θείου και/ή στη διαμερισματοποίηση της βιοσύνθεσης θειολών και της συσσώρευσης θειολών σε διαφορετικούς τόπους εντός των μολυσμένων κυττάρων του φυματίου.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι η απουσία της ενεργής συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης και στους δύο τύπους των *fix* φυματίων που μελετήθηκαν σε αυτή την εργασία οδηγεί σε δραματική καταστολή της πρόσληψης θεικών και της βιοσύνθεσης θειολών στα μη λειτουργικά φυμάτια. Αυτό καθοδηγείται από την καταστολή πολλών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένου του συμβιωτικού μεταφορέα θεικών *Sst1*, της αναγωγής του APS *Apr2* και των περισσότερων γονιδίων που εμπλέκονται στην αφομοίωση των θεικών. Οι περισσότερες αλλαγές εμφανίζονται και στους δύο τύπους των *fix* φυματίων υποδεικνύοντας ότι η ενισχυμένη αφομοίωση του θείου στα φυμάτια συνδέεται κυρίως με την ενεργή συμβιωτική αζωτοδέσμευση. Το σημείο κλειδί των *fix* φυματίων είναι η πλήρης κατάργηση της δραστικότητας της αναγωγής του APS σε συνδυασμό με τη μειωμένη πρόσληψη θεικών. Έχει δειχθεί ότι η ρύθμιση της δραστικότητας της αναγωγής του APS, καθώς και της πρόσληψης των θεικών αντιπροσωπεύουν τα κύρια ρυθμιστικά βήματα του μονοπατιού της αφομοίωσης των θεικών (Davidian and Kopriva, 2010; Hatzfeld et al., 1998; Westerman et al., 2001; Koprivona et al., 2000; Vauclaire et al., 2002; Hesse et al., 2003). Η σύνδεση μεταξύ της αφομοίωσης του θείου και της ενεργής συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης στα φυμάτια αντανακλά τη ρύθμιση της πρόσληψης και της αφομοίωσης των θεικών από τη διαθεσιμότητα του αζώτου (Davidian and Kopriva, 2010; Kopriva and Rennenberg, 2004; Clarkson et al., 1989). Σε συνθήκες χαμηλής διαθεσιμότητας αζώτου, η πρόσληψη θεικών

μειώνεται δραματικά (Davidian and Kopriva, 2010; Smith, 1980; Clarkson et al., 1989). Η μείωση αυτή καθοδηγείται από μειωμένη συσσώρευση μεταγραφημάτων που κωδικοποιούν για μεταφορείς θεικών (Davidian and Kopriva, 2010; Maruyama-nakashita et al., 2004), μια κατάσταση παρόμοια με την καταστολή των αντίστοιχων μεταγραφημάτων του *L. jaronicus* που παρατηρείται σε αυτή την εργασία. Τόσο η ενζυμική δραστικότητα όσο και τα μεταγραφήματα της αναγωγής του APS μειώνονται κατά την έλλειψη αζώτου (Koprivona et al., 2000). Επιπλέον, η έλλειψη αζώτου επηρεάζει τη συσσώρευση των mRNA πολλών γονιδίων που εμπλέκονται στην αφομοίωση των θεικών (Kopriva and Rennenberg, 2004; Yamaguchi et al., 1999). Τα επίπεδα του αμμώνιου και των αμινοξέων θεωρούνται σημαντικός παράγοντας ρύθμισης της δραστικότητας της αναγωγής του APS και της μετέπειτα αφομοίωσης του θείου (Davidian and Kopriva, 2010; Koprivona et al., 2000; Brunold and Suter, 1984). Σε συμφωνία με τις μελέτες αυτές, τα δεδομένα της παρούσας εργασίας δείχνουν ότι τα φυμάτια λειτουργούν ως ισχυροί αφομοιωτές θεικών μόνο παρουσία της ενεργής συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης και ότι τα προϊόντα της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης δρουν ως θετικοί ρυθμιστές της αφομοίωσης και του μεταβολισμού του θείου στα φυμάτια.

#### **4.1.2 Η αφομοίωση του θείου στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια επηρεάζει το μεταβολισμό και την κατανομή του θείου σε ολόκληρο το φυτό**

Παρόλο που το θείο θεωρείται σημαντικό στοιχείο για πολλά μόρια που εμπλέκονται στην αζωτοδέσμευση, όπως πρωτεΐνες και συμπαράγοντες πρωτεϊνών (Johnson et al., 2005; Dos Santos et al., 2004; Zheng et al., 1993), τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής υποδεικνύουν ότι οι θειόλες που συντίθενται στα φυμάτια δεν καλύπτουν μόνο τις ανάγκες της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης, αλλά συνεισφέρουν και στην οικονομία του θείου σε ολόκληρο το φυτό (Εικόνα 4.1). Τα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια, ως μια πιθανή πηγή ανηγμένου θείου, προκαλούν γενικό αναπρογραμματισμό της πρόσληψης, της αναγωγής και της αφομοίωσης των θεικών σε επίπεδο μεταγραφημάτων και μεταβολιτών. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι οι αλλαγές αυτές εξαρτώνται από τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση, αφού δεν παρατηρούνται στα *fix<sup>-</sup>* φυτά, τα οποία μάλιστα στα περισσότερες περιπτώσεις μοιάζουν μεταβολικά με τα μη εμβολιασμένα φυτά.

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν για πρώτη φορά ότι οι θειόλες που συντίθενται στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια θα μπορούσαν να υπόκεινται σε μεταφορά μεγάλης απόστασης συνεισφέροντας στην οικονομία του θείου των μη-συμβιωτικών οργάνων. Πράγματι, ενώσεις που περιέχουν ανηγμένο θείο έχουν ανιχνευτεί στον ανιόντα χυμό πολλών φυτικών ειδών (Herschbach and Rennenberg, 2001a, 2001b; Rennenberg et

al., 1994a, 1994b; Schneider et al., 1994a, 1994b; Schupp et al., 1991). Η σύνθεση και οι συγκεντρώσεις των θειούχων ενώσεων στον ανιόντα χυμό ποικίλουν ανάλογα με το είδος, την εποχή, τη θειούχο θρέψη, το αναπτυξιακό στάδιο, το τμήμα του κορμού καθώς και από την παρουσία μυκόρριζας (Herschbach et al., 2012; Herschbach and Rennenberg, 2001a, 2001b). Η γλουταθειόνη θεωρείται η κύρια ένωση ανηγμένου θείου που μεταφέρεται σε μεγάλη απόσταση στα φυτά (Gigolashvili and Kopriva, 2014; Herschbach et al., 2012; Herschbach and Rennenberg, 1995; Schneider et al., 1994a, 1994b). Εν τούτοις, πολλά από τα φυτά που έχουν αναλυθεί περιέχουν κυστεΐνη και γ-γλουταμυλκυστεΐνη σε αξιόλογες ποσότητες στον ανιόντα χυμό εκτός από γλουταθειόνη (Blaschke et al., 1996; Rennenberg et al., 1994a, 1994b; Schupp et al., 1991). Στον ανιόντα χυμό της οξιάς, η κυστεΐνη είναι η κύρια θειόλη μικρού μοριακού βάρους, ενώ η γλουταθειόνη απαντάται μόνο σε πολύ μικρές ποσότητες (Herschbach et al., 2012; Rennenberg et al., 1994a; Schupp et al., 1991). Ως εκ τούτου, οι ενώσεις αυτές φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταφορά ανηγμένου θείου και επομένως και στη θειούχο θρέψη. Η υψηλότερη συγκέντρωση που παρατηρείται στα φύλλα των αζωτοδεσμευτικών φυτών σε σύγκριση με τα φύλλα των μη εμβολιασμένων και των *fix<sup>-</sup>* φυτών δεν μπορεί να αποδοθεί στις τοπικές βιοσυνθετικές διεργασίες, αφού η δραστηριότητα της αναγωγής του APS στα φύλλα των *fix<sup>+</sup>* φυτών σημαντικά χαμηλότερο από ότι στα φύλλα των μη εμβολιασμένων φυτών (Εικόνα 3.2 και 4.1). Επιπλέον, τα φύλλα των φυτών που φέρουν *fix<sup>-</sup>* φυμάτια εμφανίζουν παρόμοια επίπεδα με αυτά των φύλλων των αζωτοδεσμευτικών φυτών, γεγονός που υποδεικνύει και μόνο η παρουσία των φυματίων αρκεί για τη καταστολή της δραστηριότητας της αναγωγής του APS στα φύλλα. Ωστόσο, η μεταγραφή και των δύο ισοτύπων της αναγωγής του APS στα φύλλα δεν επηρεάζεται από την παρουσία ούτε των φυματίων ούτε της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης. Αυτή η ασυμφωνία μεταξύ των επιπέδων των μεταγραφημάτων και της ενζυμικής δραστηριότητας της αναγωγής του APS πιθανόν να οφείλεται σε μετα-μεταφραστική ρύθμιση της εν λόγω ενζυμικής δραστηριότητας στα φύλλα των φυτών που φέρουν φυμάτια (Takahashi et al., 2011; Davidian and Kopriva, 2010; Koprivona et al., 2008; Kopriva and Koprivona, 2004; Bick et al., 2001). Τα χαμηλά επίπεδα τόσο της δραστηριότητας της αναγωγής του APS και όσο της κυστεΐνης στα φύλλα των *fix<sup>-</sup>* φυτών ευθύνονται για τη συσσώρευση θειικών και για τα χαμηλά επίπεδα θειολών των φυτών. Μία παρόμοια παρατήρηση έγινε στο *A. thaliana*, όπου η μειωμένη δραστηριότητας του APS συσχετίστηκε με τα υψηλά επίπεδα θειικών στα φύλλα (Davidian and Kopriva, 2010; Loudet et al., 2007). Η καταστολή της βιοσύνθεσης κυστεΐνης στα φυμάτια των αζωτοδεσμευτικών φυτών είναι φανερή και σε μεταγραφικό επίπεδο. Διάφοροι ισότυποι που εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία, συμπεριλαμβανομένου της μιτοχονδριακής O-

ακετυλο-μεταφοράσης της σερίνης *Sat4* και της κυτταροπλασματικής θειολολυάσης της Ο-ακετυλοσερίνης *Oast12* οι οποίες θεωρείται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη βιοσύνθεση κυστεΐνης (Krueger et al., 2009; Heeg et al., 2008; Haas et al., 2008; Watanabe et al., 2008a; Takahashi et al., 2011) εμφανίζουν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα μεταγραφημάτων στα φύλλα των αζωτοδεσμευτικών φυτών σε σύγκριση με τα φύλλα των μη εμβολιασμένων και των *fix<sup>-</sup>* φυτών (Εικόνες 3.12 και 4.1). Επιπρόσθετα, η υψηλότερη συγκέντρωση κυστεΐνης που παρατηρείται στις ρίζες που φέρουν ριζόβια άγριου τύπου σε σύγκριση με τις ρίζες των μη εμβολιασμένων ή των *fix<sup>-</sup>* φυτών (Εικόνες 3.10 και 4.1) υποδεικνύει επίσης τη συνεισφορά των φυματίων στα αποθέματα των ριζών σε κυστεΐνη, διότι τόσο η δραστηριότητα της αναγωγάσης του APS όσο και οι <sup>35</sup>S-ροές στα αποθέματα κυστεΐνης δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ριζών των μη εμβολιασμένων, των αζωτοδεσμευτικών και των *fix<sup>-</sup>* φυτών (Εικόνες 3.2, 3.6 και 4.1). Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υποδεικνύουν ότι και η γλουταθειόνη είναι πιθανό να μεταφέρεται από τα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια στις γεινιαζουσες ρίζες. Τα παρόμοια επίπεδα μεταγραφημάτων της συνθετάσης της γλουταθειόνης *Gshs* και των <sup>35</sup>S-ροών στα αποθέματα γλουταθειόνης που μετρώνται στις ρίζες των μη εμβολιασμένων, των αζωτοδεσμευτικών και των *fix<sup>-</sup>* φυτών δε φανερώνει υψηλότερη βιοσύνθεση γλουταθειόνης στις ρίζες που εμβολιάστηκαν με ριζόβια άγριου τύπου (Εικόνες 3.6, 3.10 και 4.1). Επομένως, οι τοπικές διεργασίες βιοσύνθεσης δεν ευθύνονται για την υψηλότερη συγκέντρωση γλουταθειόνης που απαντάται στις ρίζες των *fix<sup>+</sup>* φυτών. Αντίθετα, τα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια φαίνεται να είναι το κατεξοχήν όργανο που βιοσυνθέτει γλουταθειόνη εμφανίζονται υψηλά επίπεδα έκφρασης και υψηλή <sup>35</sup>S-ροή στα αποθέματα γλουταθειόνης (Εικόνες 3.6, 3.8 και 4.1). Τα δεδομένα αυτά αυξάνουν την πιθανότητα ένα κλάσμα της γλουταθειόνης που συντίθεται στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια να εξάγεται στις ρίζες. Εξάλλου, είναι καλά τεκμηριωμένο ότι η γλουταθειόνη μεταφέρεται σε μεγάλες αποστάσεις στα φυτά (Gigolashvili and Kopriva, 2014; Herschbach et al., 2012; Herschbach and Rennenberg, 1995; Schneider et al., 1994a, 1994b). Αντίθετα, τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής δεν υποδηλώνουν μεταφορά της ομογλουταθειόνης σε μεγάλες αποστάσεις, αφού οι υψηλές συγκεντρώσεις ομογλουταθειόνης που ανιχνεύονται στις ρίζες και τα φύλλα των αζωτοδεσμευτικών φυτών συσχετίζονται καλά με την μεταγραφική επαγωγή της συνθετάσης της ομογλουταθειόνης *Hgshs* και στα δύο όργανα (Εικόνες 3.3, 3.8 και 4.1). Επιπρόσθετα, η αυξημένη <sup>35</sup>S-ροή στα αποθέματα ομογλουταθειόνης που παρατηρείται στις ρίζες των φυτών σε σύγκριση με τις μη εμβολιασμένες ρίζες (Εικόνες 3.6 και 4.1) υποδεικνύουν την τοπική βιοσύνθεση ομογλουταθειόνης. Εξάλλου, έχει δειχθεί ότι η ομογλουταθειόνη παίζει σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυτών και μικροορ-

γανισμών. Η ομογλουταθειόνη ρυθμίζει την γονιδιακή έκφραση του φυτού-ξενιστή κατά συμβιωτική αλληλεπίδραση μεταξύ του *M. truncatula* και του *S. meliloti*. Η μειωμένη συγκέντρωσή της επιφέρει τροποποιήσεις ως προς τη μεταφορά νερού και το μονοπάτι σημάτων του σαλκυλικού οξέος επηρεάζοντας τη φυσιολογική ανάπτυξη της συμβιωτικής αλληλεπίδρασης (Pucciariello et al., 2009).

Η συναρπαστική υπόθεση ότι τα φυμάτια μπορούν να λειτουργήσουν ως νέα, ισχυρή πηγή θειολών για τα υπόλοιπα φυτικά όργανα ενισχύεται περαιτέρω από τη χαμηλότερη  $^{35}\text{S}$ -ροή στα αποθέματα πρωτεΐνης τα οποία παρατηρούνται στα ώριμα φυμάτια σε σύγκριση με τις *fix*<sup>+</sup> ρίζες των φυτών (Εικόνα 3.6). Αυτό υποδεικνύει η βιοσύνθεση πρωτεϊνών που περιέχουν θείο στα φυμάτια, συμπεριλαμβανομένων των υπομονάδων της νιτρογενάσης, δημιουργεί χαμηλότερες ανάγκες για  $^{35}\text{S}$ -ροή στα αποθέματα πρωτεΐνης από ότι η πρωτεϊνοσύνθεση στις ρίζες. Επομένως, οι απαιτήσεις για σύνθεση πρωτεϊνών στα ώριμα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια δεν μπορούν να θεωρηθούν υπεύθυνες για τα αυξημένα επίπεδα της αφομοίωσης θείου και της βιοσύνθεσης κυστεΐνης. Επίσης, τα δεδομένα της παρούσας μελέτης φανερώνουν ότι η υψηλότερη συγκέντρωση θειολών στα φυτικά όργανα του *L. japonicus* που παρατηρείται κατά την εγκαθίδρυση της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης είναι ικανή να ρυθμίζει ενεργά την πρόσληψη θεικών, αφού οι υψηλότερες συγκεντρώσεις θειολών που παρατηρούνται στα αζωτοδεσμευτικά φυτά (Εικόνες 3.3 και 4.1) οδηγούν σε σημαντικά μειωμένα επίπεδα πρόσληψης θεικών ανά φυτό, ρυθμού πρόσληψης θεικών από το ριζικό σύστημα καθώς και σε μειωμένο ρυθμό πρόσληψης οργάνων συγκριτικά με τα μη εμβολιασμένα και τα φυτά (Εικόνες 3.4, 3.5 και 4.1). Αυτό είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που αναφέρουν ότι η περίσσεια κυστεΐνης ή άλλων ενώσεων που περιέχουν ανηγμένο θείο έχει ως αποτέλεσμα την μειωμένη πρόσληψη θεικών (Hesse et al., 2004; Vauclare et al., 2002; Zhao et al., 1999; Herschbach and Rennenberg, 1994).

#### **4.1.3 Η αφομοίωση του θείου στα φυμάτια εξαρτάται από την παροχή φωτοσυνθετικού άνθρακα**

Τα δεδομένα τόσο της τρανσκριπτομικής ανάλυσης όσο και της δραστηκότητας της αναγωγάσης του APS φανερώνουν ότι όλες οι πτυχές του μεταβολισμού του θείου στα φυμάτια καταστέλλονται κατά την έλλειψη φωτοσυνθετικού άνθρακα (Εικόνα 3.13 και 3.14). Πολλά από τα μεταγραφήματα που εμπλέκονται στην πρόσληψη και το μεταβολισμό του θείου καταστέλλονται στα φυμάτια φυτών που βρίσκονται σε έλλειψη φωτοσυνθετικού άνθρακα λόγω συνθηκών παρατεταμένου σκότους από το πρώτο κιόλας εικοσιτετράωρο (Εικόνα 3.14). Ανάμεσά τους διακρίνονται οι θειικοί μεταφορείς *Sst1*, *LjSultr3.1a*, *LjSultr3.1b*, *LjSultr3.3b*, *LjSultr3.4a*, και *LjSultr1.1*, με πιο εντυπωσιακή τη μείωση

μεταγραφημάτων που κωδικοποιούν για το συμβιωτικό μεταφορέα θειικών *Sst1*. Είναι γνωστό ότι η αζωτοδέσμευση είναι ισχυρά συνδεδεμένη με την παροχή άνθρακα. Πειραματικές συνθήκες που ενισχύουν τη φωτοσύνθεση, όπως αυξημένη συγκέντρωση CO<sub>2</sub> στην ατμόσφαιρα (Hardy and Havelka, 1976; Finn and Brun, 1982; Murphy, 1986; Soussana and Hartwig, 1996; Schortemeyer et al., 1999) και αυξημένη ένταση φωτός (Lawn and Brun, 1974; Hardy and Havelka, 1976; Bethlenfalvai and Phillips, 1977), συνήθως σχετίζονται με αυξημένη αζωτοδέσμευση. Αντίθετα, χειρισμοί που περιορίζουν τη φωτοσύνθεση, όπως αποφύλλωση (Fujita et al., 1988), σκίαση (Tricot, 1993), σύντομη φωτοπερίοδος (Murphy, 1986) και μειωμένη ένταση φωτός (Feigenbaum and Mengel, 2006), μειώνουν την αζωτοδέσμευση. Επίσης, κατά την ανάπτυξη φυτών *P. sativum* (μπιζέλι) εμφανίστηκε να υπάρχει μια γραμμική συσχέτιση μεταξύ της ποσότητας άνθρακα που κατανέμεται στα φυμάτια και στην ειδική δραστικότητα της αζωτοδέσμευσης (Voisin et al., 2003). Ομοίως στο μπιζέλι, η *in vivo* δραστικότητα της νιτρογενάσης μειώθηκε σημαντικά μετά από συνεχές σκοτάδι μίας ημέρας ενώ η περιεχόμενη σακχαρόζη μειώθηκε κατά 97% (Mata-moros et al., 1999a). Τέλος, η έλλειψη φωτοσυνθετικού άνθρακα λόγω παρατεταμένου σκότους οδήγησε στη δραματική μείωση της δραστικότητας της νιτρογενάσης σε φυμάτια *L. jaronicus* ακόμα και από το πρώτο εικοσιτετράωρο (Tsikou et al., 2013). Επομένως, φαίνεται ότι ο συμβιωτικός μεταφορέας θειικών *Sst1* είναι άρρηκτα συνδεδεμένος με τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση, διότι αφενός είναι απαραίτητος για τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση (Kruse et al., 2005) και αφετέρου επάγεται εξειδικευμένα μόνο στα λειτουργικά φυμάτια (Εικόνα 3.8, 3.9 και 3.14).

Στα φυμάτια που στερούνται φωτοσυνθετικού άνθρακα παρατηρείται καταστολή της αναγωγής του θείου, αφού η ενζυμική δραστικότητα της αναγωγής του APS σχεδόν καταργείται (Εικόνα 3.13) και τα επίπεδα μεταγραφημάτων της σουλφουλυάσης του ATP, της αναγωγής του APS (*Apr2*) και της αναγωγής του θειώδους είναι σημαντικά χαμηλότερα σε σύγκριση με αυτά που απαντώνται σε φυμάτια φυτών που αναπτύσσονται σε συνθήκες κανονικής φωτοπερίοδου (Εικόνα 3.14). Μεταγραφική καταστολή παρατηρείται και για τα περισσότερα γονίδια που εμπλέκονται στην αφομοίωση του θείου στην κυστεΐνη και συγκεκριμένα για τους ισότυπους της Ο-ακετυλομεταφοράς της σερίνης *Sat1* και *Sat2* και για όλους τους ισότυπους της θειολυάσης της Ο-ακετυλοσερίνης (Εικόνα 3.14). Είναι γνωστό ότι η σύνθεση κυστεΐνης από θειικά διεγείρεται από το φως (Schmidt and Trebst, 1969). Επίσης, έχει δειχθεί ότι η δραστικότητα της σουλφουρυάσης του ATP και της αναγωγής του APS επάγονται από το φως (Passera et al., 1989; Neuenschwander et al., 1991) και ο ημερήσιος ρυθμός της αναγωγής του APS

στο *A. thaliana* και το καλαμπόκι φτάνει το μέγιστο κατά τη διάρκεια του φωτός της ημέρας (Kocsy et al., 1997; Korpriva et al., 1999). Πράγματι, στο *A. thaliana*, κατά τη διερεύνηση γονιδίων των οποίων η έκφρασή τους υπόκειται σε κίρκαδικό έλεγχο εντοπίστηκε ο συντονισμένος κίρκαδικός ρυθμός δύο μεταφορέων θειικών, της αναγωγάσης του APS και της Ο-ακετυλο-μεταφοράσης της σερίνης με μέγιστο κατά την έναρξη της περιόδου φωτός (Harmer et al., 2000). Οι παρατηρήσεις αυτές θα μπορούσαν να αποδοθούν είτε στην άμεση επίδραση του φωτός είτε στην έμμεση ρύθμιση από τους υδρογονάνθρακες που συντίθενται κατά τη φωτοσύνθεση. Οι Korpriva et al., (1999) έδειξαν ότι ο επαναφωτισμός φυτών *A. thaliana* που είχαν διατηρηθεί σε συνθήκες σκότους για 36 ώρες επάγει τη συσσώρευση μεταγραφημάτων της αναγωγάσης του APS και την ενζυμική της δραστικότητα. Την επαγωγή αυτή μπορούσε να τη μιμηθεί η εφαρμογή σακχαρόζης στις ρίζες (Korpriva et al., 1999). Η γλυκόζη μπορούσε επίσης να επάγει την δραστικότητα της αναγωγάσης του APS σε φυτά που βρίσκονται σε συνθήκες σκότους, ενώ η σορβιτόλη, η μαννιτόλη και η 2-δεοξυγλυκόζη όχι, αποκαλύπτοντας, έτσι, αφενός ότι τα σάκχαρα επιδρούν άμεσα στη δραστικότητα της αναγωγάσης του APS και όχι μέσω ωσμωτικού στρες και αφετέρου ότι τα σήματα μέσω της εξωκινάσης δεν ευθύνονται για τη ρύθμιση αυτή (Hesse et al., 2003). Επομένως, τα σάκχαρα επιδρούν στην αναγωγή του APS όπως η Ο-ακετυλοσερίνη στη δραστηριότητά της σε φυτά *Lemna* που διατηρούνται στο σκοτάδι (Neuenschwander et al., 1991). Οι Hesse et al., (2003) συνέκριναν την επίδραση της γλυκόζης, της Ο-ακετυλοσερίνης και του συνδυασμού τους, ώστε να διαπιστώσουν αν η γλυκόζη επηρεάζει την αφομοίωση θειικών και σε συνθήκες έλλειψης αζώτου. Ταυτόχρονη εφαρμογή γλυκόζης και Ο-ακετυλοσερίνης οδήγησε σε συνεργιστική επαγωγή της δραστικότητας της αναγωγάσης του APS, ενώ η αναγωγάσης του APS επάγεται από τη γλυκόζη σε φυτά που βρίσκονται σε συνθήκες έλλειψης αζώτου, αποκαλύπτοντας, έτσι, ότι τα σάκχαρα ρυθμίζουν την αφομοίωση θειικών ανεξάρτητα από την Ο-ακετυλοσερίνη και την αφομοίωση των νιτρικών (Hesse et al., 2003). Ωστόσο, ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι η μεταγραφική καταστολή της βιοσύνθεσης της κυστεΐνης δε συνοδεύεται από μείωση των επιπέδων κυστεΐνης. Αντιθέτως, τα επίπεδα κυστεΐνης στα φυμάτια των φυτών που βρίσκονται σε συνθήκες σκότους εμφανίζονται σημαντικά υψηλότερα από ότι στα φυμάτια των φυτών που αναπτύσσονται σε συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου (Εικόνα 3.13). Η συσσώρευση της κυστεΐνης στα φυμάτια που στερούνται φωτοσυνθετικού άνθρακα πιθανόν να οφείλεται στην αποδόμηση πρωτεϊνών που λαμβάνει χώρα κάτω από αυτές τις συνθήκες. Ομοίως, στα φυμάτια φυτών *L. jaronicus* που παρέμειναν σε συνθήκες σκότους παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης αμινοξέων και ταυτόχρονη μείωση της

συγκέντρωσης ολικών πρωτεϊνών που αποδόθηκε σε πιθανή αποδόμηση των πρωτεϊνών (Tsikou et al., 2013).

Στα φυμάτια φυτών που παραμένουν σε συνθήκες παρατεταμένου σκότους, τα επίπεδα της γ-γλουταμυλκυστεΐνης εμφανίζονται αυξημένα, ενώ τα επίπεδα της γλουταθειόνης εμφανίζονται μειωμένα σε σύγκριση με τα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια φυτών που αναπτύσσονται σε κανονικές συνθήκες φωτοπεριόδου. Τα επίπεδα γλουταθειόνης των φύλλων του έλατου μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια της ημέρας. Συγκεκριμένα, τα επίπεδά της αυξάνονται κατά τις πρωινές ώρες, φτάνουν στο μέγιστο τις μεσημβρινές ώρες, ενώ το απόγευμα τα επίπεδα μειώνονται αγγίζοντας τις ελάχιστες τιμές κατά τη διάρκεια της νύχτας (Schurr and Rennenberg, 1989, 1990). Οι ημερήσιες αυτές αλλαγές δεν υπαγορεύονται από κίρκαδικό ρυθμό αλλά εξαρτάται απόλυτα από το φωτισμό. Τα αυξημένα επίπεδα γλουταθειόνης οδηγούν σε μείωση των επιπέδων της γ-γλουταμυλκυστεΐνης, ενώ με τη μείωση των επιπέδων της γλουταθειόνης τα αποθέματα των φύλλων σε γ-γλουταμυλκυστεΐνη ανακάμπτουν (Schurr and Rennenberg, 1990). Στο καλαμπόκι, από την άλλη μεριά, η συγκέντρωση της γλουταθειόνης δε μεταβάλλεται σημαντικά κατά τη διάρκεια της μέρας και της νύχτας, αλλά η γ-γλουταμυλκυστεΐνη αυξάνεται κατά τη διάρκεια του σκότους (Masi et al., 2002). Λόγω του ότι η συσσώρευση της γ-γλουταμυλκυστεΐνης σε συνθήκες σκότους αποτρέπει με την παροχή γλυκίνης στα φύλλα (Noctor et al., 1997a, b), μπορεί να βγει το συμπέρασμα ότι η ενσωμάτωση της γ-γλουταμυλκυστεΐνης στη γλουταθειόνη είναι αυτό που περιορίζει τη σύνθεση της γλουταθειόνης. Ο περιορισμός αυτός μπορεί να οφείλεται στη μειωμένη διαθεσιμότητα γλυκίνης από τη φωτοαναπνοή κατά τη μείωση της έντασης του φωτός. Η σερίνη δεν μπορεί να αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για τη σύνθεση κυστεΐνης κάτω από αυτές τις συνθήκες, διότι δεν παράγεται μόνο μέσω της φωτοαναπνοής, αλλά και από ένα εναλλακτικό πλαστιδιακό μονοπάτι (Ho and Saito, 2001).

Παρατεταμένες συνθήκες καταπόνησης επάγουν την πρόωρη γήρανση του φυματίου. Η γήρανση που επάγεται από καταπόνηση έχει συσχετιστεί με αυξημένη παραγωγή οξειδωτικών ουσιών και την ταυτόχρονα μειωμένη αντιοξειδωτική προστασία (Escuredo et al., 1996; Gogorcena et al., 1997). Η έκθεση φυτών σόγιας σε συνθήκες παρατεταμένου σκοταδιού επάγει δομικές και μεταβολικές αλλαγές στα φυμάτια που μοιάζουν με φυσιολογική γήρανση, γεγονός που δηλώνει ότι οι μηχανισμοί που ελέγχουν τις διαδικασίες αυτές είναι όμοιοι (Pfeiffer et al., 1983; Cohen et al., 1986). Το παρατεταμένο σκοτάδι προάγει την παραγωγή τοξικών ριζών ΌΗ σε φυμάτια από φασόλι, που είναι μια άμεση ένδειξη οξειδωτικής καταπόνησης (Becana and Klucas, 1992). Καθώς τα θειολο-



τριπεπίδια αποτελούν σημαντικές αντιοξειδωτικές ουσίες για τα φυμάτια (Frendo et al., 2013; Becana et al., 2010), η αύξηση των επιπέδων της ομογλουταθειόνης πιθανόν να εξυπηρετεί την εξουδετέρωση τέτοιων κυτταροτοξικών ουσιών.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ευκρινώς ότι στη συμβίωση του *L. jaronicus* με το *M. loti*, τα φυμάτια δεν αποτελούν μόνο την κύρια θέση αφομοίωσης αζώτου για το φυτό, αλλά είναι και μία κύρια θέση αφομοίωσης θείου και βιοσύνθεσης θειολών. Η ισχυρή αφομοίωση θείου στα φυμάτια είναι άρρηκτα συνδεδεμένη τόσο με τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση όσο και με την παροχή φωτοσυνθετικού άνθρακα. Επιπλέον, προτείνεται ότι τα φυμάτια αντιπροσωπεύουν μία σημαντική πηγή αφομοιωμένου θείου για τα μη-συμβιωτικά όργανα και διεγείρουν ολικό αναπρογραμματισμό της κατανομής και του μεταβολισμού του θείου σε ολόκληρο το φυτό κατά την εγκαθίδρυση μίας ενεργής συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης. Η επίδραση των φυματίων στην οικονομία του θείου ολόκληρου του φυτού καταστέλλεται κατά την απουσία μιας ενεργής συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης από τα φυμάτια. Υπό αυτές τις συνθήκες το φυτό υποχρεώνεται να επιστρέψει και πάλι στα πρότυπα αφομοίωσης αζώτου και θείου που παρατηρούνται στη μη συμβιωτική τους κατάσταση. Μελλοντικά ενδιαφέρον θα παρουσίαζε η ποσοτικοποίηση της συνεισφοράς των φυματίων στην οικονομία θείου του φυτού. Επιπλέον, η ακριβής συνεισφορά των ριζοβίων στη θειούχο θρέψη του φυτού αποτελεί ένα πολύ ενδιαφέρον θέμα για μελλοντική μελέτη.

#### **4.2 Η συμβιωτική αζωτοδέσμευση επιφέρει σημαντικές αλλαγές στο μεταβόλωμα του *L. jaronicus***

Η μεταβολομική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη υποδεικνύει ότι η επαγωγή της βιοσύνθεσης αμινοξέων που παρατηρείται στα φυμάτια (Colebatch et al., 2004) συνδέεται άρρηκτα με την ενεργή συμβιωτική αζωτοδέσμευση, καθώς τα επίπεδα των περισσότερων αμινοξέων, συμπεριλαμβανομένων της ασπαραγίνης, του ασπαρτικού, της αλανίνης και της γλουταμίνης, εμφανίζονται σημαντικά χαμηλότερα και στους δύο τύπους μη αζωτοδεσμευτικών *fix<sup>-</sup>* φυματίων σε σύγκριση με τα πλήρως λειτουργικά φυμάτια. Εξάλλου, τα κυριότερα αμινοξέα που εξάγονται από τα φυμάτια των περισσότερων ψυχανθών είναι η ασπαραγίνη (Asn), η γλουταμίνη (Gln), το ασπαρτικό οξύ (Asp), το γλουταμινικό οξύ (Glu) και η αλανίνη (Ala) (Vance, 2008). Πειράματα σήμανσης στο μπιζέλι, τη σόγια και το λούπινο έδειξαν ότι υπό συνθήκες αζωτοδέσμευσης τα βακτηριοειδή εξάγουν αμινοξέα όπως Ala ή Asp (Kretovich et al., 1986; Appels and Haaker, 1991; Rosendahl et al., 1992; Waters et al., 1998; Allaway et al., 2000). Επιπλέον, η σημασία συγκεκριμένων αμινοξέων στη συμβιωτική αζωτοδέσμευση αποδεικνύεται και από πρόσφατα

αποτελέσματα που δείχνουν ότι αμινοξέα, όπως το γλουταμινικό οξύ ή παράγωγά του παράγονται από το φυτό στο βακτηριοειδές (Prell and Poole, 2006). Το βακτηριοειδές χρησιμοποιεί το γλουταμινικό για να τρανσαμινώσει το οξαλοξικό ή το πυροσταφυλικό για να παράγει ασπαρτικό οξύ ή αλανίνη, αντίστοιχα, και το ένα ή και τα δύο αυτά αμινοξέα εξάγονται. Στα ψυχανθή εύκρατων περιοχών, που συνήθως σχηματίζουν μη καθορισμένα φυμάτια, τα αρχικά προϊόντα που περιέχουν δεσμευμένο άζωτο και εξάγονται από τα φυμάτια προς το αγγειακό ρεύμα του ξυλώματος είναι τα αμίδια ασπαραγίνη και γλουταμίνη (Ta et al., 1986; Scharff et al., 2003). Για το σκοπό αυτό απαιτείται η συντονισμένη δράση της γλουταμινο-εξαρτώμενης συνθετάσης της ασπαραγίνης και της αμινοτρανσφοράς του ασπαρτικού οξέος (Gregerson et al., 1994; Mett et al., 1996; Shi et al., 1997; White et al., 2007). Αντίθετα, στα ψυχανθή τροπικών περιοχών, τα οποία συνήθως σχηματίζουν καθορισμένα φυμάτια, το δεσμευμένο άζωτο αρχικά ενσωματώνεται στα αμινοξέα ασπαραγίνη, ασπαρτικό οξύ, γλουταμίνη και γλουταμινικό οξύ, αλλά στη συνέχεια μεταβολίζεται στα φυμάτια στις ουρείδες αλλαντοΐνη και αλλαντοϊκό οξύ, τα οποία εξάγονται και μεταφέρονται στο αγγειακό ρεύμα του ξυλώματος (Dart, 1977; Sprent, 1980; Temple et al., 1998; Goggin et al., 2003). Παρόλα αυτά, τα φυμάτια του *L. japonicus*, αν και παρουσιάζουν δομή καθορισμένου φυματίου, συνθέτουν και εξάγουν αμίδια (Vance, 2008), παρατήρηση που συμφωνεί πλήρως με τη σημαντική μείωση των επιπέδων της ασπαραγίνης και της γλουταμίνης που παρατηρήθηκε στα μη λειτουργικά φυμάτια σε σύγκριση με τα αζωτοδεσμευτικά.

Στα φυμάτια παρατηρήθηκε, επίσης, συσσώρευση συμβατών ωσμωλυτών, όπως η ονονιτόλη, η προλίνη και η πουτρεσκίνη. Παλαιότερες έρευνες έχουν δείξει ότι πολλές ενώσεις που περιλαμβάνονται στην ομάδα των συμβατών ωσμωλυτών, και συνήθως συσσωρεύονται σε φυτά που βρίσκονται σε ωσμωτικό στρες, εντοπίζονται σε υψηλά επίπεδα στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια σε σύγκριση με μη συμβιωτικά όργανα (Desbrosses et al., 2005; Colebatch et al., 2004). Προκειμένου να ερμηνευτεί η συσσώρευση ωσμοπροστατευτικών ενώσεων στα φυμάτια έχει προταθεί ότι αυτή σχετίζεται με την προσαρμογή των κυττάρων του φυματίου σε συνθήκες ωσμωτικού στρες. Επιπλέον, τα χαμηλά επίπεδα ελεύθερου οξυγόνου μπορεί να ευθύνονται για τη συσσώρευση τέτοιων ωσμοπροστατευτικών ενώσεων, καθώς μπορεί να προκαλέσουν ωσμωτικό στρες στα φυτικά κύτταρα μέσω της επίδρασής τους στην πρόσληψη και την απώλεια νερού (Nuccio et al., 1999). Τα επίπεδα της ονονιτόλης παραμένουν σταθερά μεταξύ λειτουργικών και μη λειτουργικών φυματίων, ενισχύοντας το πιθανό ρόλο της ένωσης αυτής στην ωσμωρύθμιση του φυματίου και όχι στην ίδια τη διαδικασία της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης. Αντίθετα, η προλίνη και η που-

τρεσκίνη εμφανίζονται σε σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα και στους δύο τύπους των *fix* φυματίων σε σύγκριση με τα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια (Πίνακας 3.2) υποδεικνύοντας ότι πιθανά σχετίζονται κυρίως με τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση παρά με την ωσμωρύθμιση. Εξάλλου, γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της προλίνης και των πολυαμινών επάγονται κατά το σχηματισμό του φυματίου, γεγονός που εξηγεί τη συσσώρευση αυτών των ενώσεων (Colebatch et al., 2004; Flemetakis et al., 2004). Επιπλέον, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι το άζωτο της πουτρεσκίνης που βιοσυντίθεται στα φυμάτια πιθανόν να προέρχεται από τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση. Στα φυτικά κύτταρα, η πουτρεσκίνη μπορεί να συντεθεί είτε κατευθείαν από την ορνιθίνη μέσω της δράσης της αποκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης (Kwak and Lee 2001) είτε εμμέσως από την αργινίνη με τη δράση της αποκαρβοξυλάσης της αργινίνης (Chang et al. 2000). Στο *L. jaronicus* παρατηρείται συσσώρευση των μεταγραφημάτων τόσο της αποκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης όσο και της αποκαρβοξυλάσης της αργινίνης κατά το σχηματισμό του φυματίου (Flemetakis et al. 2004). Ωστόσο, ο ακριβής ρόλος των πολυαμινών στο σχηματισμό του φυματίου και τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση παραμένει άγνωστος.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι το μηλικό και το ηλεκτρικό οξύ εμφανίζουν χαμηλότερα επίπεδα στα *fix* φυμάτια που σχηματίστηκαν από το μεταλλαγμένο στέλεχος *ΔnifA* που οποίο αποτυγχάνει να διαφοροποιηθεί σε βακτηριοειδές (Πίνακας 3.2). Τα δικαρβοξυλικά και κυρίως το μηλικό θεωρούνται ως η κύρια πηγή άνθρακα που παρέχεται από το φυτά στα βακτηριοειδή για τις ανάγκες της αζωτοδέσμευσης, το οποίο τροφοδοτεί τον κύκλο TCA (Udvardi and Poole, 2013). Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι τα γονίδια που ευθύνονται για τη μεταφορά των δικαρβοξυλικών είναι απαραίτητα για τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση (Mullely et al., 2010, Zhang et al., 2012). Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υποδεικνύουν ότι η συσσώρευση και πιθανώς η μεταφορά των δικαρβοξυλικών από το φυτικό κύτταρο στα συμβιώσωμα είναι πιθανό να ελέγχεται από τη διαφοροποίηση του ριζοβίου σε βακτηριοειδές με σκοπό τον περιορισμό της ανάπτυξης μη διαφοροποιημένων ριζοβίων. Είναι γνωστό ότι τα ψυχανθή έχουν αναπτύξει στρατηγικές για να ελέγχουν την ανάπτυξη των ριζοβίων εντός του φυματίου (Prell et al, 2010; Prell et al., 2009; Ferguson et al., 2010). Επιπλέον, ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι τα οργανικά οξέα, κιτραμηλικό, οξαλικό, γλυκονικό, σικιμικό και μηλονικό οξύ, εμφανίζουν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα και στους δύο τύπους μη λειτουργικών φυματίων σε σύγκριση με τα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια. Έτσι, φαίνεται ότι η επαγωγή του μεταβολισμού των δικαρβοξυλικών και του μηλονικού στα βακτηριοειδή (Udvardi and Poole, 2013) συνδέεται άρρηκτα με τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν, επίσης, ότι ο σχηματισμός ενός νέου υπόγειου φυτικού οργάνου, ο μεταβολισμός του οποίου διαφοροποιείται σημαντικά από το υπόλοιπο ριζικό σύστημα, φαίνεται πως οδηγεί σε σημαντική διαφοροποίηση πολλών πτυχών του πρωτογενούς και δευτερογενούς μεταβολισμού ολόκληρου του φυτού, καθώς παρουσιάζονται σημαντικές διαφορές στα επίπεδα μεταβολιτών και στα μη συμβιωτικά όργανα (Πίνακες 3.3, 3.4 και 3.5). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι περισσότερες αλλαγές που παρατηρούνται στο μεταβολομικό πρότυπο μη συμβιωτικών οργάνων συνδέονται με την ενεργή συμβιωτική αζωτοδέσμευση, καθώς τα επίπεδα μεταβολιτών των μη συμβιωτικών οργάνων μη εμβολιασμένων φυτών είναι παρόμοια με αυτά που παρατηρείται σε φυτά που φέρουν μη λειτουργικά φυμάτια (Πίνακες A.15, A.16 και A.17). Η συμβιωτική αζωτοδέσμευση επηρεάζει τα επίπεδα αμινοξέων στις ρίζες των φυτών, αφού τα περισσότερα αμινοξέα, και συγκεκριμένα η σερίνη, το ασπαρτικό, η αλανίνη, η γλουταμίνη, η ιστιδίνη, η ομοσερίνη, η λυσίνη, η θρεονίνη και η βαλίνη, εμφανίζουν παρόμοια επίπεδα στις ρίζες τόσο των μη εμβολιασμένων όσο και των μη αζωτοδεσμευτικών φυτών, και στις δύο περιπτώσεις χαμηλότερα από αυτά των αζωτοδεσμευτικών φυτών (Πίνακας A.15). Ορισμένα οργανικά οξέα που παίζουν σημαντικό ρόλο ως πρόδρομες ενώσεις των αμινοξέων και οι πολυαμίνες, πουτρεσκίνη και σπερμιδίνη εμφανίζουν παρόμοια επίπεδα στα μη συμβιωτικά όργανα μη εμβολιασμένων φυτών και στα αντίστοιχα όργανα φυτών που έχουν εμβολιαστεί με το *fix<sup>-</sup>* μεταλλαγμένο στέλεχος *ΔnifH*, (Πίνακες A.15, A.16 και A.17). Η παρατήρηση αυτή ίσως να σχετίζεται με τη θέση όπου λαμβάνει χώρα η αφομοίωσή του αζώτου. Πιο συγκεκριμένα, στα μη εμβολιασμένα φυτά *L. jaronicus*, η αφομοίωση του αζώτου στα αμινοξέα πραγματοποιείται στα φύλλα, ενώ στα φυτά που εμβολιάστηκαν με το ριζόβιο άγριου τύπου τα φυμάτια αποτελούν την κύρια θέση αφομοίωσης του αζώτου με τη μορφή της αζωτοδέσμευσης. Το γεγονός ότι το μεταβολομικό πρότυπο των μη συμβιωτικών οργάνων των φυτών που φέρουν μη λειτουργικά φυμάτια παρουσιάζει ομοιότητες με αυτό των μη εμβολιασμένων φυτών υποδεικνύει ότι η θέση αφομοίωσης του αζώτου είναι και πάλι τα φύλλα και ότι οι αλλαγές στο μεταβολομικό πρότυπο μη συμβιωτικών οργάνων των αζωτοδεσμευτικών φυτών οφείλεται κατά κύριο λόγο στην ενεργή αζωτοδέσμευση και όχι στο σχηματισμό του φυματίου.

Τα επίπεδα της μαννιτόλης στις ρίζες και τα φύλλα των *fix<sup>-</sup>* φυτών είναι σημαντικά χαμηλότερα από τα αντίστοιχα επίπεδα που παρατηρούνται στα αζωτοδεσμευτικά φυτά, ενώ στα μη συμβιωτικά όργανα των μη εμβολιασμένων φυτών τα επίπεδα της μαννιτόλης είναι σχεδόν μηδενικά. Αυτό αποτελεί μια ένδειξη ότι τα βακτηριοειδή ίσως να είναι υπεύθυνα για τη συσσώρευση της μαννιτόλης στα μη συμβιωτικά όργανα των εμβολιασμένων φυτών και

μάλιστα τα επίπεδά της εξαρτώνται από την ενεργή συμβιωτική αζωτοδέσμευση. Επιπλέον, η μελέτη του πρωτεώματος του *L. jaronicus* ταυτοποιήθηκε ένας πιθανός μεταφορέας μαννιτόλης στην περιβακτηριακή μεμβράνη (Wienkoop and Saalbach, 2003), γεγονός που υποδεικνύει ότι οι πολυόλες μπορούν να μεταφέρονται μεταξύ του φυτού και των βακτηριοειδών. Η υπόθεση ότι η μαννιτόλη προέρχεται από τα βακτηριοειδή ενισχύεται και από μια πρόσφατη μελέτη στην οποία φυμάτια φυτών *L. jaronicus* που στερούνται φωτοσυνθετικού άνθρακα εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα μαννιτόλης από τα φυμάτια φυτών που αναπτύσσονταν σε κανονική φωτοπερίοδο, παρότι τα φυτικά γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της μαννιτόλης καταστέλλονται και τα φυτικά γονίδια που εμπλέκονται στον καταβολισμό της επάγονται (Tsikou et al., 2013).

Τέλος, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα πολύ υψηλά επίπεδα μαννιτόλης που απαντώνται στα όργανα του υπέργειου τμήματος φυτών *L. jaronicus* που εμβολιάστηκαν με το *fix<sup>-</sup>* μεταλλαγμένο στέλεχος *ΔnifH* σε σύγκριση με τα αντίστοιχα όργανα τόσο μη εμβολιασμένων όσο και αζωτοδεσμευτικών φυτών. Η μαννιτόλη είναι μία ένωση πολύ πλούσια σε άνθρακα, επομένως, η παρατηρούμενη αυτή αύξηση στα επίπεδά της πιθανόν να υποδεικνύει την μεταφορά της από τα μη λειτουργικά φυμάτια στο υπέργειο τμήμα των *fix<sup>-</sup>* φυτών με σκοπό τη διατήρηση της ισορροπίας του λόγου C/N. Τα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια επαναδεσμεύουν διοξείδιο του άνθρακα παρέχοντάς το αφενός στους σκελετούς άνθρακα που απαιτούνται για τη δέσμευση και αφομοίωση του αζώτου και αφετέρου μειώνοντας τις απώλειες άνθρακα κατά τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση και συνεισφέροντας στην ανακύκλωση του διοξειδίου του άνθρακα μέσω της φωτοσύνθεσης C<sub>4</sub> τύπου (Fotelli et al., 2011). Ο μηχανισμός αυτός συμβάλλει στη διατήρηση της ομοιόστασης του άνθρακα σε ολόκληρο το φυτό. Στα φυτά όμως που φέρουν μη λειτουργικά φυμάτια η ανακύκλωση του άνθρακα ίσως να επιτυγχάνεται με τη μεταφορά μαννιτόλης από τα *fix<sup>-</sup>* φυμάτια στο υπέργειο τμήμα του φυτού. Εξάλλου έχει βρεθεί ότι η μαννιτόλη μεταφέρεται σε μεγάλες αποστάσεις, καθώς απαντάται στον ανιόν χυμό φυτών σόγιας (Krishnan et al., 2011).

### 4.3 Συμπεράσματα

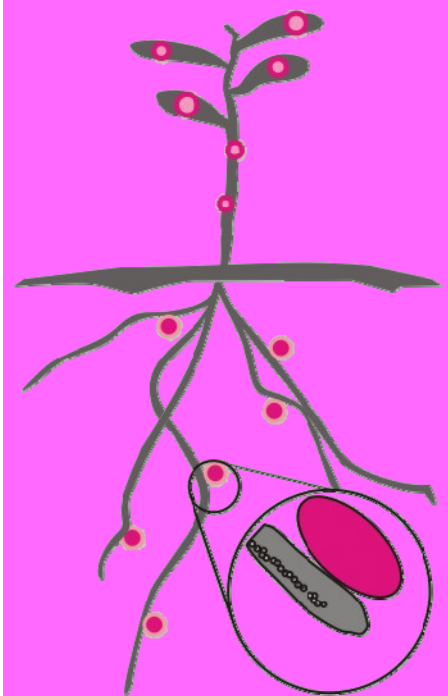
Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι η συμβιωτική αζωτοδέσμευση επιφέρει δραματικές αλλαγές στο μεταβολισμό του θείου, του αζώτου και του άνθρακα σε επίπεδο ολόκληρου του φυτού. Τα φυμάτια δεν αποτελούν μόνο την κύρια θέση αφομοίωσης του αζώτου για το φυτό, αλλά αντιπροσωπεύουν και μία σημαντική θέση αφομοίωσης θείου και βιοσύνθεσης θειολών. Επιπλέον, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι τα φυμάτια πιθανόν να αποτελούν μια σημαντική πηγή αφομοιωμένου θείου για τα υπόλοιπα όργανα του φυτού. Επίσης, το φυμάτιο συνεισφέρει στη διατήρηση

της ομοίωσης του φυτού ως προς την αναλογία C/N. Επομένως, η παρουσία αζωτοδεσμευτικών φυματίων οδηγεί στον αναπρογραμματισμό του μεταβολισμού του θείου, του αζώτου και του άνθρακα σε μεταγραφικό και μεταβολομικό επίπεδο, ενώ η ύπαρξη μη λειτουργικών φυματίων οδηγεί το φυτό να επαναφέρει το μεταβολισμό του στο μη-συμβιωτικό πρότυπο. Μελλοντική έρευνα χρησιμοποιώντας φυτικά και ριζοβιακά μεταλλάγματα θα βοηθήσει να αποσαφηνιστεί η σχετική συνεισφορά των ριζοβιακών και των φυτικών κυττάρων στο μεταβολισμό του θείου, του άνθρακα και του αζώτου και την ομοίωση τους σε επίπεδο ολόκληρου του φυτού.

Παράρτημα

Επιπρόσθετα  
αποτελέσματα

A



Πίνακας Α.1: Ζεύγη εξειδικευμένων εκκινητών.

Σύμβολο εκκινητή	Εκκινητής 1 (5'-3')	Εκκινητής 2 (5'-3')
<b>Ζεύγη εξειδικευμένων qRT-PCR εκκινητών</b>		
<i>Sst1</i>	TTTTGGTAAACCCAAGGCTGG	CCTTCACTGCATCGTCCAATG
<i>LjSultr3.1a</i>	GCCAAGGACATTTGTTCAAGGA	GGAACATGGTGTGCATTTGGAT
<i>LjSultr3.1b</i>	TTGGTCAATCCTGGATGTGAGG	CCATTTCCCATATCCTTTTGG
<i>LjSultr3.3a</i>	GTGAGCGCCATTGACACAAGT	CCAACACAAGCTCAACACCCTT
<i>LjSultr3.3b</i>	CTTTTTCTGATGCCGTTGTTCC	GCTGTGACTATGATTGCACCCA
<i>LjSultr3.4a</i>	GCCTGCTGTGCTCCTTCTTT	CGCGATTCCAAGGCCTAAA
<i>LjSultr1.1</i>	GCGAATTTCCAGCATACAGTC	CATGGATGCCACTTGTGTCAAT
<i>LjSultr1.3</i>	AGAGAGGTTCAAGCTCGTTCTGG	GATGTGTGGAGCTTGCTATCA
<i>Atps</i>	TTCAAGGTTGCCGCATATGAC	ATGAAGACGAAGTCTGAGGCC
<i>Apr1</i>	GGCGTTTGTGAATGCCTAAGA	CCGAAGTGTGACCAAGGAACAT
<i>Apr2</i>	ATTTGGCAGAGAAGCTAGCAGG	TCTCCATCCGCTCTAAATTTCC
<i>Sir</i>	CCACAACCTTCAGCTTTTGGCT	CTTTGGCTGATTCCTCCATTGCT
<i>Sat1</i>	TGCTATGATAGCTGCTGGCTCC	GGTATTCCTGCAGCAATGCTGT
<i>Sat2</i>	GCTCGGTGGTTTTGATCGAT	TGCTTAGACGGCTTCTCCTTG
<i>Sat3</i>	GAGACCCTGCTTGCAATTAGCTATG	CAATTTATGAGCCACCCTATGAGC
<i>Sat4</i>	ATCAAGGATGTGCCTCCAAGG	CCATGGTATGGCTTGAATCTT
<i>Sat5</i>	GGCATCGTGATCGGTGAAA	GGTGACCGACTGCAGAATAGAA
<i>Oastl1</i>	CCGCTGCCATTAAGATAGCAA	GGTACCTCTCACCAAAGCTTGG
<i>Oastl2</i>	TGCCAACCCAAAGGTCCATTA	TCAACCTTCCATTGGAGCTCT
<i>Oastl3</i>	TTGCGTTGTATTCCCAAGC	TGGCTCTGGTTGCATATTCTCA
<i>Oastl4</i>	GGCATGAAGCTGAACAAATGAC	GAGCTTGCTTACGAGTACTTG
<i>Oastl5</i>	AGTTGCAGCACTCAGATTGGCT	CGAAGCTCTTGAACAGGACAG
<i>Oastl6</i>	GCGACAGTGAATGAGACACCT	TGCTTTTGGTGTCAACCCAAG
<i>γecs1</i>	CCAAGGATGGCTTGGA AAAA	AACCACCTCCGCTACCTCATT
<i>γecs2</i>	GATTGCTGCAGGATGTTGCTG	AGCGTCTTGTCCAAGCCAT
<i>Gshs</i>	CAATATTTACGGCAACGCTGTG	TCTTGAGAACCTGCTTGTCTGC
<i>Hgshs</i>	TCAGAAGAAGACGCAGCGTACA	GCATCAAAATTGCAGCGGTAG
<i>Ubq</i>	TTCACCTTGTGCTCCGCTTTC	ACCACCAGCACACACAGACAATCC
<b>Ζεύγη εξειδικευμένων εκκινητών για τον υποκυταρικό εντοπισμό πρωτεϊνών</b>		
<b>GFP-APR1</b>	AAACTAGTATGGCTCTCGCTGTCACTTG	AAAAGTCGACCTCTTAAGGCATTACAAAACGC
<b>Ζεύγη εξειδικευμένων εκκινητών τον <i>in situ</i> εντοπισμό μεταγραφημάτων</b>		
<b>pBSK-APR1</b>	TTTTAAGCTTGGGTTATCAAGAAGTTCTTTG	TTTCTCGAGTAAGCTGAGGATCTTATTTTTG
<b>pBSK-APR2</b>	TTTTAAGCTTTGGTCAGCTGAGCCTGAGTATT	TTTCTCGAGGACAAAACAAAACCGACACTAA



**Πίνακας Α.2:** Αλλαγές στο μεταγραφικό πρότυπο γονιδίων του *L. japonicus* που εμπλέκονται στην πρόσληψη και το μεταβολισμό των θεικών κατά την ανάπτυξη φυματίων και στις ρίζες φυτών που εμβολιάστηκαν με το ριζόβιο *M. loti* wt.

Τα επίπεδα έκφρασης κανονικοποιήθηκαν με βάση τα μεταγραφήματα του σταθερά εκφραζόμενου γονιδίου της ουβικτίνης. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τρεις ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις. Οι λόγοι των σχετικών επιπέδων έκφρασης παρουσιάζονται και οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P < 0.05$ ) επισημαίνονται με έντονη γραφή. N14, N21 και N28: φυμάτια 14, 21 και 28 ημερών, αντίστοιχα. R: ρίζες αζωτοδεσμευτικών φυτών *L. japonicus*.

Γονίδιο	N14/R	N21/R	N28/R
<i>Sst1</i>	<b>26.995</b>	<b>28.712</b>	<b>30.561</b>
<i>LjSultr3.1a</i>	0.609	0.526	0.468
<i>LjSultr3.1b</i>	<b>8.375</b>	<b>6.032</b>	<b>3.503</b>
<i>LjSultr3.3a</i>	1.845	1.164	<b>1.680</b>
<i>LjSultr3.3b</i>	<b>2.052</b>	<b>1.328</b>	<b>1.455</b>
<i>LjSultr3.4a</i>	<b>1.936</b>	<b>0.365</b>	<b>0.155</b>
<i>LjSultr1.1</i>	<b>3.014</b>	<b>1.431</b>	<b>1.372</b>
<i>LjSultr1.3</i>	0.087	0.130	0.043
<i>Atps</i>	<b>0.386</b>	<b>0.382</b>	<b>0.367</b>
<i>Apr1</i>	<b>0.560</b>	<b>0.284</b>	<b>0.251</b>
<i>Apr2</i>	<b>3.097</b>	0.493	1.083
<i>Sir</i>	<b>1.471</b>	0.814	0.835
<i>Sat1</i>	1.398	1.426	1.174
<i>Sat2</i>	<b>0.284</b>	<b>0.502</b>	<b>0.266</b>
<i>Sat3</i>	<b>2.425</b>	<b>5.399</b>	<b>5.047</b>
<i>Sat4</i>	<b>7.390</b>	<b>3.839</b>	<b>4.136</b>
<i>Sat5</i>	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Oast1</i>	0.749	1.066	1.167
<i>Oast2</i>	<b>1.518</b>	<b>2.002</b>	<b>1.897</b>
<i>Oast3</i>	<b>2.934</b>	1.242	0.857
<i>Oast4</i>	<b>2.866</b>	<b>3.543</b>	<b>2.989</b>
<i>Oast5</i>	1.295	<b>1.810</b>	<b>1.527</b>
<i>Oast6</i>	<b>3.267</b>	<b>2.049</b>	1.184
<i>γecs1</i>	0.876	<b>0.633</b>	<b>0.569</b>
<i>γecs2</i>	<b>4.959</b>	<b>8.808</b>	<b>10.066</b>
<i>Gshs</i>	<b>4.881</b>	<b>3.947</b>	<b>4.881</b>
<i>Hgshs</i>	0.959	<b>0.582</b>	<b>0.833</b>

**Πίνακας Α.3:** Αλλαγές στο μεταγραφικό πρότυπο γονιδίων του *L. japonicus* που εμπλέκονται στην πρόσληψη και το μεταβολισμό των θεικών κατά την ανάπτυξη φυματίων και στους βλαστούς φυτών που εμβολιάστηκαν με το ριζόβιο *M. loti* wt.

Τα επίπεδα έκφρασης κανονικοποιήθηκαν με βάση τα μεταγραφήματα του σταθερά εκφραζόμενου γονιδίου της ουβικτινής. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τρεις ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις. Οι λόγοι των σχετικών επιπέδων έκφρασης παρουσιάζονται και οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P < 0.05$ ) επισημαίνονται με έντονη γραφή. N14, N21 και N28: φυμάτια 14, 21 και 28 ημερών, αντίστοιχα. S: βλαστοί αζωτοδεσμευτικών φυτών *L. japonicus*.

Γονίδιο	N14/S	N21/S	N28/S
<i>Sst1</i>	<b>94.236</b>	<b>100.232</b>	<b>106.686</b>
<i>LjSultr3.1a</i>	<b>0.016</b>	<b>0.014</b>	<b>0.012</b>
<i>LjSultr3.1b</i>	<b>5.695</b>	<b>4.102</b>	<b>2.382</b>
<i>LjSultr3.3a</i>	0.540	0.341	0.492
<i>LjSultr3.3b</i>	0.835	0.540	0.592
<i>LjSultr3.4a</i>	<b>3.636</b>	<b>0.685</b>	<b>0.291</b>
<i>LjSultr1.1</i>	<b>3624.216</b>	<b>1720.753</b>	<b>1649.850</b>
<i>LjSultr1.3</i>	<b>0.031</b>	<b>0.047</b>	<b>0.015</b>
<i>Atps</i>	<b>0.589</b>	<b>0.583</b>	<b>0.560</b>
<i>Apr1</i>	1.195	<b>0.606</b>	<b>0.535</b>
<i>Apr2</i>	<b>9.453</b>	1.505	<b>3.307</b>
<i>Sir</i>	<b>1.926</b>	1.066	1.093
<i>Sat1</i>	<b>4.564</b>	<b>4.656</b>	<b>3.833</b>
<i>Sat2</i>	<b>0.448</b>	0.790	<b>0.419</b>
<i>Sat3</i>	<b>4.909</b>	<b>10.929</b>	<b>10.216</b>
<i>Sat4</i>	<b>3.230</b>	<b>1.678</b>	<b>1.807</b>
<i>Sat5</i>	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Oastl1</i>	<b>2.083</b>	<b>2.966</b>	<b>3.247</b>
<i>Oastl2</i>	<b>10.757</b>	<b>14.183</b>	<b>13.438</b>
<i>Oastl3</i>	<b>3.791</b>	<b>1.604</b>	1.107
<i>Oastl4</i>	<b>21.351</b>	<b>26.393</b>	<b>22.266</b>
<i>Oastl5</i>	<b>3.805</b>	<b>5.319</b>	<b>4.488</b>
<i>Oastl6</i>	<b>9.349</b>	<b>5.864</b>	<b>3.388</b>
<i>γecs1</i>	1.500	1.084	0.975
<i>γecs2</i>	1.169	2.076	2.372
<i>Gshs</i>	<b>6.764</b>	<b>5.470</b>	<b>6.764</b>
<i>Hgshs</i>	1.579	0.959	1.373

**Πίνακας A.4:** Αλλαγές στο μεταγραφικό πρότυπο γονιδίων του *L. jaronicus* που εμπλέκονται στην πρόσληψη και το μεταβολισμό των θεικών κατά την ανάπτυξη φυματίων και στα φύλλα φυτών που εμβολιάστηκαν με το ριζόβιο *M. loti* wt.

Τα επίπεδα έκφρασης κανονικοποιήθηκαν με βάση τα μεταγραφήματα του σταθερά εκφραζόμενου γονιδίου της ουβικτίνης. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τρεις ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις. Οι λόγοι των σχετικών επιπέδων έκφρασης παρουσιάζονται και οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P < 0.05$ ) επισημαίνονται με έντονη γραφή. N14, N21 και N28: φυμάτια 14, 21 και 28 ημερών, αντίστοιχα. L: φύλλα αζωτοδεσμευτικών φυτών *L. jaronicus*.

Γονίδιο	N14/L	N21/L	N28/L
<i>Sst1</i>	<b>1262.376</b>	<b>1342.690</b>	<b>1429.154</b>
<i>LjSultr3.1a</i>	<b>0.150</b>	<b>0.130</b>	<b>0.115</b>
<i>LjSultr3.1b</i>	<b>5.009</b>	<b>3.607</b>	<b>2.095</b>
<i>LjSultr3.3a</i>	<b>0.521</b>	<b>0.329</b>	<b>0.475</b>
<i>LjSultr3.3b</i>	0.758	<b>0.490</b>	<b>0.537</b>
<i>LjSultr3.4a</i>	<b>114.579</b>	<b>21.585</b>	<b>9.158</b>
<i>LjSultr1.1</i>	<b>2341.190</b>	<b>1111.581</b>	<b>1065.779</b>
<i>LjSultr1.3</i>	1.174	1.749	0.579
<i>Atps</i>	<b>0.596</b>	<b>0.590</b>	<b>0.566</b>
<i>Apr1</i>	0.769	0.390	0.345
<i>Apr2</i>	<b>4.586</b>	0.730	1.604
<i>Sir</i>	<b>2.626</b>	<b>1.454</b>	<b>1.491</b>
<i>Sat1</i>	<b>3.894</b>	<b>3.973</b>	<b>3.270</b>
<i>Sat2</i>	<b>0.254</b>	<b>0.449</b>	<b>0.238</b>
<i>Sat3</i>	<b>5.364</b>	<b>11.942</b>	<b>11.163</b>
<i>Sat4</i>	<b>4.018</b>	<b>2.088</b>	<b>2.249</b>
<i>Sat5</i>	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Oastl1</i>	<b>3.940</b>	<b>5.609</b>	<b>6.141</b>
<i>Oastl2</i>	<b>6.398</b>	<b>8.435</b>	<b>7.992</b>
<i>Oastl3</i>	<b>1.497</b>	<b>0.633</b>	<b>0.437</b>
<i>Oastl4</i>	<b>5.023</b>	<b>6.209</b>	<b>5.238</b>
<i>Oastl5</i>	<b>2.010</b>	<b>2.810</b>	<b>2.370</b>
<i>Oastl6</i>	<b>6.665</b>	<b>4.181</b>	2.415
<i>γecs1</i>	2.386	1.724	1.551
<i>γecs2</i>	1.958	3.478	3.975
<i>Gshs</i>	<b>7.628</b>	<b>6.169</b>	<b>7.628</b>
<i>Hgshs</i>	<b>2.990</b>	<b>1.816</b>	<b>2.599</b>

**Πίνακας Α.5:** Αλλαγές στο μεταγραφικό πρότυπο γονιδίων του *L. jarrowicus* που εμπλέκονται στην πρόσληψη και μεταβολισμό των θεικών κατά την ανάπτυξη φυματίων που σχηματίστηκαν από το ριζόβιο *M. loti* wt.

Τα επίπεδα έκφρασης κανονικοποιήθηκαν με βάση τα μεταγραφήματα του σταθερά εκφραζόμενου γονιδίου της ουβικτινής. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τρεις ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις. Παρουσιάζονται οι λόγοι των σχετικών επιπέδων έκφρασης και οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P < 0.05$ ) επισημαίνονται με έντονη γραφή. N14, N21 και N28: φυμάτια 14, 21 και 28 ημερών, αντίστοιχα.

Γονίδιο	N14/N21	N14/N28	N21/N28
<i>Sst1</i>	0.940	0.883	0.939
<i>LjSultr3.1a</i>	1.157	1.300	1.124
<i>LjSultr3.1b</i>	1.388	<b>2.391</b>	<b>1.722</b>
<i>LjSultr3.3a</i>	1.585	1.098	<b>0.693</b>
<i>LjSultr3.3b</i>	1.546	1.410	0.913
<i>LjSultr3.4a</i>	<b>5.308</b>	<b>12.512</b>	<b>2.357</b>
<i>LjSultr1.1</i>	<b>2.106</b>	<b>2.197</b>	1.043
<i>LjSultr1.3</i>	0.671	2.028	3.022
<i>Atps</i>	1.010	1.052	1.042
<i>Apr1</i>	<b>1.971</b>	<b>2.232</b>	1.132
<i>Apr2</i>	<b>6.282</b>	2.859	<b>0.455</b>
<i>Sir</i>	<b>1.807</b>	1.762	0.975
<i>Sat1</i>	0.980	1.191	1.215
<i>Sat2</i>	0.566	1.068	1.885
<i>Sat3</i>	<b>0.449</b>	<b>0.480</b>	1.070
<i>Sat4</i>	1.925	1.787	0.928
<i>Sat5</i>	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Oast1</i>	0.703	0.642	0.913
<i>Oast2</i>	0.758	0.801	1.055
<i>Oast3</i>	<b>2.363</b>	<b>3.423</b>	1.449
<i>Oast4</i>	0.809	0.959	1.185
<i>Oast5</i>	0.715	0.848	1.185
<i>Oast6</i>	1.594	2.760	1.731
<i>γecs1</i>	1.384	1.538	1.112
<i>γecs2</i>	0.563	0.493	0.875
<i>Gshs</i>	1.236	1.000	0.809
<i>Hgshs</i>	<b>1.647</b>	1.150	<b>0.698</b>

**Πίνακας A.6:** Αλλαγές στο μεταγραφικό πρότυπο γονιδίων του *L. jaramenicus* που εμπλέκονται στην πρόσληψη και μεταβολισμό των θεικών κατά την ανάπτυξη αζωτοδεσμευτικών και μη λειτουργικών φυματίων.

Τα επίπεδα έκφρασης κανονικοποιήθηκαν με βάση τα μεταγραφήματα του σταθερά εκφραζόμενου γονιδίου της ουβικτίνης. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τρεις ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις. Οι λόγοι των σχετικών επιπέδων έκφρασης παρουσιάζονται και οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P < 0.05$ ) επισημαίνονται με έντονη γραφή. N, NA και NH: φυμάτια που σχηματίστηκαν από το αζωτοδεσμευτικό στέλεχος *M. loti* άγριου τύπου ή τα *fix* μεταλλαγμένα στελέχη *ΔnifA* και *ΔnifH*, αντίστοιχα.

Γονίδιο	NA/N	NH/N	NA/NH
<i>Sst1</i>	<b>0.125</b>	<b>0.315</b>	<b>0.398</b>
<i>LjSultr3.1a</i>	<b>0.155</b>	<b>0.226</b>	0.685
<i>LjSultr3.1b</i>	<b>0.318</b>	<b>0.426</b>	0.746
<i>LjSultr3.3a</i>	<b>0.407</b>	<b>0.526</b>	0.773
<i>LjSultr3.3b</i>	<b>0.420</b>	<b>0.437</b>	0.962
<i>LjSultr3.4a</i>	<b>0.354</b>	<b>0.296</b>	1.195
<i>LjSultr1.1</i>	<b>0.684</b>	<b>0.319</b>	<b>2.148</b>
<i>LjSultr1.3</i>	3.879	0.720	5.391
<i>Atps</i>	0.871	<b>0.515</b>	<b>1.692</b>
<i>Apr1</i>	1.271	0.386	<b>3.295</b>
<i>Apr2</i>	<b>0.593</b>	<b>0.249</b>	<b>2.377</b>
<i>Sir</i>	<b>0.297</b>	<b>0.170</b>	1.746
<i>Sat1</i>	<b>0.513</b>	<b>0.398</b>	1.289
<i>Sat2</i>	0.596	0.313	<b>1.907</b>
<i>Sat3</i>	1.411	0.723	1.951
<i>Sat4</i>	<b>0.403</b>	<b>0.603</b>	0.668
<i>Sat5</i>	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Oast1</i>	<b>0.114</b>	<b>0.141</b>	0.807
<i>Oast2</i>	<b>0.633</b>	<b>0.525</b>	1.206
<i>Oast3</i>	<b>0.461</b>	<b>0.364</b>	1.267
<i>Oast4</i>	<b>0.316</b>	<b>0.391</b>	0.809
<i>Oast5</i>	<b>0.336</b>	<b>0.299</b>	1.121
<i>Oast6</i>	<b>0.208</b>	<b>0.325</b>	0.640
<i>γecs1</i>	<b>0.391</b>	<b>0.540</b>	0.723
<i>γecs2</i>	0.250	0.009	<b>26.938</b>
<i>Gshs</i>	<b>0.562</b>	1.371	<b>0.410</b>
<i>Hgshs</i>	<b>0.363</b>	<b>0.744</b>	<b>0.488</b>

**Πίνακας Α.7:** Αλλαγές στο μεταγραφικό πρότυπο γονιδίων του *L. jaronicus* που εμπλέκονται στην πρόσληψη και μεταβολισμό των θειικών στα μη-συμβιωτικά όργανα φυτών που εμβολιάστηκαν με το ριζόβιο *M. loti* wt σε σύγκριση με τα αντίστοιχα όργανα μη εμβολιασμένων φυτών.

Τα επίπεδα έκφρασης κανονικοποιήθηκαν με βάση τα μεταγραφήματα του σταθερά εκφραζόμενου γονιδίου της ουβικτινής. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τρεις ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις. Οι λόγοι των σχετικών επιπέδων έκφρασης παρουσιάζονται και οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P < 0.05$ ) επισημαίνονται με έντονη γραφή. R, S και L: ρίζες, βλαστοί και φύλλα αζωτοδεσμευτικών φυτών *L. jaronicus*, αντίστοιχα. RU, SU και LU: ρίζες, βλαστοί και φύλλα μη εμβολιασμένων φυτών, αντίστοιχα.

Γονίδιο	R/RU	S/SU	L/LU
<i>Sst1</i>	<b>1.503</b>	3.111	31.037
<i>LjSultr3.1a</i>	0.394	2.672	0.771
<i>LjSultr3.1b</i>	0.582	<b>2.569</b>	<b>3.356</b>
<i>LjSultr3.3a</i>	0.576	1.587	<b>1.695</b>
<i>LjSultr3.3b</i>	0.543	1.067	1.094
<i>LjSultr3.4a</i>	0.936	<b>1.465</b>	1.120
<i>LjSultr1.1</i>	<b>3.868</b>	1.870	0.744
<i>LjSultr1.3</i>	2.012	<b>1.854</b>	1.026
<i>Atps</i>	0.893	<b>1.552</b>	1.338
<i>Apr1</i>	<b>2.013</b>	<b>3.525</b>	3.000
<i>Apr2</i>	0.859	<b>4.736</b>	2.973
<i>Sir</i>	1.405	<b>2.793</b>	1.122
<i>Sat1</i>	<b>3.941</b>	<b>3.864</b>	<b>2.079</b>
<i>Sat2</i>	<b>2.751</b>	<b>1.957</b>	0.911
<i>Sat3</i>	1.340	2.227	<b>3.826</b>
<i>Sat4</i>	0.383	<b>1.698</b>	<b>0.454</b>
<i>Sat5</i>	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Oast1</i>	<b>3.034</b>	<b>1.933</b>	0.674
<i>Oast2</i>	<b>3.221</b>	1.218	<b>0.574</b>
<i>Oast3</i>	<b>2.229</b>	1.230	<b>0.374</b>
<i>Oast4</i>	<b>5.372</b>	<b>2.658</b>	<b>3.129</b>
<i>Oast5</i>	<b>2.184</b>	<b>2.870</b>	<b>2.268</b>
<i>Oast6</i>	<b>1.943</b>	1.709	0.594
<i>γecs1</i>	<b>1.327</b>	<b>1.683</b>	0.540
<i>γecs2</i>	0.075	0.635	<b>0.289</b>
<i>Gshs</i>	0.601	1.207	0.481
<i>Hgshs</i>	<b>1.559</b>	2.264	<b>1.994</b>

**Πίνακας Α.8:** Αλλαγές στο μεταγραφικό πρότυπο γονιδίων του *L. jaronicus* που εμπλέκονται στην πρόσληψη και μεταβολισμό των θεικών στα μη-συμβιωτικά όργανα αζωτοδεσμευτικών και *fix* φυτών.

Τα επίπεδα έκφρασης κανονικοποιήθηκαν με βάση τα μεταγραφήματα του σταθερά εκφραζόμενου γονιδίου της ουβικτίνης. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τρεις ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις. Οι λόγοι των σχετικών επιπέδων έκφρασης παρουσιάζονται και οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P < 0.05$ ) επισημαίνονται με έντονη γραφή. R, S και L: ρίζες, βλαστοί και φύλλα φυτών *L. jaronicus* που εμβολιάστηκαν με το *M. loti* άγριου τύπου, αντίστοιχα. RA, SA και LA: ρίζες, βλαστοί και φύλλα φυτών *L. jaronicus* που εμβολιάστηκαν με το μεταλλαγμένο στέλεχος *ΔnifA*, αντίστοιχα. RH, SH και LH: ρίζες, βλαστοί και φύλλα φυτών *L. jaronicus* που εμβολιάστηκαν με το μεταλλαγμένο στέλεχος *ΔnifH*, αντίστοιχα.

Γονίδιο	RA/R	RH/R	RA/RH	SA/S	SH/S	SA/SH	LA/L	LH/L	LA/LH
<i>Sst1</i>	<b>0.368</b>	1.066	<b>0.345</b>	0.664	0.459	1.446	1.783	1.640	1.087
<i>LjSultr3.1a</i>	0.785	1.174	0.669	1.339	0.799	<b>1.677</b>	1.191	0.678	1.756
<i>LjSultr3.1b</i>	0.587	1.173	0.501	0.715	1.001	0.714	<b>3.570</b>	1.460	2.444
<i>LjSultr3.3a</i>	0.772	0.847	0.912	<b>6.825</b>	<b>3.960</b>	1.724	<b>0.818</b>	<b>0.705</b>	<b>1.161</b>
<i>LjSultr3.3b</i>	0.661	0.797	0.830	<b>5.714</b>	3.173	1.801	1.413	0.896	<b>1.577</b>
<i>LjSultr3.4a</i>	0.728	0.790	0.921	<b>0.266</b>	<b>0.161</b>	1.655	1.326	0.685	1.936
<i>LjSultr1.1</i>	<b>0.562</b>	<b>0.558</b>	1.007	0.326	0.110	2.973	2.697	1.613	1.673
<i>LjSultr1.3</i>	0.518	0.993	0.522	0.667	0.520	1.283	2.496	4.796	0.520
<i>Atps</i>	0.648	0.891	0.728	1.034	<b>0.773</b>	<b>1.337</b>	0.498	0.660	0.755
<i>Apr1</i>	0.743	0.698	1.065	1.080	1.123	0.962	0.794	0.557	1.426
<i>Apr2</i>	<b>0.293</b>	<b>0.402</b>	0.729	<b>0.501</b>	<b>0.576</b>	0.869	<b>1.643</b>	0.724	<b>2.268</b>
<i>Sir</i>	0.774	0.726	1.067	<b>2.504</b>	1.648	1.519	<b>0.640</b>	<b>0.516</b>	1.241
<i>Sat1</i>	<b>0.426</b>	<b>0.448</b>	0.951	<b>2.166</b>	<b>1.807</b>	1.199	<b>0.302</b>	<b>0.355</b>	0.851
<i>Sat2</i>	<b>0.635</b>	<b>0.457</b>	1.388	1.465	0.958	1.529	<b>0.442</b>	<b>0.364</b>	1.211
<i>Sat3</i>	0.521	0.556	0.938	0.935	0.934	1.001	<b>2.142</b>	1.875	1.142
<i>Sat4</i>	0.321	0.553	0.580	<b>0.307</b>	<b>0.405</b>	0.760	0.913	<b>1.607</b>	<b>0.568</b>
<i>Sat5</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Oast11</i>	<b>0.377</b>	<b>0.331</b>	1.138	1.082	0.931	1.162	0.596	0.503	1.185
<i>Oast12</i>	1.187	1.038	1.143	<b>2.984</b>	<b>2.891</b>	1.032	<b>3.177</b>	<b>2.102</b>	1.512
<i>Oast13</i>	<b>0.499</b>	<b>0.454</b>	1.099	<b>0.392</b>	<b>0.604</b>	<b>0.649</b>	0.785	0.313	<b>2.513</b>
<i>Oast14</i>	0.945	0.997	0.949	2.462	3.136	0.785	<b>0.442</b>	<b>0.539</b>	0.820
<i>Oast15</i>	<b>0.774</b>	<b>0.364</b>	2.127	<b>2.318</b>	<b>2.104</b>	1.102	0.898	1.132	0.794
<i>Oast16</i>	1.721	0.758	2.270	1.046	0.730	1.433	0.819	1.222	0.670
<i>yeccs1</i>	<b>0.402</b>	<b>0.718</b>	0.559	<b>3.392</b>	2.152	1.576	0.854	<b>0.128</b>	6.663
<i>yeccs2</i>	0.202	17.349	<b>0.012</b>	2.947	1.268	2.324	7.225	0.043	169.610
<i>Gshs</i>	1.443	0.918	1.572	<b>4.977</b>	3.856	1.291	<b>5.506</b>	3.084	1.785
<i>Hgshs</i>	1.154	<b>0.809</b>	1.339	4.451	2.563	1.736	<b>0.463</b>	<b>0.559</b>	0.829

**Πίνακας Α.9:** Αλλαγές στο μεταγραφικό πρότυπο γονιδίων του *L. jaronicus* που εμπλέκονται στην πρόσληψη και μεταβολισμό των θεικών στα φυμάτια κατά την έλλειψη άνθρακα.

Τα επίπεδα έκφρασης κανονικοποιήθηκαν με βάση τα μεταγραφήματα του σταθερά εκφραζόμενου γονιδίου της ουβικιτίνης. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τρεις ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις. Οι λόγοι των σχετικών επιπέδων έκφρασης παρουσιάζονται και οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P < 0.05$ ) επισημαίνονται με έντονη γραφή. NPh, D24 και D72: φυμάτια φυτών εμβολιασμένων με το *M. loti* άγριου τύπου που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου, που υποβλήθηκαν σε συνθήκες σκότους για 24 και 72 ώρες, αντίστοιχα.

Γονίδιο	D24/NPh	D72/NPh	D72/D24
<i>Sst1</i>	<b>0.059</b>	<b>0.029</b>	<b>0.483</b>
<i>LjSultr3.1a</i>	<b>0.308</b>	<b>0.056</b>	<b>0.182</b>
<i>LjSultr3.1b</i>	<b>0.100</b>	<b>0.071</b>	0.707
<i>LjSultr3.3a</i>	0.388	0.287	0.739
<i>LjSultr3.3b</i>	<b>0.226</b>	<b>0.315</b>	1.393
<i>LjSultr3.4a</i>	<b>0.024</b>	<b>0.009</b>	<b>0.392</b>
<i>LjSultr1.1</i>	<b>0.020</b>	<b>0.040</b>	1.962
<i>LjSultr1.3</i>	0.882	3.144	3.564
<i>Atps</i>	<b>0.375</b>	<b>0.411</b>	1.096
<i>Apr1</i>	0.149	0.080	0.539
<i>Apr2</i>	<b>0.121</b>	<b>0.077</b>	0.639
<i>Sir</i>	<b>0.102</b>	<b>0.053</b>	0.517
<i>Sat1</i>	<b>0.161</b>	<b>0.043</b>	0.269
<i>Sat2</i>	1.492	0.715	0.479
<i>Sat3</i>	1.271	<b>2.412</b>	<b>1.897</b>
<i>Sat4</i>	<b>0.175</b>	<b>0.169</b>	0.966
<i>Sat5</i>	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Oast1</i>	<b>0.214</b>	<b>0.098</b>	0.458
<i>Oast12</i>	<b>0.722</b>	<b>0.572</b>	0.792
<i>Oast13</i>	<b>0.144</b>	<b>0.131</b>	0.906
<i>Oast14</i>	<b>0.340</b>	<b>0.077</b>	0.228
<i>Oast15</i>	<b>0.161</b>	<b>0.074</b>	0.456
<i>Oast16</i>	<b>0.338</b>	<b>0.146</b>	0.431
<i>γecs1</i>	0.472	<b>0.421</b>	0.893
<i>γecs2</i>	6.588	<b>7.887</b>	1.197
<i>Gshs</i>	0.525	1.096	2.089
<i>Hgshs</i>	<b>0.353</b>	<b>0.307</b>	0.869



**Πίνακας Α.10:** Μεταβολίτες που ανιχνεύονται σε φυμάτια *L. jaronicus* που σχηματίστηκαν είτε από το αζωτοδεσμευτικό ριζόβιο άγριου τύπου είτε από τα *fix* στελέχη *ΔnifA* ή *ΔnifH*.

Για κάθε μεταβολίτη παρουσιάζεται η αναλογία μάζας προς φορτίο ( $m/z$ ), ο χρόνος έκλουσης (RT), ο μέσος όρος (AVG) και η τυπική απόκλιση (SE) της σχετικής απόκρισης πέντε ανεξάρτητων βιολογικών επαναλήψεων σε φυμάτια που σχηματίστηκαν είτε από το *M. loti* άγριου τύπου (N), είτε από τα *fix* στελέχη *ΔnifA* (NA) ή *ΔnifH* (NH).

Μεταβολίτης	m/z	RT	N		NA		NH	
			AVG	SE	AVG	SE	AVG	SE
<b>Αμινοξέα</b>								
L-σερίνη	204	13.696	1.006	0.186	0.539	0.035	0.693	0.080
Ασπαρτικό οξύ	232	17.622	2.218	0.233	0.602	0.053	1.018	0.076
β-αλανίνη	248	15.211	0.183	0.010	0.031	0.003	0.116	0.012
Κυκλολευκίνη	156	13.545	0.316	0.180	0.161	0.099	0.339	0.228
L-ισολευκίνη	158	11.883	0.254	0.047	0.119	0.003	0.137	0.028
L-αλανίνη	116	7.235	1.434	0.269	0.325	0.045	0.438	0.040
L-ασπαραγίνη	231	21.044	6.137	0.470	0.221	0.009	0.747	0.064
L-γλουταμικό οξύ	246	19.868	3.075	0.426	1.725	0.643	4.303	1.863
L-γλουταμίνη	156	23.189	0.784	0.095	0.064	0.015	0.070	0.015
L-ιστιδίνη	154	26.191	0.303	0.067	0.001	0.001	0.005	0.005
L-ομοσερίνη	218	15.902	0.174	0.054	0.079	0.009	0.213	0.025
L-λυσίνη	317	26.244	0.771	0.181	0.082	0.023	0.198	0.061
L-μεθειονίνη	176	17.415	0.008	0.003	0.014	0.006	0.055	0.004
L-προλίνη	142	11.894	0.268	0.035	0.082	0.005	0.108	0.014
L-θρεονίνη	218	14.389	0.591	0.034	0.201	0.031	0.243	0.060
L-τρυπτοφάνη	202	31.641	0.263	0.055	0.436	0.056	1.548	0.152
L-βαλίνη	144	9.907	0.320	0.073	0.138	0.014	0.207	0.016
Τυροσίνη	218	26.534	0.330	0.046	0.389	0.031	0.808	0.066
<b>Σάκχαρα</b>								
Κυτταροβιόζη	361	37.768	0.022	0.018	0.018	0.007	0.065	0.016
D-(+) τρεχαλόζη	361	40.480	0.508	0.156	0.181	0.013	0.490	0.036
D-(+)-μελεζιτόζη	361	50.441	1.105	0.279	0.212	0.022	2.607	0.397
D-αλλόζη	319	26.077	0.046	0.020	0.040	0.024	0.308	0.121
D-γλυκόζη	319	26.164	2.349	1.082	1.428	0.061	4.120	0.371
D-λυσόζη	262	21.228	0.080	0.027	0.095	0.008	0.211	0.023
Φρουκτόζη	307	25.688	1.815	1.296	0.390	0.075	0.718	0.053
Ισομαλτόζη	361	41.763	0.341	0.087	0.432	0.016	0.824	0.289
Λακτόζη	361	37.843	n.d.	n.d.	0.036	0.019	0.096	0.030
Μαλτόζη	361	40.655	0.436	0.274	0.333	0.063	0.533	0.065
Μαλτοτριόζη	361	49.168	0.042	0.011	n.d.	n.d.	0.079	0.018
Μελιβιόζη	361	40.955	0.538	0.050	0.333	0.013	0.827	0.074
Παλατινόζη	361	41.090	0.333	0.167	0.090	0.089	0.624	0.261
Ραφινόζη	87	49.005	0.224	0.017	0.090	0.010	0.421	0.082
Σακχαρόζη	361	39.060	25.979	16.305	35.155	8.866	44.539	21.818
Ταγκατόζη	217	25.652	0.044	0.044	0.249	0.070	0.445	0.072

Μεταβολίτης	m/z	RT	N		NA		NH	
			AVG	SE	AVG	SE	AVG	SE
<b>Πολυόλες</b>								
Ακετόλη	219	18.567	n.d.	n.d.	0.283	0.042	0.052	0.022
D-μαννιτόλη	319	26.784	11.598	1.666	3.514	0.189	4.946	0.496
D-θρεϊτόλη	217	17.550	0.134	0.082	0.010	0.004	0.156	0.064
Γαλακτινόλη	204	43.854	0.117	0.058	0.104	0.016	0.645	0.097
Μυο-ινοσιτόλη	432	29.727	10.927	0.215	14.672	1.042	32.112	1.950
Παλατινιτόλη	361	41.590	0.056	0.013	0.016	0.000	0.032	0.006
Ονονιτόλη	217	27.183	37.411	10.795	16.021	2.431	31.950	6.292
Πινιτόλη	260	24.782	126.824	39.334	182.537	48.702	178.799	21.648
<b>Οργανικά οξέα</b>								
2-φουροϊκό οξύ	125	7.822	0.013	0.005	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2-υδροκινναμωμικό οξύ	293	21.673	0.085	0.035	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2-ισοπροπυλμηλικό οξύ	147	18.931	0.160	0.072	0.124	0.009	0.441	0.031
4-γουανιδουβουτυρικό οξύ	174	17.698	2.164	0.184	0.248	0.038	0.463	0.105
4-υδροκινναμωμικό οξύ	293	26.346	0.167	0.029	0.016	0.004	0.055	0.016
6-υδροξυνικοτινικό οξύ	268	18.570	0.174	0.070	0.003	0.003	0.072	0.031
α-κετογλουταρικό οξύ	147	18.875	0.147	0.078	n.d.	n.d.	0.168	0.104
Κιτραμηλικό οξύ	147	16.456	15.623	2.880	3.826	2.709	2.743	0.868
Κιτρικό οξύ	347	24.395	6.647	1.238	5.284	0.320	14.368	5.353
D-μηλικό οξύ	147	16.893	13.022	1.184	4.063	0.476	12.826	2.891
Γαλακτουρονικό οξύ	333	24.550	0.034	0.034	0.075	0.020	n.d.	n.d.
Γλυκοεπτονικό οξύ	217	31.134	5.772	3.551	0.038	0.007	0.185	0.013
Γλυκονικό οξύ	333	27.476	0.762	0.133	0.142	0.011	0.357	0.031
Γλυκερικό οξύ	189	12.940	0.228	0.058	0.071	0.005	0.352	0.039
Ιμινοδιοξικό οξύ	232	18.301	0.006	0.002	0.001	0.001	n.d.	n.d.
L-γαλακτικό οξύ	147	6.432	3.637	1.762	3.897	0.472	5.881	1.754
Λακτοβιονικό οξύ	217	40.453	0.024	0.018	0.009	0.002	0.016	0.007
Μηλειναμικό οξύ	244	17.411	0.219	0.066	0.009	0.004	0.133	0.011
Μηλεινικό οξύ	147	12.083	0.313	0.080	0.060	0.017	0.149	0.032
Μηλονικό οξύ	147	9.500	0.993	0.219	0.090	0.012	0.421	0.080
Μανδελικό οξύ	179	16.460	0.011	0.006	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Μεθυλμηλονικό οξύ	147	9.822	n.d.	n.d.	0.179	0.052	0.011	0.003
Βλεννικό οξύ	333	28.987	0.710	0.079	0.406	0.023	1.032	0.064
Οξαλικό οξύ	147	7.870	0.456	0.067	0.037	0.009	0.100	0.019
Φαινυλοπυροσταφυλικό οξύ	116	19.002	0.201	0.054	n.d.	n.d.	0.003	0.003
Πικολονικό οξύ	180	12.461	0.023	0.010	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Πιπεκολικό οξύ	156	13.564	0.542	0.168	0.325	0.016	0.714	0.291
Πυροσταφυλικό οξύ	174	6.214	0.071	0.005	0.080	0.009	0.173	0.019
Σακχαρικό οξύ	333	28.402	0.804	0.083	0.785	0.042	1.593	0.115
Σικιμικό οξύ	204	24.205	0.214	0.042	0.008	0.005	0.027	0.017
Ηλεκτρικό οξύ	148	12.313	1.799	0.128	0.762	0.028	2.085	0.125
trans-3-εξενοδιοϊκό οξύ	73	15.512	n.d.	n.d.	0.038	0.016	0.056	0.024
trans-ακονιτικό οξύ	229	22.730	0.088	0.057	0.019	0.002	0.057	0.014

Μεταβολίτης	m/z	RT	N		NA		NH	
			AVG	SE	AVG	SE	AVG	SE
<b>Αζωτούχες ενώσεις</b>								
1-μεθυλ-νικοτιναμίδη	179	15.974	0.029	0.007	0.003	0.001	0.017	0.004
2-φαινυλακεταμίδιο	92	15.728	n.d.	n.d.	0.017	0.001	0.036	0.009
3,5-διυδροξυφαινυλογλυκίνη	355	26.344	0.058	0.015	n.d.	n.d.	0.006	0.004
3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρικό οξύ	247	19.497	n.d.	n.d.	0.034	0.005	0.120	0.018
4-υδροξυβενζυλο κυάνιο	190	17.117	n.d.	n.d.	0.004	0.002	0.009	0.004
4-υδροξυμανδελονιτρίλιο	223	16.600	n.d.	n.d.	0.002	0.001	0.014	0.007
5-αμινοϊμιδαζολο-4-καρβοξαμίδιο	237	23.929	0.044	0.018	n.d.	n.d.	0.005	0.005
5'-δεοξυ-5'-(μεθυλθειο)αδενοσίνη	236	40.530	0.387	0.095	0.003	0.002	0.009	0.009
5-υδροξυ-L-τρυπτοφάνη	290	34.483	n.d.	n.d.	0.001	0.001	0.007	0.002
Αδενίνη	264	24.964	0.070	0.013	0.024	0.002	0.057	0.004
Αδενοσίνη	236	38.433	0.318	0.024	0.046	0.014	0.155	0.029
β-κυανο-L-αλανίνη	141	13.876	0.896	0.137	0.013	0.003	0.029	0.008
DL-2-αμινο-3-φωσφοπροπιονικό οξύ	340	23.698	0.005	0.001	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
D-λυξοζαμίνη	217	21.227	0.040	0.029	0.093	0.019	0.106	0.035
Υποξανθίνη	265	23.716	0.008	0.003	n.d.	n.d.	0.002	0.001
L-νορλευκίνη	158	11.325	0.082	0.051	0.041	0.019	0.050	0.016
N-μεθυλγλουταμικό οξύ	260	21.298	0.257	0.060	0.022	0.002	0.022	0.006
Οροτικό οξύ	254	22.674	0.032	0.009	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Παντοθενικό οξύ	291	27.664	0.054	0.015	0.008	0.001	0.023	0.002
Φαινυλαιθυλαμίνη	174	18.324	0.023	0.016	0.071	0.010	0.058	0.006
Πουτρεσκίνη	174	22.345	0.145	0.022	0.035	0.003	0.054	0.003
Σπερμιδίνη	174	32.267	0.122	0.020	0.040	0.004	0.032	0.003
Ουρακίλη	241	12.975	0.208	0.037	0.067	0.005	0.078	0.020
Ουρία	147	10.280	0.183	0.153	0.168	0.035	0.257	0.109
<b>Φωσφορικές ενώσεις</b>								
3-φωσφογλυκερικό	357	23.773	0.049	0.042	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3-φωσφογλυκερικό οξύ	387	24.186	0.072	0.028	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
6-φωσφογλυκονικό οξύ	387	35.051	0.165	0.059	0.015	0.004	0.051	0.007
5'-μονοφωσφορική αδενοσίνη	315	44.459	0.299	0.088	0.000	0.000	0.005	0.004
5'-μονοφωσφορική κυτινίνη	299	28.329	0.022	0.009	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
6-φωσφορική-D-γλυκόζη	387	33.979	1.109	0.223	0.320	0.133	2.062	0.510
1-φωσφορική γλυκερόλη	357	23.245	0.392	0.035	0.135	0.007	0.370	0.036
O-φωσφοκολαμίνη	299	23.494	0.100	0.029	0.099	0.006	0.181	0.017
O-φωσφο-L-θρεονίνη	370	24.501	0.073	0.020	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Φωσφορικό οξύ	299	11.440	7.462	1.379	4.856	0.348	1.356	0.296
5-φωσφορική ριβουλόζη	357	30.442	n.d.	n.d.	0.020	0.003	0.043	0.012
<b>Άλλες ενώσεις</b>								
2,3-διυδροξυδιφαινύλιο	330	23.908	0.021	0.008	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Αρβουτίνη	254	37.925	0.006	0.006	0.005	0.001	0.033	0.009

Μεταβολίτης	m/z	RT	N		NA		NH	
			AVG	SE	AVG	SE	AVG	SE
Καρβαμικό οξύ (ουρεθάνη)	146	4.586	0.117	0.049	0.032	0.008	n.d.	n.d.
Κατεχίνη	368	41.996	0.002	0.002	0.019	0.003	0.022	0.003
Χρυσίνη	383	38.002	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.006	0.001
Κονιφερυλοαλκοόλη	324	26.396	n.d.	n.d.	0.003	0.001	0.006	0.003
Δεϋδροασκορβικό οξύ	173	24.923	0.018	0.018	0.058	0.013	n.d.	n.d.
Γλυκονικό οξύ λακτόνη	275	25.784	0.313	0.205	1.507	0.097	3.119	0.184
Λογανίνη	361	41.758	0.165	0.041	0.112	0.019	0.120	0.040
Φαινυλακεταλδεΐδη	117	7.926	0.017	0.007	n.d.	n.d.	0.001	0.001
Φλωροβενζοφαινόνη	431	32.027	0.126	0.040	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

**Πίνακας Α.11:** Μεταβολίτες που ανιχνεύονται σε ρίζες *L. jaronicus* που είτε δεν εμβολιάστηκαν είτε εμβολιάστηκαν από το αζωτοδεσμευτικό ριζόβιο άγριου τύπου είτε με το *fix* στέλεχος *ΔnifH*.

Για κάθε μεταβολίτη παρουσιάζεται η αναλογία μάζας προς φορτίο (m/z), ο χρόνος έκλουσης (RT), ο μέσος όρος (AVG) και η τυπική απόκλιση (SE) της σχετικής απόκρισης πέντε ανεξάρτητων βιολογικών επαναλήψεων σε ρίζες που εμβολιάστηκαν με το *M. loti* άγριου τύπου (R), σε μη εμβολιασμένες ρίζες (RU) και σε ρίζες εμβολιασμένες με το στέλεχος *ΔnifH* (RH).

Μεταβολίτης	m/z	RT	R		RU		RH	
			AVG	SE	AVG	SE	AVG	SE
<b>Αμινοξέα</b>								
L-σερίνη	204	13.696	1.428	0.171	0.489	0.031	0.554	0.201
Ασπαρτικό οξύ	232	17.622	1.488	0.183	0.486	0.036	0.397	0.109
β-αλανίνη	248	15.211	0.170	0.019	0.061	0.008	0.060	0.014
Κυκλολευκίνη	156	13.545	0.045	0.019	0.010	0.010	n.d.	n.d.
L-ισολευκίνη	158	11.883	0.113	0.029	0.054	0.007	0.056	0.027
L-αλανίνη	116	7.235	0.467	0.058	0.114	0.016	0.025	0.013
L-ασπαραγίνη	231	21.044	3.591	0.532	1.756	0.170	0.241	0.044
L-γλουταμικό οξύ	246	19.868	1.717	0.531	0.647	0.089	0.651	0.240
L-γλουταμίνη	156	23.189	0.324	0.044	0.032	0.002	0.081	0.014
L-ιστιδίνη	154	26.191	0.025	0.009	0.003	0.001	0.001	0.001
L-ομοσερίνη	218	15.902	0.066	0.007	0.031	0.003	0.020	0.002
L-λευκίνη	158	11.300	0.038	0.019	0.006	0.006	n.d.	n.d.
L-λυσίνη	317	26.244	0.096	0.014	0.051	0.007	0.046	0.011
L-μεθειονίνη	176	17.415	0.013	0.003	0.002	0.001	0.006	0.002
L-ορνιθίνη	174	24.154	0.133	0.030	0.137	0.019	0.045	0.032
L-προλίνη	142	11.894	0.106	0.033	0.036	0.009	0.030	0.016
L-θρεονίνη	218	14.389	0.488	0.070	0.139	0.008	0.187	0.047
L-τρυπτοφάνη	202	31.641	0.093	0.015	0.041	0.005	0.345	0.063
L-βαλίνη	144	9.907	0.122	0.015	0.057	0.007	0.037	0.012
Τυροσίνη	218	26.534	0.146	0.021	0.048	0.005	0.097	0.020

Μεταβολίτης	m/z	RT	R		RU		RH	
			AVG	SE	AVG	SE	AVG	SE
<b>Σάκχαρα</b>								
Κυτταροβιόζη	361	37.768	0.006	0.002	0.004	0.000	0.008	0.002
D-(+) τρεχαλόζη	361	40.480	0.228	0.044	0.008	0.001	0.111	0.040
D-(+)-μελεζιτόζη	361	50.441	0.001	0.000	n.d.	n.d.	0.020	0.004
D-αλλόζη	319	26.077	0.224	0.053	0.036	0.005	0.301	0.058
D-γλυκόζη	319	26.164	4.565	1.174	0.291	0.015	2.896	0.259
D-λυξόζη	262	21.228	0.099	0.012	0.017	0.004	0.086	0.017
Φρουκτόζη	307	25.688	5.969	0.629	0.174	0.028	2.365	0.219
Μαλτόζη	361	40.655	1.155	0.167	0.297	0.026	0.968	0.343
Μελιβιόζη	361	40.955	0.288	0.043	0.067	0.005	0.284	0.051
Ραφινόζη	87	49.005	0.177	0.027	0.010	0.001	0.102	0.021
Άνυδρη μονοϋδρική σεδοε- πτουλόζη	204	26.899	0.226	0.052	0.005	0.005	0.006	0.006
Σοφορόζη	319	40.391	0.001	0.001	0.002	0.001	n.d.	n.d.
Σακχαρόζη	361	39.060	29.09 8	4.802	8.607	0.660	3.844	3.119
Ταγκατόζη	217	25.652	n.d.	n.d.	0.121	0.015	0.016	0.016
<b>Πολυόλες</b>								
Ακετόλη	219	18.567	0.093	0.033	0.013	0.002	0.028	0.006
D-μαννιτόλη	319	26.784	15.94 0	2.140	0.050	0.005	6.985	1.433
D-σορβιτόλη	319	26.785	5.650	3.449	0.014	0.009	n.d.	n.d.
Γαλακτινόλη	204	43.854	0.261	0.030	0.008	0.000	0.211	0.050
Μυο-ινοσιτόλη	432	29.727	9.589	1.199	0.505	0.212	11.146	1.979
Παλατινιτόλη	361	41.590	0.012	0.005	0.000	0.000	0.005	0.002
Ονονιτόλη	217	27.183	3.884	0.589	6.663	3.340	22.605	11.887
Πινιτόλη	260	24.782	63.17 7	6.707	91.620	43.604	236.187	101.947
<b>Οργανικά οξέα</b>								
2-ισοπροπυλμηλικό οξύ	147	18.931	0.113	0.019	0.021	0.003	0.105	0.015
4-γουανιδοβουτυρικό οξύ	174	17.698	1.454	0.189	0.211	0.028	0.439	0.073
4-υδροκινναμωμικό οξύ	293	26.346	0.051	0.007	0.019	0.001	0.029	0.004
6-υδροξυνικοτινικό οξύ	268	18.570	0.009	0.003	n.d.	n.d.	0.004	0.002
α-κετογλουταρικό οξύ	147	18.875	0.157	0.040	n.d.	n.d.	0.059	0.014
Κιτρακονικό οξύ	147	13.315	0.587	0.074	0.058	0.004	0.273	0.052
Κιτραμηλικό οξύ	147	16.456	2.382	0.548	0.905	0.151	1.371	0.445
Κιτρικό οξύ	347	24.395	1.491	0.295	2.048	0.219	1.730	0.448
D-μηλικό οξύ	147	16.893	9.527	2.480	0.727	0.033	6.495	0.583
Γαλακτουρονικό οξύ	333	24.550	0.041	0.041	0.030	0.005	0.122	0.023
Γαλλικό οξύ	458	27.005	0.000	0.000	0.001	0.000	0.001	0.001
Γλυκοεπτονικό οξύ	217	31.134	7.861	1.372	n.d.	n.d.	2.071	2.030
Γλυκονικό οξύ	333	27.476	0.217	0.026	0.102	0.009	0.148	0.029
Γλυκερικό οξύ	189	12.940	0.064	0.024	0.007	0.002	0.042	0.012
Ιμινοδιοξικό οξύ	232	18.301	0.015	0.003	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Μεταβολίτης	m/z	RT	R		RU		RH	
			AVG	SE	AVG	SE	AVG	SE
L-γαλακτικό οξύ	147	6.432	4.946	1.038	2.007	0.052	3.922	2.442
Λακτοβιονικό οξύ	217	40.453	0.003	0.002	0.001	0.001	0.038	0.036
Μηλειναμικό οξύ	244	17.411	0.001	0.001	n.d.	n.d.	0.008	0.002
Μηλεινικό οξύ	147	12.083	0.290	0.068	0.054	0.014	0.074	0.023
Μηλονικό οξύ	147	9.500	0.110	0.027	0.007	0.001	0.062	0.015
Μεθυλμηλονικό οξύ	147	9.822	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.007	0.003
Βλεννικό οξύ	333	28.987	0.321	0.038	0.081	0.006	0.325	0.051
Φαινυλοπυροσταφυλικό οξύ	116	19.002	0.004	0.002	n.d.	n.d.	0.002	0.001
Σακχαρικό οξύ	333	28.402	0.967	0.118	0.321	0.023	0.739	0.103
Ηλεκτρικό οξύ	148	12.313	1.706	0.197	0.197	0.008	0.795	0.097
Τρυγικό οξύ	147	19.707	0.008	0.008	0.000	0.000	0.316	0.134
trans-ακονιτικό οξύ	229	22.730	0.249	0.029	0.002	0.002	0.120	0.020
Αζωτούχες ενώσεις								
1-μεθυλ-νικοτιναμίδη	179	15.974	0.001	0.001	n.d.	n.d.	0.001	0.000
3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρικό οξύ	247	19.497	0.078	0.015	0.293	0.012	0.050	0.009
Αδενίνη	264	24.964	0.021	0.003	0.009	0.000	0.010	0.001
Αδενοσίνη	236	38.433	0.160	0.029	n.d.	n.d.	0.068	0.029
Αλλαντοΐνη	331	25.705	n.d.	n.d.	0.027	0.008	n.d.	n.d.
β-κυανο-L-αλανίνη	141	13.876	0.550	0.069	0.370	0.028	0.037	0.004
D-λυξοζαμίνη	217	21.227	0.047	0.019	0.013	0.004	0.072	0.033
L-νορλευκίνη	158	11.325	0.032	0.014	0.013	0.006	0.008	0.005
N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνη	319	30.263	0.251	0.092	0.120	0.021	0.349	0.060
N-μεθυλγλουταμικό οξύ	260	21.298	0.026	0.006	0.008	0.004	0.001	0.001
Παντοθενικό οξύ	291	27.664	0.031	0.006	0.003	0.001	0.008	0.002
Φαινυλαιθυλαμίνη	174	18.324	0.077	0.009	0.011	0.001	0.141	0.026
Πουτρεσκίνη	174	22.345	0.058	0.007	0.022	0.001	0.022	0.005
Σπερμιδίνη	174	32.267	0.060	0.010	0.014	0.001	0.009	0.002
Σφιγγοσίνη	204	36.123	0.001	0.001	0.001	0.000	0.004	0.004
Ουρία	147	10.280	0.345	0.056	0.355	0.043	0.428	0.347
Φωσφορικές ενώσεις								
6-φωσφογλυκονικό οξύ	387	35.051	0.008	0.004	0.003	0.001	0.002	0.001
6-φωσφορική-D-γλυκόζη	387	33.979	0.240	0.032	0.114	0.012	0.375	0.068
1-φωσφορική γλυκερόλη	357	23.245	0.171	0.025	0.032	0.004	0.153	0.024
Ο-φωσφοκολαμίνη	299	23.494	n.d.	n.d.	0.008	0.002	0.017	0.010
Φωσφορικό οξύ	299	11.440	1.185	0.484	1.847	0.857	5.987	2.954
5-φωσφορική ριβουλόζη	357	30.442	0.009	0.005	0.001	0.000	0.010	0.001
Άλλες ενώσεις								
2,3-διϋδροξυδιφαινύλιο	330	23.908	n.d.	n.d.	0.036	0.003	n.d.	n.d.
Αρβουτίνη	254	37.925	0.003	0.002	0.002	0.001	0.009	0.002
Καρβαμικό οξύ (ουρεθάνη)	146	4.586	0.056	0.009	0.008	0.003	0.025	0.009
Κατεχίνη	368	41.996	0.018	0.004	0.014	0.003	0.055	0.016
Χρυσίνη	383	38.002	0.000	0.000	n.d.	n.d.	0.001	0.000

Μεταβολίτης	m/z	RT	R		RU		RH	
			AVG	SE	AVG	SE	AVG	SE
Κονιφερυλοαλκοόλη	324	26.396	0.002	0.001	n.d.	n.d.	0.003	0.002
Δεϋδροασκορβικό οξύ	173	24.923	0.028	0.005	0.005	0.002	0.004	0.002
Γλυκονικό οξύ λακτόνη	275	25.784	0.461	0.119	0.094	0.032	0.194	0.086
Λογανίνη	361	41.758	0.008	0.003	0.000	0.000	0.005	0.002
Ριβονικό οξύ-γ-λακτόνη	147	20.162	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.020	0.007

**Πίνακας A.12:** Μεταβολίτες που ανιχνεύονται σε βλαστούς φυτών *L. jaronicus* που είτε δεν εμβολιάστηκαν είτε εμβολιάστηκαν από το αζωτοδεσμευτικό ριζόβιο άγριου τύπου είτε με το *fix* στέλεχος *ΔnifH*.

Για κάθε μεταβολίτη παρουσιάζεται η αναλογία μάζας προς φορτίο (m/z), ο χρόνος έκλουσης (RT), ο μέσος όρος (AVG) και η τυπική απόκλιση (SE) της σχετικής απόκρισης πέντε ανεξάρτητων βιολογικών επαναλήψεων σε βλαστούς φυτών που εμβολιάστηκαν με το *M. loti* άγριου τύπου (S), σε βλαστούς μη εμβολιασμένων φυτών (SU) και σε βλαστούς φυτών εμβολιασμένων με το στέλεχος *ΔnifH* (SH).

Μεταβολίτης	m/z	RT	S		SU		SH	
			AVG	SE	AVG	SE	AVG	SE
<b>Αμινοξέα</b>								
L-σερίνη	204	13.696	11.759	0.671	15.235	0.719	1.820	0.206
Ασπαρτικό οξύ	232	17.622	19.004	0.190	29.074	1.228	1.552	0.120
β-αλανίνη	248	15.211	0.532	0.050	1.038	0.088	0.117	0.020
L-ισολευκίνη	158	11.883	1.068	0.198	0.789	0.382	0.711	0.194
Γλυκίνη	174	12.140	7.913	3.146	0.641	0.208	4.756	1.950
L-αλανίνη	116	7.235	4.493	0.246	2.657	0.270	0.342	0.076
L-ασπαραγίνη	231	21.044	33.371	1.264	23.384	1.333	0.146	0.063
L-γλουταμικό οξύ	246	19.868	23.483	5.657	29.341	0.418	3.304	1.038
L-γλουταμίνη	156	23.189	1.339	0.223	1.674	0.198	n.d.	n.d.
L-ομοσερίνη	218	15.902	0.106	0.005	0.233	0.013	0.069	0.018
L-λυσίνη	317	26.244	0.204	0.010	0.364	0.013	0.675	0.108
L-μεθειονίνη	176	17.415	0.010	0.006	0.024	0.015	0.020	0.005
L-προλίνη	142	11.894	0.876	0.206	0.580	0.159	0.380	0.162
L-θρεονίνη	218	14.389	4.391	0.155	5.392	0.465	0.691	0.128
L-τροπτοφάνη	202	31.641	0.040	0.012	0.140	0.017	3.631	0.297
L-βαλίνη	144	9.907	0.479	0.024	0.625	0.039	0.270	0.077
Τυροσίνη	218	26.534	0.361	0.016	0.530	0.057	0.451	0.040
<b>Σάκχαρα</b>								
D-(+) αλτρόζη	205	26.461	n.d.	n.d.	0.049	0.030	0.694	0.206
Κυτταροβιόζη	361	37.768	0.037	0.015	0.231	0.098	0.032	0.002
D-(+) τρεχαλόζη	361	40.480	1.122	0.069	0.587	0.047	1.828	0.096
D-αλλόζη	319	26.077	0.791	0.250	0.561	0.151	1.724	1.060
D-γλυκόζη	319	26.164	27.317	8.564	4.346	0.301	52.417	7.743
D-λυσόζη	262	21.228	0.530	0.073	0.374	0.079	0.641	0.160
Φρουκτόζη	307	25.688	34.115	5.266	2.524	0.195	63.703	8.201
Ισομαλτόζη	361	41.763	0.129	0.033	0.203	0.082	0.168	0.040

Μεταβολίτης	m/z	RT	S		SU		SH	
			AVG	SE	AVG	SE	AVG	SE
Λακτόζη	361	37.843	0.031	0.014	0.126	0.049	0.100	0.015
Λακτουλόζη	204	36.931	0.030	0.013	0.010	0.010	0.099	0.027
Μαλτόζη	361	40.655	0.079	0.033	0.065	0.044	0.736	0.190
Μαλτοτριόζη	361	49.168	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.013	0.006
Μελιβιόζη	361	40.955	0.405	0.090	0.314	0.057	0.331	0.011
Ραφινόζη	87	49.005	1.387	0.223	1.725	0.280	1.735	0.055
Άνυδρη μονοϋδρική σεδοεπτουλόζη	204	26.899	0.410	0.192	0.336	0.224	0.463	0.233
Σοφορόζη	319	40.391	0.001	0.001	0.018	0.003	0.009	0.001
Σακχαρόζη	361	39.060	214.306	9.669	136.881	29.790	151.322	35.745
Ταγκατόζη	217	25.652	0.075	0.044	1.392	0.325	0.103	0.063
<b>Πολυόλες</b>								
Ακετόλη	219	18.567	0.262	0.016	0.074	0.032	0.899	0.076
D-μαννιτόλη	319	26.784	24.276	1.773	0.300	0.088	30.386	2.081
D-θρεϊτόλη	217	17.550	n.d.	n.d.	0.015	0.015	0.063	0.014
Γαλακτινόλη	204	43.854	1.304	0.157	0.946	0.092	3.064	0.121
Μαλιτιτόλη	361	40.701	0.113	0.031	0.019	0.019	0.188	0.188
Μυο-ινοσιτόλη	432	29.727	86.508	2.696	42.859	2.025	64.491	3.843
Παλατινιτόλη	361	41.590	n.d.	n.d.	0.007	0.003	0.010	0.010
Ονονιτόλη	217	27.183	36.220	5.116	23.356	0.972	154.945	21.562
Πινιτόλη	260	24.782	1752.995	397.118	1653.604	575.132	5196.624	583.164
<b>Οργανικά οξέα</b>								
2-ισοπροπυλμηλικό οξύ	147	18.931	4.183	0.761	2.128	0.085	2.236	0.073
3-υδροκινναμωμικό οξύ	293	23.371	3.230	0.099	2.801	0.195	2.810	0.127
4-γουανιδοβουτυρικό οξύ	174	17.698	2.733	0.468	1.209	0.174	0.742	0.295
4-υδροκινναμωμικό οξύ	293	26.346	4.848	0.207	4.493	0.291	3.856	0.162
6-υδροξυνικοτινικό οξύ	268	18.570	0.294	0.006	n.d.	n.d.	0.125	0.033
Κιτραμηλικό οξύ	147	16.456	185.361	8.603	118.979	4.384	180.868	45.980
Κιτρικό οξύ	347	24.395	75.433	4.469	45.911	24.955	73.184	4.677
D-μηλικό οξύ	147	16.893	111.656	29.693	58.619	15.646	106.152	20.341
Φερουλικό οξύ	338	29.264	1.421	0.076	1.452	0.113	1.181	0.024
Φουμαρικό οξύ	245	13.148	5.553	0.320	4.001	0.225	3.577	0.260
Γαλακτουρονικό οξύ	333	24.550	1.981	0.421	0.980	0.359	2.600	0.455
Γλυκοεπτονικό οξύ	217	31.134	168.612	3.451	136.506	6.128	162.340	4.707
Γλυκονικό οξύ	333	27.476	1.206	0.641	0.914	0.058	0.794	0.022
Γλυκερικό οξύ	189	12.940	0.253	0.108	0.196	0.107	0.218	0.063
Ιμινοδιοξικό οξύ	232	18.301	0.054	0.006	0.028	0.011	n.d.	n.d.
L-γαλακτικό οξύ	147	6.432	4.498	1.045	8.714	1.118	5.184	2.277
Λακτοβιονικό οξύ	217	40.453	2.755	0.191	1.252	0.105	5.280	0.195
Μηλεϊνάμικό οξύ	244	17.411	0.207	0.051	0.043	0.027	0.035	0.021



Μεταβολίτης	m/z	RT	S		SU		SH	
			AVG	SE	AVG	SE	AVG	SE
Μηλεινικό οξύ	147	12.083	3.060	0.720	1.472	0.747	1.784	0.386
Μηλονικό οξύ	147	9.500	19.374	1.747	8.201	0.943	10.271	2.204
Μεθυλμηλονικό οξύ	147	9.822	0.015	0.006	n.d.	n.d.	0.032	0.009
Βλεννικό οξύ	333	28.987	0.513	0.022	0.998	0.098	1.550	0.060
Σακχαρικό οξύ	333	28.402	2.954	0.159	4.929	0.255	6.304	0.224
Σικιμικό οξύ	204	24.205	0.431	0.026	0.504	0.037	0.387	0.027
Ηλεκτρικό οξύ	148	12.313	10.790	0.468	12.492	0.219	11.028	1.093
Τρυγικό οξύ	147	19.707	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.174	0.026
Ταρτρονικό οξύ	147	14.510	0.221	0.058	0.054	0.054	0.109	0.045
trans-ακονιτικό οξύ	229	22.730	0.261	0.027	0.317	0.021	0.223	0.033
<b>Αζωτούχες ενώσεις</b>								
L-πυρογλουταμικό οξύ	156	17.487	1.539	0.943	2.309	1.581	0.450	0.253
1-μεθυλ-νικοτιναμίδη	179	15.974	0.001	0.001	0.002	0.002	0.006	0.003
3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρικό οξύ	247	19.497	0.246	0.060	0.330	0.019	0.264	0.014
5'-δεοξυ-5'-(μεθυλθειο)αδενοσίνη	236	40.530	0.010	0.004	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Αδενίνη	264	24.964	0.030	0.008	0.040	0.003	0.028	0.002
Αδενοσίνη	236	38.433	0.333	0.134	0.049	0.015	0.364	0.204
Αλλαντοΐνη	331	25.705	0.142	0.069	0.607	0.092	n.d.	n.d.
β-κυανο-L-αλανίνη	141	13.876	4.429	0.070	2.528	0.098	0.061	0.007
D-λυξοζαμίνη	217	21.227	0.091	0.055	0.288	0.065	0.602	0.175
gly-pro	174	27.403	0.014	0.003	0.008	0.005	0.010	0.001
L-νορλευκίνη	158	11.325	0.143	0.037	0.117	0.052	0.054	0.040
N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνη	319	30.263	2.341	0.063	2.639	0.137	3.057	0.709
N-μεθυλγλουταμικό οξύ	260	21.298	0.090	0.012	0.217	0.019	0.002	0.002
Παντοθενικό οξύ	291	27.664	0.470	0.016	0.060	0.010	0.087	0.006
Φαινυλαιθυλαμίνη	174	18.324	0.434	0.156	0.508	0.051	1.255	0.197
Πουτρεσκίνη	174	22.345	0.202	0.020	0.084	0.007	0.063	0.014
Σπερμιδίνη	174	32.267	0.141	0.003	0.065	0.027	0.013	0.008
Σφιγγοσίνη	204	36.123	0.008	0.003	0.002	0.002	0.009	0.009
Ουρία	147	10.280	0.119	0.019	0.466	0.100	0.140	0.074
<b>Φωσφορικές ενώσεις</b>								
6-φωσφογλυκονικό οξύ	387	35.051	n.d.	n.d.	0.075	0.022	0.009	0.005
6-φωσφορική-D-γλυκόζη	387	33.979	0.914	0.051	2.246	0.250	1.518	0.067
1-φωσφορική γλυκερόλη	357	23.245	0.097	0.007	0.378	0.045	0.139	0.016
Φωσφορικό οξύ	299	11.440	30.965	3.686	74.410	16.291	57.674	9.757

Μεταβολίτης	m/z	RT	S		SU		SH	
			AVG	SE	AVG	SE	AVG	SE
<b>Άλλες ενώσεις</b>								
2,3-διϋδροξυδιφαινύλιο	330	23.908	0.011	0.007	0.103	0.007	n.d.	n.d.
Καρβαμικό οξύ (ουρεθάνη)	146	4.586	6.079	6.015	0.104	0.064	11.756	7.418
Κατεχίνη	368	41.996	0.004	0.002	0.022	0.008	0.331	0.070
Κονιφερυλοαλκοόλη	324	26.396	n.d.	n.d.	0.037	0.026	0.054	0.021
Δειδροασκορβικό οξύ	173	24.923	0.115	0.051	0.208	0.087	0.566	0.325
Γλυκονικό οξύ λακτόνη	275	25.784	6.842	0.263	9.334	0.583	5.668	1.382
Λογανίνη	361	41.758	0.040	0.010	0.089	0.017	0.078	0.020
μεθυλο-β-D-γαλακτοπυρανοσίδιο	204	26.103	1.037	0.235	2.730	0.231	1.177	0.483
φαινυλ-β-γλυκοπυρανοσίδιο	361	33.604	0.074	0.011	0.089	0.052	0.049	0.011
Φλωρογλυκινόλη	342	20.411	0.059	0.036	0.034	0.015	0.055	0.007
Πυρογαλλόλη	239	18.016	0.013	0.006	0.355	0.044	0.065	0.017
Ριβονικό οξύ-γ-λακτόνη	147	20.162	n.d.	n.d.	0.081	0.053	0.223	0.049
Συναπυλαλκοόλη	354	29.191	0.010	0.007	0.027	0.009	0.021	0.005
Ταξιφολίνη	368	42.039	0.003	0.001	n.d.	n.d.	0.002	0.001

**Πίνακας Α.13:** Μεταβολίτες που ανιχνεύονται σε φύλλα φυτών *L. jaronicus* που είτε δεν εμβολιάστηκαν είτε εμβολιάστηκαν από το αζωτοδεσμευτικό ριζόβιο άγριου τύπου είτε με το *fix* στέλεχος *ΔnifH*.

Για κάθε μεταβολίτη παρουσιάζεται η αναλογία μάζας προς φορτίο (m/z), ο χρόνος έκλουσης (RT), ο μέσος όρος (AVG) και η τυπική απόκλιση (SE) της σχετικής απόκρισης πέντε ανεξάρτητων βιολογικών επαναλήψεων σε φύλλα φυτών που εμβολιάστηκαν με το *M. loti* άγριου τύπου (L), σε φύλλα μη εμβολιασμένων φυτών (LU) και σε φύλλα φυτών εμβολιασμένων με το στέλεχος *ΔnifH* (LH).

Μεταβολίτης	m/z	RT	L		LU		LH	
			AVG	SE	AVG	SE	AVG	SE
<b>Αμινοξέα</b>								
L-σερίνη	204	13.696	7.215	0.115	16.507	0.533	1.884	0.319
Ασπαρτικό οξύ	232	17.622	15.346	0.173	19.121	0.526	2.600	0.208
β-αλανίνη	248	15.211	0.471	0.083	0.293	0.050	0.074	0.017
L-ισολευκίνη	158	11.883	0.893	0.217	0.522	0.224	0.913	0.252
Γλυκίνη	174	12.140	4.531	1.607	0.671	0.092	4.424	2.024
L-αλανίνη	116	7.235	7.651	0.721	5.300	0.480	1.384	0.345
L-ασπαραγίνη	231	21.044	12.787	0.960	26.206	3.847	0.496	0.013
L-γλουταμικό οξύ	246	19.868	27.735	0.636	16.978	6.480	10.607	0.843
L-γλουταμίνη	156	23.189	1.359	0.041	1.549	0.211	0.016	0.010
L-ομοσερίνη	218	15.902	0.056	0.019	0.125	0.011	0.024	0.010
L-λυσίνη	317	26.244	0.128	0.024	0.145	0.010	0.151	0.031
L-προλίνη	142	11.894	2.139	0.402	1.759	0.140	1.310	0.180

Μεταβολίτης	m/z	RT	L		LU		LH	
			AVG	SE	AVG	SE	AVG	SE
L-θρεονίνη	218	14.389	3.441	0.142	3.655	0.063	0.768	0.155
L-τρυπτοφάνη	202	31.641	0.094	0.039	0.052	0.007	0.993	0.140
L-βαλίνη	144	9.907	0.722	0.038	0.489	0.021	0.648	0.088
Τυροσίνη	218	26.534	0.064	0.064	0.132	0.081	0.283	0.016
<b>Σάκχαρα</b>								
D-(+) αλτρούζη	205	26.461	n.d.	n.d.	0.039	0.039	0.395	0.171
Κυτταροβιόζη	361	37.768	0.302	0.047	0.102	0.055	0.507	0.053
D-(+) τρεχαλόζη	361	40.480	0.613	0.053	0.467	0.118	1.023	0.092
D-αλλόζη	319	26.077	0.207	0.207	0.742	0.508	3.201	0.845
D-γλυκόζη	319	26.164	34.096	14.152	5.407	4.929	55.266	11.375
D-λυξόζη	262	21.228	0.383	0.027	0.405	0.075	0.551	0.069
Φρουκτόζη	307	25.688	50.358	4.827	20.845	3.541	46.454	3.375
Ισομαλτόζη	361	41.763	0.017	0.014	0.045	0.027	0.100	0.018
Λακτόζη	361	37.843	0.147	0.081	0.178	0.027	0.241	0.068
Λακτουλόζη	204	36.931	0.861	0.367	0.159	0.056	1.035	0.285
Μαλτόζη	361	40.655	0.085	0.025	0.424	0.115	1.213	0.326
Μελιβιόζη	361	40.955	1.220	0.182	1.058	0.091	1.201	0.291
Ραφινόζη	87	49.005	0.218	0.062	0.076	0.014	0.454	0.036
Ριβόζη	217	21.557	0.078	0.041	0.080	0.034	n.d.	n.d.
Άνυδρη μονοϋδρική σεδοεπτουλόζη	204	26.899	1.225	0.366	n.d.	n.d.	1.430	0.388
Σοφορόζη	319	40.391	0.055	0.013	0.073	0.015	0.083	0.006
Σακχαρόζη	361	39.060	155.460	11.527	197.597	8.402	173.172	8.735
Ταγκατόζη	217	25.652	1.454	0.373	0.682	0.042	0.191	0.191
<b>Πολυόλες</b>								
Ακετόλη	219	18.567	0.383	0.101	0.185	0.048	0.864	0.090
D-μαννιτόλη	319	26.784	56.396	3.825	0.093	0.093	43.673	2.834
D-θρεϊτόλη	217	17.550	0.699	0.115	0.186	0.054	0.449	0.156
Γαλακτινόλη	204	43.854	0.166	0.045	0.078	0.010	1.274	0.147
Γλυκερόλη	147	11.489	2.471	0.567	0.918	0.891	3.470	0.622
Μυο-ινοσιτόλη	432	29.727	116.280	29.194	95.871	2.966	152.486	8.894
Παλατινιτόλη	361	41.590	0.083	0.022	0.047	0.002	0.061	0.011
Ονονιτόλη	217	27.183	29.753	3.151	68.576	31.685	146.397	30.352
Πινιτόλη	260	24.782	540.686	128.378	1967.332	304.313	4183.373	617.350
<b>Οργανικά οξέα</b>								
2-ισοπροπυλμηλικό οξύ	147	18.931	1.798	0.253	1.375	0.060	1.502	0.271
3-υδροκινναμωμικό οξύ	293	23.371	5.613	0.278	4.976	0.299	5.174	0.165
4-γουανιδουβουτυρικό οξύ	174	17.698	2.818	0.308	1.201	0.083	0.694	0.300
4-υδροκινναμωμικό οξύ	293	26.346	7.605	0.286	8.396	0.230	8.082	0.309
6-υδροξυνικοτινικό οξύ	268	18.570	0.043	0.022	n.d.	n.d.	0.061	0.025

Μεταβολίτης	m/z	RT	L		LU		LH	
			AVG	SE	AVG	SE	AVG	SE
Κιτρακονικό οξύ	147	13.315	0.281	0.018	0.165	0.015	0.733	0.049
Κιτραμηλικό οξύ	147	16.456	61.051	2.647	51.929	3.715	109.569	5.400
Κιτρικό οξύ	347	24.395	75.395	1.745	157.912	15.712	160.000	12.360
D-μηλικό οξύ	147	16.893	61.686	12.033	39.882	13.916	50.796	4.349
Φερουλικό οξύ	338	29.264	1.471	0.084	1.706	0.089	1.585	0.058
Φουμαρικό οξύ	245	13.148	6.375	0.124	4.979	0.273	4.061	0.293
Γαλακτουρονικό οξύ	333	24.550	2.111	0.099	1.366	0.332	0.409	0.379
Γλυκοεπτονικό οξύ	217	31.134	156.392	58.850	185.962	6.571	173.718	42.560
Γλυκονικό οξύ	333	27.476	2.069	0.032	3.609	1.095	7.492	1.845
Γλυκερικό οξύ	189	12.940	1.095	0.231	2.158	0.254	0.781	0.075
Γλυκολικό οξύ	147	6.695	1.113	0.060	0.878	0.067	0.691	0.020
Γουανιδοηλεκτρικό οξύ	444	27.151	0.011	0.004	0.003	0.001	n.d.	n.d.
Ιμινοδιοξικό οξύ	232	18.301	0.215	0.007	0.248	0.022	0.070	0.011
L-γαλακτικό οξύ	147	6.432	4.611	0.469	11.824	2.776	10.586	0.960
Λακτοβιονικό οξύ	217	40.453	0.417	0.044	0.236	0.027	0.513	0.042
Μηλείναμικό οξύ	244	17.411	0.519	0.041	0.116	0.065	0.076	0.016
Μηλείνικό οξύ	147	12.083	0.962	0.411	0.695	0.547	1.526	0.583
Μηλονικό οξύ	147	9.500	15.005	3.183	11.663	6.823	24.315	3.800
Μεθυλμηλονικό οξύ	147	9.822	0.014	0.011	0.024	0.008	0.075	0.028
Βλεννικό οξύ	333	28.987	0.669	0.045	0.794	0.065	0.834	0.075
Νικοτινικό οξύ	180	11.660	0.009	0.003	0.022	0.009	0.017	0.004
Πιπεκολικό οξύ	156	13.564	0.121	0.020	10.506	1.559	0.043	0.018
Σακχαρικό οξύ	333	28.402	35.112	1.688	43.857	3.982	54.249	5.151
Σικιμικό οξύ	204	24.205	0.498	0.020	0.300	0.087	0.149	0.063
Ηλεκτρικό οξύ	148	12.313	7.568	0.506	9.391	0.517	10.817	1.943
Τρυγικό οξύ	147	19.707	0.066	0.066	n.d.	n.d.	0.335	0.014
Ταρτρικό οξύ	147	14.510	0.359	0.045	0.157	0.057	0.203	0.057
trans-ακονιτικό οξύ	229	22.730	0.326	0.034	0.414	0.048	0.805	0.092
<b>Αζωτούχες ενώσεις</b>								
L-πυρογλουταμικό οξύ	156	17.487	0.989	0.989	4.351	1.662	1.149	0.444
1-μεθυλδαντοΐνη	171	12.504	0.092	0.024	0.002	0.002	n.d.	n.d.
3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρικό οξύ	247	19.497	0.209	0.053	0.245	0.011	0.213	0.028
5-αμινοβαλερικό οξύ	174	19.936	n.d.	n.d.	0.647	0.285	n.d.	n.d.
5'-δεοξυ-5'-(μεθυλθειο)αδενοσίνη	236	40.530	0.017	0.004	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Αδενοσίνη	236	38.433	0.738	0.369	0.005	0.005	0.892	0.526
Αλλαντοΐνη	331	25.705	n.d.	n.d.	0.324	0.150	n.d.	n.d.
β-κυανο-L-αλανίνη	141	13.876	1.215	0.155	2.332	0.330	0.014	0.009
Biuret	344	22.043	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.007	0.004
D-λυξοζαμίνη	217	21.227	0.237	0.078	0.418	0.060	0.294	0.094

Μεταβολίτης	m/z	RT	L		LU		LH	
			AVG	SE	AVG	SE	AVG	SE
L-νορλευκίνη	158	11.325	0.182	0.051	0.098	0.028	0.220	0.082
N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνη	319	30.263	8.420	0.174	6.747	0.494	9.963	0.397
N-μεθυλαλανίνη	130	8.856	0.039	0.003	0.025	0.008	n.d.	n.d.
N-μεθυλγλουταμικό οξύ	260	21.298	0.123	0.018	0.144	0.012	n.d.	n.d.
Παντοθενικό οξύ	291	27.664	0.330	0.004	0.025	0.010	0.059	0.006
Πουτρεσκίνη	174	22.345	0.232	0.018	0.204	0.024	0.072	0.008
Σπερμιδίνη	174	32.267	0.406	0.050	0.560	0.092	0.075	0.012
trans-4-υδροξυ-L-προλίνη	230	17.738	0.022	0.022	0.091	0.026	0.008	0.008
Ουρία	147	10.280	0.175	0.051	0.575	0.245	0.079	0.028
<b>Φωσφορικές ενώσεις</b>								
6-φωσφογλυκονικό οξύ	387	35.051	0.072	0.048	0.147	0.036	0.071	0.034
6-φωσφορική-D-γλυκόζη	387	33.979	1.146	0.089	1.946	0.138	1.471	0.215
1-φωσφορική γλυκερόλη	357	23.245	0.274	0.029	0.465	0.041	0.322	0.036
Φωσφορικό οξύ	299	11.440	8.348	0.418	45.654	9.480	17.052	1.411
<b>Άλλες ενώσεις</b>								
2,3-διϋδροξυδιφαινύλιο	330	23.908	n.d.	n.d.	0.105	0.043	n.d.	n.d.
Καρβαμικό οξύ (ουρεθάνη)	146	4.586	6.039	5.527	5.263	5.123	27.207	7.513
Κατεχίνη	368	41.996	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.012	0.004
Χρυσίνη	383	38.002	n.d.	n.d.	0.003	0.002	0.003	0.001
Δεϋδροασκορβικό οξύ	173	24.923	n.d.	n.d.	0.404	0.403	0.521	0.253
Γλυκονικό οξύ λακτόνη	275	25.784	6.635	0.242	4.889	0.905	5.245	0.848
L-ασκορβικό οξύ	332	26.988	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.492	0.273
μεθυλο-β-D-γαλακτοπυρανοσίδιο	204	26.103	3.659	0.523	2.680	0.474	3.592	0.928
φαινυλ-β-γλυκοπυρανοσίδιο	361	33.604	0.233	0.120	0.280	0.029	0.419	0.124
Φλωρογλυκινόλη	342	20.411	0.135	0.083	0.195	0.010	0.166	0.017
Ριβονικό οξύ-γ-λακτόνη	147	20.162	0.023	0.023	0.106	0.043	0.291	0.177

**Πίνακας Α.14:** Μεταβολίτες που ανιχνεύονται σε φυμάτια *L. jaronicus* που σχηματίστηκαν είτε από το αζωτοδεσμευτικό ριζόβιο άγριου τύπου είτε από τα *fix* στελέχη *ΔnifA* ή *ΔnifH*.

Για κάθε μεταβολίτη παρουσιάζεται η αναλογία μάζας προς φορτίο (m/z), ο χρόνος έκλουσης (RT), ο λόγος της σχετικής απόκρισης σε *fix* φυμάτια σχηματισμένα είτε από το στέλεχος *ΔnifA* (NA) είτε από το *ΔnifH* (NH), ως προς τη σχετική απόκριση στα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια που σχηματίστηκαν από το *M. loti* άγριου τύπου (N), καθώς και ο λόγος σχετικής απόκρισης σε φυμάτια ως προς τη σχετική απόκριση σε φυμάτια *ΔnifH*. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε πέντε βιολογικές επαναλήψεις. Οι λόγοι σχετικής απόκρισης που αντιπροσωπεύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P < 0.05$ ) επισημαίνονται με έντονη γραφή. Η τιμή  $P$  αντιπροσωπεύει το επίπεδο σημαντικότητας μεταξύ των σχετικών αποκρίσεων για κάθε μεταβολίτη (ANOVA), όταν τουλάχιστον δύο μέσοι όροι σχετικών αποκρίσεων είναι  $>0$ .

Μεταβολίτης	m/z	RT	NA/N	NH/N	NA/NH	P
<b>Αμινοξέα</b>						
L-σερίνη	204	13.696	<b>0.536</b>	0.689	0.778	<b>0.046</b>
Ασπαρτικό οξύ	232	17.622	<b>0.271</b>	<b>0.459</b>	0.591	<b>0.000</b>
β-αλανίνη	248	15.211	<b>0.172</b>	<b>0.632</b>	<b>0.272</b>	<b>0.000</b>
Κυκλολευκίνη	156	13.545	0.508	1.073	0.473	0.745
L-ισολευκίνη	158	11.883	<b>0.466</b>	0.537	0.867	<b>0.020</b>
L-αλανίνη	116	7.235	<b>0.227</b>	<b>0.305</b>	0.742	<b>0.001</b>
L-ασπαραγίνη	231	21.044	<b>0.036</b>	<b>0.122</b>	0.296	<b>0.000</b>
L-γλουταμικό οξύ	246	19.868	0.561	1.399	0.401	0.328
L-γλουταμίνη	156	23.189	<b>0.082</b>	<b>0.089</b>	0.922	<b>0.000</b>
L-ιστιδίνη	154	26.191	<b>0.004</b>	<b>0.018</b>	0.206	<b>0.000</b>
L-ομοσερίνη	218	15.902	0.457	1.227	0.372	0.050
L-λυσίνη	317	26.244	<b>0.106</b>	<b>0.257</b>	0.414	<b>0.002</b>
L-μεθειονίνη	176	17.415	1.773	<b>6.863</b>	<b>0.258</b>	<b>0.000</b>
L-προλίνη	142	11.894	<b>0.308</b>	<b>0.404</b>	0.762	<b>0.000</b>
L-θρεονίνη	218	14.389	<b>0.339</b>	<b>0.410</b>	0.827	<b>0.000</b>
L-τρυπτοφάνη	202	31.641	1.656	<b>5.883</b>	<b>0.282</b>	<b>0.000</b>
L-βαλίνη	144	9.907	<b>0.431</b>	0.647	0.667	<b>0.038</b>
Τυροσίνη	218	26.534	1.177	<b>2.444</b>	<b>0.482</b>	<b>0.000</b>
<b>Σάκχαρα</b>						
Κυτταροβιόζη	361	37.768	0.820	2.943	0.279	0.076
D-(+) τρεχαλόζη	361	40.480	0.355	0.965	0.368	<b>0.048</b>
D-(+)-μελεζιτόζη	361	50.441	0.192	<b>2.360</b>	<b>0.081</b>	<b>0.000</b>
D-αλλόζη	319	26.077	0.853	6.639	0.128	<b>0.035</b>
D-γλυκόζη	319	26.164	0.608	1.753	<b>0.347</b>	<b>0.040</b>
D-λυξόζη	262	21.228	1.178	<b>2.619</b>	<b>0.450</b>	<b>0.002</b>
Φρουκτόζη	307	25.688	0.215	0.395	0.543	0.400
Ισομαλτόζη	361	41.763	1.269	2.418	0.525	0.158
Λακτόζη	361	37.843	s.p.	<b>s.p.</b>	0.375	<b>0.019</b>
Μαλτόζη	361	40.655	0.763	1.222	0.624	0.705
Μαλτοτριόζη	361	49.168	n.d.	1.897	<b>n.d.</b>	<b>0.002</b>
Μελιβιόζη	361	40.955	0.620	<b>1.536</b>	<b>0.403</b>	<b>0.000</b>
Παλατινόζη	361	41.090	0.271	1.872	0.145	0.170

Μεταβολίτης	m/z	RT	NA/N	NH/N	NA/NH	P
Ραφινόζη	87	49.005	0.400	<b>1.879</b>	<b>0.213</b>	<b>0.002</b>
Σακχαρόζη	361	39.060	1.353	1.714	0.789	0.736
Ταγκατόζη	217	25.652	5.658	<b>10.111</b>	0.560	<b>0.003</b>
<b>Πολυόλες</b>						
Ακετόλη	219	18.567	s.p.	s.p.	<b>5.414</b>	<b>0.000</b>
D-μαννιτόλη	319	26.784	<b>0.303</b>	<b>0.426</b>	0.710	<b>0.000</b>
D-θρεϊτόλη	217	17.550	0.073	1.167	0.063	0.223
Γαλακτινόλη	204	43.854	0.888	<b>5.522</b>	<b>0.161</b>	<b>0.000</b>
Μυο-ινοσιτόλη	432	29.727	1.343	<b>2.939</b>	<b>0.457</b>	<b>0.000</b>
Παλατινιτόλη	361	41.590	<b>0.292</b>	0.571	0.512	<b>0.020</b>
Ονονιτόλη	217	27.1831	0.428	0.854	0.501	0.144
Πινιτόλη	260	24.7816	1.439	1.410	1.021	0.533
<b>Οργανικά οξέα</b>						
2-φουροϊκό οξύ	125	7.822	n.d.	n.d.	n.d.	<b>0.011</b>
2-υδροκιναμωμικό οξύ	293	21.673	n.d.	n.d.	n.d.	<b>0.016</b>
2-ισοπροπυλμηλικό οξύ	147	18.931	0.778	<b>2.759</b>	<b>0.282</b>	<b>0.001</b>
4-γουανιδοβουτυρικό οξύ	174	17.698	<b>0.115</b>	<b>0.214</b>	0.536	<b>0.000</b>
4-υδροκιναμωμικό οξύ	293	26.346	<b>0.094</b>	<b>0.331</b>	0.283	<b>0.000</b>
6-υδροξυνικοτινικό οξύ	268	18.570	0.019	0.413	0.047	0.054
α-κετογλουταρικό οξύ	147	18.875	n.d.	1.143	n.d.	0.264
Κιτραμηλικό οξύ	147	16.456	<b>0.245</b>	<b>0.176</b>	1.395	<b>0.004</b>
Κιτρικό οξύ	347	24.395	0.795	2.162	0.368	0.135
D-μηλικό οξύ	147	16.893	<b>0.312</b>	0.985	<b>0.317</b>	<b>0.007</b>
Γαλακτουρονικό οξύ	333	24.550	2.225	n.d.	s.p.	0.103
Γλυκοεπτονικό οξύ	217	31.134	0.007	0.032	0.206	0.120
Γλυκονικό οξύ	333	27.476	<b>0.186</b>	<b>0.468</b>	0.398	<b>0.000</b>
Γλυκερικό οξύ	189	12.940	0.310	1.545	<b>0.201</b>	<b>0.001</b>
Ιμινοδιοξικό οξύ	232	18.301	<b>0.088</b>	n.d.	s.p.	<b>0.002</b>
L-γαλακτικό οξύ	147	6.432	1.072	1.617	0.663	0.513
Λακτοβιονικό οξύ	217	40.453	0.363	0.681	0.533	0.642
Μηλεϊναμικό οξύ	244	17.411	<b>0.039</b>	0.606	0.065	<b>0.007</b>
Μηλεϊνικό οξύ	147	12.083	<b>0.192</b>	0.476	0.403	<b>0.013</b>
Μηλονικό οξύ	147	9.500	<b>0.090</b>	<b>0.423</b>	0.214	<b>0.002</b>
Μανδελικό οξύ	179	16.460	n.d.	n.d.	n.d.	0.058
Μεθυλμηλονικό οξύ	147	9.822	s.p.	s.p.	<b>15.569</b>	<b>0.002</b>
Βλεννικό οξύ	333	28.987	<b>0.572</b>	<b>1.453</b>	<b>0.394</b>	<b>0.000</b>
Οξαλικό οξύ	147	7.870	<b>0.080</b>	<b>0.220</b>	0.366	<b>0.000</b>
Φαινυλοπυροσταφυλικό οξύ	116	19.002	n.d.	<b>0.013</b>	n.d.	<b>0.001</b>
Πικολονικό οξύ	180	12.461	n.d.	n.d.	n.d.	<b>0.022</b>
Πιπεκολικό οξύ	156	13.564	0.600	1.318	0.455	0.394
Πυροσταφυλικό οξύ	174	6.214	1.133	<b>2.443</b>	<b>0.464</b>	<b>0.000</b>
Σακχαρικό οξύ	333	28.402	0.976	<b>1.981</b>	<b>0.493</b>	<b>0.000</b>
Σικιμικό οξύ	204	24.205	<b>0.039</b>	<b>0.125</b>	0.312	<b>0.000</b>
Ηλεκτρικό οξύ	148	12.313	<b>0.424</b>	1.159	<b>0.366</b>	<b>0.000</b>

Μεταβολίτης	m/z	RT	NA/N	NH/N	NA/NH	P
trans-3-εξενοδιοϊκό οξύ	73	15.512	s.p.	s.p.	0.683	0.090
trans-ακονιτικό οξύ	229	22.730	0.215	0.649	0.332	0.386
<b>Αζωτούχες ενώσεις</b>						
1-μεθυλ-νικοτιναμίδη	179	15.974	<b>0.107</b>	0.591	0.182	<b>0.009</b>
2-φαινυλακεταμίδιο	92	15.728	s.p.	<b>s.p.</b>	0.461	<b>0.002</b>
3,5-διυδροξυφαινυλογλυκίνη	355	26.344	<b>n.d.</b>	<b>0.102</b>	n.d.	<b>0.001</b>
3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρικό οξύ	247	19.497	s.p.	<b>s.p.</b>	<b>0.286</b>	<b>0.000</b>
4-υδροξυβενζυλο κυάνιο	190	17.117	s.p.	s.p.	0.408	0.066
4-υδροξυμανδελονιτρίλιο	223	16.600	s.p.	s.p.	0.150	0.063
5-αμινοϊμιδαζολο-4-καρβοξαμίδιο	237	23.929	<b>n.d.</b>	0.111	n.d.	<b>0.024</b>
5'-δεοξυ-5'-(μεθυλθειο)αδενοσίνη	236	40.530	<b>0.007</b>	<b>0.022</b>	0.335	<b>0.000</b>
5-υδροξυ-L-τρυπτοφάνη	290	34.483	s.p.	<b>s.p.</b>	<b>0.159</b>	<b>0.004</b>
Αδενίνη	264	24.964	<b>0.347</b>	0.806	<b>0.431</b>	<b>0.003</b>
Αδενοσίνη	236	38.433	<b>0.145</b>	<b>0.489</b>	<b>0.297</b>	<b>0.000</b>
β-κυανο-L-αλανίνη	141	13.876	<b>0.015</b>	<b>0.033</b>	0.458	<b>0.000</b>
DL-2-αμινο-3-φωσφοπροπιονικό οξύ	340	23.698	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	n.d.	<b>0.001</b>
D-λυξοζαμίνη	217	21.227	2.328	2.648	0.879	0.263
Υποξανθίνη	265	23.716	<b>n.d.</b>	<b>0.223</b>	n.d.	<b>0.007</b>
L-νορλευκίνη	158	11.325	0.499	0.616	0.809	0.657
N-μεθυλγλουταμικό οξύ	260	21.298	<b>0.087</b>	<b>0.085</b>	1.019	<b>0.000</b>
Οροτικό οξύ	254	22.674	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	n.d.	<b>0.002</b>
Παντοθενικό οξύ	291	27.664	<b>0.153</b>	0.423	0.362	<b>0.008</b>
Φαινυλαιθυλαμίνη	174	18.324	<b>3.053</b>	2.496	1.223	<b>0.037</b>
Πουτρεσκίνη	174	22.345	<b>0.239</b>	<b>0.372</b>	0.643	<b>0.000</b>
Σπερμιδίνη	174	32.267	<b>0.330</b>	<b>0.262</b>	1.263	<b>0.000</b>
Ουρακίλη	241	12.975	<b>0.320</b>	<b>0.376</b>	0.851	<b>0.003</b>
Ουρία	147	10.280	0.922	1.410	0.654	0.832
<b>Φωσφορικές ενώσεις</b>						
3-φωσφογλυκερικό	357	23.773	n.d.	n.d.	n.d.	0.286
3-φωσφογλυκερικό οξύ	387	24.186	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	n.d.	<b>0.011</b>
6-φωσφογλυκονικό οξύ	387	35.051	<b>0.094</b>	0.309	0.303	<b>0.024</b>
5'-μονοφωσφορική αδενοσίνη	315	44.459	<b>0.0003</b>	<b>0.018</b>	0.016	<b>0.002</b>
5'-μονοφωσφορική κυτινίνη	299	28.329	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	n.d.	<b>0.018</b>
6-φωσφορική-D-γλυκόζη	387	33.979	0.288	1.860	<b>0.155</b>	<b>0.010</b>
1-φωσφορική γλυκερόλη	357	23.245	<b>0.344</b>	0.944	<b>0.365</b>	<b>0.000</b>
Ο-φωσφοκολαμίνη	299	23.494	0.988	<b>1.815</b>	<b>0.544</b>	<b>0.017</b>
Ο-φωσφο-L-θρεονίνη	370	24.501	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	n.d.	<b>0.001</b>
Φωσφορικό οξύ	299	11.440	0.651	<b>0.182</b>	<b>3.582</b>	<b>0.001</b>
5-φωσφορική ριβουλόζη	357	30.442	s.p.	<b>s.p.</b>	0.462	<b>0.003</b>
<b>Άλλες ενώσεις</b>						
2,3-διυδροξυδιφαινύλιο	330	23.908	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	n.d.	<b>0.011</b>
Αρβουτίνη	254	37.925	0.908	<b>5.485</b>	<b>0.166</b>	<b>0.016</b>
Καρβαμικό οξύ (ουρεθάνη)	146	4.586	0.270	<b>n.d.</b>	s.p.	<b>0.036</b>
Κατεχίνη	368	41.996	<b>8.290</b>	<b>9.655</b>	0.859	<b>0.001</b>



Μεταβολίτης	m/z	RT	NA/N	NH/N	NA/NH	P
Χρυσίνη	383	38.002	n.d.	s.p.	n.d.	0.000
Κονιφερυλοαλκοόλη	324	26.396	s.p.	s.p.	0.468	0.080
Δεϋδροασκορβικό οξύ	173	24.923	3.232	n.d.	s.p.	0.023
Γλυκονικό οξύ λακτόνη	275	25.784	4.810	9.952	0.483	0.000
Λογανίνη	361	41.758	0.681	0.730	0.934	0.534
Φαινυλακεταλδεϋδη	117	7.926	n.d.	0.083	n.d.	0.024
Φλωροβενζοφαινόνη	431	32.027	n.d.	n.d.	n.d.	0.003

**Πίνακας A.15:** Μεταβολίτες που ανιχνεύονται σε ρίζες *L. jaronicus* που είτε δεν εμβολιάστηκαν είτε εμβολιάστηκαν από το αζωτοδεσμευτικό ριζόβιο άγριου τύπου είτε με το *fix* στέλεχος *ΔnifH*.

Για κάθε μεταβολίτη παρουσιάζεται η αναλογία μάζας προς φορτίο (m/z), ο χρόνος έκλουσης (RT), ο λόγος της σχετικής απόκρισης σε μη εμβολιασμένες ρίζες (RU) και σε ρίζες εμβολιασμένες με το στέλεχος *ΔnifH* (RH), ως προς τη σχετική απόκριση σε ρίζες που εμβολιάστηκαν με το *M. loti* άγριου τύπου (R), καθώς και ο λόγος σχετικής απόκρισης σε μη εμβολιασμένες ρίζες (RU) ως προς τη σχετική απόκριση σε ρίζες που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος *ΔnifH*. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε πέντε βιολογικές επαναλήψεις. Οι λόγοι σχετικής απόκρισης που αντιπροσωπεύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P < 0.05$ ) επισημαίνονται με έντονη γραφή. Η τιμή *P* αντιπροσωπεύει το επίπεδο σημαντικότητας μεταξύ των σχετικών αποκρίσεων για κάθε μεταβολίτη (ANOVA), όταν τουλάχιστον δύο μέσοι όροι σχετικών αποκρίσεων είναι  $>0$ .

Μεταβολίτης	m/z	RT	RU/R	RH/R	RU/RH	P
<b>Αμινοξέα</b>						
L-σερίνη	204	13.696	0.343	0.388	0.883	0.002
Ασπαρτικό οξύ	232	17.622	0.327	0.267	1.224	0.000
β-αλανίνη	248	15.211	0.357	0.352	1.014	0.000
Κυκλολευκίνη	156	13.545	0.229	n.d.	s.p.	0.063
L-ισολευκίνη	158	11.883	0.481	0.497	0.968	0.173
L-αλανίνη	116	7.235	0.244	0.053	4.611	0.000
L-ασπαραγίνη	231	21.044	0.489	0.067	7.286	0.000
L-γλουταμικό οξύ	246	19.868	0.377	0.379	0.995	0.073
L-γλουταμίνη	156	23.189	0.098	0.249	0.396	0.000
L-ιστιδίνη	154	26.191	0.102	0.043	2.355	0.010
L-ομοσερίνη	218	15.902	0.471	0.307	1.536	0.000
L-λευκίνη	158	11.300	0.162	0.000	s.p.	0.087
L-λυσίνη	317	26.244	0.529	0.477	1.108	0.012
L-μεθειονίνη	176	17.415	0.169	0.468	0.361	0.020
L-ορνιθίνη	174	24.154	1.035	0.336	3.079	0.064
L-προλίνη	142	11.894	0.343	0.286	1.200	0.059
L-θρεονίνη	218	14.389	0.285	0.382	0.745	0.001
L-τροπτοφάνη	202	31.641	0.439	3.698	0.119	0.000
L-βαλίνη	144	9.907	0.468	0.305	1.532	0.001
Τυροσίνη	218	26.534	0.331	0.663	0.499	0.005
<b>Σάκχαρα</b>						
Κυτταροβιόζη	361	37.768	0.738	1.457	0.507	0.149
D-(+) τρεχαλόζη	361	40.480	0.033	0.488	0.068	0.002

Μεταβολίτης	m/z	RT	RU/R	RH/R	RU/RH	P
D-(+)-μελεζιτόζη	361	50.441	0.000	<b>13.843</b>	n.d.	<b>0.000</b>
D-αλλόζη	319	26.077	<b>0.162</b>	1.345	<b>0.121</b>	<b>0.004</b>
D-γλυκόζη	319	26.164	<b>0.064</b>	0.634	0.101	<b>0.003</b>
D-λυξόζη	262	21.228	<b>0.167</b>	0.871	<b>0.192</b>	<b>0.001</b>
Φρουκτόζη	307	25.688	<b>0.029</b>	<b>0.396</b>	<b>0.074</b>	<b>0.000</b>
Μαλτόζη	361	40.655	0.257	0.838	0.307	<b>0.042</b>
Μελιβιόζη	361	40.955	<b>0.233</b>	0.985	<b>0.237</b>	<b>0.002</b>
Ραφινόζη	87	49.005	<b>0.058</b>	0.575	<b>0.102</b>	<b>0.000</b>
Άνυδρη μονοϋδρική σεδοεππουλόζη	204	26.899	<b>0.024</b>	<b>0.025</b>	0.935	<b>0.000</b>
Σοφορόζη	319	40.391	2.941	n.d.	s.p.	0.083
Σακχαρόζη	361	39.060	<b>0.296</b>	<b>0.132</b>	2.239	<b>0.000</b>
Ταγκατόζη	217	25.652	s.p.	s.p.	<b>7.717</b>	<b>0.000</b>
<b>Πολυόλες</b>						
Ακετόλη	219	18.567	<b>0.137</b>	0.304	0.452	<b>0.031</b>
D-μαννιτόλη	319	26.784	<b>0.003</b>	<b>0.438</b>	<b>0.007</b>	<b>0.000</b>
D-σορβιτόλη	319	26.785	0.003	n.d.	s.p.	0.109
Γαλακτινόλη	204	43.854	<b>0.030</b>	0.810	<b>0.037</b>	<b>0.000</b>
Μυο-ινοσιτόλη	432	29.727	<b>0.053</b>	1.162	<b>0.045</b>	<b>0.000</b>
Παλατινιτόλη	361	41.590	<b>0.039</b>	0.439	0.089	<b>0.035</b>
Ονονιτόλη	217	27.183	1.715	5.819	0.295	0.178
Πινιτόλη	260	24.782	1.450	3.739	0.388	0.166
<b>Οργανικά οξέα</b>						
2-ισοπροπυλμηλικό οξύ	147	18.931	<b>0.188</b>	0.930	<b>0.202</b>	<b>0.001</b>
4-γουανιδοβουτυρικό οξύ	174	17.698	<b>0.145</b>	<b>0.302</b>	0.480	<b>0.000</b>
4-υδροκινναμωμικό οξύ	293	26.346	<b>0.374</b>	<b>0.575</b>	0.651	<b>0.002</b>
6-υδροξυνικοτινικό οξύ	268	18.570	n.d.	0.433	n.d.	<b>0.032</b>
α-κετογλουταρικό οξύ	147	18.875	n.d.	<b>0.377</b>	n.d.	<b>0.002</b>
Κιτρακονικό οξύ	147	13.315	<b>0.099</b>	<b>0.466</b>	<b>0.213</b>	<b>0.000</b>
Κιτραμηλικό οξύ	147	16.456	0.380	0.576	0.660	0.073
Κιτρικό οξύ	347	24.395	1.373	1.160	1.184	0.518
D-μηλικό οξύ	147	16.893	<b>0.076</b>	0.682	0.112	<b>0.004</b>
Γαλακτουρονικό οξύ	333	24.550	0.746	3.003	0.248	0.065
Γαλλικό οξύ	458	27.005	2.293	4.668	0.491	0.300
Γλυκοεπτονικό οξύ	217	31.134	n.d.	<b>0.263</b>	n.d.	<b>0.005</b>
Γλυκονικό οξύ	333	27.476	<b>0.471</b>	0.681	0.691	<b>0.015</b>
Γλυκερικό οξύ	189	12.940	0.104	0.666	0.156	0.065
Ιμινοδιοξικό οξύ	232	18.301	n.d.	n.d.	n.d.	<b>0.000</b>
L-γαλακτικό οξύ	147	6.432	0.406	0.793	0.512	0.415
Λακτοβιονικό οξύ	217	40.453	0.431	12.017	0.036	0.411
Μηλειναμικό οξύ	244	17.411	0.000	<b>12.319</b>	n.d.	<b>0.002</b>
Μηλεινικό οξύ	147	12.083	<b>0.185</b>	<b>0.256</b>	0.721	<b>0.003</b>
Μηλονικό οξύ	147	9.500	<b>0.060</b>	0.567	0.106	<b>0.005</b>
Μεθυλμηλονικό οξύ	147	9.822	n.d.	s.p.	n.d.	<b>0.024</b>
Βλεννικό οξύ	333	28.987	<b>0.253</b>	1.012	<b>0.250</b>	<b>0.001</b>

Μεταβολίτης	m/z	RT	RU/R	RH/R	RU/RH	P
Φαινυλοπυροσταφυλικό οξύ	116	19.002	n.d.	0.485	n.d.	0.138
Σακχαρικό οξύ	333	28.402	<b>0.332</b>	0.764	<b>0.434</b>	<b>0.001</b>
Ηλεκτρικό οξύ	148	12.313	<b>0.115</b>	<b>0.466</b>	<b>0.247</b>	<b>0.000</b>
Τρυγικό οξύ	147	19.707	0.047	<b>39.586</b>	<b>0.001</b>	<b>0.021</b>
trans-ακονιτικό οξύ	229	22.730	<b>0.008</b>	<b>0.483</b>	<b>0.016</b>	<b>0.000</b>
Αζωτούχες ενώσεις						
1-μεθυλ-νικοτιναμίδη	179	15.974	n.d.	0.948	n.d.	0.439
3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρικό οξύ	247	19.497	<b>3.741</b>	0.643	<b>5.815</b>	<b>0.000</b>
Αδενίνη	264	24.964	<b>0.444</b>	<b>0.481</b>	0.922	<b>0.000</b>
Αδενοσίνη	236	38.433	n.d.	0.423	n.d.	<b>0.002</b>
Αλλαντοΐνη	331	25.705	s.p.	n.d.	s.p.	<b>0.001</b>
β-κυανο-L-αλανίνη	141	13.876	<b>0.672</b>	<b>0.066</b>	<b>10.116</b>	<b>0.000</b>
D-λυξοζαμίνη	217	21.227	0.267	1.531	0.175	0.208
L-νορλευκίνη	158	11.325	0.419	0.257	1.628	0.181
N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνη	319	30.263	0.477	1.388	0.343	0.078
N-μεθυλγλουταμικό οξύ	260	21.298	<b>0.323</b>	<b>0.033</b>	9.729	<b>0.003</b>
Παντοθενικό οξύ	291	27.664	<b>0.084</b>	<b>0.260</b>	0.325	<b>0.000</b>
Φαινυλαιθυλαμίνη	174	18.324	<b>0.137</b>	<b>1.833</b>	<b>0.075</b>	<b>0.000</b>
Πουτρεσκίνη	174	22.345	<b>0.382</b>	<b>0.386</b>	0.991	<b>0.000</b>
Σπερμιδίνη	174	32.267	<b>0.237</b>	<b>0.156</b>	1.521	<b>0.000</b>
Σφιγγοσίνη	204	36.123	1.641	8.539	0.192	0.514
Ουρία	147	10.280	1.028	1.241	0.828	0.952
Φωσφορικές ενώσεις						
6-φωσφογλυκονικό οξύ	387	35.051	0.358	0.218	1.641	0.189
6-φωσφορική-D-γλυκόζη	387	33.979	0.475	1.562	<b>0.304</b>	<b>0.004</b>
1-φωσφορική γλυκερόλη	357	23.245	<b>0.189</b>	0.892	<b>0.212</b>	<b>0.001</b>
Ο-φωσφοκολαμίνη	299	23.494	s.p.	s.p.	0.461	0.141
Φωσφορικό οξύ	299	11.440	1.558	5.053	0.308	0.166
5-φωσφορική ριβουλόζη	357	30.442	0.082	1.105	0.074	0.123
Άλλες ενώσεις						
2,3-διϋδροξυδιφαινύλιο	330	23.908	s.p.	n.d.	s.p.	<b>0.000</b>
Αρβουτίνη	254	37.925	0.594	3.112	<b>0.191</b>	<b>0.032</b>
Καρβαμικό οξύ (ουρεθάνη)	146	4.586	<b>0.139</b>	<b>0.443</b>	0.313	<b>0.002</b>
Κατεχίνη	368	41.996	0.769	3.061	<b>0.251</b>	<b>0.022</b>
Χρυσίνη	383	38.002	n.d.	3.140	n.d.	0.058
Κονιφερυλοαλκοόλη	324	26.396	n.d.	1.234	n.d.	0.257
Δειδροασκορβικό οξύ	173	24.923	<b>0.179</b>	<b>0.127</b>	1.405	<b>0.000</b>
Γλυκονικό οξύ λακτόνη	275	25.784	<b>0.203</b>	0.421	0.483	<b>0.030</b>
Λογανίνη	361	41.758	0.018	0.554	0.032	0.059
Ριβονικό οξύ-γ-λακτόνη	147	20.162	n.d.	s.p.	n.d.	<b>0.004</b>

**Πίνακας Α.16:** Μεταβολίτες που ανιχνεύονται σε βλαστούς φυτών *L. jaronicus* που είτε δεν εμβολιάστηκαν είτε εμβολιάστηκαν από το αζωτοδεσμευτικό ριζόβιο άγριου τύπου είτε με το *fix* στέλεχος *ΔnifH*.

Για κάθε μεταβολίτη παρουσιάζεται η αναλογία μάζας προς φορτίο (m/z), ο χρόνος έκλουσης (RT), ο λόγος της σχετικής απόκρισης σε βλαστούς μη εμβολιασμένων φυτών (SU) και σε βλαστούς φυτών εμβολιασμένων με το στέλεχος *ΔnifH* (SH), ως προς τη σχετική απόκριση σε βλαστούς φυτών που εμβολιάστηκαν με το *M. loti* άγριου τύπου (S), καθώς και ο λόγος σχετικής απόκρισης σε βλαστούς μη εμβολιασμένων φυτών ως προς τη σχετική απόκριση σε βλαστούς φυτών εμβολιασμένων με το στέλεχος *ΔnifH*. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε πέντε βιολογικές επαναλήψεις. Οι λόγοι σχετικής απόκρισης που αντιπροσωπεύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P < 0.05$ ) επισημαίνονται με έντονη γραφή. Η τιμή *P* αντιπροσωπεύει το επίπεδο σημαντικότητας μεταξύ των σχετικών αποκρίσεων για κάθε μεταβολίτη (ANOVA), όταν τουλάχιστον δύο μέσοι όροι σχετικών αποκρίσεων είναι >0.

Μεταβολίτης	m/z	RT	SU/S	SH/S	SU/SH	P
<b>Αμινοξέα</b>						
L-σερίνη	204	13.696	<b>1.296</b>	<b>0.155</b>	<b>8.369</b>	<b>0.000</b>
Ασπαρτικό οξύ	232	17.622	<b>1.530</b>	<b>0.082</b>	<b>18.733</b>	<b>0.000</b>
β-αλανίνη	248	15.211	<b>1.949</b>	<b>0.220</b>	<b>8.876</b>	<b>0.000</b>
L-ισολευκίνη	158	11.883	0.739	0.666	1.109	0.634
Γλυκίνη	174	12.140	0.081	0.601	0.135	0.094
L-αλανίνη	116	7.235	<b>0.591</b>	<b>0.076</b>	<b>7.781</b>	<b>0.000</b>
L-ασπαραγίνη	231	21.044	<b>0.701</b>	<b>0.004</b>	<b>160.176</b>	<b>0.000</b>
L-γλουταμικό οξύ	246	19.868	1.249	<b>0.141</b>	<b>8.880</b>	<b>0.000</b>
L-γλουταμίνη	156	23.189	1.250	n.d.	s.p.	<b>0.000</b>
L-ομοσερίνη	218	15.902	<b>2.195</b>	0.653	<b>3.361</b>	<b>0.000</b>
L-λυσίνη	317	26.244	1.788	<b>3.312</b>	<b>0.540</b>	<b>0.001</b>
L-μεθειονίνη	176	17.415	2.416	1.992	1.213	0.600
L-προλίνη	142	11.894	0.662	0.434	1.526	0.179
L-θρεονίνη	218	14.389	1.228	<b>0.157</b>	<b>7.806</b>	<b>0.000</b>
L-τρυπτοφάνη	202	31.641	3.510	<b>91.241</b>	<b>0.038</b>	<b>0.000</b>
L-βαλίνη	144	9.907	1.306	<b>0.564</b>	<b>2.316</b>	<b>0.001</b>
Τυροσίνη	218	26.534	<b>1.466</b>	1.250	1.174	<b>0.043</b>
<b>Σάκχαρα</b>						
D-(+) αλτρούζη	205	26.461	s.p.	<b>s.p.</b>	<b>0.070</b>	<b>0.002</b>
Κυτταροβιόζη	361	37.768	6.290	0.883	7.120	<b>0.048</b>
D-(+) τρεχαλόζη	361	40.480	<b>0.523</b>	<b>1.629</b>	<b>0.321</b>	<b>0.000</b>
D-αλλόζη	319	26.077	0.709	2.178	0.326	0.418
D-γλυκόζη	319	26.164	0.159	1.919	<b>0.083</b>	<b>0.001</b>
D-λυξόζη	262	21.228	0.706	1.209	0.584	0.272
Φρουκτόζη	307	25.688	<b>0.074</b>	<b>1.867</b>	<b>0.040</b>	<b>0.000</b>
Ισομαλτόζη	361	41.763	1.578	1.305	1.209	0.656
Λακτόζη	361	37.843	4.004	3.194	1.253	0.118
Λακτουλόζη	204	36.931	0.330	3.282	<b>0.100</b>	<b>0.013</b>
Μαλτόζη	361	40.655	0.826	<b>9.282</b>	<b>0.089</b>	<b>0.002</b>
Μαλτοτριόζη	361	49.168	n.d.	s.p.	n.d.	<b>0.047</b>
Μελιβιόζη	361	40.955	0.774	0.815	0.949	0.554

Μεταβολίτης	m/z	RT	SU/S	SH/S	SU/SH	P
Ραφινόζη	87	49.005	1.244	1.251	0.994	0.434
Άνυδρη μονοϋδρική σεδοεπτουλόζη	204	26.899	0.820	1.130	0.725	0.918
Σοφορόζη	319	40.391	<b>14.235</b>	<b>7.030</b>	<b>2.025</b>	<b>0.000</b>
Σακχαρόζη	361	39.060	0.639	0.706	0.905	0.148
Ταγκατόζη	217	25.652	<b>18.656</b>	1.381	<b>13.509</b>	<b>0.001</b>
Πολυόλες						
Ακετόλη	219	18.567	0.284	<b>3.434</b>	<b>0.083</b>	<b>0.000</b>
D-μαννιτόλη	319	26.784	<b>0.012</b>	1.252	<b>0.010</b>	<b>0.000</b>
D-θρεϊτόλη	217	17.550	s.p.	<b>s.p.</b>	<b>0.231</b>	<b>0.006</b>
Γαλακτινόλη	204	43.854	0.726	<b>2.350</b>	<b>0.309</b>	<b>0.000</b>
Μαλτιτόλη	361	40.701	0.167	1.664	0.100	0.571
Μυο-ινοσιτόλη	432	29.727	<b>0.495</b>	<b>0.745</b>	<b>0.665</b>	<b>0.000</b>
Παλατινιτόλη	361	41.590	s.p.	s.p.	0.750	0.496
Ονονιτόλη	217	27.183	0.645	<b>4.278</b>	<b>0.151</b>	<b>0.000</b>
Πινιτόλη	260	24.782	0.943	<b>2.964</b>	<b>0.318</b>	<b>0.001</b>
Οργανικά οξέα						
2-ισοπροπυλμηλικό οξύ	147	18.931	<b>0.509</b>	<b>0.534</b>	0.952	<b>0.011</b>
3-υδροκινναμωμικό οξύ	293	23.371	0.867	0.870	0.996	0.100
4-γουανιδιοβουτυρικό οξύ	174	17.698	<b>0.442</b>	<b>0.271</b>	1.631	<b>0.003</b>
4-υδροκινναμωμικό οξύ	293	26.346	0.927	<b>0.795</b>	1.165	<b>0.028</b>
6-υδροξυνικοτινικό οξύ	268	18.570	<b>0.000</b>	<b>0.425</b>	<b>n.d.</b>	<b>0.000</b>
Κιτραμηλικό οξύ	147	16.456	0.642	0.976	0.658	0.196
Κιτρικό οξύ	347	24.395	0.609	0.970	0.627	0.330
D-μηλικό οξύ	147	16.893	0.525	0.951	0.552	0.232
Φερουλικό οξύ	338	29.264	1.021	0.831	1.230	0.065
Φουμαρικό οξύ	245	13.148	<b>0.720</b>	<b>0.644</b>	1.119	<b>0.001</b>
Γαλακτουρονικό οξύ	333	24.550	0.495	1.313	0.377	<b>0.049</b>
Γλυκοεπτονικό οξύ	217	31.134	<b>0.810</b>	0.963	<b>0.841</b>	<b>0.001</b>
Γλυκονικό οξύ	333	27.476	0.758	0.659	1.150	0.730
Γλυκερικό οξύ	189	12.940	0.778	0.864	0.900	0.916
Ιμινοδιοξικό οξύ	232	18.301	0.511	<b>n.d.</b>	s.p.	<b>0.001</b>
L-γαλακτικό οξύ	147	6.432	1.937	1.153	1.681	0.173
Λακτοβιονικό οξύ	217	40.453	<b>0.454</b>	<b>1.917</b>	<b>0.237</b>	<b>0.000</b>
Μηλεϊναμικό οξύ	244	17.411	<b>0.208</b>	<b>0.169</b>	1.227	<b>0.008</b>
Μηλεϊνικό οξύ	147	12.083	0.481	0.583	0.825	0.219
Μηλονικό οξύ	147	9.500	<b>0.423</b>	<b>0.530</b>	0.798	<b>0.001</b>
Μεθυλμηλονικό οξύ	147	9.822	<b>n.d.</b>	2.209	<b>n.d.</b>	<b>0.012</b>
Βλεννικό οξύ	333	28.987	<b>1.945</b>	<b>3.023</b>	<b>0.643</b>	<b>0.000</b>
Σακχαρικό οξύ	333	28.402	<b>1.669</b>	<b>2.134</b>	<b>0.782</b>	<b>0.000</b>
Σικιμικό οξύ	204	24.205	1.168	0.898	1.301	0.054
Ηλεκτρικό οξύ	148	12.313	1.158	1.022	1.133	0.217
Τρυγικό οξύ	147	19.707	<b>n.d.</b>	<b>s.p.</b>	<b>n.d.</b>	<b>0.000</b>
Ταρτρωνικό οξύ	147	14.510	0.242	0.493	0.491	0.110
trans-ακονιτικό οξύ	229	22.730	1.216	0.854	1.425	0.087

Μεταβολίτης	m/z	RT	SU/S	SH/S	SU/SH	P
<b>Αζωτούχες ενώσεις</b>						
L-πυρογλουταμικό οξύ	156	17.487	1.500	0.293	5.127	0.490
1-μεθυλ-νικοτιναμίδη	179	15.974	2.079	8.011	0.260	0.110
3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταμικό οξύ	247	19.497	1.343	1.073	1.251	0.276
5'-δεοξυ-5'-(μεθυλθειο)αδενοσίνη	236	40.530	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	n.d.	<b>0.017</b>
Αδενίνη	264	24.964	1.364	0.939	1.452	0.191
Αδενοσίνη	236	38.433	0.148	1.094	0.135	0.261
Αλλαντοΐνη	331	25.705	<b>4.260</b>	0.000	<b>s.p.</b>	<b>0.000</b>
β-κυανο-L-αλανίνη	141	13.876	<b>0.571</b>	<b>0.014</b>	<b>41.498</b>	<b>0.000</b>
D-λυξοζαμίνη	217	21.227	3.179	<b>6.646</b>	0.478	<b>0.023</b>
gly-pro	174	27.403	0.561	0.721	0.779	0.471
L-νορλευκίνη	158	11.325	0.820	0.377	2.177	0.358
N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνη	319	30.263	1.127	1.306	0.863	0.499
N-μεθυλγλουταμικό οξύ	260	21.298	<b>2.412</b>	<b>0.021</b>	<b>115.574</b>	<b>0.000</b>
Παντοθενικό οξύ	291	27.664	<b>0.128</b>	<b>0.185</b>	0.688	<b>0.000</b>
Φαινυλαιθυλαμίνη	174	18.324	1.170	<b>2.890</b>	<b>0.405</b>	<b>0.003</b>
Πουτρεσκίνη	174	22.345	<b>0.417</b>	<b>0.310</b>	1.347	<b>0.000</b>
Σπερμιδίνη	174	32.267	<b>0.458</b>	<b>0.089</b>	5.143	<b>0.001</b>
Σφιγγοσίνη	204	36.123	0.309	1.103	0.280	0.693
Ουρία	147	10.280	<b>3.904</b>	1.176	<b>3.321</b>	<b>0.009</b>
<b>Φωσφορικές ενώσεις</b>						
6-φωσφογλυκονικό οξύ	387	35.051	<b>s.p.</b>	s.p.	<b>8.550</b>	<b>0.003</b>
6-φωσφορική-D-γλυκόζη	387	33.979	<b>2.458</b>	<b>1.661</b>	<b>1.480</b>	<b>0.000</b>
1-φωσφορική γλυκερόλη	357	23.245	<b>3.907</b>	1.433	<b>2.726</b>	<b>0.000</b>
Φωσφορικό οξύ	299	11.440	2.403	1.863	1.290	0.051
<b>Άλλες ενώσεις</b>						
2,3-διϋδροξυδιφαινύλιο	330	23.908	<b>9.187</b>	0.000	<b>s.p.</b>	<b>0.000</b>
Καρβαμικό οξύ (ουρεθάνη)	146	4.586	0.017	1.934	0.009	0.359
Κατεχίνη	368	41.996	5.832	<b>85.964</b>	<b>0.068</b>	<b>0.000</b>
Κονιφερυλοαλκοόλη	324	26.396	s.p.	s.p.	0.680	0.174
Δεϋδροασκορβικό οξύ	173	24.923	1.805	4.924	0.367	0.268
Γλυκονικό οξύ λακτόνη	275	25.784	1.364	0.828	<b>1.647</b>	<b>0.034</b>
Λογανίνη	361	41.758	2.201	1.927	1.142	0.133
μεθυλο-β-D-γαλακτοπυρανοσίδιο	204	26.103	<b>2.632</b>	1.135	<b>2.319</b>	<b>0.007</b>
φαινυλ-β-γλυκοπυρανοσίδιο	361	33.604	1.193	0.660	1.807	0.675
Φλωρογλυκινόλη	342	20.411	0.583	0.941	0.620	0.720
Πυρογαλλόλη	239	18.016	<b>26.634</b>	4.845	<b>5.497</b>	<b>0.000</b>
Ριβονικό οξύ-γ-λακτόνη	147	20.162	s.p.	<b>s.p.</b>	0.364	<b>0.008</b>
Συναπυλαλκοόλη	354	29.191	2.777	2.139	1.298	0.265
Ταξιφολίνη	368	42.039	<b>n.d.</b>	0.701	n.d.	<b>0.010</b>

**Πίνακας A.17:** Μεταβολίτες που ανιχνεύονται σε φύλλα φυτών *L. jaronicus* που είτε δεν εμβολιάστηκαν είτε εμβολιάστηκαν από το αζωτοδεσμευτικό ριζόβιο άγριου τύπου είτε με το *fix* στέλεχος *ΔnifH*.

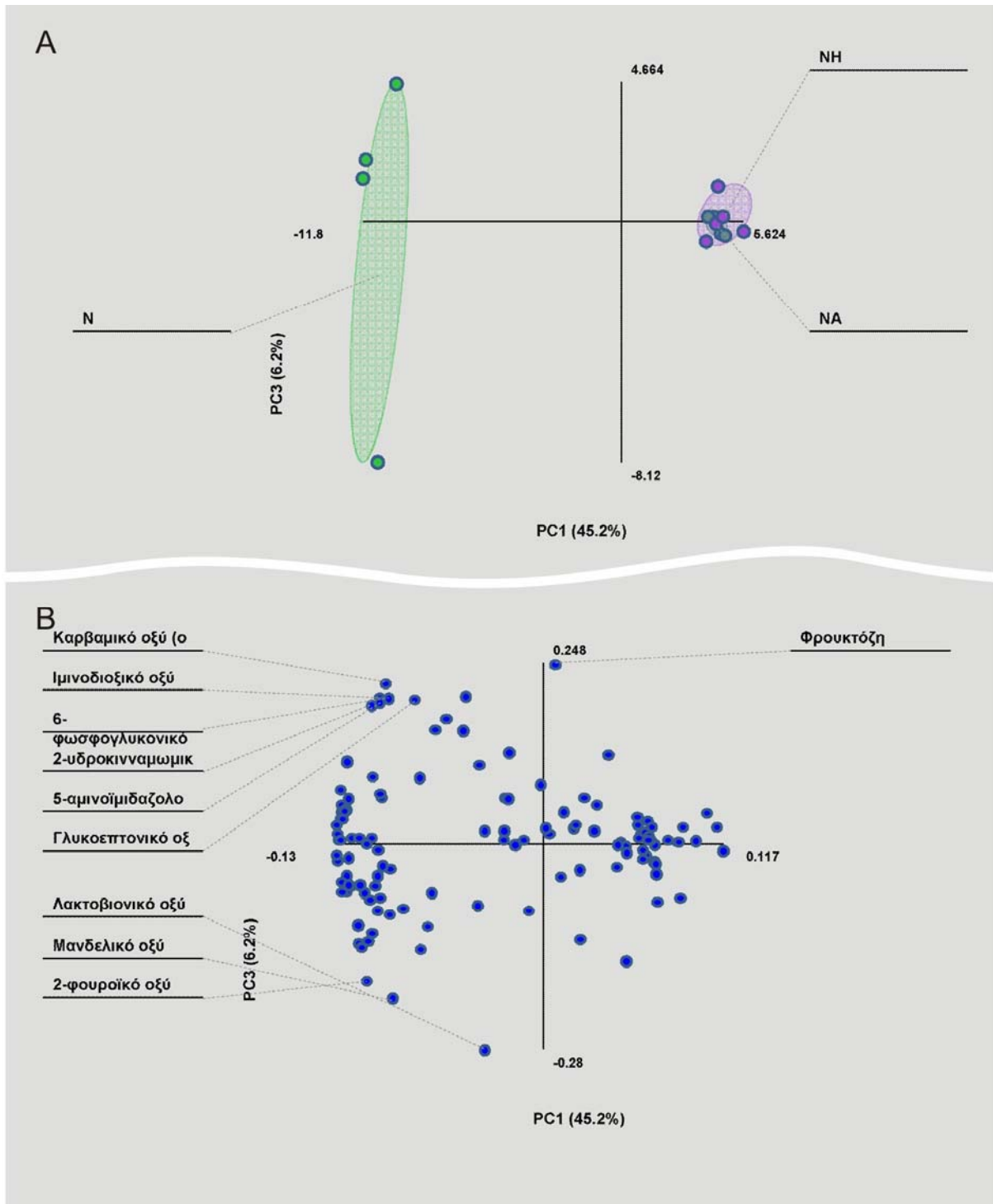
Για κάθε μεταβολίτη παρουσιάζεται η αναλογία μάζας προς φορτίο ( $m/z$ ), ο χρόνος έκλουσης (RT), ο λόγος της σχετικής απόκρισης σε φύλλα μη εμβολιασμένων φυτών (LU) και σε φύλλα φυτών εμβολιασμένων με το στέλεχος *ΔnifH* (LH), ως προς τη σχετική απόκριση σε φύλλα φυτών που εμβολιάστηκαν με το *M. loti* άγριου τύπου (L), καθώς και ο λόγος σχετικής απόκρισης σε φύλλα μη εμβολιασμένων φυτών ως προς τη σχετική απόκριση σε φύλλα φυτών εμβολιασμένων με το στέλεχος *ΔnifH*. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε πέντε βιολογικές επαναλήψεις. Οι λόγοι σχετικής απόκρισης που αντιπροσωπεύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P < 0.05$ ) επισημαίνονται με έντονη γραφή. Η τιμή  $P$  αντιπροσωπεύει το επίπεδο σημαντικότητας μεταξύ των σχετικών αποκρίσεων για κάθε μεταβολίτη (ANOVA), όταν τουλάχιστον δύο μέσοι όροι σχετικών αποκρίσεων είναι  $>0$ .

Μεταβολίτης	$m/z$	RT	LU/L	LH/L	LU/LH	$P$
<b>Αμινοξέα</b>						
L-σερίνη	204	13.696	<b>2.288</b>	<b>0.261</b>	<b>8.760</b>	<b>0.000</b>
Ασπαρτικό οξύ	232	17.622	<b>1.246</b>	<b>0.169</b>	<b>7.354</b>	<b>0.000</b>
β-αλανίνη	248	15.211	0.622	<b>0.158</b>	3.941	<b>0.001</b>
L-ισολευκίνη	158	11.883	0.584	1.023	0.571	0.429
Γλυκίνη	174	12.140	0.148	0.976	0.152	0.157
L-αλανίνη	116	7.235	<b>0.693</b>	<b>0.181</b>	<b>3.830</b>	<b>0.000</b>
L-ασπαραγίνη	231	21.044	<b>2.049</b>	<b>0.039</b>	<b>52.842</b>	<b>0.000</b>
L-γλουταμικό οξύ	246	19.868	0.612	<b>0.382</b>	1.601	<b>0.023</b>
L-γλουταμίνη	156	23.189	1.140	<b>0.012</b>	<b>97.078</b>	<b>0.000</b>
L-ομοσερίνη	218	15.902	<b>2.224</b>	0.436	<b>5.106</b>	<b>0.001</b>
L-λυσίνη	317	26.244	1.131	1.179	0.960	0.773
L-προλίνη	142	11.894	0.823	0.612	1.343	0.131
L-θρεονίνη	218	14.389	1.062	<b>0.223</b>	<b>4.758</b>	<b>0.000</b>
L-τροπτοφάνη	202	31.641	0.555	<b>10.554</b>	<b>0.053</b>	<b>0.000</b>
L-βαλίνη	144	9.907	<b>0.677</b>	0.897	0.755	<b>0.037</b>
Τυροσίνη	218	26.534	2.068	4.422	0.468	0.066
<b>Σάκχαρα</b>						
D-(+) αλτρούζη	205	26.461	s.p.	s.p.	0.098	<b>0.033</b>
Κυτταροβιόζη	361	37.768	0.338	<b>1.681</b>	<b>0.201</b>	<b>0.001</b>
D-(+) τρεχαλόζη	361	40.480	0.763	<b>1.670</b>	<b>0.457</b>	<b>0.003</b>
D-αλλόζη	319	26.077	3.576	<b>15.438</b>	<b>0.232</b>	<b>0.008</b>
D-γλυκόζη	319	26.164	0.159	1.621	<b>0.098</b>	<b>0.022</b>
D-λυξόζη	262	21.228	1.057	1.437	0.735	0.149
Φρουκτόζη	307	25.688	<b>0.414</b>	0.922	<b>0.449</b>	<b>0.000</b>
Ισομαλτόζη	361	41.763	2.702	<b>5.989</b>	0.451	<b>0.040</b>
Λακτόζη	361	37.843	1.210	1.639	0.738	0.576
Λακτουλόζη	204	36.931	0.185	1.202	0.154	0.091
Μαλτόζη	361	40.655	4.984	<b>14.278</b>	<b>0.349</b>	<b>0.005</b>
Μελιβιόζη	361	40.955	0.867	0.984	0.881	0.833
Ραφινόζη	87	49.005	0.347	<b>2.089</b>	<b>0.166</b>	<b>0.000</b>
Ριβόζη	217	21.557	1.025	n.d.	s.p.	0.150

Μεταβολίτης	m/z	RT	LU/L	LH/L	LU/LH	P
Άνυδρη μονοϋδρική σεδοεπτουλόζη	204	26.899	n.d.	1.168	0.000	0.013
Σοφορόζη	319	40.391	1.331	1.512	0.881	0.282
Σακχαρόζη	361	39.060	1.271	1.114	1.141	0.029
Ταγκατόζη	217	25.652	0.469	0.131	3.569	0.010
Πολυόλες						
Ακετόλη	219	18.567	0.482	2.255	0.214	0.000
D-μαννιτόλη	319	26.784	0.002	0.774	0.002	0.000
D-θρεϊτόλη	217	17.550	0.266	0.643	0.414	0.028
Γαλακτινόλη	204	43.854	0.469	7.684	0.061	0.000
Γλυκερόλη	147	11.489	0.372	1.405	0.265	0.072
Μυο-ινοσιτόλη	432	29.727	0.824	1.311	0.629	0.113
Παλατινιτόλη	361	41.590	0.568	0.730	0.778	0.236
Ονονιτόλη	217	27.183	2.305	4.920	0.468	0.020
Πινιτόλη	260	24.782	3.639	7.737	0.470	0.000
Οργανικά οξέα						
2-ισοπροπυλμηλικό οξύ	147	18.931	0.765	0.836	0.915	0.397
3-υδροκινναμωμικό οξύ	293	23.371	0.887	0.922	0.962	0.234
4-γουανιδοβουτυρικό οξύ	174	17.698	0.426	0.246	1.729	0.000
4-υδροκινναμωμικό οξύ	293	26.346	1.104	1.063	1.039	0.169
6-υδροξυνικοτινικό οξύ	268	18.570	n.d.	1.421	n.d.	0.114
Κιτρακονικό οξύ	147	13.315	0.589	2.611	0.226	0.000
Κιτραμηλικό οξύ	147	16.456	0.851	1.795	0.474	0.000
Κιτρικό οξύ	347	24.395	2.094	2.122	0.987	0.000
D-μηλικό οξύ	147	16.893	0.647	0.823	0.785	0.397
Φερουλικό οξύ	338	29.264	1.160	1.078	1.076	0.145
Φουμαρικό οξύ	245	13.148	0.781	0.637	1.226	0.000
Γαλακτουρονικό οξύ	333	24.550	0.647	0.194	3.340	0.005
Γλυκοεπτονικό οξύ	217	31.134	1.189	1.111	1.070	0.884
Γλυκονικό οξύ	333	27.476	1.744	3.620	0.482	0.025
Γλυκερικό οξύ	189	12.940	1.971	0.714	2.763	0.001
Γλυκολικό οξύ	147	6.695	0.788	0.620	1.271	0.000
Γουανιδοηλεκτρικό οξύ	444	27.151	0.319	n.d.	s.p.	0.044
Ιμινοδιοξικό οξύ	232	18.301	1.151	0.325	3.538	0.000
L-γαλακτικό οξύ	147	6.432	2.565	2.296	1.117	0.026
Λακτοβιονικό οξύ	217	40.453	0.566	1.231	0.460	0.001
Μηλειναμικό οξύ	244	17.411	0.224	0.146	1.538	0.000
Μηλεινικό οξύ	147	12.083	0.723	1.587	0.455	0.530
Μηλονικό οξύ	147	9.500	0.777	1.620	0.480	0.205
Μεθυλμηλονικό οξύ	147	9.822	1.688	5.231	0.323	0.070
Βλεννικό οξύ	333	28.987	1.187	1.248	0.951	0.195
Νικοτινικό οξύ	180	11.660	2.400	1.849	1.298	0.330
Πιπεκολικό οξύ	156	13.564	86.524	0.358	241.659	0.000
Σακχαρικό οξύ	333	28.402	1.249	1.545	0.808	0.015
Σικιμικό οξύ	204	24.205	0.603	0.298	2.022	0.007

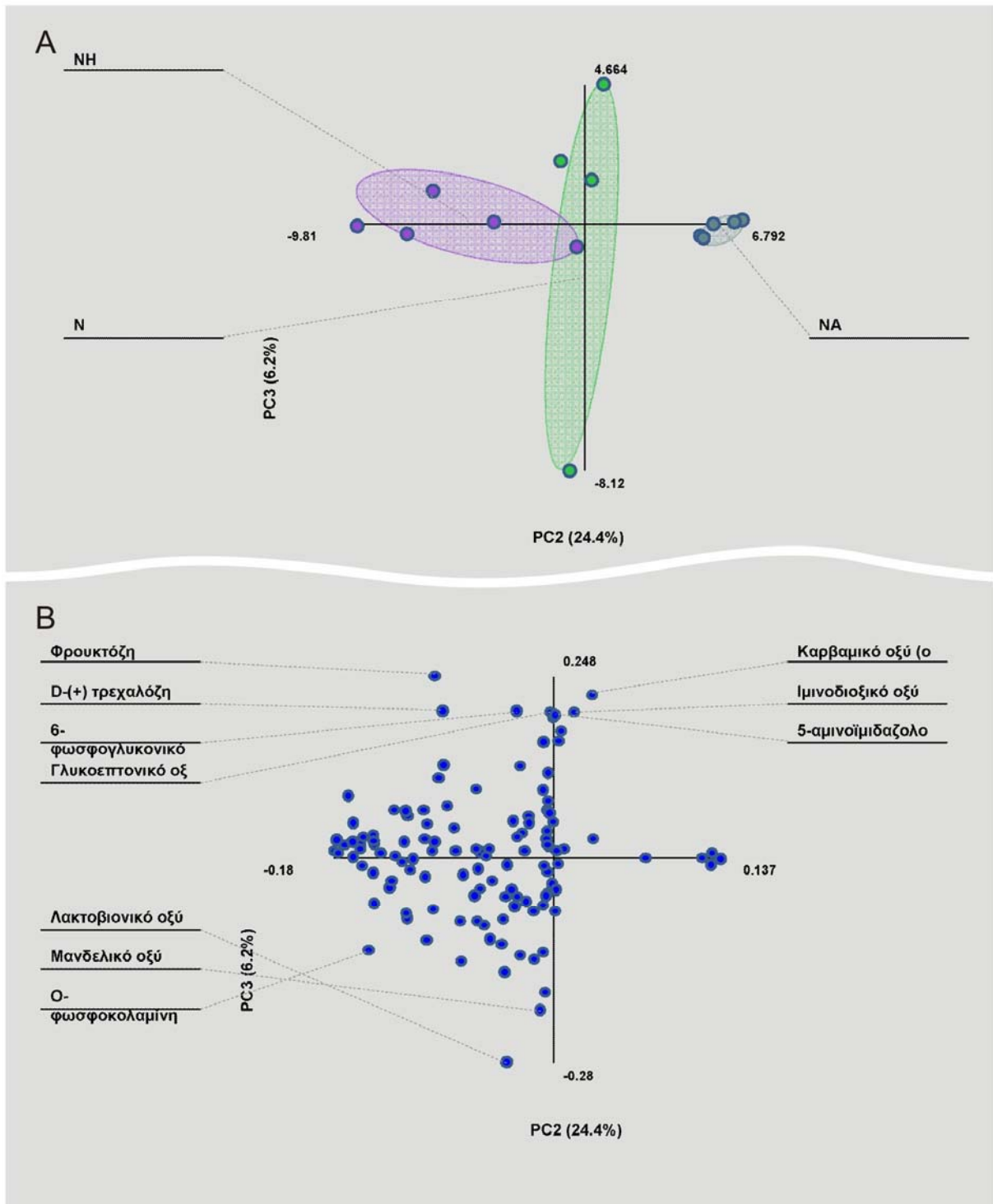


Μεταβολίτης	m/z	RT	LU/L	LH/L	LU/LH	P
Ηλεκτρικό οξύ	148	12.313	1.241	1.429	0.868	0.199
Τρυγικό οξύ	147	19.707	n.d.	<b>5.068</b>	<b>n.d.</b>	<b>0.000</b>
Ταρτρικό οξύ	147	14.510	0.438	0.567	0.773	<b>0.048</b>
trans-ακονιτικό οξύ	229	22.730	1.269	<b>2.471</b>	<b>0.514</b>	<b>0.000</b>
Αζωτούχες ενώσεις						
L-πυρογλουταμικό οξύ	156	17.487	4.399	1.162	3.787	0.105
1-μεθυλδαντοΐνη	171	12.504	<b>0.019</b>	<b>n.d.</b>	s.p.	<b>0.001</b>
3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρικό οξύ	247	19.497	1.173	1.018	1.152	0.735
5-αμινοβαλερικό οξύ	174	19.936	s.p.	n.d.	s.p.	<b>0.025</b>
5'-δεοξυ-5'-(μεθυλθειο)αδενοσίνη	236	40.530	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	n.d.	<b>0.000</b>
Αδενοσίνη	236	38.433	0.006	1.209	0.005	0.236
Αλλαντοΐνη	331	25.705	s.p.	n.d.	s.p.	<b>0.032</b>
β-κυανο-L-αλανίνη	141	13.876	<b>1.919</b>	<b>0.012</b>	<b>163.014</b>	<b>0.000</b>
Biuret	344	22.043	n.d.	s.p.	n.d.	0.066
D-λυξοζαμίνη	217	21.227	1.761	1.240	1.420	0.289
L-νορλευκίνη	158	11.325	0.540	1.212	0.446	0.348
N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνη	319	30.263	<b>0.801</b>	<b>1.183</b>	<b>0.677</b>	<b>0.000</b>
N-μεθυλαλανίνη	130	8.856	0.637	<b>n.d.</b>	<b>s.p.</b>	<b>0.001</b>
N-μεθυλγλουταμικό οξύ	260	21.298	1.174	<b>n.d.</b>	<b>s.p.</b>	<b>0.000</b>
Παντοθενικό οξύ	291	27.664	<b>0.076</b>	<b>0.179</b>	<b>0.423</b>	<b>0.000</b>
Πουτρεσίνη	174	22.345	0.880	<b>0.310</b>	<b>2.835</b>	<b>0.000</b>
Σπερμιδίνη	174	32.267	1.381	<b>0.186</b>	<b>7.440</b>	<b>0.000</b>
trans-4-υδροξυ-L-προλίνη	230	17.738	4.076	0.349	<b>11.665</b>	<b>0.028</b>
Ουρία	147	10.280	3.291	0.454	7.250	0.074
Φωσφορικές ενώσεις						
6-φωσφογλυκονικό οξύ	387	35.051	2.056	0.993	2.071	0.330
6-φωσφορική-D-γλυκόζη	387	33.979	<b>1.698</b>	1.283	1.323	<b>0.011</b>
1-φωσφορική γλυκερόλη	357	23.245	<b>1.698</b>	1.176	<b>1.444</b>	<b>0.007</b>
Φωσφορικό οξύ	299	11.440	<b>5.469</b>	2.043	<b>2.677</b>	<b>0.001</b>
Άλλες ενώσεις						
2,3-διϋδροξυδιφαινύλιο	330	23.908	<b>s.p.</b>	n.d.	<b>s.p.</b>	<b>0.016</b>
Καρβαμικό οξύ (ουρεθάνη)	146	4.586	0.872	4.505	0.193	<b>0.044</b>
Κατεχίνη	368	41.996	n.d.	<b>s.p.</b>	<b>n.d.</b>	<b>0.002</b>
Χρυσίνη	383	38.002	s.p.	s.p.	0.999	0.245
Δεϋδροασκορβικό οξύ	173	24.923	s.p.	s.p.	0.774	0.400
Γλυκονικό οξύ λακτόνη	275	25.784	0.737	0.791	0.932	0.243
L-ασκορβικό οξύ	332	26.988	n.d.	s.p.	n.d.	0.075
μεθυλο-β-D-γαλακτοπυρανοσίδιο	204	26.103	0.733	0.982	0.746	0.535
φαινυλ-β-γλυκοπυρανοσίδιο	361	33.604	1.204	1.798	0.670	0.426
Φλωρογλυκινόλη	342	20.411	1.446	1.227	1.179	0.694
Ριβονικό οξύ-γ-λακτόνη	147	20.162	4.616	12.670	0.364	0.229



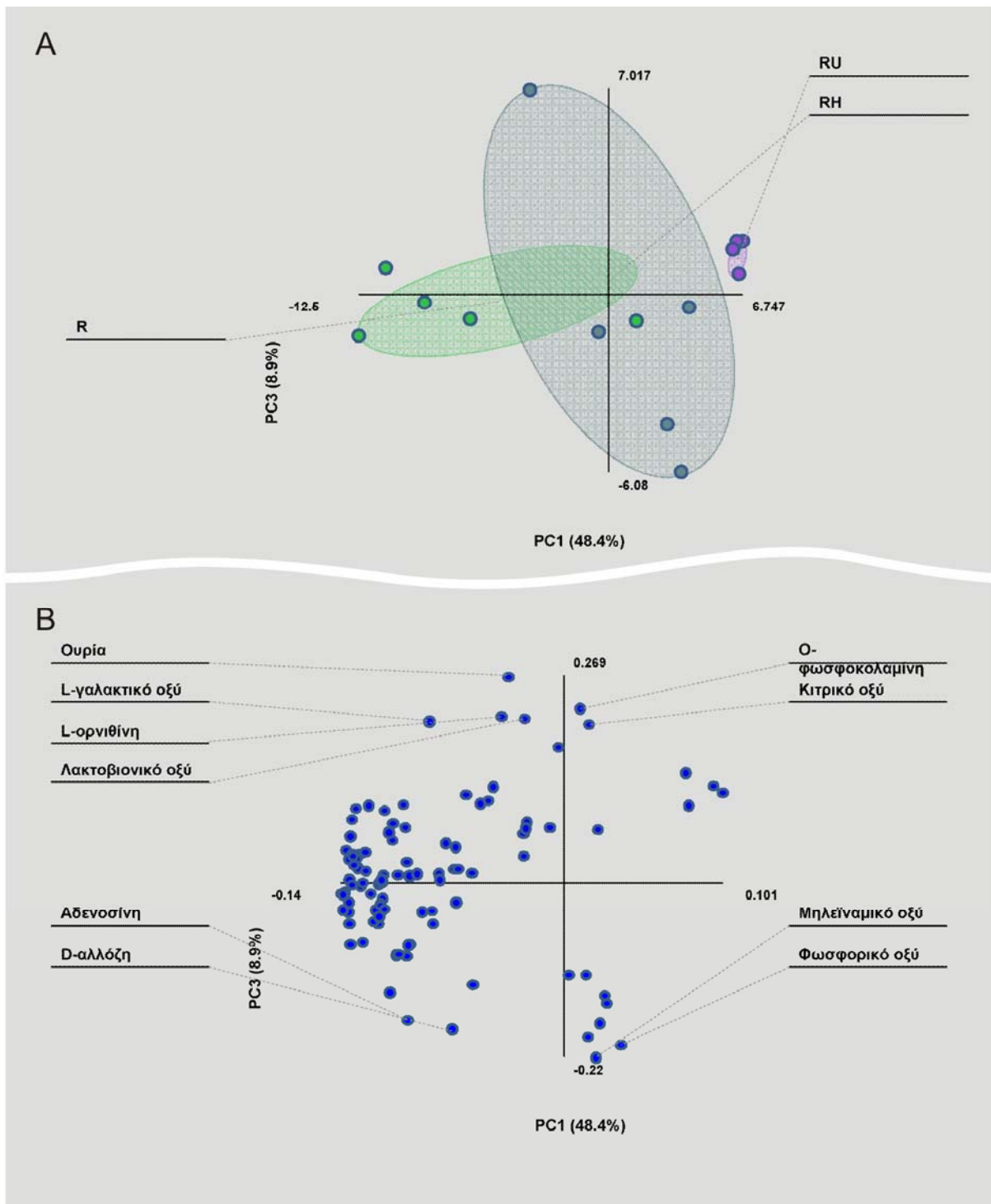
**Εικόνα A.1:** Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) των μεταβολομικών προτύπων φυματίων *L. jarrowii* που σχηματίστηκαν είτε από το αζωτοδεσμευτικό ριζόβιο άγριου τύπου είτε από τα *fix* στελέχη *ΔnifA* ή *ΔnifH*.

Για την ανάλυση κύριων συνιστωσών χρησιμοποιήθηκαν μετρήσεις από πέντε ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις για κάθε τύπο φυματίου. **(A)** Διάγραμμα των κύριων συνιστωσών 1 και 3 που αντιπροσωπεύουν το 51.4% της συνολικής παραλλακτικότητας που παρατηρείται στο μεταβολομικό πρότυπο των διαφορετικών τύπων φυματίων. **(B)** Διάγραμμα των βαρών (loadings) των συνιστωσών που δείχνουν τη μεγαλύτερη παραλλακτικότητα/διακύμανση στους διαφορετικούς τύπους φυματίων.



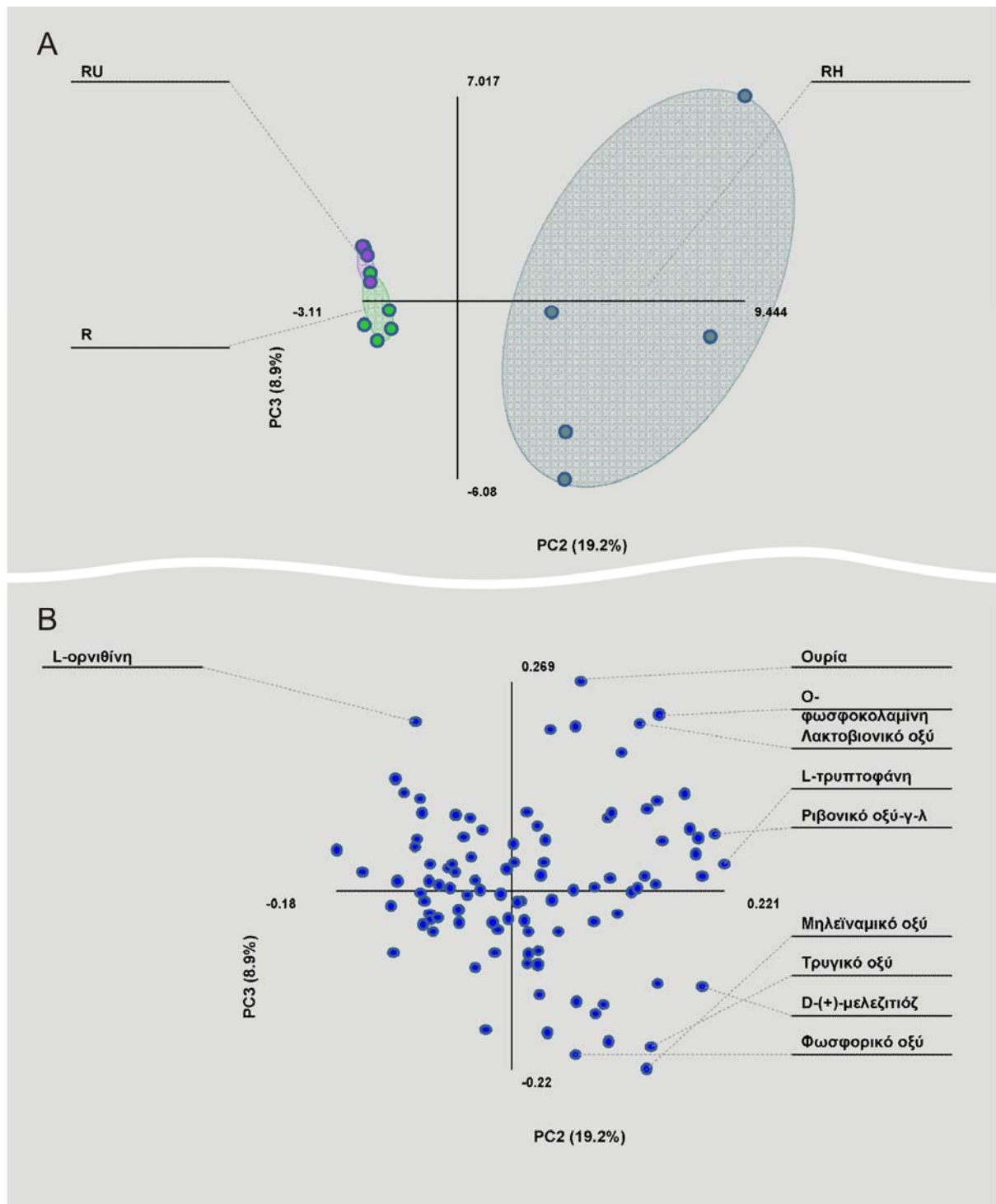
**Εικόνα A.2:** Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) των μεταβολομικών προτύπων φυματίων *L. jarrowii* που σχηματίστηκαν είτε από το αζωτοδεσμευτικό ριζόβιο άγριου τύπου είτε από τα *fix* στελέχη *ΔnifA* ή *ΔnifH*.

Για την ανάλυση κύριων συνιστωσών χρησιμοποιήθηκαν μετρήσεις από πέντε ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις για κάθε τύπο φυματίου. **(A)** Διάγραμμα των κύριων συνιστωσών 2 και 3 που αντιπροσωπεύουν το 30.6% της συνολικής παραλλακτικότητας που παρατηρείται στο μεταβολομικό πρότυπο των διαφορετικών τύπων φυματίων. **(B)** Διάγραμμα των βαρών (loadings) των συνιστωσών που δείχνουν τη μεγαλύτερη παραλλακτικότητα/διακύμανση στους διαφορετικούς τύπους φυματίων.



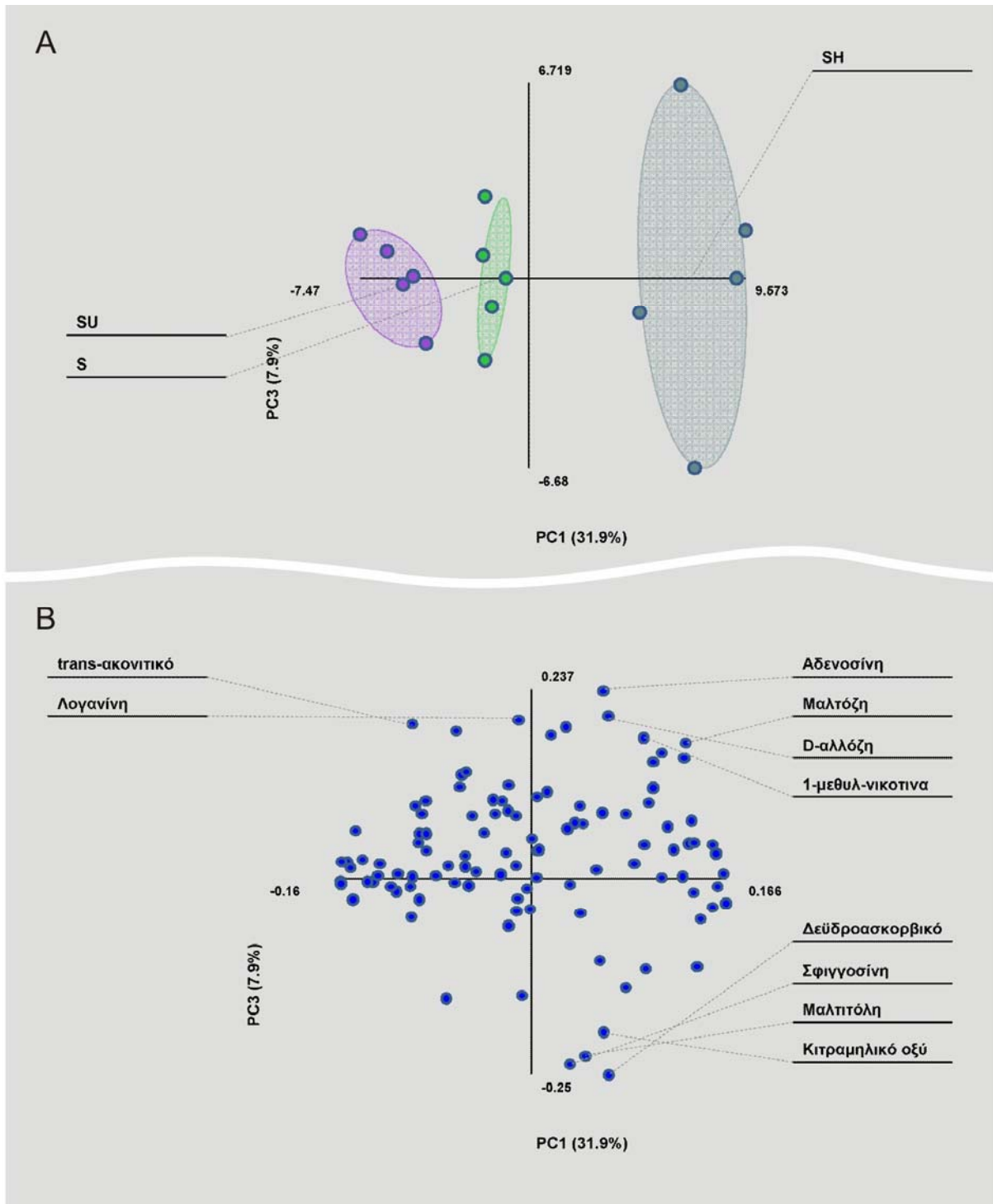
**Εικόνα Α.3:** Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) των μεταβολομικών προτύπων ριζών *L. japonicus* που είτε δεν εμβολιάστηκαν είτε εμβολιάστηκαν από το αζωτοδεσμευτικό ριζόβιο άγριου τύπου είτε με το *fix* στέλεχος *DnifH*.

Για την ανάλυση κύριων συνιστωσών χρησιμοποιήθηκαν μετρήσεις από πέντε ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις για κάθε τύπο ρίζας. **(Α)** Διάγραμμα των κύριων συνιστωσών 1 και 3 που αντιπροσωπεύουν το 57.3% της συνολικής παραλλακτικότητας που παρατηρείται στο μεταβολομικό πρότυπο των διαφορετικών τύπων ριζών. **(Β)** Διάγραμμα των βαρών (loadings) των συνιστωσών που δείχνουν τη μεγαλύτερη διακύμανση στους διαφορετικούς τύπους ριζών.



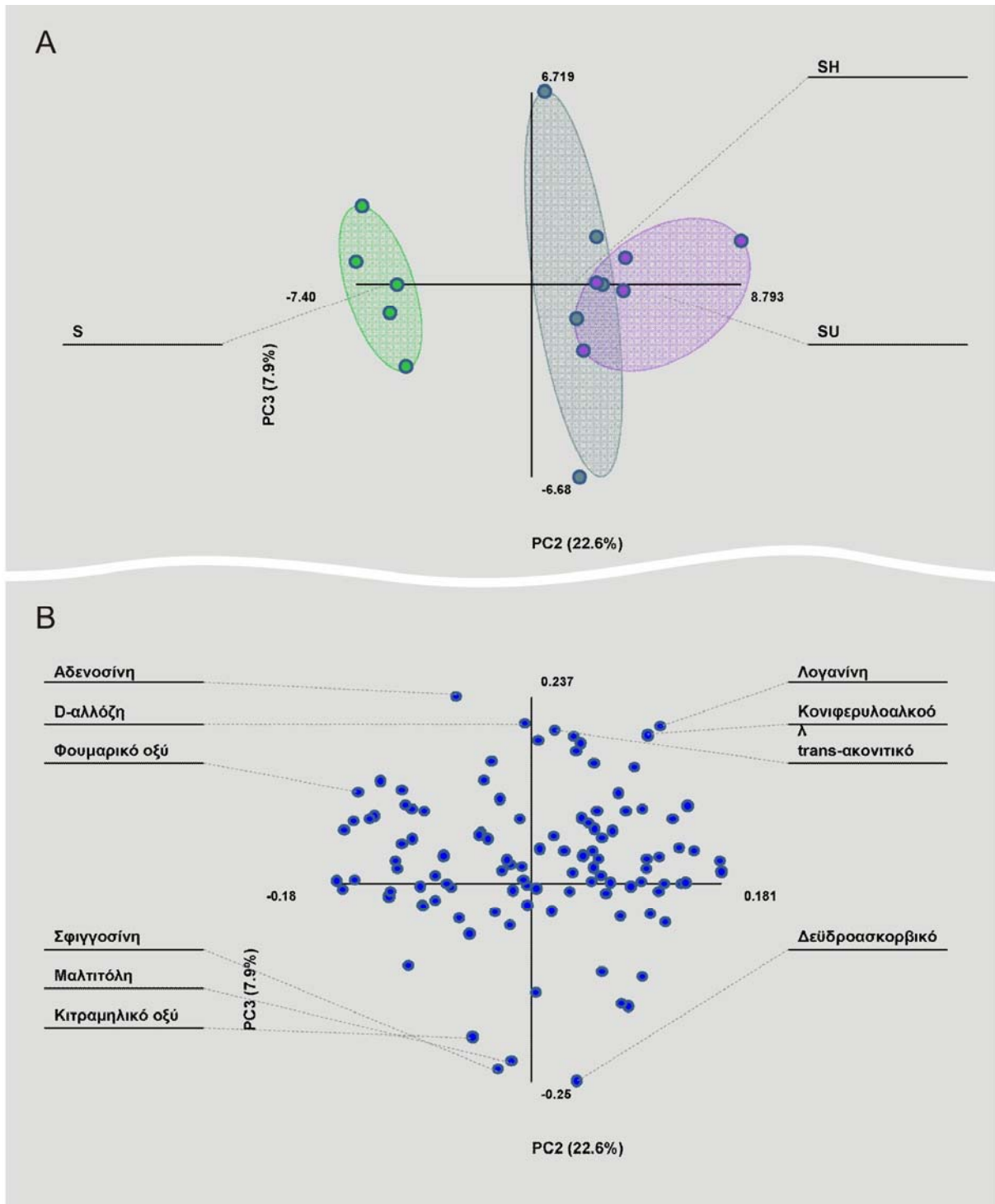
**Εικόνα A.4:** Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) των μεταβολομικών προτύπων ριζών *L. jaronicus* που είτε δεν εμβολιάστηκαν είτε εμβολιάστηκαν από το αζωτοδεσμευτικό ριζόβιο άγριου τύπου είτε με το *fix* στέλεχος *DnifH*.

Για την ανάλυση κύριων συνιστωσών χρησιμοποιήθηκαν μετρήσεις από πέντε ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις για κάθε τύπο ρίζας. **(Α)** Διάγραμμα των κύριων συνιστωσών 2 και 3 που αντιπροσωπεύουν το 28.1% της συνολικής παραλλακτικότητας που παρατηρείται στο μεταβολομικό πρότυπο των διαφορετικών τύπων ριζών. **(Β)** Διάγραμμα των βαρών (loadings) των συνιστωσών που δείχνουν τη μεγαλύτερη διακύμανση στους διαφορετικούς τύπους ριζών.



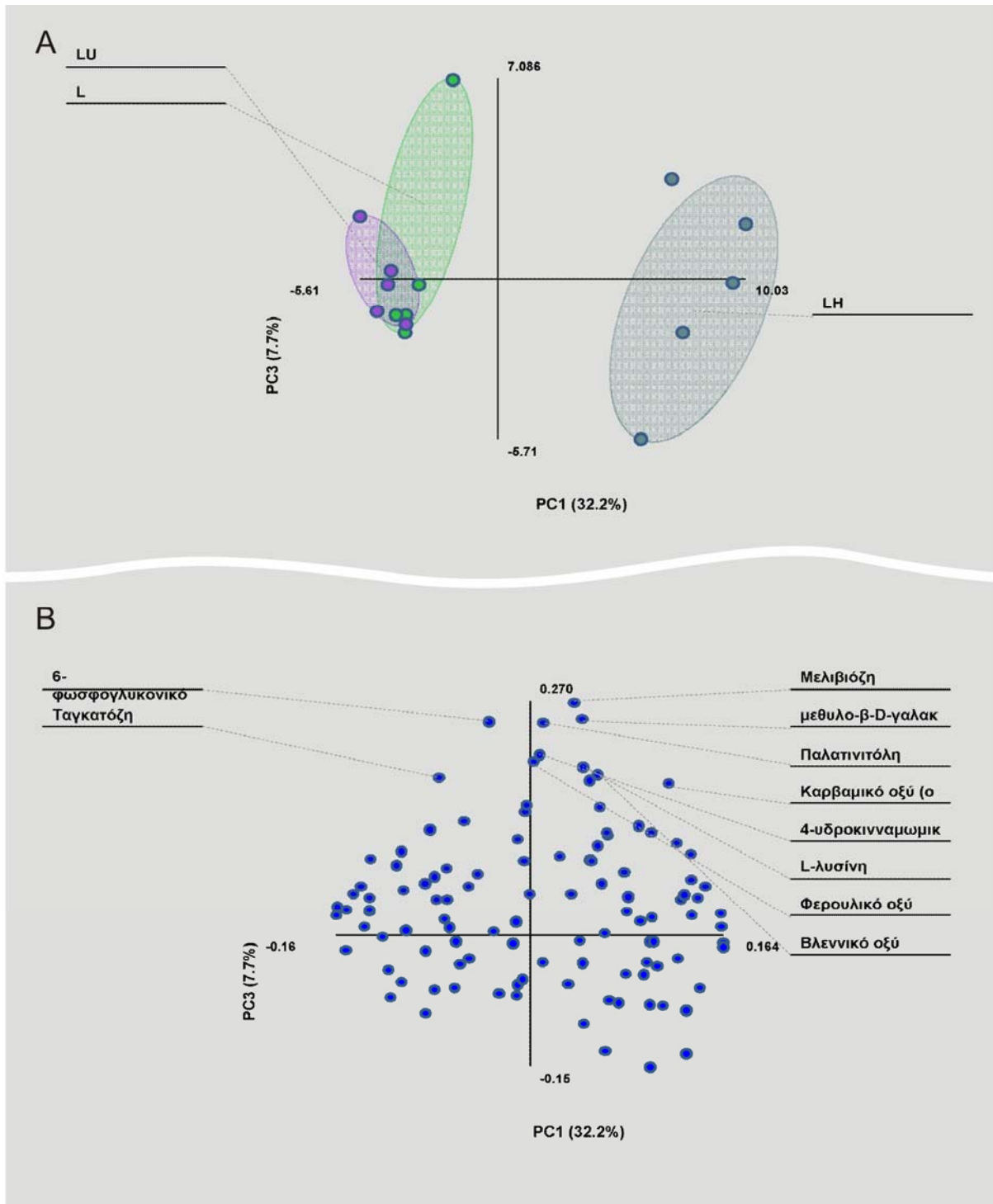
**Εικόνα Α.5:** Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) των μεταβολομικών προτύπων βλαστών φυτών *L. jarroviensis* που είτε δεν εμβολιάστηκαν είτε εμβολιάστηκαν από το αζωτοδεσμευτικό ριζόβιο άγριου τύπου είτε με το *fix* στέλεχος *ΔnifH*.

Για την ανάλυση κύριων συνιστωσών χρησιμοποιήθηκαν μετρήσεις από πέντε ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις για κάθε τύπο βλαστού. **(Α)** Διάγραμμα των κύριων συνιστωσών 1 και 3 που αντιπροσωπεύουν το 39.8% της συνολικής παραλλακτικότητας που παρατηρείται στο μεταβολομικό πρότυπο των διαφορετικών τύπων βλαστών. **(Β)** Διάγραμμα των βαρών (loadings) των συνιστωσών που δείχνουν τη μεγαλύτερη διακύμανση στους διαφορετικούς τύπους βλαστών.



**Εικόνα Α.6:** Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) των μεταβολομικών προτύπων βλαστών φυτών *L. jarroviensis* που είτε δεν εμβολιάστηκαν είτε εμβολιάστηκαν από το αζωτοδεσμευτικό ριζόβιο άγριου τύπου είτε με το *fix* στέλεχος *ΔnifH*.

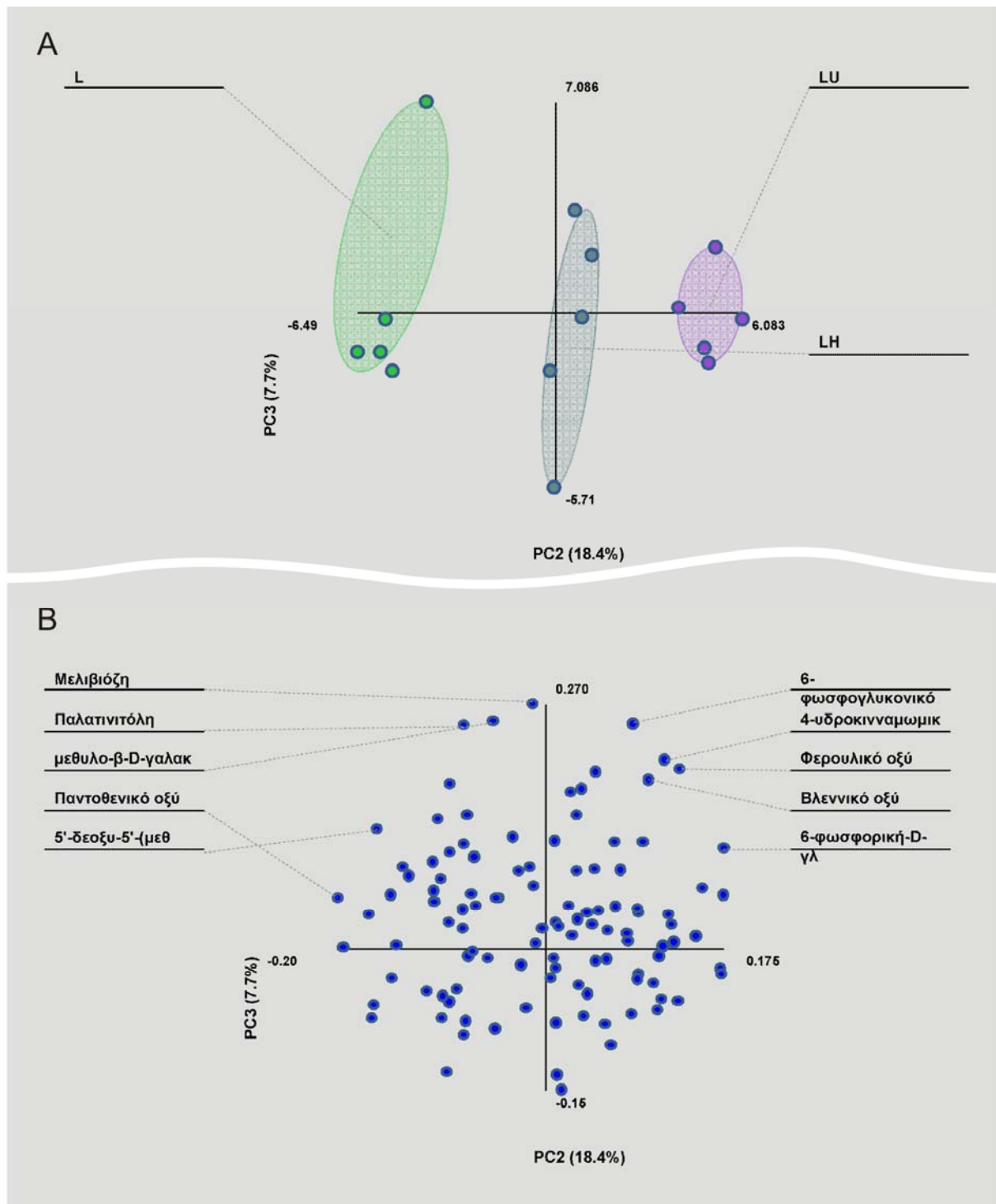
Για την ανάλυση κύριων συνιστωσών χρησιμοποιήθηκαν μετρήσεις από πέντε ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις για κάθε τύπο βλαστού. **(Α)** Διάγραμμα των κύριων συνιστωσών 2 και 3 που αντιπροσωπεύουν το 30.5% της συνολικής παραλλακτικότητας που παρατηρείται στο μεταβολομικό πρότυπο των διαφορετικών τύπων βλαστών. **(Β)** Διάγραμμα των βαρών (loadings) των συνιστωσών που δείχνουν τη μεγαλύτερη διακύμανση στους διαφορετικούς τύπους βλαστών.



**Εικόνα A.7:** Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) των μεταβολομικών προτύπων φύλλων φυτών *L. jarroii* που είτε δεν εμβολιάστηκαν είτε εμβολιάστηκαν από το αζωτοδεσμευτικό ριζόβιο άγριου τύπου είτε με το *fix* στέλεχος *ΔnifH*.

Για την ανάλυση κύριων συνιστωσών χρησιμοποιήθηκαν μετρήσεις από πέντε ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις για κάθε τύπο φύλλου. **(Α)** Διάγραμμα των κύριων συνιστωσών 1 και 3 που αντιπροσωπεύουν το 39.9% της συνολικής παραλλακτικότητας που παρατηρείται στο μεταβολομικό πρότυπο των διαφορετικών τύπων φύλλων. **(Β)** Διάγραμμα των βαρών (loadings) των συνιστωσών που δείχνουν τη μεγαλύτερη διακύμανση στους διαφορετικούς τύπους φύλλων.





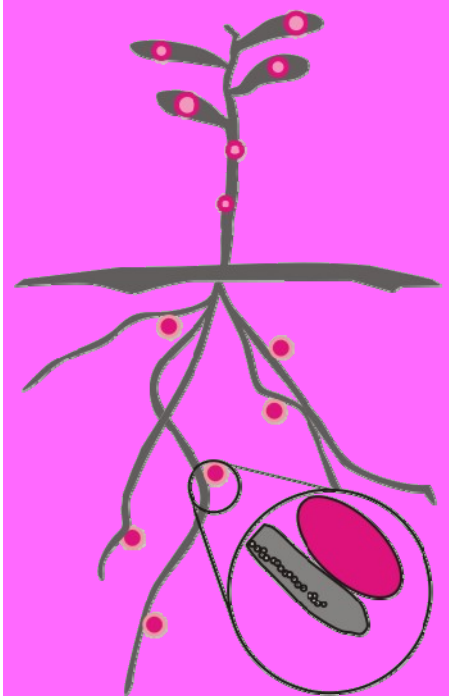
**Εικόνα A.8:** Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) των μεταβολομικών προτύπων φύλλων φυτών *L. jarroicus* που είτε δεν εμβολιάστηκαν είτε εμβολιάστηκαν από το αζωτοδεσμευτικό ριζόβιο άγριου τύπου είτε με το *fix* στέλεχος *ΔnifH*.

Για την ανάλυση κύριων συνιστωσών χρησιμοποιήθηκαν μετρήσεις από πέντε ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις για κάθε τύπο φύλλου. **(A)** Διάγραμμα των κύριων συνιστωσών 2 και 3 που αντιπροσωπεύουν το 26.1% της συνολικής παραλλακτικότητας που παρατηρείται στο μεταβολομικό πρότυπο των διαφορετικών τύπων φύλλων. **(B)** Διάγραμμα των βαρών (loadings) των συνιστωσών που δείχνουν τη μεγαλύτερη διακύμανση στους διαφορετικούς τύπους φύλλων.

Παράρτημα

Στατιστική  
ανάλυση

B



**Πίνακας Β.1:** Στατιστική ανάλυση των αλλαγών στο μεταγραφικό πρότυπο γονιδίων του *L. jaronicus* που εμπλέκονται στην πρόσληψη και το μεταβολισμό των θεικών κατά την ανάπτυξη φυματίων και στα μη-συμβιωτικά όργανα φυτών που εμβολιάστηκαν με το ριζόβιο *M. loti* wt.

Τα επίπεδα έκφρασης κανονικοποιήθηκαν με βάση τα μεταγραφήματα του σταθερά εκφραζόμενου γονιδίου της ουβικτινής. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τρεις ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P < 0.05$ ) επισημαίνονται με έντονη γραφή. N14, N21 και N28: φυμάτια 14, 21 και 28 ημερών, αντίστοιχα. R, S και L: ρίζες, βλαστοί και φύλλα αζωτοδεσμευτικών φυτών *L. jaronicus*, αντίστοιχα.

Γονίδιο	N14/R	N21/R	N28/R	N14/S	N21/S	N28/S	N14/L	N21/L	N28/L
<i>Sst1</i>	<b>0.014</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.002</b>	<b>0.013</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.002</b>	<b>0.012</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.002</b>
<i>LjSultr3.1a</i>	0.186	0.111	0.127	<b>0.014</b>	<b>0.014</b>	<b>0.014</b>	<b>0.022</b>	<b>0.021</b>	<b>0.020</b>
<i>LjSultr3.1b</i>	<b>0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.001</b>	<b>0.002</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.002</b>	<b>0.002</b>	<b>0.001</b>	<b>0.006</b>
<i>LjSultr3.3a</i>	0.064	0.200	<b>0.028</b>	0.147	0.052	0.107	<b>0.018</b>	<b>0.001</b>	<b>0.006</b>
<i>LjSultr3.3b</i>	<b>0.004</b>	<b>0.004</b>	<b>0.016</b>	0.567	0.126	0.334	0.124	<b>0.003</b>	<b>0.049</b>
<i>LjSultr3.4a</i>	<b>0.049</b>	<b>0.050</b>	<b>0.020</b>	<b>0.023</b>	<b>0.013</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.008</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>
<i>LjSultr1.1</i>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.015</b>	<b>0.030</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>
<i>LjSultr1.3</i>	0.095	0.108	0.085	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.770	0.377	0.470
<i>Atps</i>	<b>0.023</b>	<b>0.050</b>	<b>0.050</b>	<b>0.002</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.009</b>	<b>0.035</b>	<b>0.025</b>	<b>0.030</b>
<i>Apr1</i>	<b>0.009</b>	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	0.185	<b>0.009</b>	<b>0.021</b>	0.437	0.080	0.071
<i>Apr2</i>	<b>0.001</b>	0.097	0.644	<b>&lt;0.001</b>	0.407	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.001</b>	0.541	0.134
<i>Sir</i>	<b>0.049</b>	0.411	0.516	<b>0.046</b>	0.805	0.769	<b>0.009</b>	<b>0.021</b>	<b>0.028</b>
<i>Sat1</i>	0.163	0.326	0.538	<b>0.004</b>	<b>0.033</b>	<b>0.015</b>	<b>0.005</b>	<b>0.040</b>	<b>0.021</b>
<i>Sat2</i>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.002</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.015</b>	0.251	<b>0.013</b>	<b>0.005</b>	<b>0.018</b>	<b>0.005</b>
<i>Sat3</i>	<b>0.023</b>	<b>0.006</b>	<b>0.003</b>	<b>0.014</b>	<b>0.003</b>	<b>0.001</b>	<b>0.011</b>	<b>0.003</b>	<b>0.001</b>
<i>Sat4</i>	<b>0.028</b>	<b>0.045</b>	<b>0.002</b>	<b>0.005</b>	<b>0.029</b>	<b>0.033</b>	<b>0.046</b>	<b>0.036</b>	<b>0.015</b>
<i>Sat5</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Oastl1</i>	0.175	0.668	0.359	<b>0.043</b>	<b>0.004</b>	<b>0.005</b>	<b>0.014</b>	<b>0.002</b>	<b>0.002</b>
<i>Oastl2</i>	<b>0.047</b>	<b>0.023</b>	<b>0.027</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.002</b>	<b>0.002</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.003</b>
<i>Oastl3</i>	<b>0.015</b>	0.354	0.614	<b>0.022</b>	<b>0.032</b>	0.427	<b>0.049</b>	<b>0.008</b>	<b>&lt;0.001</b>
<i>Oastl4</i>	<b>0.008</b>	<b>0.012</b>	<b>0.014</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.003</b>	<b>0.002</b>	<b>0.002</b>	<b>0.005</b>	<b>0.005</b>
<i>Oastl5</i>	0.336	<b>0.013</b>	<b>0.032</b>	<b>0.027</b>	<b>0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.018</b>	<b>0.003</b>	<b>&lt;0.001</b>
<i>Oastl6</i>	<b>0.049</b>	<b>0.043</b>	0.497	<b>0.041</b>	<b>0.009</b>	<b>0.025</b>	<b>0.048</b>	<b>0.017</b>	0.376
<i>yeccs1</i>	0.511	<b>0.018</b>	<b>0.026</b>	0.171	0.666	0.926	0.058	0.113	0.257
<i>yeccs2</i>	<b>0.032</b>	<b>0.023</b>	<b>0.046</b>	0.847	0.465	0.269	0.171	0.251	0.082
<i>Gshs</i>	<b>0.005</b>	<b>0.024</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.004</b>	<b>0.019</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.004</b>	<b>0.019</b>	<b>&lt;0.001</b>
<i>Hgshs</i>	0.683	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.003</b>	0.171	0.915	0.409	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>

**Πίνακας Β.2:** Στατιστική ανάλυση των αλλαγών στο μεταγραφικό πρότυπο γονιδίων του *L. jarami-cus* που εμπλέκονται στην πρόσληψη και μεταβολισμό των θεικών κατά την ανάπτυξη φυματίων που σχηματίστηκαν από το ριζόβιο *M. loti wt*.

Τα επίπεδα έκφρασης κανονικοποιήθηκαν με βάση τα μεταγραφήματα του σταθερά εκφραζόμενου γονιδίου της ουβικτίνης. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τρεις ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P < 0.05$ ) επισημαίνονται με έντονη γραφή. N14, N21 και N28: φυμάτια 14, 21 και 28 ημερών, αντίστοιχα.

Γονίδιο	N14/N21	N14/N28	N21/N28
<i>Sst1</i>	0.818	0.663	0.748
<i>LjSultr3.1a</i>	0.726	0.625	0.830
<i>LjSultr3.1b</i>	0.080	<b>0.006</b>	<b>0.009</b>
<i>LjSultr3.3a</i>	0.105	0.680	<b>0.049</b>
<i>LjSultr3.3b</i>	0.091	0.178	0.558
<i>LjSultr3.4a</i>	<b>0.016</b>	<b>0.010</b>	<b>0.006</b>
<i>LjSultr1.1</i>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.334
<i>LjSultr1.3</i>	0.397	0.101	0.115
<i>Atps</i>	0.952	0.818	0.827
<i>Apr1</i>	<b>0.008</b>	<b>0.012</b>	0.595
<i>Apr2</i>	<b>&lt;0.001</b>	0.595	<b>0.027</b>
<i>Sir</i>	<b>0.032</b>	0.052	0.902
<i>Sat1</i>	0.946	0.452	0.566
<i>Sat2</i>	0.061	0.816	0.051
<i>Sat3</i>	<b>0.027</b>	<b>0.019</b>	0.724
<i>Sat4</i>	0.171	0.169	0.791
<i>Sat5</i>	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Oast11</i>	0.138	0.089	0.603
<i>Oast12</i>	0.177	0.244	0.779
<i>Oast13</i>	<b>0.050</b>	<b>0.026</b>	0.089
<i>Oast14</i>	0.328	0.819	0.457
<i>Oast15</i>	0.192	0.463	0.213
<i>Oast16</i>	0.353	0.139	0.109
<i>γecs1</i>	0.204	0.165	0.611
<i>γecs2</i>	0.455	0.187	0.83
<i>Gshs</i>	0.441	0.976	0.334
<i>Hgshs</i>	<b>&lt;0.001</b>	0.076	<b>0.006</b>

**Πίνακας Β.3:** Στατιστική ανάλυση των αλλαγών στο μεταγραφικό πρότυπο γονιδίων του *L. jarmouicensis* που εμπλέκονται στην πρόσληψη και μεταβολισμό των θεικών κατά την ανάπτυξη αζωτοδεσμευτικών και μη λειτουργικών φυματίων.

Τα επίπεδα έκφρασης κανονικοποιήθηκαν με βάση τα μεταγραφήματα του σταθερά εκφραζόμενου γονιδίου της ουβικτίνης. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τρεις ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P < 0.05$ ) επισημαίνονται με έντονη γραφή. N, NA και NH: φυμάτια που σχηματίστηκαν από το αζωτοδεσμευτικό στελέχος *M. loti* άγριου τύπου ή τα *fix*<sup>-</sup> μεταλλαγμένα στελέχη *ΔnifA* και *ΔnifH*, αντίστοιχα.

Γονίδιο	NA/N	NH/N	NA/NH
<i>Sst1</i>	<b>0.009</b>	<b>0.022</b>	<b>0.006</b>
<i>LjSultr3.1a</i>	<b>0.010</b>	<b>0.017</b>	0.420
<i>LjSultr3.1b</i>	<b>0.004</b>	<b>0.009</b>	0.069
<i>LjSultr3.3a</i>	<b>0.002</b>	<b>0.009</b>	0.131
<i>LjSultr3.3b</i>	<b>0.010</b>	<b>0.014</b>	0.771
<i>LjSultr3.4a</i>	<b>0.012</b>	<b>0.010</b>	0.221
<i>LjSultr1.1</i>	<b>0.008</b>	<b>0.002</b>	<b>0.032</b>
<i>LjSultr1.3</i>	0.374	0.578	0.336
<i>Atps</i>	0.302	<b>0.011</b>	<b>0.005</b>
<i>Apr1</i>	0.392	0.078	<b>0.002</b>
<i>Apr2</i>	<b>0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.008</b>
<i>Sir</i>	<b>0.033</b>	<b>0.019</b>	0.211
<i>Sat1</i>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.018</b>	0.511
<i>Sat2</i>	0.329	0.126	<b>0.026</b>
<i>Sat3</i>	0.079	0.226	0.054
<i>Sat4</i>	<b>0.017</b>	<b>0.012</b>	0.221
<i>Sat5</i>	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Oast11</i>	<b>0.007</b>	<b>0.008</b>	0.130
<i>Oast12</i>	<b>0.020</b>	<b>0.014</b>	0.280
<i>Oast13</i>	<b>0.003</b>	<b>0.004</b>	0.412
<i>Oast14</i>	<b>0.042</b>	<b>0.011</b>	0.373
<i>Oast15</i>	<b>0.008</b>	<b>0.004</b>	0.683
<i>Oast16</i>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.214
<i>γecs1</i>	<b>0.016</b>	<b>0.044</b>	0.076
<i>γecs2</i>	0.416	0.297	<b>0.006</b>
<i>Gshs</i>	<b>0.020</b>	0.066	<b>0.001</b>
<i>Hgshs</i>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.023</b>	<b>&lt;0.001</b>

**Πίνακας Β.4:** Στατιστική ανάλυση των αλλαγών στο μεταγραφικό πρότυπο γονιδίων του *L. jaronicus* που εμπλέκονται στην πρόσληψη και μεταβολισμό των θεικών στα μη-συμβιωτικά όργανα φυτών που εμβολιάστηκαν με το ριζόβιο *M. loti* wt σε σύγκριση με τα αντίστοιχα όργανα μη εμβολιασμένων φυτών.

Τα επίπεδα έκφρασης κανονικοποιήθηκαν με βάση τα μεταγραφήματα του σταθερά εκφραζόμενου γονιδίου της ουβικτίνης. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τρεις ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P < 0.05$ ) επισημαίνονται με έντονη γραφή. R, S και L: ρίζες, βλαστοί και φύλλα αζωτοδεσμευτικών φυτών *L. jaronicus*, αντίστοιχα. RU, SU και LU: ρίζες, βλαστοί και φύλλα μη εμβολιασμένων φυτών, αντίστοιχα.

Γονίδιο	R/RU	S/SU	L/LU
<i>Sst1</i>	<b>0.033</b>	0.121	0.374
<i>LjSultr3.1a</i>	0.269	0.058	0.381
<i>LjSultr3.1b</i>	0.185	<b>0.014</b>	<b>0.016</b>
<i>LjSultr3.3a</i>	0.228	0.252	<b>0.032</b>
<i>LjSultr3.3b</i>	0.207	0.898	0.631
<i>LjSultr3.4a</i>	0.568	<b>0.012</b>	0.762
<i>LjSultr1.1</i>	<b>0.002</b>	0.051	0.487
<i>LjSultr1.3</i>	0.306	<b>0.032</b>	0.972
<i>Atps</i>	0.660	<b>0.008</b>	0.222
<i>Apr1</i>	<b>0.006</b>	<b>0.002</b>	0.084
<i>Apr2</i>	0.541	<b>0.007</b>	0.084
<i>Sir</i>	0.373	<b>0.044</b>	0.577
<i>Sat1</i>	<b>0.023</b>	<b>0.009</b>	<b>0.015</b>
<i>Sat2</i>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.038</b>	0.798
<i>Sat3</i>	0.520	0.152	<b>0.010</b>
<i>Sat4</i>	0.081	<b>0.049</b>	<b>0.038</b>
<i>Sat5</i>	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Oastl1</i>	<b>0.003</b>	<b>0.042</b>	0.457
<i>Oastl2</i>	<b>0.004</b>	0.232	<b>0.001</b>
<i>Oastl3</i>	<b>0.020</b>	0.298	<b>0.001</b>
<i>Oastl4</i>	<b>0.027</b>	<b>0.038</b>	<b>0.033</b>
<i>Oastl5</i>	<b>0.009</b>	<b>0.012</b>	<b>0.005</b>
<i>Oastl6</i>	<b>0.022</b>	0.243	0.613
<i>γecs1</i>	<b>0.049</b>	<b>0.049</b>	0.178
<i>γecs2</i>	0.082	0.721	<b>0.051</b>
<i>Gshs</i>	0.315	0.558	0.106
<i>Hgshs</i>	<b>0.034</b>	0.191	<b>0.035</b>

**Πίνακας Β.5:** Στατιστική ανάλυση των αλλαγών στο μεταγραφικό πρότυπο γονιδίων του *L. jaronicus* που εμπλέκονται στην πρόσληψη και μεταβολισμό των θεικών στα μη-συμβιωτικά όργανα αζωτοδεσμευτικών και *fix* φυτών.

Τα επίπεδα έκφρασης κανονικοποιήθηκαν με βάση τα μεταγραφήματα του σταθερά εκφραζόμενου γονιδίου της ουβικτινής. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τρεις ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P < 0.05$ ) επισημαίνονται με έντονη γραφή. R, S και L: ρίζες, βλαστοί και φύλλα φυτών *L. jaronicus* που εμβολιάστηκαν με το *M. loti* άγριου τύπου, αντίστοιχα. RA, SA και LA: ρίζες, βλαστοί και φύλλα φυτών *L. jaronicus* που εμβολιάστηκαν με το μεταλλαγμένο στέλεχος *ΔnifA*, αντίστοιχα. RH, SH και LH: ρίζες, βλαστοί και φύλλα φυτών *L. jaronicus* που εμβολιάστηκαν με το μεταλλαγμένο στέλεχος *ΔnifH*, αντίστοιχα.

Γονίδιο	RA/R	RH/R	RA/RH	SA/S	SH/S	SA/SH	LA/L	LH/L	LA/LH
<i>Sst1</i>	<b>0.012</b>	0.820	<b>0.012</b>	0.148	0.051	0.210	0.440	0.586	0.922
<i>LjSultr3.1a</i>	0.594	0.731	0.442	0.069	0.216	<b>0.041</b>	0.590	0.331	0.110
<i>LjSultr3.1b</i>	0.054	0.626	0.131	0.350	0.998	0.307	<b>0.048</b>	0.341	0.086
<i>LjSultr3.3a</i>	0.340	0.490	0.380	<b>0.002</b>	<b>0.048</b>	0.100	<b>0.011</b>	<b>0.004</b>	<b>0.030</b>
<i>LjSultr3.3b</i>	0.247	0.524	0.528	<b>&lt;0.001</b>	0.079	0.055	0.053	0.052	<b>0.027</b>
<i>LjSultr3.4a</i>	0.573	0.651	0.721	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.081	0.608	0.157	0.344
<i>LjSultr1.1</i>	<b>0.015</b>	<b>0.007</b>	0.971	0.203	0.105	0.178	0.465	0.531	0.655
<i>LjSultr1.3</i>	0.289	0.992	0.388	0.418	0.190	0.581	0.086	0.353	0.564
<i>Atps</i>	0.128	0.367	0.208	0.752	<b>0.009</b>	<b>0.046</b>	0.126	0.287	0.330
<i>Apr1</i>	0.529	0.467	0.813	0.728	0.600	0.626	0.511	0.134	0.311
<i>Apr2</i>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.109	<b>0.011</b>	<b>0.023</b>	0.655	<b>0.026</b>	0.431	<b>0.026</b>
<i>Sir</i>	0.386	0.278	0.615	<b>0.012</b>	0.342	0.172	<b>0.019</b>	<b>0.013</b>	0.264
<i>Sat1</i>	<b>0.016</b>	<b>0.020</b>	0.863	<b>0.029</b>	<b>0.039</b>	0.331	<b>0.020</b>	<b>0.021</b>	0.572
<i>Sat2</i>	<b>0.011</b>	<b>0.014</b>	0.071	0.154	0.660	0.138	<b>0.012</b>	<b>0.042</b>	0.354
<i>Sat3</i>	0.138	0.124	0.791	0.846	0.874	0.998	<b>0.044</b>	0.087	0.229
<i>Sat4</i>	0.102	0.256	0.177	<b>0.004</b>	<b>0.008</b>	0.580	0.760	<b>0.042</b>	<b>0.031</b>
<i>Sat5</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Oast1</i>	<b>0.026</b>	<b>0.034</b>	0.702	0.645	0.649	0.232	0.154	0.067	0.505
<i>Oast2</i>	0.446	0.867	0.415	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.006</b>	0.816	<b>0.032</b>	<b>0.020</b>	0.199
<i>Oast3</i>	<b>0.039</b>	<b>0.032</b>	0.704	<b>0.002</b>	<b>0.007</b>	<b>0.027</b>	0.533	0.063	<b>0.047</b>
<i>Oast4</i>	0.799	0.987	0.665	0.277	0.051	0.609	<b>0.011</b>	<b>0.042</b>	0.616
<i>Oast5</i>	<b>0.043</b>	<b>0.021</b>	0.069	<b>0.014</b>	<b>0.007</b>	0.472	0.736	0.657	0.275
<i>Oast6</i>	0.747	0.327	0.348	0.966	0.761	0.665	0.748	0.706	0.547
<i>yeccs1</i>	<b>0.014</b>	<b>0.038</b>	0.053	<b>&lt;0.001</b>	0.135	0.121	0.759	<b>0.005</b>	0.184
<i>yeccs2</i>	0.170	0.052	<b>0.036</b>	0.524	0.839	0.601	0.360	0.057	0.299
<i>Gshs</i>	0.356	0.751	0.242	<b>0.011</b>	0.055	0.461	<b>0.017</b>	0.087	0.165
<i>Hgshs</i>	0.313	<b>0.030</b>	0.117	0.218	0.477	0.563	<b>0.019</b>	<b>0.026</b>	0.299

**Πίνακας Β.6:** Στατιστική ανάλυση των αλλαγών στο μεταγραφικό πρότυπο γονιδίων του *L. jarami-cus* που εμπλέκονται στην πρόσληψη και μεταβολισμό των θεικών στα φυμάτια κατά την έλλειψη άνθρακα.

Τα επίπεδα έκφρασης κανονικοποιήθηκαν με βάση τα μεταγραφήματα του σταθερά εκφραζόμενου γονιδίου της ουβικιτίνης. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τρεις ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P < 0.05$ ) επισημαίνονται με έντονη γραφή. NPh, D24 και D72: φυμάτια φυτών εμβολιασμένων με το *M. loti* άγριου τύπου που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου, που υποβλήθηκαν σε συνθήκες σκότους για 24 και 72 ώρες, αντίστοιχα.

Γονίδιο	D24/NPh	D72/NPh	D72/D24
<i>Sst1</i>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.017</b>
<i>LjSultr3.1a</i>	<b>0.007</b>	<b>0.002</b>	<b>0.004</b>
<i>LjSultr3.1b</i>	<b>0.002</b>	<b>0.002</b>	0.269
<i>LjSultr3.3a</i>	0.151	0.107	0.379
<i>LjSultr3.3b</i>	<b>0.007</b>	<b>0.013</b>	0.537
<i>LjSultr3.4a</i>	<b>0.049</b>	<b>0.049</b>	<b>0.042</b>
<i>LjSultr1.1</i>	<b>0.005</b>	<b>0.005</b>	0.086
<i>LjSultr1.3</i>	0.700	0.431	0.407
<i>Atps</i>	<b>0.001</b>	<b>0.010</b>	0.820
<i>Apr1</i>	0.108	0.084	0.542
<i>Apr2</i>	<b>0.006</b>	<b>0.005</b>	0.299
<i>Sir</i>	<b>0.046</b>	<b>0.039</b>	0.108
<i>Sat1</i>	<b>0.023</b>	<b>0.014</b>	0.118
<i>Sat2</i>	0.176	0.351	0.052
<i>Sat3</i>	0.372	<b>0.007</b>	<b>0.028</b>
<i>Sat4</i>	<b>0.002</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.944
<i>Sat5</i>	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Oast1</i>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.052
<i>Oast2</i>	<b>0.049</b>	<b>0.012</b>	0.163
<i>Oast3</i>	<b>0.016</b>	<b>0.014</b>	0.808
<i>Oast4</i>	<b>0.048</b>	<b>0.034</b>	0.092
<i>Oast5</i>	<b>0.027</b>	<b>0.018</b>	0.164
<i>Oast6</i>	<b>0.049</b>	<b>0.049</b>	0.124
<i>γecs1</i>	0.238	<b>0.180</b>	0.769
<i>γecs2</i>	0.165	<b>&lt;0.001</b>	0.713
<i>Gshs</i>	0.208	0.774	0.091
<i>Hgshs</i>	<b>0.041</b>	<b>0.036</b>	0.563



**Πίνακας Β.7:** Στατιστική ανάλυση των αλλαγών στο μεταβολομικό πρότυπο φυματίων *L. jarmonicus* που σχηματίστηκαν είτε από το αζωτοδεσμευτικό ριζόβιο άγριου τύπου είτε από τα *fix* στελέχη *ΔnifA* ή *ΔnifH*.

Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε πέντε βιολογικές επαναλήψεις. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P < 0.05$ ) επισημαίνονται με έντονη γραφή. Η τιμή  $P$  αντιπροσωπεύει το επίπεδο σημαντικότητας μεταξύ των σχετικών αποκρίσεων για κάθε μεταβολίτη (ANOVA), όταν τουλάχιστον δύο μέσοι όροι σχετικών αποκρίσεων είναι  $>0$ .  $m/z$ : αναλογία μάζας προς φορτίο, RT: χρόνος έκλουσης. N, NA και NH: φυμάτια που σχηματίστηκαν από το αζωτοδεσμευτικό στέλεχος *M. loti* άγριου τύπου ή τα *fix* μεταλλαγμένα στελέχη *ΔnifA* και *ΔnifH*, αντίστοιχα.

Μεταβολίτης	$m/z$	RT	NA/N	NH/N	NA/NH	$P$
<b>Αμινοξέα</b>						
L-σερίνη	204	13.696	<b>0.049</b>	0.259	1.000	<b>0.046</b>
Ασπαρτικό οξύ	232	17.622	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	0.195	<b>0.000</b>
β-αλανίνη	248	15.211	<b>0.000</b>	<b>0.001</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
Κυκλολευκίνη	156	13.545	1.000	1.000	1.000	0.745
L-ισολευκίνη	158	11.883	<b>0.030</b>	0.065	1.000	<b>0.020</b>
L-αλανίνη	116	7.235	<b>0.001</b>	<b>0.002</b>	1.000	<b>0.001</b>
L-ασπαραγίνη	231	21.044	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	1.000	<b>0.000</b>
L-γλουταμικό οξύ	246	19.868	1.000	1.000	0.430	0.328
L-γλουταμίνη	156	23.189	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	1.000	<b>0.000</b>
L-ιστιδίνη	154	26.191	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	1.000	<b>0.000</b>
L-ομοσερίνη	218	15.902	0.240	1.000	0.057	0.050
L-λυσίνη	317	26.244	<b>0.003</b>	<b>0.010</b>	1.000	<b>0.002</b>
L-μεθειονίνη	176	17.415	1.000	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
L-προλίνη	142	11.894	<b>0.000</b>	<b>0.001</b>	1.000	<b>0.000</b>
L-θρεονίνη	218	14.389	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	1.000	<b>0.000</b>
L-τροπτοφάνη	202	31.641	0.717	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
L-βαλίνη	144	9.907	<b>0.039</b>	0.285	0.870	<b>0.038</b>
Τυροσίνη	218	26.534	1.000	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
<b>Σάκχαρα</b>						
Κυτταροβιόζη	361	37.768	1.000	0.175	0.124	0.076
D-(+) τρεχαλόζη	361	40.480	0.084	1.000	0.108	<b>0.048</b>
D-(+)-μελεζιτόζη	361	50.441	0.132	<b>0.008</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
D-αλλόζη	319	26.077	1.000	0.075	0.066	<b>0.035</b>
D-γλυκόζη	319	26.164	1.000	0.248	<b>0.042</b>	<b>0.040</b>
D-λυσόζη	262	21.228	1.000	<b>0.003</b>	<b>0.007</b>	<b>0.002</b>
Φρουκτόζη	307	25.688	0.613	0.965	1.000	0.400
Ισομαλτόζη	361	41.763	1.000	0.221	0.415	0.158
Λακτόζη	361	37.843	0.718	<b>0.019</b>	0.183	<b>0.019</b>
Μαλτόζη	361	40.655	1.000	1.000	1.000	0.705
Μαλτοτριόζη	361	49.168	0.095	0.149	<b>0.002</b>	<b>0.002</b>
Μελιβιόζη	361	40.955	0.051	<b>0.006</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
Παλατινόζη	361	41.090	1.000	0.875	0.197	0.170
Ραφινόζη	87	49.005	0.229	<b>0.045</b>	<b>0.001</b>	<b>0.002</b>
Σακχαρόζη	361	39.060	1.000	1.000	1.000	0.736

Μεταβολίτης	m/z	RT	NA/N	NH/N	NA/NH	P
Ταγκατόζη	217	25.652	0.124	<b>0.002</b>	0.148	<b>0.003</b>
<b>Πολυόλες</b>						
Ακετόλη	219	18.567	<b>0.000</b>	0.611	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
D-μαννιτόλη	319	26.784	<b>0.000</b>	<b>0.002</b>	1.000	<b>0.000</b>
D-θρεϊτόλη	217	17.550	0.517	1.000	0.337	0.223
Γαλακτινόλη	204	43.854	1.000	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
Μυο-ινοσιτόλη	432	29.727	0.183	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
Παλατινιτόλη	361	41.590	<b>0.019</b>	0.207	0.658	<b>0.020</b>
Ονονιτόλη	217	27.1831	0.186	1.000	0.454	0.144
Πινιτόλη	260	24.7816	0.970	1.000	1.000	0.533
<b>Οργανικά οξέα</b>						
2-φουροϊκό οξύ	125	7.822	<b>0.024</b>	<b>0.024</b>	1.000	<b>0.011</b>
2-υδροκινναμωμικό οξύ	293	21.673	<b>0.034</b>	<b>0.034</b>	1.000	<b>0.016</b>
2-ισοπροπυλμηλικό οξύ	147	18.931	1.000	<b>0.003</b>	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>
4-γουανιδοβουτυρικό οξύ	174	17.698	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	0.732	<b>0.000</b>
4-υδροκινναμωμικό οξύ	293	26.346	<b>0.000</b>	<b>0.004</b>	0.499	<b>0.000</b>
6-υδροξυνικοτινικό οξύ	268	18.570	0.055	0.387	0.885	0.054
α-κετογλουταρικό οξύ	147	18.875	0.572	1.000	0.416	0.264
Κιτραμηλικό οξύ	147	16.456	<b>0.012</b>	<b>0.006</b>	1.000	<b>0.004</b>
Κιτρικό οξύ	347	24.395	1.000	0.334	0.198	0.135
D-μηλικό οξύ	147	16.893	<b>0.014</b>	1.000	<b>0.016</b>	<b>0.007</b>
Γαλακτουρονικό οξύ	333	24.550	0.661	0.936	0.110	0.103
Γλυκοεπτονικό οξύ	217	31.134	0.214	0.234	1.000	0.120
Γλυκονικό οξύ	333	27.476	<b>0.000</b>	<b>0.011</b>	0.240	<b>0.000</b>
Γλυκερικό οξύ	189	12.940	0.051	0.147	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>
Ιμινοδιοξικό οξύ	232	18.301	<b>0.008</b>	<b>0.004</b>	1.000	<b>0.002</b>
L-γαλακτικό οξύ	147	6.432	1.000	0.897	1.000	0.513
Λακτοβιονικό οξύ	217	40.453	1.000	1.000	1.000	0.642
Μηλεινάμικό οξύ	244	17.411	<b>0.007</b>	0.415	0.124	<b>0.007</b>
Μηλεινικό οξύ	147	12.083	<b>0.013</b>	0.124	0.717	<b>0.013</b>
Μηλονικό οξύ	147	9.500	<b>0.001</b>	<b>0.033</b>	0.324	<b>0.002</b>
Μανδελικό οξύ	179	16.460	0.113	0.113	1.000	0.058
Μεθυλμηλονικό οξύ	147	9.822	<b>0.004</b>	1.000	<b>0.006</b>	<b>0.002</b>
Βλεννικό οξύ	333	28.987	<b>0.011</b>	<b>0.008</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
Οξαλικό οξύ	147	7.870	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	0.867	<b>0.000</b>
Φαινυλοπυροσταφυλικό οξύ	116	19.002	<b>0.002</b>	<b>0.002</b>	1.000	<b>0.001</b>
Πικολονικό οξύ	180	12.461	<b>0.045</b>	<b>0.045</b>	1.000	<b>0.022</b>
Πιπεκολικό οξύ	156	13.564	1.000	1.000	0.546	0.394
Πυροσταφυλικό οξύ	174	6.214	1.000	<b>0.000</b>	<b>0.001</b>	<b>0.000</b>
Σακχαρικό οξύ	333	28.402	1.000	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
Σικιμικό οξύ	204	24.205	<b>0.000</b>	<b>0.001</b>	1.000	<b>0.000</b>
Ηλεκτρικό οξύ	148	12.313	<b>0.000</b>	0.231	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
trans-3-εξενοδιοϊκό οξύ	73	15.512	0.389	0.104	1.000	0.090
trans-ακονιτικό οξύ	229	22.730	0.532	1.000	1.000	0.386

Μεταβολίτης	m/z	RT	NA/N	NH/N	NA/NH	P
<b>Αζωτούχες ενώσεις</b>						
1-μεθυλ-νικοτιναμίδη	179	15.974	<b>0.008</b>	0.329	0.191	<b>0.009</b>
2-φαινυλακεταμίδιο	92	15.728	0.137	<b>0.001</b>	0.069	<b>0.002</b>
3,5-διυδροξυφαινυλογλυκίνη	355	26.344	<b>0.002</b>	<b>0.004</b>	1.000	<b>0.001</b>
3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρικό οξύ	247	19.497	0.126	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
4-υδροξυβενζυλο κυάνιο	190	17.117	0.923	0.069	0.446	0.066
4-υδροξυμανδελονιτρίλιο	223	16.600	1.000	0.090	0.175	0.063
5-αμινοϊμιδαζολο-4-καρβοξαμίδιο	237	23.929	<b>0.038</b>	0.069	1.000	<b>0.024</b>
5'-δεοξυ-5'-(μεθυλθειο)αδενοσίνη	236	40.530	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	1.000	<b>0.000</b>
5-υδροξυ-L-τρυπτοφάνη	290	34.483	1.000	<b>0.006</b>	<b>0.020</b>	<b>0.004</b>
Αδενίνη	264	24.964	<b>0.003</b>	0.691	<b>0.034</b>	<b>0.003</b>
Αδενοσίνη	236	38.433	<b>0.000</b>	<b>0.001</b>	<b>0.018</b>	<b>0.000</b>
β-κυανο-L-αλανίνη	141	13.876	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	1.000	<b>0.000</b>
DL-2-αμινο-3-φωσφοπροπιονικό οξύ	340	23.698	<b>0.003</b>	<b>0.003</b>	1.000	<b>0.001</b>
D-λυξοζαμίνη	217	21.227	0.639	0.386	1.000	0.263
Υποξανθίνη	265	23.716	<b>0.009</b>	<b>0.041</b>	1.000	<b>0.007</b>
L-νορλευκίνη	158	11.325	1.000	1.000	1.000	0.657
N-μεθυλγλουταμικό οξύ	260	21.298	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	1.000	<b>0.000</b>
Οροτικό οξύ	254	22.674	<b>0.004</b>	<b>0.004</b>	1.000	<b>0.002</b>
Παντοθενικό οξύ	291	27.664	<b>0.008</b>	0.076	0.765	<b>0.008</b>
Φαινυλαιθυλαμίνη	174	18.324	<b>0.042</b>	0.175	1.000	<b>0.037</b>
Πουτρεσκίνη	174	22.345	<b>0.000</b>	<b>0.001</b>	0.962	<b>0.000</b>
Σπερμιδίνη	174	32.267	<b>0.001</b>	<b>0.000</b>	1.000	<b>0.000</b>
Ουρακίλη	241	12.975	<b>0.005</b>	<b>0.009</b>	1.000	<b>0.003</b>
Ουρία	147	10.280	1.000	1.000	1.000	0.832
<b>Φωσφορικές ενώσεις</b>						
3-φωσφογλυκερικό	357	23.773	0.522	0.522	1.000	0.286
3-φωσφογλυκερικό οξύ	387	24.186	<b>0.024</b>	<b>0.024</b>	1.000	<b>0.011</b>
6-φωσφογλυκονικό οξύ	387	35.051	<b>0.029</b>	0.111	1.000	<b>0.024</b>
5'-μονοφωσφορική αδενοσίνη	315	44.459	<b>0.004</b>	<b>0.004</b>	1.000	<b>0.002</b>
5'-μονοφωσφορική κυτινίνη	299	28.329	<b>0.039</b>	<b>0.039</b>	1.000	<b>0.018</b>
6-φωσφορική-D-γλυκόζη	387	33.979	0.350	0.192	<b>0.009</b>	<b>0.010</b>
1-φωσφορική γλυκερόλη	357	23.245	<b>0.000</b>	1.000	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
O-φωσφοκολαμίνη	299	23.494	1.000	<b>0.037</b>	<b>0.034</b>	<b>0.017</b>
O-φωσφο-L-θρεονίνη	370	24.501	<b>0.003</b>	<b>0.003</b>	1.000	<b>0.001</b>
Φωσφορικό οξύ	299	11.440	0.145	<b>0.001</b>	<b>0.036</b>	<b>0.001</b>
5-φωσφορική ριβουλόζη	357	30.442	0.181	<b>0.002</b>	0.098	<b>0.003</b>
<b>Άλλες ενώσεις</b>						
2,3-διϋδροξυδιφαινύλιο	330	23.908	<b>0.024</b>	<b>0.024</b>	1.000	<b>0.011</b>
Αρβουτίνη	254	37.925	1.000	<b>0.036</b>	<b>0.033</b>	<b>0.016</b>
Καρβαμικό οξύ (ουρεθάνη)	146	4.586	0.171	<b>0.041</b>	1.000	<b>0.036</b>
Κατεχίνη	368	41.996	<b>0.004</b>	<b>0.001</b>	1.000	<b>0.001</b>
Χρυσίνη	383	38.002	1.000	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>

Μεταβολίτης	m/z	RT	NA/N	NH/N	NA/NH	P
Κονιφερυλοαλκοόλη	324	26.396	0.793	0.083	0.623	0.080
Δειύδροασκορβικό οξύ	173	24.923	0.149	1.000	<b>0.025</b>	<b>0.023</b>
Γλυκονικό οξύ λακτόνη	275	25.784	<b>0.001</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
Λογανίνη	361	41.758	0.921	1.000	1.000	0.534
Φαινυλακεταλδεύδη	117	7.926	<b>0.041</b>	0.064	1.000	<b>0.024</b>
Φλωροβενζοφαινόνη	431	32.027	<b>0.006</b>	<b>0.006</b>	1.000	<b>0.003</b>

**Πίνακας Β.8:** Στατιστική ανάλυση των αλλαγών στο μεταβολομικό πρότυπο ριζών *L. jaronicus* που είτε δεν εμβολιάστηκαν είτε εμβολιάστηκαν από το αζωτοδεσμευτικό ριζόβιο άγριου τύπου είτε με το *fix* στέλεχος *ΔnifH*.

Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε πέντε βιολογικές επαναλήψεις. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P < 0.05$ ) επισημαίνονται με έντονη γραφή. Η τιμή  $P$  αντιπροσωπεύει το επίπεδο σημαντικότητας μεταξύ των σχετικών αποκρίσεων για κάθε μεταβολίτη (ANOVA), όταν τουλάχιστον δύο μέσοι όροι σχετικών αποκρίσεων είναι  $>0$ . m/z: αναλογία μάζας προς φορτίο, RT: χρόνος έκλουσης. RU, R και RH: μη εμβολιασμένες ρίζες, ρίζες εμβολιασμένες με το *M. loti* άγριου τύπου και ρίζες που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος *ΔnifH*, αντίστοιχα.

Μεταβολίτης	m/z	RT	RU/R	RH/R	RU/RH	P
<b>Αμινοξέα</b>						
L-σερίνη	204	13.696	<b>0.003</b>	<b>0.005</b>	1.000	<b>0.002</b>
Ασπαρτικό οξύ	232	17.622	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	1.000	<b>0.000</b>
β-αλανίνη	248	15.211	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	1.000	<b>0.000</b>
Κυκλολευκίνη	156	13.545	0.224	0.079	1.000	0.063
L-ισολευκίνη	158	11.883	0.305	0.334	1.000	0.173
L-αλανίνη	116	7.235	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	0.305	<b>0.000</b>
L-ασπαραγίνη	231	21.044	<b>0.005</b>	<b>0.000</b>	<b>0.019</b>	<b>0.000</b>
L-γλουταμικό οξύ	246	19.868	0.139	0.140	1.000	0.073
L-γλουταμίνη	156	23.189	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	0.653	<b>0.000</b>
L-ιστιδίνη	154	26.191	<b>0.026</b>	<b>0.018</b>	1.000	<b>0.010</b>
L-ομοσερίνη	218	15.902	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	0.347	<b>0.000</b>
L-λευκίνη	158	11.300	0.239	0.124	1.000	0.087
L-λυσίνη	317	26.244	<b>0.036</b>	<b>0.020</b>	1.000	<b>0.012</b>
L-μεθειονίνη	176	17.415	<b>0.020</b>	0.173	0.784	<b>0.020</b>
L-ορνιθίνη	174	24.154	1.000	0.138	0.112	0.064
L-προλίνη	142	11.894	0.137	0.096	1.000	0.059
L-θρεονίνη	218	14.389	<b>0.001</b>	<b>0.003</b>	1.000	<b>0.001</b>
L-τροπτοφάνη	202	31.641	1.000	<b>0.001</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
L-βαλίνη	144	9.907	<b>0.007</b>	<b>0.001</b>	0.795	<b>0.001</b>
Τυροσίνη	218	26.534	<b>0.004</b>	0.185	0.194	<b>0.005</b>
<b>Σάκχαρα</b>						
Κυτταροβιόζη	361	37.768	1.000	0.624	0.175	0.149
D-(+) τρεχαλόζη	361	40.480	<b>0.002</b>	0.097	0.159	<b>0.002</b>
D-(+)-μελεζιτόζη	361	50.441	1.000	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	<b>0.000</b>
D-αλλόζη	319	26.077	<b>0.040</b>	0.768	<b>0.004</b>	<b>0.004</b>
D-γλυκόζη	319	26.164	<b>0.003</b>	0.344	0.063	<b>0.003</b>

Μεταβολίτης	m/z	RT	RU/R	RH/R	RU/RH	P
D-λυσόζη	262	21.228	<b>0.001</b>	1.000	<b>0.005</b>	<b>0.001</b>
Φρουκτόζη	307	25.688	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.005</b>	<b>0.000</b>
Μαλτόζη	361	40.655	0.053	1.000	0.159	<b>0.042</b>
Μελιβιόζη	361	40.955	<b>0.005</b>	1.000	<b>0.005</b>	<b>0.002</b>
Ραφινόζη	87	49.005	<b>0.000</b>	0.059	<b>0.020</b>	<b>0.000</b>
Άνυδρη μονοϋδρική σεδοεπτου- λόζη	204	26.899	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	1.000	<b>0.000</b>
Σοφορόζη	319	40.391	0.398	1.000	0.093	0.083
Σακχαρόζη	361	39.060	<b>0.003</b>	<b>0.001</b>	0.994	<b>0.000</b>
Ταγκατόζη	217	25.652	<b>0.000</b>	1.000	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
Πολυόλες						
Ακετόλη	219	18.567	<b>0.041</b>	0.113	1.000	<b>0.031</b>
D-μαννιτόλη	319	26.784	<b>0.000</b>	<b>0.003</b>	<b>0.019</b>	<b>0.000</b>
D-σορβιτόλη	319	26.785	0.205	0.204	1.000	0.109
Γαλακτινόλη	204	43.854	<b>0.001</b>	0.968	<b>0.003</b>	<b>0.000</b>
Μυο-ινοσιτόλη	432	29.727	<b>0.001</b>	1.000	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
Παλατινιτόλη	361	41.590	<b>0.034</b>	0.322	0.713	<b>0.035</b>
Ονονιτόλη	217	27.183	1.000	0.265	0.421	0.178
Πινιτόλη	260	24.782	1.000	0.242	0.411	0.166
Οργανικά οξέα						
2-ισοπροπυλμηλικό οξύ	147	18.931	<b>0.001</b>	1.000	<b>0.003</b>	<b>0.001</b>
4-γουανιδοβουτυρικό οξύ	174	17.698	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	0.587	<b>0.000</b>
4-υδροκινναμωμικό οξύ	293	26.346	<b>0.002</b>	<b>0.023</b>	0.474	<b>0.002</b>
6-υδροξυνικοτινικό οξύ	268	18.570	<b>0.031</b>	0.332	0.638	<b>0.032</b>
α-κετογλουταρικό οξύ	147	18.875	<b>0.002</b>	<b>0.048</b>	0.346	<b>0.002</b>
Κιτρακονικό οξύ	147	13.315	<b>0.000</b>	<b>0.004</b>	<b>0.040</b>	<b>0.000</b>
Κιτραμηλικό οξύ	147	16.456	0.083	0.336	1.000	0.073
Κιτρικό οξύ	347	24.395	0.789	1.000	1.000	0.518
D-μηλικό οξύ	147	16.893	<b>0.003</b>	0.512	0.051	<b>0.004</b>
Γαλακτουρονικό οξύ	333	24.550	1.000	0.164	0.101	0.065
Γαλλικό οξύ	458	27.005	1.000	0.401	0.954	0.300
Γλυκοεπτονικό οξύ	217	31.134	<b>0.006</b>	<b>0.040</b>	0.963	<b>0.005</b>
Γλυκονικό οξύ	333	27.476	<b>0.014</b>	0.173	0.576	<b>0.015</b>
Γλυκερικό οξύ	189	12.940	0.069	1.000	0.386	0.065
Ιμινοδιοξικό οξύ	232	18.301	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	1.000	<b>0.000</b>
L-γαλακτικό οξύ	147	6.432	0.600	1.000	1.000	0.415
Λακτοβιονικό οξύ	217	40.453	1.000	0.797	0.729	0.411
Μηλεινάμικό οξύ	244	17.411	1.000	<b>0.006</b>	<b>0.003</b>	<b>0.002</b>
Μηλεινικό οξύ	147	12.083	<b>0.006</b>	<b>0.011</b>	1.000	<b>0.003</b>
Μηλονικό οξύ	147	9.500	<b>0.004</b>	0.248	0.141	<b>0.005</b>
Μεθυλμηλονικό οξύ	147	9.822	1.000	<b>0.049</b>	<b>0.049</b>	<b>0.024</b>
Βλεννικό οξύ	333	28.987	<b>0.002</b>	1.000	<b>0.002</b>	<b>0.001</b>
Φαινυλοπυροσταφυλικό οξύ	116	19.002	0.153	0.858	0.944	0.138
Σακχαρικό οξύ	333	28.402	<b>0.001</b>	0.311	<b>0.022</b>	<b>0.001</b>

Μεταβολίτης	m/z	RT	RU/R	RH/R	RU/RH	P
Ηλεκτρικό οξύ	148	12.313	<b>0.000</b>	<b>0.001</b>	<b>0.018</b>	<b>0.000</b>
Τρυγικό οξύ	147	19.707	1.000	<b>0.046</b>	<b>0.041</b>	<b>0.021</b>
trans-ακονιτικό οξύ	229	22.730	<b>0.000</b>	<b>0.002</b>	<b>0.004</b>	<b>0.000</b>
<b>Αζωτούχες ενώσεις</b>						
1-μεθυλ-νικοτιναμίδη	179	15.974	0.782	1.000	0.855	0.439
3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρικό οξύ	247	19.497	<b>0.000</b>	0.397	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
Αδενίνη	264	24.964	<b>0.001</b>	<b>0.002</b>	1.000	<b>0.000</b>
Αδενοσίνη	236	38.433	<b>0.001</b>	0.051	0.197	<b>0.002</b>
Αλλαντοΐνη	331	25.705	<b>0.003</b>	1.000	<b>0.003</b>	<b>0.001</b>
β-κυανο-L-αλανίνη	141	13.876	<b>0.035</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
D-λυξοζαμίνη	217	21.227	0.885	1.000	0.250	0.208
L-νορλευκίνη	158	11.325	0.495	0.249	1.000	0.181
N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνη	319	30.263	0.525	0.917	0.082	0.078
N-μεθυλγλουταμικό οξύ	260	21.298	<b>0.033</b>	<b>0.003</b>	0.671	<b>0.003</b>
Παντοθενικό οξύ	291	27.664	<b>0.000</b>	<b>0.001</b>	0.852	<b>0.000</b>
Φαινυλαιθυλαμίνη	174	18.324	<b>0.037</b>	<b>0.045</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
Πουτρεσκίνη	174	22.345	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	1.000	<b>0.000</b>
Σπερμιδίνη	174	32.267	<b>0.001</b>	<b>0.000</b>	1.000	<b>0.000</b>
Σφιγγοσίνη	204	36.123	1.000	0.917	1.000	0.514
Ουρία	147	10.280	1.000	1.000	1.000	0.952
<b>Φωσφορικές ενώσεις</b>						
6-φωσφογλυκονικό οξύ	387	35.051	0.472	0.273	1.000	0.189
6-φωσφορική-D-γλυκόζη	387	33.979	0.195	0.151	<b>0.004</b>	<b>0.004</b>
1-φωσφορική γλυκερόλη	357	23.245	<b>0.001</b>	1.000	<b>0.004</b>	<b>0.001</b>
O-φωσφοκολαμίνη	299	23.494	1.000	0.158	0.807	0.141
Φωσφορικό οξύ	299	11.440	1.000	0.250	0.388	0.166
5-φωσφορική ριβουλόζη	357	30.442	0.278	1.000	0.194	0.123
<b>Άλλες ενώσεις</b>						
2,3-διϋδροξυδιφαινύλιο	330	23.908	<b>0.000</b>	1.000	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
Αρβουτίνη	254	37.925	1.000	0.105	<b>0.045</b>	<b>0.032</b>
Καρβαμικό οξύ (ουρεθάνη)	146	4.586	<b>0.002</b>	<b>0.037</b>	0.404	<b>0.002</b>
Κατεχίνη	368	41.996	1.000	0.062	<b>0.036</b>	<b>0.022</b>
Χρυσίνη	383	38.002	1.000	0.291	0.065	0.058
Κονιφερυλοαλκοόλη	324	26.396	0.622	1.000	0.378	0.257
Δεϋδροασκορβικό οξύ	173	24.923	<b>0.001</b>	<b>0.000</b>	1.000	<b>0.000</b>
Γλυκονικό οξύ λακτόνη	275	25.784	<b>0.034</b>	0.151	1.000	<b>0.030</b>
Λογανίνη	361	41.758	0.059	0.738	0.504	0.059
Ριβονικό οξύ-γ-λακτόνη	147	20.162	1.000	<b>0.010</b>	<b>0.010</b>	<b>0.004</b>

**Πίνακας Β.9:** Στατιστική ανάλυση των αλλαγών στο μεταβολομικό πρότυπο βλαστών φυτών *L. jatrophanicus* που είτε δεν εμβολιάστηκαν είτε εμβολιάστηκαν από το αζωτοδεσμευτικό ριζόβιο άγριου τύπου είτε με το *fix* στέλεχος *ΔnifH*.

Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε πέντε βιολογικές επαναλήψεις. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P < 0.05$ ) επισημαίνονται με έντονη γραφή. Η τιμή  $P$  αντιπροσωπεύει το επίπεδο σημαντικότητας μεταξύ των σχετικών αποκρίσεων για κάθε μεταβολίτη (ANOVA), όταν τουλάχιστον δύο μέσοι όροι σχετικών αποκρίσεων είναι  $>0$ . m/z: αναλογία μάζας προς φορτίο, RT: χρόνος έκλουσης. SU, S και SH: βλαστοί μη εμβολιασμένων φυτών, βλαστοί φυτών που εμβολιάστηκαν με το *M. loti* άγριου τύπου ή με το στέλεχος *ΔnifH*, αντίστοιχα.

Μεταβολίτης	m/z	RT	SU/S	SH/S	SU/SH	P
<b>Αμινοξέα</b>						
L-σερίνη	204	13.696	<b>0.003</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
Ασπαρτικό οξύ	232	17.622	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
β-αλανίνη	248	15.211	<b>0.000</b>	<b>0.001</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
L-ισολευκίνη	158	11.883	1.000	1.000	1.000	0.634
Γλυκίνη	174	12.140	0.100	0.953	0.597	0.094
L-αλανίνη	116	7.235	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
L-ασπαραγίνη	231	21.044	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
L-γλουταμικό οξύ	246	19.868	0.712	<b>0.003</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
L-γλουταμίνη	156	23.189	0.583	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
L-ομοσερίνη	218	15.902	<b>0.000</b>	0.216	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
L-λυσίνη	317	26.244	0.295	<b>0.001</b>	<b>0.014</b>	<b>0.001</b>
L-μεθειονίνη	176	17.415	1.000	1.000	1.000	0.600
L-προλίνη	142	11.894	0.778	0.212	1.000	0.179
L-θρεονίνη	218	14.389	0.097	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
L-τρυπτοφάνη	202	31.641	1.000	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
L-βαλίνη	144	9.907	0.204	<b>0.043</b>	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>
Τυροσίνη	218	26.534	<b>0.042</b>	0.450	0.619	<b>0.043</b>
<b>Σάκχαρα</b>						
D-(+) αλτρούζη	205	26.461	1.000	<b>0.005</b>	<b>0.008</b>	<b>0.002</b>
Κυτταροβιόζη	361	37.768	0.100	1.000	0.090	<b>0.048</b>
D-(+) τρεχαλόζη	361	40.480	<b>0.001</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
D-αλλόζη	319	26.077	1.000	0.959	0.660	0.418
D-γλυκόζη	319	26.164	0.094	0.062	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>
D-λυσόζη	262	21.228	1.000	1.000	0.346	0.272
Φρουκτόζη	307	25.688	<b>0.006</b>	<b>0.009</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
Ισομαλτόζη	361	41.763	1.000	1.000	1.000	0.656
Λακτόζη	361	37.843	0.147	0.407	1.000	0.118
Λακτουλόζη	204	36.931	1.000	0.064	<b>0.015</b>	<b>0.013</b>
Μαλτόζη	361	40.655	1.000	<b>0.005</b>	<b>0.004</b>	<b>0.002</b>
Μαλτοτριόζη	361	49.168	1.000	0.093	0.093	<b>0.047</b>
Μελιβιόζη	361	40.955	0.948	1.000	1.000	0.554
Ραφινόζη	87	49.005	0.828	0.787	1.000	0.434
Ανυδρή μονοϋδρική σεδοε- πτουλόζη	204	26.899	1.000	1.000	1.000	0.918

Μεταβολίτης	m/z	RT	SU/S	SH/S	SU/SH	P
Σοφορόζη	319	40.391	<b>0.000</b>	<b>0.039</b>	<b>0.013</b>	<b>0.000</b>
Σακχαρόζη	361	39.060	0.208	0.392	1.000	0.148
Ταγκατόζη	217	25.652	<b>0.001</b>	1.000	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>
Πολυόλες						
Ακετόλη	219	18.567	0.053	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
D-μαννιτόλη	319	26.784	<b>0.000</b>	0.054	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
D-θρεϊτόλη	217	17.550	1.000	<b>0.007</b>	<b>0.036</b>	<b>0.006</b>
Γαλακτινόλη	204	43.854	0.204	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
Μαλτιτόλη	361	40.701	1.000	1.000	0.902	0.571
Μυο-ινοσιτόλη	432	29.727	<b>0.000</b>	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	<b>0.000</b>
Παλατινιτόλη	361	41.590	1.000	0.793	1.000	0.496
Ονονιτόλη	217	27.183	1.000	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
Πινιτόλη	260	24.782	1.000	<b>0.002</b>	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>
Οργανικά οξέα						
2-ισοπροπυλμηλικό οξύ	147	18.931	<b>0.020</b>	<b>0.027</b>	1.000	<b>0.011</b>
3-υδροκινναμωμικό οξύ	293	23.371	0.180	0.196	1.000	0.100
4-γουανιδοβουτυρικό οξύ	174	17.698	<b>0.022</b>	<b>0.004</b>	1.000	<b>0.003</b>
4-υδροκινναμωμικό οξύ	293	26.346	0.870	<b>0.028</b>	0.210	<b>0.028</b>
6-υδροξυνικοτινικό οξύ	268	18.570	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.002</b>	<b>0.000</b>
Κιτραμηλικό οξύ	147	16.456	0.327	1.000	0.398	0.196
Κιτρικό οξύ	347	24.395	0.558	1.000	0.658	0.330
D-μηλικό οξύ	147	16.893	0.371	1.000	0.491	0.232
Φερουλικό οξύ	338	29.264	1.000	0.163	0.101	0.065
Φουμαρικό οξύ	245	13.148	<b>0.005</b>	<b>0.001</b>	0.871	<b>0.001</b>
Γαλακτουρονικό οξύ	333	24.550	0.338	0.932	0.051	<b>0.049</b>
Γλυκοεπτονικό οξύ	217	31.134	<b>0.002</b>	1.000	<b>0.008</b>	<b>0.001</b>
Γλυκονικό οξύ	333	27.476	1.000	1.000	1.000	0.730
Γλυκερικό οξύ	189	12.940	1.000	1.000	1.000	0.916
Ιμινοδιοξικό οξύ	232	18.301	0.076	<b>0.001</b>	0.062	<b>0.001</b>
L-γαλακτικό οξύ	147	6.432	0.253	1.000	0.423	0.173
Λακτοβιονικό οξύ	217	40.453	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
Μηλειναμικό οξύ	244	17.411	<b>0.020</b>	<b>0.015</b>	1.000	<b>0.008</b>
Μηλεινικό οξύ	147	12.083	0.314	0.551	1.000	0.219
Μηλονικό οξύ	147	9.500	<b>0.002</b>	<b>0.008</b>	1.000	<b>0.001</b>
Μεθυλμηλονικό οξύ	147	9.822	0.387	0.216	<b>0.011</b>	<b>0.012</b>
Βλεννικό οξύ	333	28.987	<b>0.001</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
Σακχαρικό οξύ	333	28.402	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.002</b>	<b>0.000</b>
Σικιμικό οξύ	204	24.205	0.354	0.975	0.057	0.054
Ηλεκτρικό οξύ	148	12.313	0.331	1.000	0.492	0.217
Τρυγικό οξύ	147	19.707	1.000	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
Ταρτρικό οξύ	147	14.510	0.128	0.467	1.000	0.110
trans-ακονιτικό οξύ	229	22.730	0.514	1.000	0.093	0.087



Μεταβολίτης	m/z	RT	SU/S	SH/S	SU/SH	P
<b>Αζωτούχες ενώσεις</b>						
L-πυρογλουταμικό οξύ	156	17.487	1.000	1.000	0.732	0.490
1-μεθυλ-νικοτιναμίδη	179	15.974	1.000	0.160	0.284	0.110
3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρικό οξύ	247	19.497	0.400	1.000	0.690	0.276
5'-δεοξυ-5'-(μεθυλθειο)αδενοσίνη	236	40.530	<b>0.037</b>	<b>0.037</b>	1.000	<b>0.017</b>
Αδενίνη	264	24.964	0.444	1.000	0.289	0.191
Αδενοσίνη	236	38.433	0.544	1.000	0.423	0.261
Αλλαντοΐνη	331	25.705	<b>0.001</b>	0.461	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
β-κυανο-L-αλανίνη	141	13.876	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
D-λυξοζαμίνη	217	21.227	0.718	<b>0.023</b>	0.217	<b>0.023</b>
gly-pro	174	27.403	0.705	1.000	1.000	0.471
L-νορλευκίνη	158	11.325	1.000	0.515	0.965	0.358
N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνη	319	30.263	1.000	0.751	1.000	0.499
N-μεθυलगλουταμικό οξύ	260	21.298	<b>0.000</b>	<b>0.001</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
Παντοθενικό οξύ	291	27.664	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	0.332	<b>0.000</b>
Φαινυλαιθυλαμίνη	174	18.324	1.000	<b>0.006</b>	<b>0.012</b>	<b>0.003</b>
Πουτρεσκίνη	174	22.345	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	0.944	<b>0.000</b>
Σπερμιδίνη	174	32.267	<b>0.021</b>	<b>0.000</b>	0.139	<b>0.001</b>
Σφιγγοσίνη	204	36.123	1.000	1.000	1.000	0.693
Ουρία	147	10.280	<b>0.016</b>	1.000	<b>0.024</b>	<b>0.009</b>
<b>Φωσφορικές ενώσεις</b>						
6-φωσφογλυκονικό οξύ	387	35.051	<b>0.005</b>	1.000	<b>0.011</b>	<b>0.003</b>
6-φωσφορική-D-γλυκόζη	387	33.979	<b>0.000</b>	<b>0.047</b>	<b>0.016</b>	<b>0.000</b>
1-φωσφορική γλυκερόλη	357	23.245	<b>0.000</b>	0.924	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
Φωσφορικό οξύ	299	11.440	0.053	0.350	0.931	0.051
<b>Άλλες ενώσεις</b>						
2,3-διϋδροξυδιφαινύλιο	330	23.908	<b>0.000</b>	0.536	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
Καρβαμικό οξύ (ουρεθάνη)	146	4.586	1.000	1.000	0.483	0.359
Κατεχίνη	368	41.996	1.000	<b>0.000</b>	<b>0.001</b>	<b>0.000</b>
Κονιφερυλοαλκοόλη	324	26.396	0.614	0.217	1.000	0.174
Δεϋδροασκορβικό οξύ	173	24.923	1.000	0.391	0.663	0.268
Γλυκονικό οξύ λακτόνη	275	25.784	0.205	1.000	<b>0.037</b>	<b>0.034</b>
Λογανίνη	361	41.758	0.175	0.397	1.000	0.133
μεθυλο-β-D-γαλακτοπυρανοσίδιο	204	26.103	<b>0.012</b>	1.000	<b>0.021</b>	<b>0.007</b>
φαινυλ-β-γλυκοπυρανοσίδιο	361	33.604	1.000	1.000	1.000	0.675
Φλωρογλυκινόλη	342	20.411	1.000	1.000	1.000	0.720
Πυρογαλλόλη	239	18.016	<b>0.000</b>	0.640	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
Ριβονικό οξύ-γ-λακτόνη	147	20.162	0.583	<b>0.008</b>	0.100	<b>0.008</b>
Συναπυλαλκοόλη	354	29.191	0.344	0.891	1.000	0.265
Ταξιφολίνη	368	42.039	<b>0.010</b>	0.897	0.078	<b>0.010</b>

**Πίνακας Β.10:** Στατιστική ανάλυση των αλλαγών στο μεταβολομικό πρότυπο φύλλων φυτών *L. jarroenicus* που είτε δεν εμβολιάστηκαν είτε εμβολιάστηκαν από το αζωτοδεσμευτικό ριζόβιο άγριου τύπου είτε με το *fix* στέλεχος *ΔnifH*.

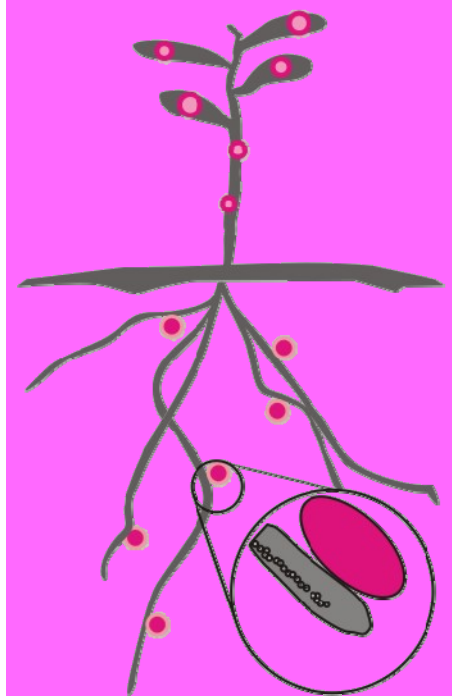
Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε πέντε βιολογικές επαναλήψεις. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P < 0.05$ ) επισημαίνονται με έντονη γραφή. Η τιμή  $P$  αντιπροσωπεύει το επίπεδο σημαντικότητας μεταξύ των σχετικών αποκρίσεων για κάθε μεταβολίτη (ANOVA), όταν τουλάχιστον δύο μέσοι όροι σχετικών αποκρίσεων είναι  $>0$ . m/z: αναλογία μάζας προς φορτίο, RT: χρόνος έκλουσης. LU, L και LH: φύλλα μη εμβολιασμένων φυτών, φύλλα φυτών που εμβολιάστηκαν με το *M. loti* άγριου τύπου ή με το στέλεχος *ΔnifH*, αντίστοιχα.

Μεταβολίτης	m/z	RT	LU/L	LH/L	LU/LH	P
<b>Αμινοξέα</b>						
L-σερίνη	204	13.696	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
Ασπαρτικό οξύ	232	17.622	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
β-αλανίνη	248	15.211	0.139	<b>0.001</b>	0.055	<b>0.001</b>
L-ισολευκίνη	158	11.883	0.836	1.000	0.763	0.429
Γλυκίνη	174	12.140	0.278	1.000	0.303	0.157
L-αλανίνη	116	7.235	<b>0.028</b>	<b>0.000</b>	<b>0.001</b>	<b>0.000</b>
L-ασπαραγίνη	231	21.044	<b>0.004</b>	<b>0.008</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
L-γλουταμικό οξύ	246	19.868	0.204	<b>0.023</b>	0.773	<b>0.023</b>
L-γλουταμίνη	156	23.189	0.898	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
L-ομοσερίνη	218	15.902	<b>0.013</b>	0.391	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>
L-λυσίνη	317	26.244	1.000	1.000	1.000	0.773
L-προλίνη	142	11.894	1.000	0.145	0.770	0.131
L-θρεονίνη	218	14.389	0.764	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
L-τρυπτοφάνη	202	31.641	1.000	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
L-βαλίνη	144	9.907	<b>0.040</b>	1.000	0.214	<b>0.037</b>
Τυροσίνη	218	26.534	1.000	0.074	0.308	0.066
<b>Σάκχαρα</b>						
D-(+) αλτρούζη	205	26.461	1.000	0.053	0.087	<b>0.033</b>
Κυτταροβιόζη	361	37.768	0.057	<b>0.049</b>	<b>0.000</b>	<b>0.001</b>
D-(+) τρεχαλόζη	361	40.480	0.849	<b>0.024</b>	<b>0.003</b>	<b>0.003</b>
D-αλλόζη	319	26.077	1.000	<b>0.010</b>	<b>0.034</b>	<b>0.008</b>
D-γλυκόζη	319	26.164	0.259	0.580	<b>0.021</b>	<b>0.022</b>
D-λυσόζη	262	21.228	1.000	0.227	0.349	0.149
Φρουκτόζη	307	25.688	<b>0.001</b>	1.000	<b>0.002</b>	<b>0.000</b>
Ισομαλτόζη	361	41.763	1.000	<b>0.042</b>	0.248	<b>0.040</b>
Λακτόζη	361	37.843	1.000	0.938	1.000	0.576
Λακτουλόζη	204	36.931	0.273	1.000	0.122	0.091
Μαλτόζη	361	40.655	0.763	<b>0.005</b>	<b>0.049</b>	<b>0.005</b>
Μελιβιόζη	361	40.955	1.000	1.000	1.000	0.833
Ραφινόζη	87	49.005	0.107	<b>0.006</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
Ριβόζη	217	21.557	1.000	0.288	0.267	0.150
Άνυδρη μονοϋδρική σεδοεππουλόζη	204	26.899	<b>0.047</b>	1.000	<b>0.020</b>	<b>0.013</b>
Σοφορόζη	319	40.391	0.916	0.372	1.000	0.282
Σακχαρόζη	361	39.060	<b>0.028</b>	0.657	0.297	<b>0.029</b>

Μεταβολίτης	m/z	RT	LU/L	LH/L	LU/LH	P
Ταγκατόζη	217	25.652	0.133	<b>0.010</b>	0.537	<b>0.010</b>
<b>Πολυόλες</b>						
Ακετόλη	219	18.567	0.346	<b>0.004</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
D-μαννιτόλη	319	26.784	<b>0.000</b>	<b>0.020</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
D-θρεϊτόλη	217	17.550	<b>0.026</b>	0.460	0.402	<b>0.028</b>
Γαλακτινόλη	204	43.854	1.000	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
Γλυκερόλη	147	11.489	0.440	1.000	0.076	0.072
Μυο-ινοσιτόλη	432	29.727	1.000	0.521	0.129	0.113
Παλατινιτόλη	361	41.590	0.297	0.858	1.000	0.236
Ονονιτόλη	217	27.183	0.903	<b>0.021</b>	0.153	<b>0.020</b>
Πινιτόλη	260	24.782	0.084	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
<b>Οργανικά οξέα</b>						
2-ισοπροπυλμηλικό οξύ	147	18.931	0.580	1.000	1.000	0.397
3-υδροκινναμωμικό οξύ	293	23.371	0.306	0.737	1.000	0.234
4-γουανιδιοβουτυρικό οξύ	174	17.698	<b>0.002</b>	<b>0.000</b>	0.546	<b>0.000</b>
4-υδροκινναμωμικό οξύ	293	26.346	0.199	0.740	1.000	0.169
6-υδροξυνικοτινικό οξύ	268	18.570	0.428	1.000	0.137	0.114
Κιτρακονικό οξύ	147	13.315	0.070	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
Κιτραμηλικό οξύ	147	16.456	0.420	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
Κιτρικό οξύ	347	24.395	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	1.000	<b>0.000</b>
D-μηλικό οξύ	147	16.893	0.550	1.000	1.000	0.397
Φερουλικό οξύ	338	29.264	0.162	0.961	0.880	0.145
Φουμαρικό οξύ	245	13.148	<b>0.005</b>	<b>0.000</b>	0.060	<b>0.000</b>
Γαλακτουρονικό οξύ	333	24.550	0.302	<b>0.005</b>	0.125	<b>0.005</b>
Γλυκοεπτονικό οξύ	217	31.134	1.000	1.000	1.000	0.884
Γλυκονικό οξύ	333	27.476	1.000	<b>0.028</b>	0.140	<b>0.025</b>
Γλυκερικό οξύ	189	12.940	<b>0.009</b>	0.889	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>
Γλυκολικό οξύ	147	6.695	<b>0.026</b>	<b>0.000</b>	0.085	<b>0.000</b>
Γουανιδιοηλεκτρικό οξύ	444	27.151	0.242	<b>0.048</b>	1.000	<b>0.044</b>
Ιμινοδιοξικό οξύ	232	18.301	0.415	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
L-γαλακτικό οξύ	147	6.432	<b>0.035</b>	0.090	1.000	<b>0.026</b>
Λακτοβιονικό οξύ	217	40.453	<b>0.018</b>	0.302	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>
Μηλεϊναμικό οξύ	244	17.411	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	1.000	<b>0.000</b>
Μηλεϊνικό οξύ	147	12.083	1.000	1.000	0.838	0.530
Μηλονικό οξύ	147	9.500	1.000	0.604	0.273	0.205
Μεθυλμηλονικό οξύ	147	9.822	1.000	0.099	0.200	0.070
Βλεννικό οξύ	333	28.987	0.557	0.264	1.000	0.195
Νικοτινικό οξύ	180	11.660	0.442	1.000	1.000	0.330
Πιπεκολικό οξύ	156	13.564	<b>0.000</b>	1.000	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
Σακχαρικό οξύ	333	28.402	0.412	<b>0.014</b>	0.248	<b>0.015</b>
Σικιμικό οξύ	204	24.205	0.139	<b>0.006</b>	0.342	<b>0.007</b>
Ηλεκτρικό οξύ	148	12.313	0.908	0.237	1.000	0.199
Τρυγικό οξύ	147	19.707	0.762	<b>0.001</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
Ταρτρονικό οξύ	147	14.510	0.060	0.183	1.000	<b>0.048</b>

Μεταβολίτης	m/z	RT	LU/L	LH/L	LU/LH	P
trans-ακονιτικό οξύ	229	22.730	1.000	<b>0.001</b>	<b>0.003</b>	<b>0.000</b>
<b>Αζωτούχες ενώσεις</b>						
L-πυρογλουταμικό οξύ	156	17.487	0.181	1.000	0.215	0.105
1-μεθυλνταντοΐνη	171	12.504	<b>0.002</b>	<b>0.002</b>	1.000	<b>0.001</b>
3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρικό οξύ	247	19.497	1.000	1.000	1.000	0.735
5-αμινοβαλερικό οξύ	174	19.936	0.051	1.000	0.051	<b>0.025</b>
5'-δεοξυ-5'-(μεθυλθειο)αδενοσίνη	236	40.530	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	1.000	<b>0.000</b>
Αδενοσίνη	236	38.433	0.563	1.000	0.350	0.236
Αλλαντοΐνη	331	25.705	0.065	1.000	0.065	<b>0.032</b>
β-κυανο-L-αλανίνη	141	13.876	<b>0.008</b>	<b>0.005</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
Biuret	344	22.043	1.000	0.128	0.128	0.066
D-λυξοζαμίνη	217	21.227	0.390	1.000	0.863	0.289
L-νορλευκίνη	158	11.325	0.988	1.000	0.489	0.348
N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνη	319	30.263	<b>0.027</b>	<b>0.042</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
N-μεθυλαλανίνη	130	8.856	0.218	<b>0.000</b>	<b>0.014</b>	<b>0.001</b>
N-μεθυλγλουταμικό οξύ	260	21.298	0.717	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
Παντοθενικό οξύ	291	27.664	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.019</b>	<b>0.000</b>
Πουτρεσίνη	174	22.345	0.881	<b>0.000</b>	<b>0.001</b>	<b>0.000</b>
Σπερμιδίνη	174	32.267	0.289	<b>0.007</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
trans-4-υδροξυ-L-προλίνη	230	17.738	0.098	1.000	<b>0.038</b>	<b>0.028</b>
Ουρία	147	10.280	0.227	1.000	0.099	0.074
<b>Φωσφορικές ενώσεις</b>						
6-φωσφογλυκονικό οξύ	387	35.051	0.609	1.000	0.601	0.330
6-φωσφορική-D-γλυκόζη	387	33.979	<b>0.011</b>	0.503	0.157	<b>0.011</b>
1-φωσφορική γλυκερόλη	357	23.245	<b>0.008</b>	1.000	<b>0.045</b>	<b>0.007</b>
Φωσφορικό οξύ	299	11.440	<b>0.001</b>	0.865	<b>0.010</b>	<b>0.001</b>
<b>Άλλες ενώσεις</b>						
2,3-διϋδροξυδιφαινύλιο	330	23.908	<b>0.033</b>	1.000	<b>0.033</b>	<b>0.016</b>
Καρβαμικό οξύ (ουρεθάνη)	146	4.586	1.000	0.094	0.080	<b>0.044</b>
Κατεχίνη	368	41.996	1.000	<b>0.004</b>	<b>0.004</b>	<b>0.002</b>
Χρυσίνη	383	38.002	0.448	0.447	1.000	0.245
Δεϋδροασκορβικό οξύ	173	24.923	0.958	0.613	1.000	0.400
Γλυκονικό οξύ λακτόνη	275	25.784	0.349	0.609	1.000	0.243
L-ασκορβικό οξύ	332	26.988	1.000	0.144	0.144	0.075
μεθυλο-β-D-γαλακτοπυρανοσίδιο	204	26.103	0.972	1.000	1.000	0.535
φαινυλ-β-γλυκοπυρανοσίδιο	361	33.604	1.000	0.650	1.000	0.426
Φλωρογλυκινόλη	342	20.411	1.000	1.000	1.000	0.694
Ριβονικό οξύ-γ-λακτόνη	147	20.162	1.000	0.298	0.724	0.229

# Βιβλιογραφία



- Abbas, B.A, Vineetha, K.E., Prasad, C.K., Vij, N., Hassani, R., and Randhawa, G.S.** (2002). Symbiotic characteristics of cysteine and methionine auxotrophs of *Sinorhizobium meliloti*. *Indian J. Exp. Biol.* 40: 1121–1130.
- Abd-Alla, M.H., Koyro, H.W., Yan, F., Schubert, S., and Peiter E.** (2000). Functional structure of the indeterminate *Vicia faba* L. root nodule: implications for metabolite transport. *J. Plant Physiol.* 157: 335–343.
- Alber, B.E., and Ferry, J.G.** (1994). A carbonic anhydrase from the archaeon *Methanosarcina thermophila*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 91: 6909–6913.
- Allaway, D., Lodwig, E., Crompton, L.A., Wood, M., Parsons, T.R., Wheeler, T., and Poole, P.S.** (2000). Identification of alanine dehydrogenase and its role in mixed secretion of ammonium and alanine by pea bacteroids. *Mol. Microbiol.* 36: 508–515.
- Amtmann, A., and Armengaud, P.** (2009). Effects of N, P, K, and S on metabolism: new knowledge gained from multi-level analysis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12: 275–283.
- Appels, M.A., and Haaker, H.** (1991). Glutamate oxaloacetate transaminase in pea root nodules—participation in a malate/aspartate shuttle between plant and bacteroid. *Plant Physiol.* 95: 740–747.
- Ardourel, M., Demont, N., Debelle, F., Maillet, F., de Billy, F., Prome, J.C., Denarie, J., and Truchet, G.** (1994). *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide nodulation factors: different structural requirements for bacterial entry into target root hair cells and induction of plant symbiotic developmental responses. *Plant Cell.* 6: 1357–1374.
- Artus N.N., and Edwards G.E.** (1985). NAD-malic enzyme from plants. *FEBS Lett.* 182: 225–233.
- Atkins, C.A., Smith, P., Mann, A., and Thumfort, P.** (2001). Localization of carbonic anhydrase in legume nodules. *Plant Cell Environ.* 24: 317–326.
- Badger, M.R., and Price, G.D.** (1994). The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* Vol. 45: 369–392.
- Barberon, M., Berthomieu, P., Clairotte, M., Shibagaki, N., Davidian, J.-C., and Gosti, F.** (2008). Unequal functional redundancy between the two *Arabidopsis thaliana* high-affinity sulphate transporters SULTR1;1 and SULTR1;2. *New Phytol.* 180: 608–619.

- Barroso, C., Romero, L.C., Cejudo, F.J., Vega, J.M., and Gotor, C.** (1999). Salt-specific regulation of the cytosolic O-acetylserine(thiol)lyase gene from *Arabidopsis thaliana* is dependent on abscisic acid. *Plant Mol. Biol.* 40: 729–736.
- Bashandy, T., Guillemintot, J., Vernoux, T., Caparros-Ruiz, D., Ljung, K., et al.** (2010). Interplay between the NADP-linked thioredoxin and glutathione systems in *Arabidopsis* auxin signaling. *Plant Cell.* 22: 376–91.
- Batut, J., and Boistard, P.** (1994). Oxygen control in *Rhizobium*. *Antonie Leeuwenhoek.* 66: 129-150.
- Becana, M., and Klucas, R.V.** (1992). Transition metals in legume root nodules: iron-dependent free radical production increases during nodule senescence. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 89: 8958-8962.
- Becana, M., Matamoros, M.A., Udvardi, M., and Dalton, D.A.** (2010). Recent insights into antioxidant defenses of legume root nodules. *New Phytol.* 188: 960–976.
- Becking, J.H.** (1992). The *Rhizobium* Symbiosis of the Non legume *Parasponia*, In: (G. Stacey, R.H.Burris and H.J. Evans, Eds.), *Biological Nitrogen Fixation*, Chapman & Hall, New York, 497-559.
- Beinert, H.** (2000). A tribute to sulfur. *Eur J Biochem* 267: 5657–5664.
- Benson, D.R., and Clawson, M.L.** (2000). Evolution of the actinorhizal plant nitrogen-fixing symbiosis, p. 207–224. In E. Triplett (ed.), *Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for the analysis of a biological process*. Horizon Scientific Press, Wymondham, England.
- Benson, D.R., and Silvester, W.B.** (1993). Biology of *Frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiol. Rev.* 57: 293–319.
- Berkowitz, O., Wirtz, M., Wolf, A., Kuhlmann, J., and Hell, R.** (2002). Use of biomolecular interaction analysis to elucidate the regulatory mechanism of the cysteine synthase complex from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 277: 30629–30634.
- Bethlenfalvay, G.J., and Phillips, D.A.** (1977). Photosynthesis and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L. *Basic Life Sci.* 9: 401-9.
- Bianucci, E., Tordable, M.D.C., Fabra, A., and Castro, S.** (2008). Importance of glutathione in the nodulation process of peanut (*Arachis hypogaea*). *Physiol. Plant.* 134: 342–347.

- Bick, J.-A., Setterdahl, A.T., Knaff, D.B., Chen, Y., Pitcher, L.H., Zilinskas, B.A., and Leustek, T.** (2001). Regulation of the plant-type 5'-adenylyl sulfate reductase by oxidative stress. *Biochemistry* 40: 9040–9048.
- Blaschke, L., Schneider, A., Herschbach, C., and Rennenberg, H.** (1996). Reduced sulphur allocation from three-year-old needles of Norway spruce (*Picea abies* [Karst] L.). *J. Exp. Bot.* 47: 1025–1032.
- Blaszczyk, A., Brodzik, R., and Sirko, A.** (1999). Increased resistance to oxidative stress in transgenic tobacco plants overexpressing bacterial serine acetyltransferase. *Plant J.* 20: 237–243.
- Blumwald, E., Fortin, M.G., Rea, P.A., Verma, D.P.S., and Poole, R.J.** (1985). Presence of host-plasma membrane type H1-ATPase in the membrane envelope enclosing the bacteroids in soybeanroot nodules. *Plant Physiol.* 78: 665–672.
- Boddey, R.M., and Döbereiner, J.** (1988). Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent results and perspectives for future research. *Plant Soili.* 108: 53–65.
- Bolchi, A., Petrucco, S., Tenca, P.L., Foroni, C., and Ottonello, S.** (1999). Coordinate modulation of maize sulphate permease and ATP sulphurylase mRNAs in response to variations in sulphur nutritional status: stereospecific down regulation by L-cysteine. *Plant Mol. Biol.* 39: 527–537.
- Bothe, H., Yates, M.G., and Cannon, F.C.** (1983). Physiology, biochemistry and genetic dinitrogen fixation. In 'Encyclopedia of Plant Physiology, *New Series*' (A. Läuchi and R.L. Bielecki, eds.) Springer-Verlag, Berlin and New York.15A: 241–285
- Brown, S.M., and Walsh, K.B.** (1994), Anatomy of the legume nodule cortex with respect to nodulepermeability. *Australian J. Plant Physiol.* 21: 49–68.
- Brunner, M., Kocsy, G., Ru"egsegger, A., Schmutz, D., and Brunold, C.** (1995). Effect of chilling on assimilatory sulfate reduction and glutathione synthesis in maize. *J. Plant Physiol.* 146: 743–747.
- Brunold, C.** (1993). Regulatory interactions between sulphate and nitrate assimilation. In *Sulphur Nutrition and Sulphur Assimilation in Higher Plants*, L.J. De Kok, I. Stulen, H. Rennenberg, C. Brunold, and W.E. Rauser, eds (The Hague, the Netherlands: SPB Academic Publishing), pp. 61–75.
- Brunold, C., and Suter, M.** (1984). Regulation of Sulfate Assimilation by Nitrogen Nutrition in the Duckweed *Lemna minor* L. *Plant Physiol.* 76: 579–583.



- Brunold, C., and Suter, M.** (1990). Adenosine 5'-phosphosulphate sulfotransferase. In: Lea P, editor. Methods in plant biochemistry. Vol. 3. London: Academic Press; p. 339-343.
- Brusslan, J.A., and Tobin, E.M.** (1992). Light-independent development regulation of *cab* gene expression in *Arabidopsis thaliana* seedlings. Proc. Natl Acad. Sci. USA 89: 7791-7795.
- Caetano-Anolles, G., Lagares, A., and Favelukes, G.** (1989) Adsorption of *Rhizobium meliloti* to alfalfa roots: Dependence on divalent cations and pH. Plant Soil. 117: 67-74.
- Carroll, B.J., Hansen, A.P., McNeil, D.L., and Gresshoff, P.M.** (1987). Effect of oxygen supply on nitrogenase activity of nitrate- and darkstressed soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) plants. Aust. J. Plant Physiol. 14: 679–687.
- Chang, C., Damiani, I., Puppo, A., and Frendo, P.** (2009). Redox changes during the legume-rhizobium symbiosis. Mol. Plant 2: 370–377.
- Chang, K.S., Lee, S.H., Hwang, S.B., and Park, K.Y.** (2000). Characterization and translational regulation of the arginine decarboxylase gene in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). Plant J. 24: 45–56.
- Cherest, H., Davidian, J.-C., Thomas, D., Benes, V., Ansoerge, W., and Surdin-Kerjan, Y.** (1997). Molecular characterization of two high affinity sulfate transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics. 145: 627–635.
- Chollet, R., Vidal, J., and O'Leary, M.H.** (1996). Phosphoenolpyruvate carboxylase: A ubiquitously highly regulated enzyme in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42: 273-298.
- Chopra, J., Kaur, N., and Gupta, A.K.** (1998). Carbohydrate status and sucrose metabolism in mungbean roots and nodules. Phytochemistry 49: 1891–1895.
- Clarkson, D.T., Saker, L.R., and Purves, J.V.** (1989). Depression of nitrate and ammonium transport in barley plants with diminished sulphate status: evidence of co-regulation of nitrogen and sulphate intake. J. Exp. Bot. 40: 953–963.
- Clemente, M.R., Bustos-Sanmamed, P., Loscos, J., James, E.K., Pérez-Rontomé, C., Navascués, J., et al.** (2012). Thiol synthetases of legumes: immunogold localization and differential gene regulation by phytohormones. J. Exp. Bot. 63: 3923–3934.

- Cohen, H.P., Sarath, G., Lee, K., and Wagner, F.W.** (1986). Soybean root nodule ultrastructure during dark-induced stress and recovery. *Protoplasma*. 132: 69-75.
- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., and Hsu, L.** (1972). Non chromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R factor DNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 69: 2110-2114.
- Colebatch, G., Desbrosses, G., Ott, T., Krusell, L., Montanari, O., Kloska, S., Kopka, J., and Udvardi, M.K.** (2004). Global changes in transcription orchestrate metabolic differentiation during symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus*. *Plant Journal*. 39: 487-512.
- Colebatch, G., Kloska, S., Trevaskis, B., Freund, S., Altmann, T., and Udvardi, M.K.** (2002). Novel aspects of symbiotic nitrogen fixation uncovered by transcript profiling with cDNA arrays. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15: 411-420.
- Cooper, C.E., Patel, R.P., Brookes, P.S., and Darley-Usmar, V.M.** (2002). Nanotransducers in cellular redox signaling: modification of thiols by reactive oxygen and nitrogen species. *Trends Biochem Sci.* 27: 489-492.
- Copeland, L., Lee, H.S., and Cowlshaw, N.** (1995). Carbon metabolism in chickpea nodules. *SoilBiol.Biochem.*, 27: 381-385.
- Copeland, L., Vella, J., and Hong, A.** (1989). Enzymes of carbohydrate metabolism in soybean nodules. *Phytochemistry* 28: 57-61.
- Coruzzi, G.** (2003). Primary N-assimilation into amino acids in *Arabidopsis*. In (C.R. Somerville and E. M. Meyerowitz, Eds.), *The Arabidopsis book, Vol. 31*, Rockville, MD: American Society of Plant Biologists, 1-17.
- Cralle, H.T., Heichel, G.H., and Barnes, D.K.** (1987). Photosynthate partitioning in plants of alfalfa populations selected for high and low nodule mass. *Crop Sci.* 27: 96-100.
- Cralle, HT., and Heichel, G.H.** (1985). Interorgan photosynthate partitioning in alfalfa. *Plant Physiol.* 79: 381-5.
- Cren, M., and Hirel, B.** (1999). Glutamine synthetase in higher plants: Regulation of gene and protein expression from the organ to the cell. *Plant Cell Physiol.*, 40, 1187-1193.
- Cumming, M., Leung, S., McCallum, J., and McManus, M.T.** (2007). Complex formation between recombinant ATP sulfur-ylase and APS reductase of *Allium cepa* (L.). *FEBS Lett.* 581: 4139-4147.

- Dart, P.** (1977). Infection and development of legumes nodules. In: (W.F. Hardy, W.S. Silver, Eds.), *A Treatise on Nitrogen Fixation, Vol. III*. R. Wiley, New York, 367-472.
- Davidian, J.-C., and Kopriva, S.** (2010). Regulation of sulfate uptake and assimilation--the same or not the same? *Mol. Plant* 3: 314–325.
- Day, D.A., and Copeland, L.** (1991). Carbon metabolism and compartmentation in nitrogen-fixing legume nodules. *Plant Physiol. Biochem.* 29: 185–201.
- Day, D.A., Poole P.S., Tyerman S.D., and Rosendahl L.** (2001). Ammonia and amino acid transport across symbiotic membranes in nitrogen-fixing legume nodules. *Cell Mol. Life Sci.* 58: 61–71.
- Day, D.A., Price, G.D., and Udvardi, M.K.** (1989). The membrane interface of the *Bradyrhizobium japonicum-Glycine max* symbiosis: peribacteroid units from soybean nodules. *Aust. J. Plant Physiol.* 16: 69-84.
- Dazzo, F.B., Hollingsworth, R., Philip-Hollingsworth, S., Robeles, M., Olen, T., Salzwedel, J., Djordjevic, M., and Rolfe, B.** (1988). Recognition process in the *Rhizobium trifolii*-white clover symbiosis, 431–435. In: (Bothe, H., De Bruijn, F.J. and Newton, W.E., Eds.), *Nitrogen fixation: hundred years after*. Gustav Fischer, Stuttgart, Germany.
- de Ruijter, N.C.A., Bisseling, T., and Emons, A.M.C.** (1999). *Rhizobium* Nod factors induce an increase in subapical fine bundles of actin filaments in *Vicia sativa* root hairs within minutes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12: 829-832.
- Dellaporta, S.L., Chomet, P.S., Mottinger, J.P., Wood, J.A., Yu, S.M., and Hicks, J.B.** (1984). Endogenous transposable elements associated with virus infection in maize. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 49: 321-328.
- Dénarié, J., Debelle, F., and Promé, J.C.** (1996). *Rhizobium* lipo-chitoooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 503-535.
- De-Polli, H., Boyer, C.D., and Neyra, C.A.** (1982). Nitrogenase activity associated with roots and stems of field-grown corn (*Zea mays* L.) *Plants. Plant Physiol.* 70: 1609-1613.
- Desbrosses, G.G., Kopka, J., and Udvardi M.K.** (2005). *Lotus japonicus* metabolic profiling. Development of gas chromatography-mass spectrometry resources for the study of plant-microbe interactions. *Plant Physiol.* 137: 1302-1318.

- Dietz, K.-J.** (2003). Plant peroxiredoxins. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 93-107.
- Dixon, D.P., Laphorn, A., and Edwards, R.** (2002). Plant glutathione transferase. *Genome Biol* 3: 1–10
- Droux M** (2003). Plant serine acetyltransferase: new insights for regulation of sulphur metabolism in plant cells. *Plant Physiol. Biochem.* 41: 619-627.
- Dos Santos, P.C., Dean, D.R., Hu, Y.L., and Ribbe, M.W.** (2004). Formation and insertion of the nitrogenase iron-molybdenum cofactor. *Chem. Rev.* 104: 1159–1173.
- Downie, J.A., and Walker, S.A.** (1999). Plant responses to nodulation factors. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 483-489.
- Drincovich, M.F., Casati, P., and Andreo, C.S.** (2001). NADP-malic enzyme from plants: ubiquitous enzyme involved in different metabolic pathways. *FEBS Letters.* 490: 1-6.
- Driscoll, B.T., and Finan, T.M.** (1993). NAD<sup>+</sup>-dependent malic enzyme of *Rhizobium meliloti* is required for symbiotic nitrogen fixation. *Mol. Microbiol.* 7: 865–873.
- Driscoll, B.T., and Finan, T.M.** (1996). NAD<sup>+</sup>-dependent malic enzyme of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 178: 2224–2231.
- Droux, M.** (2003). Plant serine acetyltransferase: new insights for regulation of sulphur metabolism in plant cells. *Plant Physiol. Biochem.* 41: 619–627.
- Droux, M., Ruffet, M.L., Douce, R., and Job, D.** (1998). Interactions between serine acetyltransferase and O-acetylserine (thiol) lyase in higher plants: structural and kinetic properties of the free and bound enzymes. *Eur. J. Biochem.* 255: 235–245.
- Dubousset, L., et al.** (2009). Remobilization of leaf S compounds and senescence in response to restricted sulphate supply during the vegetative stage of oilseed rape are affected by mineral N availability. *J. Exp. Bot.* 60: 3239–3253.
- Egli, M.A., Griffith, S.M., Miller, S.S., Anderson, M.P., and Vance, C.P.** (1989). Nitrogen assimilating enzyme activities and enzyme protein during development and senescence of effective and plant gene-controlled ineffective alfalfa nodules. *Plant Physiol.* 91: 898-904.
- El Kassis, E., Cathala, N., Rouached, H., Fourcroy, P., Berthomieu, P., Terry, N., and Davidian, J.-C.** (2007). Characterization of a selenate-resistant *Arabidopsis thaliana* mutant. Root growth as a potential target for selenate toxicity. *Plant Physiol.* 143: 1231–1241.

- El Msehli, S., Lambert, A., Baldacci-cresp, F., Hopkins, J., Boncompagni, E., Smiti, S.A., Hérouart, D., and Frendo, P.** (2011). Crucial role of (homo)glutathione in nitrogen fixation in *Medicago truncatula* nodules. *New Phytol.* 192: 496–506.
- El Yahyaoui, F., Kuster, H., Ben Amor, B., Hohnjec, N., Puhler, A., Becker, A., Gouzy, J., Vernie, T., Gough, C., Niebel, A., et al.** (2004). Expression profiling in *Medicago truncatula* identifies more than 750 genes differentially expressed during nodulation, including many potential regulators of the symbiotic program. *Plant Physiol.* 136: 3159–3176.
- Engelke, T., Jording, D., Kapp, D., and Pühler, A.** (1989). Identification and sequence analysis of the *Rhizobium meliloti* dctA gene encoding the C<sub>4</sub>-dicarboxylate carrier. *J. Bacteriol.* 171: 5551–5560.
- Escuredo, P.R., Minchin, F.R., Gogorcena, Y., Iturbe-Ormaetxe, I., Klucas, R.V., and Becana, M.** (1996). Involvement of Activated Oxygen in Nitrate-Induced Senescence of Pea Root Nodules. *Plant Physiol.* 110: 1187-1195.
- Feigenbaum, S., and Mengel, K.** (1979). The effect of reduced light intensity and sub-optimal potassium supply on N<sub>2</sub> fixation and N turnover in Rhizobium-infected lucerne. *Physiologia Plantarum* 45: 245-249
- Feigenbaum, S., and Mengel, K.** (2006). The Effect of Reduced Light Intensity and Sub-optimal Potassium Supply on N<sub>2</sub> Fixation and N Turnover in Rhizobium Infected Lucerne. *Physiologia Plant.* 45: 245–249.
- Ferguson, B.J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M.H., Lin, Y.H., Reid, D.E., and Gresshoff, P.M.** (2010). Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *J. Integr. Plant Biol.* 52: 61-76.
- Fett, J.P., and Coleman, J.R.** (1994). Characterization and expression of two cDNAs encoding carbon anhydrase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 105: 707-713.
- Finan, T.M., Mcwhinnie, E., Driscoll, B., and Watson, R.J.** (1991). Complex symbiotic phenotypes result from gluconeogenic mutations in *Rhizobium meliloti*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 4: 386–392.
- Finan, T.M., Wood, J.M., and Jordon, D.C.** (1983). Symbiotic properties of C<sub>4</sub>-dicarboxylic acid transport mutants of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol.* 154: 1403-1413.

- Finn, G.A., and Brun, W.A.** (1982). Effect of atmospheric CO<sub>2</sub> enrichment on growth, non-structural carbohydrate content and root nodule activity in soybean. *Plant Physiol.* 69: 327-31.
- Fischer, H.M.** (1994). Genetic Regulation of Nitrogen Fixation in Rhizobia, *Microbiol. Rev.* 58: 352-386.
- Fitzpatrick, K.L., Tyerman, S.D., and Kaiser, B.N.** (2008). Molybdate transport through the plant sulfate transporter SHST1. *FEBS Lett.* 582: 1508–1513.
- Flemetakis, E. and Wang, T.L.** (2013). Carbon Metabolism during Symbiotic Nitrogen Fixation. p. 53-68 In: *Symbiotic Endophytes, Soil Biology 37*. R. Aroca (ed.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Flemetakis, E., Dimou, M., Cotzur, D., Aivalakis, G., Efroze, R.D., Kenoutis, C., Udvardi, M., and Katinakis, P.** (2003). A *Lotus japonicus* β-type carbonic anhydrase gene expression pattern suggests distinct physiological roles during nodule development. *Biochim. Biophys. Acta* 1628: 186-194.
- Flemetakis, E., Efroze, R.C., Desbrosses, G., Dimou, M., Delis, C., Aivalakis, G., Udvardi, M.K., and Katinakis, P.** (2004). Induction and spatial organization of polyamine biosynthesis during nodule development in *Lotus japonicus*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17: 1283–1293.
- Flemetakis, E., Efroze, R.C., Ott, T., Stedel, C., Aivalakis, G., Udvardi, M.K., and Katinakis, P.** (2006). Spatial and temporal organization of sucrose metabolism in *Lotus japonicus* nitrogen-fixing nodules suggests a role for the elusive alkaline/neutral invertase. *Plant Mol. Biol.* 62: 53-69.
- Fotelli, M.N., Tsikou, D., Kolliopoulou, A., Aivalakis, G., Katinakis, P., Udvardi, M.K., Rennenberg, H., and Flemetakis, E.** (2011). Nodulation enhances dark CO<sub>2</sub> fixation and recycling in the model legume *Lotus japonicus*. *J. Exp. Bot.* 62: 2959–2971.
- Foyer, C.H., and Noctor, G.** (2009). Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid. Redox. Signal.* 11: 861–905.
- Foyer, C.H., Theodoulou, F.L., and Delrot, S.** (2001). The functions of inter- and intracellular glutathione transport systems in plants. *Trends Plant Sci.* 6: 486–492.

- Frendo, P., Gallesi, D., Turnbull, R., Van de Sype, G., Hérouart, D., and Puppo, A. (1999).** Localisation of glutathione and homoglutathione in *Medicago truncatula* is correlated to a differential expression of genes involved in their synthesis. *Plant J.* 17: 215–219.
- Frendo, P., Jiménez, M.J., Mathieu, C., Duret, L., Gallesi, D., Van de Sype, G., et al. (2001).** A *Medicago truncatula* homoglutathione synthetase is derived from glutathione synthetase by gene duplication. *Plant Physiol.* 126: 1706–1715.
- Frendo, P., Matamoros, M.A., Alloing, G., and Becana, M. (2013).** Thiol-based redox signaling in the nitrogen-fixing symbiosis. *Front. Plant Sci.* 4: 376.
- Fujita, K., Masuda, T., and Ogata, S. (1988).** Dinitrogen fixation, ureide concentration in xylem exudate and translocation of photosynthates in soybean as influenced by pod removal and defoliation. *Soil Sci. and Plant Nutrition* 34:265-275
- Fukai, E., Soyano, T., Umehara, Y., Nakayama, S., Hirakawa, H., Tabata, S., Sato, S., and Hayashi, M. (2012).** Establishment of a *Lotus japonicus* gene tagging population using the exon-targeting endogenous retrotransposon LORE1. *Plant J.* 69: 720-730.
- Galant, A., Preuss, M.L., Cameron, J.C., and Jez, J.M. (2011).** Plant glutathione biosynthesis: diversity in biochemical regulation and reaction products. *Front. Plant Sci.* 2: 45.
- Galibert, F., Finan, T.M., Long, S.R., Puhler, A., Abola, P., Ampe, F., et al. (2001).** The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science.* 293: 668–672.
- Galili, G., and Hofgen, R. (2002).** Metabolic engineering of amino-acids and storage proteins in plants. *Metab. Eng.* 4: 3–11.
- Gaude, N., Tippmann, H., Flietakis, E., Katinakis, P., Udvardi, M., and Dörmann, P. (2004).** The galactolipid digalactosyldiacylglycerol accumulates in the peribacteroid membrane of nitrogen-fixing nodules of soybean and Lotus. *J. Biol. Chem.* 279: 34624–34630.
- Gerber, J., and Lill, R. (2002).** Biogenesis of iron–sulfur proteins in eukaryotes: Components, mechanism and pathology. *Mitochondrion* 2: 71–86.
- Geßler, A., Schneider, S., Weber, P., Hanemann, U., and Rennenberg, H. (1998).** Soluble N compounds in trees exposed to high loads of N: a comparison between the roots of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst) and beech (*Fagus sylvatica*) trees grown under field conditions. *New Phytologist.* 138: 385–399.

- Gietl, C.** (1992). Malate dehydrogenase isoenzymes: Cellular locations and role in the flow of metabolites between the cytoplasm and cell organelles. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1100: 217-234.
- Gigolashvili, T., and Kopriva, S.** (2014). Transporters in plant sulfur metabolism. *Front. Plant Sci.* 5: 442.
- Giles, N.M., Giles, G.I., and Jacob, C.** (2003). Multiple role of cysteine in biocatalysis. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 300: 1–4.
- Giovannetti, M., Tolosano, M., Volpe, V., Kopriva, S., and Bonfante, P.** (2014). Identification and functional characterization of a sulfate transporter induced by both sulfur starvation and mycorrhiza formation in *Lotus japonicus*. *New Phytol.* 204: 609-619.
- Gläser, K., Kanawati, B., Kubo, T., Schmitt-Kopplin, P., and Grill, E.** (2014). Exploring the Arabidopsis sulfur metabolome. *Plant J.* 77: 31–45.
- Goedhart, J., Hink, M.A., Visser, A.J.W.G., Bisseling, T., and Gadella, Jr., T.W.J.** (2000). *In vivo* fluorescence correlation microscopy (FCM) reveals accumulation and immobilization of Nod factors in root hair cell walls. *Plant J.*, 21: 109-119.
- Goggin, D.E., Lipscombe, R., Fedorova, E., Millar, A.H., Mann, A., Atkins, C.A., and Smith, P.M.C.** (2003). Dual intracellular localization and targeting of aminoimidazole ribonucleotidesynthetase in cowpea. *Plant Physiol.* 131: 1033–1041.
- Gogorcena, Y., Gordon, A.J., Escuredo, P.R., Minchin, F.R., Witty, J.F., Moran, J.F., and Becana, M.** (1997). N<sub>2</sub> fixation, carbon metabolism, and oxidative damage in nodules of dark-stressed common bean plants. *Plant Physiol.* 113: 1193-1201.
- Gojon, A., Nacry, P., and Davidian, J.-C.** (2009). Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12: 328–338.
- Gonzales, E.M., Gordon, A.J., James, C.L. and Arrese-Igor, C.** (1995). The role of sucrose synthase in the response of soybean nodules to drought. *J Exp. Bot.* 46:1515-1523.
- Gordon, A.J.** (1995). Sucrose metabolism to support N<sub>2</sub> fixation in legume root nodules. In: (Tikhonovich, I.A., Provorov, N.A., Romanov, V.I., Newton, W.E., Eds), *Nitrogen fixation: fundamentals and applications*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands, 533-538.



- Gordon, A.J., Minchin, F.R., James, C.L., and Komina, O.** (1999). Sucrose Synthase in Legume Nodules is Essential for Nitrogen Fixation. *Plant Physiol.* 120: 867-877.
- Gordon, A.J., Ougham, H.J., and James, C.L.** (1993). Changes in the levels of gene transcripts and their corresponding proteins in nodules of soybean plants subjected to dark-induced stress. *J. Exp. Bot.* 44: 1453-1460.
- Gordon, A.J., Ryle, G.J.A., Mitchell, D.F., and Powell, C.E.** (1985). The flux of  $^{14}\text{C}$  labeled photosynthate through soybean root nodules during  $\text{N}_2$  fixation. *J. Exp. Bot.* 36: 756-759.
- Gotz, R., Gnann, A., and Zimmermann, F.K.** (1999). Deletion of the carbonic anhydrase-like gene NCE103 of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* causes an oxygen-sensitive growth defect. *Yeast* 15: 855-864.
- Gregerson, R.G., Miller, S.S., Petrowski, M., Gantt, J.S., and Vance, C.P.** (1994). Genomic structure, expression and evolution of the alfalfa aspartate aminotransferase genes. *Plant Mol. Biol.* 25: 387-399.
- Gromes, R., Hothorn, M., Lenherr, E.D., Rybin, V., Scheffzek, K., et al.** (2008). The redox switch of  $\gamma$ -glutamylcysteine ligase via a reversible monomer-dimer transition is a mechanism unique to plants. *Plant J.* 54: 1063-75.
- Haas, F.H., Heeg, C., Queiroz, R., Bauer, A., Wirtz, M., and Hell, R.** (2008). Mitochondrial serine acetyltransferase functions as a pacemaker of cysteine synthesis in plant cells. *Plant Physiol.* 148: 1055-67.
- Hadri, A., Spaink, H.P., Bisseling, T., and Brewin N.J.** (1998). Diversity of Root Nodulation and Rhizobial Infection Processes. In: (Spaink, H.P., Kondorosi, A. and Hooykaas, P.J.J., Eds.), *The Rhizobiaceae: molecular biology of model plant-associated bacteria*, Kluwer Academic Publishers.
- Hall, J.L.** (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* 53: 1-11.
- Hardy, R.W.F., and Havelka, U.D.** (1976). Photosynthate as a major factor limiting nitrogen fixation by field grown legumes with emphasis on soybean. *Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants*, ed. P.S. Nutman, pp 421-439.

- Harmer, S.L., Hogenesch, L.B., Straume, M., Chang, H.S., Han, B., Zhu, T., Wang, X., Kreps, J.A., Kay, S.A.** (2000). Orchestrated transcription of key pathways in Arabidopsis by the circadian clock. *Science*. 290: 2110–2113.
- Harms, K., von Ballmoos, P., Brunold, C., Hoffgen, R., and Hesse, H.** (2000). Expression of a bacterial serine acetyltransferase in transgenic potato plants leads to increased levels of cysteine and glutathione. *Plant J.* 22: 335–343.
- Harrison, J., Jamet, A., Muglia, C.I., Van de Sype, G., Aguilar, O.M., Puppo, A., and Frendo, P.** (2005). Glutathione Plays a Fundamental Role in Growth and Symbiotic Capacity of *Sinorhizobium meliloti*. 187: 168–174.
- Hartmann, K., Peiter, E., Koch, K., Schubert, S., and Schreiber, L.** (2002). Chemical composition and ultrastructure of broad bean (*Vicia faba* L.) nodule endodermis in comparison to the root endodermis. *Planta* 215: 14–25.
- Hassinen, V.H., Tervahauta, A. I., Schat, H., and Kärenlampi, S.O.** (2011). Plant metallothioneins—metal chelators with ROS scavenging activity? *Plant Biol.* 13: 225–232.
- Hatzfeld, Y., Cathala, N., Grignon, N., and Davidian, J.-C.** (1998). Effect of ATP sulfurylase overexpression in bright yellow 2 tobacco cells. *Plant Physiol.* 116: 1307–1313.
- Havelka, U.D., and Hardy, R.W.F.** (1976). Legume N<sub>2</sub> fixation as a problem in carbon nutrition. *Proceedings 1st International Symposium Nitrogen Fixation*. ed. W.E. Newton, C.J. Nyman, 2: 456–475.
- Hawkesford, M.** (2000). Plant responses to sulfur deficiency and the genetic manipulation of sulfate transporters to improve S-utilisation efficiency. *J. Exp. Bot.* 51: 131–138.
- Hawkesford, M.J.** (2003). Transporter gene families in plants: the sulphate transporter gene family—redundancy or specialization? *Physiol. Plantarum.* 117: 155–163.
- Heeg, C., Kruse, C., Jost, R., Gutensohn, M., Ruppert, T., Wirtz, M., and Hell, R.** (2008). Analysis of the Arabidopsis O-acetylserine(thiol)lyase gene family demonstrates compartment-specific differences in the regulation of cysteine synthesis. *Plant Cell* 20: 168–185.
- Heidstra, R., Yang, W.C., Yalcin, Y., Peck, S., Emons, A.M., Van Kammen, A., et al.** (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.

- Hell, R., and Bergmann, L.** (1990).  $\gamma$ -Glutamylcysteine synthetase in higher plants: catalytic properties and subcellular localization. *Planta* 180: 603–12.
- Herrada, G., Puppo, A., and Rigaud, J.** (1989). Uptake of metabolites by bacteroid containing vesicles and by free bacteroids from french bean nodules. *J. Gen. Microbiol.* 135: 3165–3177.
- Herschbach, C., and Rennenberg, H.** (1994). Influence of glutathione (GSH) on net uptake of sulfate and sulfate transport in tobacco plants. *J. Exp. Bot.* 45: 1069–1076.
- Herschbach, C., and Rennenberg, H.** (1995). Long-distance transport of  $^{35}\text{S}$ -sulphur in 3-year-old beech trees (*Fagus sylvatica*). *Physiol. Plant.* 95: 379–386.
- Herschbach, C., and Rennenberg, H.** (2001a). Significance of phloem-translocated organic sulfur compounds for the regulation of sulfur nutrition. *Prog. Bot.* 62: 177–193.
- Herschbach, C., and Rennenberg, H.** (2001b). Sulfur nutrition of deciduous trees. *Naturwissenschaften* 88: 25–36.
- Herschbach, C., De Kok, L.J., and Rennenberg, H.** (1995). Net uptake of sulfate and its transport to the shoot in spinach plants fumigated with  $\text{H}_2\text{S}$  or  $\text{SO}_2$ : does atmospheric sulfur affect the 'inter-organ' regulation of sulfur nutrition. *Bot. Acta.* 108: 41–46.
- Herschbach, C., Gessler, A., and Rennenberg, H.** (2012). Long-distance transport and plant internal cycling of N- and S-compounds. In *Progress in Botany*, U. Lüttge, W. Beyschlag, B. Büdel, and D. Francis, eds, Progress in Botany. (Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg), pp. 161–188.
- Hesse, H., and Hoefgen, R.** (2003). Molecular aspects of methionine biosynthesis. *Trends Plant Sci.* 8: 259–262.
- Hesse, H., Nikiforova, V., Gakière, B., and Hoefgen, R.** (2004). Molecular analysis and control of cysteine biosynthesis: integration of nitrogen and sulphur metabolism. *J. Exp. Bot.* 55: 1283–1292.
- Hesse, H., Trachsel, N., Suter, M., Kopriva, S., von Ballmoos, P., Rennenberg, H., and Brunold, C.** (2003). Effect of glucose on assimilatory sulphate reduction in *Arabidopsis thaliana* roots. *J. Exp. Bot.* 54: 1701–1709.
- Hewett-Emett, D., and Tashian, R.E.** (1996). Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -carbonic anhydrase gene families. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 5: 50-77.

- Hill, S.** (1992). Physiology of nitrogen fixation in free-living heterotrophs. In (Stacey, G., Burns, R. H. and Evans, H. J., Eds.), *Biological Nitrogen Fixation*, Chapman & Hall, New York, London, 87-134.
- Hirai, M.Y., et al.** (2005). Elucidation of gene-to-gene and metabolite-to-gene networks in *Arabidopsis* by integration of metabolomics and transcriptomics. *J. Biol. Chem.* 280: 25590–25595.
- Hirai, M.Y., Fujiwara, T., Awazuhara, M., Kimura, T., Noji, M., and Saito, K.** (2003). Global expression profiling of sulfur-starved *Arabidopsis* by DNA macroarray reveals the role of O-acetyl-L-serine as a general regulator of gene expression in response to sulfur nutrition. *Plant J.* 33: 651–663.
- Ho, C.-L., and Saito, K.** (2001). Molecular biology of the plastidic phosphorylated serine biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Amino Acids* 20: 243–259.
- Hohnjec, N., Perlick, A.M., Pühler, A., and Küster, H.** (2003). The *Medicago truncatula* sucrose synthase gene *MtSuc1* is activated both in the infected region of root nodules and in the cortex of roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16: 903-915.
- Holmes, D.S., and Quigley, M.** (1981). A rapid boiling method for the preparation of Bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114: 193-197.
- Hopkins, L., Parmar, S., Baszczyk, A., Hesse, H., Hoefgen, R., and Hawkesford, M.J.** (2005). O-acetylserine and the regulation of expression of genes encoding components for sulfate uptake and assimilation in potato. *Plant Physiol.* 138: 433–440.
- Hostak, M., Henson, C.A., Duke, S.H., and Vandenbosch, K.A.** (1987). Starch granule distribution between cell types of alfalfa nodules as affected by symbiotic development. *Can. J. Bot.* 65: 1108-1115.
- Hubbell, D.H., and Kidder, G.** (2003). *Biological Nitrogen Fixation*. Univ. Florida, IFAS Extension.
- Hunt, S., and Layzell, B.D.** (1993). Gas exchange of legume nodules and the regulation of nitrogenase activity. *Annual Review of Plant Physiol. and Mol. Biol.* 44: 483-511.
- Hunt, S., and Layzell, D.B.** (1993). Gas exchange of legume nodules and the regulation of nitrogenase activity. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 44: 483–511.

- Iannetta, P.P.M., de Lorenzo, C., James, E.K., Fernandez-Pascual, M., Sprent, J.I., Lucas, M.M., Witty, J.F., de Felipe, M.R., and Minchin, F.R. (1993). Oxygen diffusion in lupin nodules I. Visualization of diffusion barrier operation. *J. Exp. Bot.* 44: 1461-1467.
- Innocenti, G., Pucciariello, C., Le Gleuher, M., Hopkins, J., de Stefano, M., Delledonne, M., et al. (2007). Glutathione synthesis is regulated by nitric oxide in *Medicago truncatula* roots. *Planta*. 225: 1597–1602.
- Inue, H., Nijima, H., and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28.
- Ireland, R.J., and Lea, P.J. (1999). The enzymes of glutamine, asparagine, and aspartate metabolism. In (B. K. Singh, Ed.), *Plant amino acids*, New York, NY: Marcel Dekker. 49-109.
- Irigoyen, J.J., Sanchez-Diaz, M., and Emerich, D.W. (1990). Carbon metabolism enzymes of *Rhizobium meliloti* cultures and bacteroids and their distribution within alfalfa nodules. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 2587-2589.
- Iturbe-Ormaetxe, I., Heras, B., Matamoros, M.A., Ramos, J., Moran, J.F., and Becana, M. (2002). Cloning and functional characterization of a homoglutathione synthetase from pea nodules. *Physiol. Plant*. 115: 69–73.
- Johnson, D.C., Dean, D.R., Smith, A.D., and Johnson, M.K. (2005). Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annu. Rev. Biochem.* 74: 247–281.
- Jording, D., and Pühler, A. (1993). The membrane topology of the *Rhizobium meliloti* C<sub>4</sub>-dicarboxylate permease (DctA) as derived from protein fusions with *Escherichia coli* K12 alkaline-phosphatase (PhoA) and beta-galactosidase (LacZ). *Mol. Gen. Genet.* 241: 106–114.
- Jost, R., Berkowitz, O., Wirtz, M., Hopkins, L., Hawkesford, M.J., and Hell, R. (2000). Genomic and functional characterization of the *oas* gene family encoding O-acetylserine (thiol) lyases, enzymes catalyzing the final step in cysteine biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*. 253: 237–247.
- Jost, R., et al. (2005). Expression profiling of metabolic genes in response to methyl jasmonate reveals regulation of genes of primary and secondary sulfur-related pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Photosynth. Res.* 86: 491–508.

- Kahn, M.L., Kraus, J., and Sommerville, J.E.** (1985). A model of nutrient exchange in the *Rhizobium*-legume symbiosis. In: (H.J. Evans, P.J. Bottomley, W.E. Newton, Eds), *Nitrogen Fixation Research Progress*. Martinus Nijhoff, Dordrecht, The Netherlands, 193–199.
- Kahn, M.L., McDermott, T.R., and Udvardi, M.K.** (1998). Carbon and Nitrogen Metabolism in Rhizobia, In: (Spaink, H.P., Kondorosi, A. and Hooykaas, P.J.J., Eds.), *The Rhizobiaceae: molecular biology of model plant-associated bacteria*, Kluwer Academic Publishers.
- Kaiser, B.N., Finnegan, P.M., Tyerman, S.D., Whitehead, L.F., Bergersen, F.J., Day, D.A., and Udvardi, M.K.** (1998). Characterization of an ammonium transport protein from the peribacteroid membrane of soybean nodules. *Science* 281: 1202–1206.
- Kalloniati, C., Tsikou, D., Lampiri, V., Fotelli, M.N., Rennenberg, H., Chatzipavlidis, I., Fasseas, C., Katinakis, P., and Flemetakis, E.** (2009). Characterization of a *Mesorhizobium loti*  $\alpha$ -type carbonic anhydrase and its role in symbiotic nitrogen fixation. *J. Bacteriol.* 191: 2593–2600.
- Kaminski, P.A., Batut, J., and Boistard, P.** (1998). A Survey of Symbiotic Nitrogen Fixation by Rhizobia, In: (Spaink, H.P., Kondorosi, A. and Hooykaas, P.J.J., Eds.), *The Rhizobiaceae: molecular biology of model plant-associated bacteria*, Kluwer Academic Publishers.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., et al.** (2000). Complete genome structure of the nitrogen fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.* 7: 331–338.
- Kataoka, T., Hayashi, N., Yamaya, T., and Takahashi, H.** (2004a). Root-to-shoot transport of sulfate in Arabidopsis: evidence for the role of SULTR3;5 as a component of low-affinity sulfate transport system in the root vasculature. *Plant Physiol.* 136: 4198–4204.
- Kataoka, T., Watanabe-Takahashi, A., Hayashi, N., Ohnishi, M., Mimura, T., Buchner, P., Hawkesford, M.J., Yamaya, T., and Takahashi, H.** (2004b). Vacuolar sulfate transporters are essential determinants controlling internal distribution of sulfate in Arabidopsis. *Plant Cell.* 16: 2693–2704.
- Kavroulakis, N., Flemetakis, E., Aivalakis, G., and Katinakis, P.** (2000). Carbon Metabolism in Developing Soybean Root Nodules: The Role of Carbonic Anhydrase. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13: 14–22.
- Kawashima, C.G., Berkowitz, O., Hell, R., Noji, M., and Saito, K.** (2005). Characterization and expression analysis of a serine acetyltransferase gene family involved in a key step of the sulfur assimilation pathway in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 137: 220–230.

- Kelly, G.J., Lutzko, E., and Gibbs, M.** (1976). Regulatory aspects of photosynthetic carbon metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 27: 181-205.
- Kerppola, T.K., and Kahn, M.L.** (1988). Symbiotic phenotypes of auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* 104a14. *J. Gen. Microbiol.* 134: 913-919.
- Kijne, J.W.** (1992). The *Rhizobium* infection process. In: (G. Stacey, R.H. Burris and H.J. Evans, Eds.), *Biological Nitrogen Fixation*, Chapman & Hall, New York, 349-398.
- King, B.J., Layzell, D.B., and Calvin, D.T.** (1986). The role of dark carbon dioxide fixation in root nodules of soybean. *Plant Physiol.* 81: 200-205.
- Klapheck, S., Latus, C., and Bergmann, L.** (1987). Localization of glutathione synthetase and distribution of glutathione in leaf cells of *Pisum sativum* L. *J. Plant Physiol.* 131: 123-31.
- Klapheck, S., Zopes, H., Levels, H. G., and Bergmann, L.** (1988). Properties and localization of the homoglutathione synthetase from *Phaseolus coccineus* leaves. *Physiol. Plant.* 74: 733-739.
- Kocsy, G., Owtrim, G., Brander, K., and Brunold, C.** (1997). Effect of chilling on the diurnal rhythm of enzymes involved in protection against oxidative stress in a chilling-tolerant and a chilling-sensitive maize genotype. *Physiologia Plantarum.* 99: 249-254.
- Kopriva S, and Koprivova A.** (2003). Sulphate assimilation: a pathway which likes to surprise. In: Abrol YP, Ahmad A eds, *Sulphur in higher plants*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 87-112.
- Kopriva, S., and Koprivova, A.** (2004). Plant adenosine 5'-phosphosulphate reductase: the past, the present, and the future. *J. Exp. Bot.* 55: 1775-1783.
- Kopriva, S., and Rennenberg, H.** (2004). Control of sulphate assimilation and glutathione synthesis: interaction with N and C metabolism. *J. Exp. Bot.* 55: 1831-1842.
- Kopriva, S., Fritzeimer, K., Wiedemann, G., and Reski, R.** (2007a). The putative moss 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate reductase is a novel form of adenosine 5'-phosphosulfate reductase without iron sulfur cluster. *J. Biol. Chem.* 282: 22930-22938.
- Kopriva, S., Muheim, R., Koprivova, A., Trachsel, N., Catalano, C., Suter, M., and Brunold, C.** (1999). Light regulation of assimilatory sulfate reduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 20: 37-44.

- Kopriva, S., Suter, M., von Ballmoos, P., Hesse, H., Krahenbuhl, U., Rennenberg, H., and Brunold, C.** (2002). Interaction of sulphate assimilation with carbon and nitrogen in *Lemna minor*. *Plant Physiol.* 130: 1406–1413.
- Kopriva, S., Wiedemann, G., and Reski, R.** (2007b). Sulfate assimilation in basal land plants: what does genomic sequencing tell us? *Plant Biol.* 9: 556–564.
- Koprivova, A., Melzer, M., von Ballmoos, P., Mandel, T., Brunold, C., and Kopriva, S.** (2001). Assimilatory sulfate reduction in C<sub>3</sub>, C<sub>3</sub>–C<sub>4</sub>, and C<sub>4</sub> species of *Flaveria*. *Plant Physiol.* 127: 543–550.
- Koprivova, A., Mugford, S.T., and Kopriva, S.** (2010). Arabidopsis root growth dependence on glutathione is linked to auxin transport. *Plant Cell Rep.* 29: 1157–67.
- Koprivova, A., North, K.A., and Kopriva, S.** (2008). Complex signaling network in regulation of adenosine 5'-phosphosulfate reductase by salt stress in Arabidopsis roots. *Plant Physiol.* 146: 1408–1420.
- Koprivova, A., Suter, M., Op den Camp, R., Brunold, C., and Kopriva, S.** (2000). Regulation of sulfate assimilation by nitrogen in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 122: 737–746.
- Kouchi, H., and Hata, S.** (1993). Isolation and characterization of novel nodulin cDNAs representing genes expressed at early stages of soybean nodule development. *Mol. Gen. Genet.* 238: 106-119.
- Kouchi, H., and Nakaji, K.** (1985). Utilization and metabolism of photoassimilated <sup>13</sup>C in soybean roots and nodules. *Soil Science and Plant Nutrition.* 31: 323-334.
- Kouchi, H., Nakaji, K., Yoneyama, T., and Ishizuka, J.** (1985). Dynamics of carbon photosynthetically assimilated in nodulated soybean plants under steady state conditions. 3. Time course study on <sup>14</sup>C incorporation into soluble metabolites and respiratory evolution of CO<sub>2</sub> from roots and nodules. *Ann. Bot.* 56: 333-346.
- Kouchi, H., Shimomura, K., Hata, S., Hirota, A., Wu, G., Kumagai, H., Tajima, S., Suganuma, N., Suzuki, A., Aoki, T., Hayashi, M., Yokoyama, T., Ohyama, T., Asamizu, E., Kuwata, C., Shibata, D., and Tabata, S.** (2004). Large-Scale Analysis of Gene Expression Profiles during Early Stages of Root Nodule Formation in a Model Legume, *Lotus japonicus*. *DNA Research.* 11: 263-274.
- Kredich, N.M.** (1996). Biosynthesis of cysteine. In *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, F. Neidhardt, ed (Washington, D.C.: ASM Press), pp. 514–527.



- Kretovich, V.L., Karyakina, T.I., Sidelnikova, L.I., Shaposhnikov, G.L., and Kaloshina, G.S.** (1986). Nitrogen fixation and biosynthesis of aspartic acid and alanine by bacteroids of *Rhizobium lupini* on various carbon sources. Dokl Akad Nauk SSSR 291: 1008–1011.
- Krishnan, H.B., Natarajan, S.S., Bennett, J.O., and Sicher, R.C.** (2011). Protein and metabolite composition of xylem sap from field-grown soybeans (*Glycine max*). Planta. 233: 921-931.
- Krueger, S., Niehl, A., Lopez Martin, M.C., Steinhauser, D., Donath, A., Hildebrandt, T., Romero, L.C., Hoefgen, R., Gotor, C., and Hesse, H.** (2009). Analysis of cytosolic and plastidic serine acetyltransferase mutants and subcellular metabolite distributions suggests interplay of the cellular compartments for cysteine biosynthesis in Arabidopsis. Plant. Cell Environ. 32: 349–367.
- Krusell, L. et al.** (2005). The Sulfate Transporter SST1 Is Crucial for Symbiotic Nitrogen Fixation in *Lotus japonicus* Root Nodules. Plant Cell 17: 1625–1636.
- Lance, C., and Rustin, P.** (1984). The central role of malate in plant metabolism. Physiol. Veg. 22: 625-641.
- Lane, T.W., and Morel, F.M.M.** (2000). A biological function for cadmium in marine diatoms. Proc. Natl Acad. Sci. USA 97: 4627-4631.
- Lappartient, A.G., and Touraine, B.** (1996). Demand-driven control of root ATP sulfurylase activity and  $\text{SO}_4^{2-}$  uptake in intact canola: the role of phloem-translocated glutathione. Plant Physiol. 111: 147–157.
- Lappartient, A.G., Vidmar, J.J., Leustek, T., Glass, A.D.M., and Touraine, B.** (1999). Inter-organ signaling in plants: regulation of ATP sulfurylase and sulfate transporter genes expression in roots mediated by phloem-translocated compound. Plant J. 18: 89–95.
- Lawn, R.J., and Brun, W.A.** (1974). Symbiotic nitrogen fixation in soybeans. I. Effect of photosynthate source-sink manipulation. Crop Sci. 14: 11-16.
- Layzell, D.B., Hunt, S., and Palmer, G.R.** (1990). Mechanisms of nitrogenase inhibition in soybean nodules: pulse-modulated spectroscopy indicates that nitrogenase activity is limited by  $\text{O}_2$ . Plant Physiol. 92: 1101–1107.
- Lee, S.M., and Leustek, T.** (1999). The affect of cadmium on sulfate assimilation enzymes in *Brassica juncea*. Plant Sci. 141: 201–207.

- Leigh, J.A., and Walker, G.C.** (1994). Exopolysaccharides of *Rhizobium*: synthesis, regulation and symbiotic function. *Trends in Genetics*. 10: 63-67.
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé, J.C., and Dénarié, J.** (1990). Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acetylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature*. 344: 781-784.
- Leustek, T., and Saito, K.** (1999). Sulfate Transport and Assimilation in Plants. *Plant Physiol.* 120: 637–643.
- Leustek, T., Martin, M.N., Bick, J.A., and Davies, J.P.** (2000). Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 141–165.
- Lindskog, S.** (1997). Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacological Therapeutics* 74: 1-20.
- Lodeiro, A.R., Lagares, A., Martinez, E.N., and Favelukes, G.** (1995). Early Interactions of *Rhizobiumleguminosarum* bv. phaseoli and Bean Roots: Specificity in the Process of Adsorption and Its Requirement of  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  Ions *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1571-1579.
- Lodwig, E., and Poole, P.** (2003). Metabolism of *Rhizobium* bacteroids. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 22: 37–78.
- Lodwig, E.M., Hosie, A.H.F., Bourdes, A., Findlay, K., Allaway, D., Karunakaran, R., Downie, J.A., and Poole, P.S.** (2003). Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Nature*. 422: 722–726.
- Logan, H.M., Cathala, N., Grignon, N., and Davidian, J.-C.** (1996). Cloning of a cDNA encoded by a member of the Arabidopsis thaliana ATP sulfurylase multigene family: expression studies in yeast and in relation to plant sulfur nutrition. *J. Biol. Chem.* 271: 12227–12233.
- Loudet, O., Saliba-Colombani, V., Camilleri, C., Calenge, F., Gaudon, V., Koprivova, A., North, K.A., Kopriva, S., and Daniel-Vedele, F.** (2007). Natural variation for sulfate content in *Arabidopsis thaliana* is highly controlled by APR2. *Nat. Genet.* 39: 896–900.
- Lunn, J.E., Droux, M., Martin, J., and Douce, R.** (1990). Localization of ATP sulfurylase and O-acetylserine(thiol)lyase in spinach leaves. *Plant Physiol.* 94: 1345–1352.

- Macnicol, P.K.** (1987). Homogluthathione and glutathione synthetases of legume seedlings: partial purification and substrate specificity. *Plant Sci.* 53, 229–235.
- Mahon, J.D.** (1982). Field evaluation of growth and nitrogen fixation in peas selected for high and low photosynthetic CO<sub>2</sub> exchange. *Can. J. Plant Sci.* 62: 5-17.
- Marquet, A.** (2001). Enzymology of carbon–sulfur bond formation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5: 541–549.
- Martin, M.N., Tarczynski, M.C., Shen, B., and Leustek, T.** (2005). The role of 5'-adenylylsulfate reductase in controlling sulfate reduction in plants. *Photosynth. Res.* 86: 309–323.
- Marty, L., Siala, W., Schwarzlander, M., Fricker, M.D., Wirtz, M., et al.** (2009). The NADPH-dependent thioredoxin system constitutes a functional backup for cytosolic glutathione reductase in Arabidopsis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 106: 9109–14.
- Maruyama-nakashita, A., Nakamura, Y., Yamaya, T., and Takahashi, H.** (2004). Regulation of high-affinity sulphate transporters in plants: towards systematic analysis of sulphur signalling and regulation. *J. Exp. Bot.* 55: 1843–1849.
- Marzluf, G.A.** (1997). Molecular genetics of sulfur assimilation in filamentous fungi and yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* 51: 73-96.
- Masi, A., Ghisi, R., and Ferretti, M.** (2002). Measuring low-molecular-weight thiols by detecting the fluorescence of their SBD-derivatives: application to studies of diurnal and UV-B induced changes in *Zea mays* L. *Journal of Plant Physiology* 159: 499–507.
- Matamoros, M. A, Clemente, M.R., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S., Ramos, J., Moran, J.F., Stiller, J., Gresshoff, P.M., and Becana, M.** (2003). Molecular analysis of the pathway for the synthesis of thiol tripeptides in the model legume *Lotus japonicus*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 16: 1039–1046.
- Matamoros, M.A, Moran, J.F., Iturbe-Ormaetxe, I., Rubio, M.C., and Becana, M.** (1999b). Glutathione and homogluthathione synthesis in legume root nodules. *Plant Physiol.* 121: 879–888.
- Matamoros, M.A., Baird, L.M., Escuredo, P.R., Dalton, D.A., Minchin, F.R., Iturbe-Ormaetxe, I., Rubio, M.C., Moran, J.F., Gordon, A.J., and Becana, M.** (1999a). Stress-induced legume root nodule senescence. Physiological, biochemical, and structural alterations. *Plant Physiol.* 121: 97-112.

- Mathesius, U., Charon, C., Rolfe, B.G., Kondorosi, A., and 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.
- Matthysse, A.G., and Kijne J.W.** (1998). Attachment of *Rhizobiaceae* to Plant Cells, In: (Spaink, H.P., Kondorosi, A., and Hooykaas, P.J.J., Eds.), *The Rhizobiaceae: molecular biology of model plant-associated bacteria*, Kluwer Academic Publishers.
- Maunoury, N., Kondorosi, A., Kondorosi, E., and Mergaert, P.** (2008). Cell biology of nodule infection and development, In: (Dilworth M.J., James, E.K., Sprent, J.I. and Newton, W.E., Eds.), *Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses*, Springer.
- May, M.J., Vernoux, T., Leaver, C., Van Montagu, M., and Inzé, D.** (1998). Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *J. Exp. Bot.* 49: 649–667.
- Meeks, J.C., Wolk, P.C., Schilling, N., Shaffer, P.W., Avissar, Y., and Chien, W. S.** (1978). Initial organic products of fixation of  $^{15}\text{N}$  dinitrogen by root nodules of soybean (*Glycine max*). *PlantPhysiol.*, 61: 980-983.
- Mendel, R.R., and Hañnsch, R.** (2002). Molybdoenzymes and molybdenum cofactor in plants. *J. Exp. Bot.* 53: 1689–1698.
- Mett, V.L., Podivinsky, E., Tennant, A.M., Lochhead, L.P., Jones, W.T., and Reynolds, P.H.** (1996). A system for tissue-specific copper-controllable gene expression in transgenic plants: nodule-specific antisense of aspartate aminotransferase-P2. *Transgenic Res.* 5: 105–113.
- Miflin, B.J., and Habash, D.Z.** (2002). The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in N assimilation and possibilities for improvement in nitrogen utilization by crops. *J. Exp. Bot.* 53, 979-987.
- Miller, D.D., de Ruijter, N.C.A., Bisseling, T., and Emons, A.M.C.** (1999). The role of actin in root hair morphogenesis: Studies with lipochito-oligosaccharide as a growth stimulator and cytochalasins as an actin perturbing drug. *Plant J.* 17: 141-154.
- Miller, S.S., Driscoll, B.T., Gregerson, R.G., Gant, J.S., and Vance C.P.** (1998). Alfalfa malate dehydrogenase (MDH): molecular cloning and characterization of five different forms reveals a unique nodule-enhanced MDH. *Plant J.* 15: 173-184.

- Minchin, F.R., Minguéz, I., Sheehy, J.E., Witty, J.F., and Skot, L.** (1986). Relationships between nitrate and oxygen supply in symbiotic nitrogen fixation by white clover. *Journal of Experimental Botany* 37: 1103-1113.
- Minchin, F.R., Summerfield, R.J., Hadley, P., Roberts, E.H., and Rawsthorn, S.** (1981). Carbon and nitrogen nutrition of nodulated roots of grain legumes. *Plant Cell Environ.* 4: 5-26.
- Mitsch, M.J., Cowie, A., and Finan, T.M.** (2007). Malic enzyme cofactor and domain requirements for symbiotic N<sub>2</sub> fixation by *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol.* 189:160-8.
- Mittler, R.** (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7: 405-410.
- Moran, J.F., Iturbe-Ormaetxe, I., Matamoros, M.A., Rubio, M.C., Clemente, M.R., Brewin, N.J., et al.** (2000). Glutathione and homoglutathione synthetases of legume nodules. Cloning, expression, and subcellular localization. *Plant Physiol.* 124: 1381-1392.
- Moroney, J.V., Bartlett, S.G., and Samuelsson, G.** (2001). Carbonic anhydrases in plants and algae. *Plant Cell Env.* 24: 141-153.
- Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B., and Boivin-Masson, C.** (2001). Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature.* 411: 948-950.
- Mugford, S.G., et al.** (2009). Disruption of adenosine-5'-phosphosulfate kinase in *Arabidopsis* reduces levels of sulfated secondary metabolites. *Plant Cell.* 21: 910-927.
- Muglia, C., Comai, G., Spegazzini, E., Riccillo, P.M., and Aguilar, O.M.** (2008). Glutathione produced by *Rhizobium tropici* is important to prevent early senescence in common bean nodules. *FEMS Microbiol. Lett.* 286: 191-198.
- Mulley, G., Lopez-Gomez, M., Zhang, Y., Terpolilli, J., Prell, J., et al.** (2010). Pyruvate is synthesized by two pathways in pea bacteroids with different efficiencies for nitrogen fixation. *J. Bacteriol.* 192: 4944-53.
- Mullineaux, P., and Rausch, T.** (2005). Glutathione, photosynthesis and the redox regulation of stress-responsive gene expression. *Photosynth. Res.* 86: 459-474.
- Murphy, P.M.** (1986). The effect of light and atmospheric carbon dioxide concentration on nitrogen fixation by herbage legumes. *Plant Soil* 95: 399-409.

- Mylona, P., Pawlowki, K., and Bisseling, T.** (1995). Symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell*. 7: 869-885.
- Nap, J.P., and Bisseling, T.** (1990). Developmental Biology of a Plant-Prokaryote Symbiosis: The Legume Root Nodule. *Science*. 250: 948-954.
- Neuenschwander, U., Suter, M., and Brunold, C.** (1991). Regulation of sulfate assimilation by light and O-acetyl-L-serine in *Lemna minor*. *L. Plant Physiol.* 97: 253–258.
- Niemietz, C.M., and Tyerman, S.D.** (2000). Channel-mediated permeation of ammonia gas through the peribacteroid membrane of soybean nodules. *FEBS Lett.* 465: 110–114.
- Nikiforova, V., Freitag, J., Kempa, S., Adamik, M., Hesse, H., and Hoefgen, R.** (2003). Transcriptome analysis of sulfur depletion in *Arabidopsis thaliana*: interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity. *Plant J.* 33: 633–650.
- Nikiforova, V., Kempa, S., Zeh, M., Maimann, Kreft, O., Casazza, A.P., Riedel, K., Tauberger, E., Hoefgen, R., and Hesse, H.** (2002). Engineering of cysteine and methionine biosynthesis in potato. *Amino Acids* 22: 259–278.
- Nocito, F., Lancilli, C., Crema, B., Fourcroy, P., Davidian, J.-C., and Sacchi, G.A.** (2006). Heavy metal stress and sulfate uptake in maize roots. *Plant Physiol.* 141: 1138–1148.
- Noctor, G., Arisi, A.-C.M., Jouanin, L., Kunert, K.J., Rennenberg, H., Foyer, C.H.** (1998). Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *J. Exp. Bot.* 49: 623–647.
- Noctor, G., Arisi, A.-C.M., Jouanin, L., Valadier, M.-H., Roux, Y., Foyer, C.H.** (1997a). The role of glycine in determining the rate of glutathione synthesis in poplars. Possible implications for glutathione production during stress. *Physiol. Plant.* 100: 255–263.
- Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H., and Foyer, C.H.** (2002). Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling. *J. Exp. Bot.* 53: 1283–1304.
- Noctor, G., Jouanin, L., Arisi, A.-C.M., Valadier, M.-H., Roux, Y., Foyer, C.H.** (1997b). Light-dependent modulation of foliar glutathione synthesis and associated amino acid metabolism in transformed poplar. *Planta.* 202: 357–369.
- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B., Queval, G., and Foyer, C.H.** (2012). Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant. Cell Environ.* 35: 454–484.

- Noji, M., and Saito, K.** (2002). Molecular and biochemical analysis of serine acetyltransferase and cysteine synthase towards sulfur metabolic engineering in plants. *Amino Acids* 22: 231–243.
- Noji, M., Inoue, K., Kimura, N., Gouda, A., and Saito, K.** (1998). Isoform-dependent Differences in Feedback Regulation and Subcellular Localization of Serine Acetyltransferase Involved in Cysteine Biosynthesis from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 273: 32739–32745.
- Nomura, M., Mai, H.T., Fujii, M., Hata, S., Izui, K., and Tajima, S.** (2006). Phosphoenolpyruvate carboxylase plays a crucial role in limiting nitrogen fixation in *Lotus japonicus* nodules. *Plant Cell Physiol.* 47: 613–621.
- Nuccio, M.L., Rhodes, D., McNeil, S.D., and Hanson, A.D.** (1999). Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 128–134.
- Nukui, N., Ezura, H., and Minamisawa, K.** (2004). Transgenic *Lotus japonicus* with an ethylene receptor gene *Cm-ERS1/H70A* enhances formation of infection threads and nodule primordia. *Plant Cell Physiol.* 45: 427–435.
- Ohkama, N., Takei, K., Sakakibara, H., Hayashi, H., Yoneyama, T., and Fujiwara, T.** (2002). Regulation of sulfur-responsive gene expression by exogenously applied cytokinins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 43: 1493–1501.
- Ohkama-Ohtsu, N., Kasajima, I., Fujiwara, T., and Naito, S.** (2004). Isolation and characterization of an *Arabidopsis* mutant that overaccumulates O-acetyl-L-Ser. *Plant Physiol.* 136: 3209–3222.
- Oldroyd, G.E., and Downie, J.A.** (2004). Calcium kinases and nodulation signalling in legumes. *Nat.Rev. Mol. Cell. Biol.* 5: 556–576.
- Oldroyd, G.E.D., Harrison, M.J., and Udvardi, M.** (2005). Peace Talks and Trade Deals. Keys to Long-Term Harmony in Legume-Microbe Symbioses. *Plant Physiol.* 137: 1205–1210.
- Ouyang, L., Udvardi, M.K., and Day, D.** (1990). Specificity and regulation of the dicarboxylate carrier on the peribacteroid membrane of soybean nodules. *Planta* 182: 437–444.
- Ouyang, L.J., and Day, D.A.** (1992). Transport properties of symbiosomes isolated from siratro nodules. *Plant Physiol. Biochem.* 30: 613–623.

- Pain, A.N.** (1979). Symbiotic properties of antibiotic-resistant and auxotrophic mutants of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Appl. Bacteriol.* 47: 53–64.
- Papadopoulou, K., Roussis, A., and Katinakis, P.** (1996). *Phaseolus* ENOD40 is involved in symbiotic and non-symbiotic organogenesis processes: expression during nodule and lateral root development. *Plant Mol. Biol.* 30: 403-417.
- Parmar, S., Buchner, P., and Hawkesford, M.J.** (2007). Leaf developmental stage affects sulfate depletion and specific sulfate transporter expression during sulfur deprivation in *Brassica napus*. *L. Plant Biol.* 9: 647–653.
- Passera, C., Ghisi, R., and Ferretti, M.** (1989). Light-activation of ATP- sulfurylase in leaves and chloroplasts of *Zea mays*. *Photosynthetica.* 23: 166–172.
- Pasternak, M., Lim, B., Wirtz, M., Hell, R., Cobbett, C.S., et al.** (2008). Restricting glutathione biosynthesis to the cytosol is sufficient for normal plant development. *Plant J.* 53: 999–1012.
- Pathirana, M.S., Samac, D.A., Roeven, R., Yoshioka, H., Vance, C.P., and Gantt, J.S.** (1997). Analyses of phosphoenolpyruvate carboxylase gene structure and expression in alfalfa nodules. *Plant J.* 12: 293-304.
- Patron, N., Durnford, D., and Kopriva, S.** (2008). Sulfate assimilation in eukaryotes: evolutionary origins and subcellular localisation. *BMC Evol. Biol.* 8: 39.
- Peiter, E., Yan, F., and Schubert, S.** (2004). Amino acid export from infected cells of *Vicia faba* root nodules: evidence for an apoplastic step in the infected zone. *Physiol. Plant.* 122: 107–114.
- Penmetsa, R.V., and Cook, D.R.** (1997). A legume ethylene-insensitive mutant hyperinfected by its rhizobial symbiont. *Science.* 275: 527-530.
- Perry, J.A., Wang, T.L., Welham TJ, Gardner S, Pike JM, Yoshida S, Parniske M.** (2003). A TILLING reverse genetics tool and a web-accessible collection of mutants of the legume *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* 131: 866-871.
- Peters, N.K., and Crist-Estes, D.K.** (1989). Nodule formation is stimulated by the ethylene inhibitor aminoethoxyvinylglycine. *Plant Physiol.* 91: 690–693.
- Petre, B., Morin, E., Tisserant, E., Hacquard, S., Da Silva, C., Poulain, J., et al.** (2012). RNA-Seq of early-infected poplar leaves by the rust pathogen *Melampsora larici-populina* uncovers PtSultr3;5, a fungal-induced host sulfate transporter. *PLoS ONE.* 7: e44408.



- Pfeiffer, N.E., Malik, N.S., and Wagner, F.W.** (1983). Reversible dark-induced senescence of soybean root nodules. *Plant Physiol.* 71: 393-9.
- Phillips, D.A.** (1980). Efficiency of symbiotic nitrogen fixation in legumes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31: 29-49.
- Pilon-Smits, E.A., Hwang, S., Mel Lytle, C., Zhu, Y., Tai, J.C., Bravo, R.C., Chen, Y., Leustek, T., and Terry, N.** (1999). Overexpression of ATP sulfurylase in indian mustard leads to increased selenate uptake, reduction, and tolerance. *Plant Physiol.* 119: 123–132.
- Poole, P.S., and Allaway, D.A.** (2000). Carbon and nitrogen metabolism in *Rhizobium*. *Adv. Microb. Physiol.* 43: 117–163.
- Prell, J., and Poole, P.** (2006). Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends Microbiol.* 14: 161-168.
- Prell, J., Bourdes, A., Kumar, S., Lodwig, E., Hosie, A., et al.** (2010). Role of symbiotic auxotrophy in the *Rhizobium*-legume symbioses. *PLoS ONE.* 5: e13933.
- Prell, J., White, J.P., Bourdes, A., Bunnell, S., Bongaerts, R.J., and Poole, P.S.** (2009). Legumes regulate *Rhizobium* bacteroid development and persistence by the supply of branched-chain amino acids. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 106: 12477-12482.
- Provorov, N.A., and Vorob'ev, N.I.** (2000). Evolutionary Genetics of Nodule Bacteria: Molecular and Population Aspects. *Russ. J. Gen.* 36: 1323-1335.
- Pucciariello, C., Innocenti, G., Van de Velde, W., Lambert, A., Hopkins, J., Clément, M., Ponchet, M., Pauly, N., Goormachtig, S., Holsters, M., Puppo, A., and Frendo, P.** (2009). (Homo)glutathione depletion modulates host gene expression during the symbiotic interaction between *Medicago truncatula* and *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* 151: 1186–1196.
- Puppo, A., Groten, K., Bastian, F., Carzaniga, R., Soussi, M., Lucas, M.M., et al.** (2005). Legume nodule senescence: Roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. *New Phytol.* 165: 683-701.
- Queval, G., Thominet, D., Vanacker, H., Miginiac-Maslow, M., Gakière, B., and Noctor, G.** (2009). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-activated up-regulation of glutathione in *Arabidopsis* involves induction of genes encoding enzymes involved in cysteine synthesis in the chloroplast. *Mol. Plant.* 2: 344–356.

- Ramakers, C., Rujiter, J.M., Deprez, R.H., and Moorman, A.F.** (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett.* 339: 62-66.
- Rausch, T., Gromes, R., Liedschulte, V., Müller, I., Bogs, J., Galovic, V., et al.** (2007). Novel insight into the regulation of GSH biosynthesis in higher plants. *Plant Biol.* 9: 565–572.
- Ravanel, S., Gakiere, B., Job, D., and Douce, R.** (1998). The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 95: 7805-7812.
- Reibach, P.H., and Streeter, J.G.** (1983). Metabolism of <sup>14</sup>C-labelled photosynthate and distribution of enzymes of glucose metabolism in soybean nodules. *Plant Physiol.* 72: 634-640.
- Rennenberg, H., and Herschbach, C.** (1996). Responses of plants to atmospheric sulphur. In *Plant Response to Air Pollution* (eds M. Yunus & M. Iqbal), pp. 285–294. John Wiley and Sons, Chichester, UK.
- Rennenberg, H., and Herschbach, C.** (2014). A detailed view on sulphur metabolism at the cellular and whole-plant level illustrates challenges in metabolite flux analyses. *J. Exp. Bot.* 65: 5711–5724.
- Rennenberg, H., and Polle, A.** (1994). Metabolic consequences of atmospheric sulphur influx into plants. In *Plant Responses to the Gaseous Environment* (eds R. Alscher & A. Wellburn), pp. 165–180. Chapman & Hall, London, UK.
- Rennenberg, H., Schupp, R., and Schneider, A.** (1994b). Thiol composition of a xylem-tapping mistletoe and the xylem sap of its hosts. *Phytochemistry* 37: 975–977.
- Rennenberg, H., Schupp, R., Glavac, V., and Jochheim, H.** (1994a). Xylem sap composition of beech (*Fagus sylvatica* L.) trees: seasonal changes in the axial distribution of sulfur compounds. *Tree Physiol.* 14: 541–548.
- Renosto, F., Patel, H.C., Martin, R.L., Thomassian, C., Zimmerman, G., and Segel, I.H.** (1993). ATP sulfurylase from higher plants: kinetic and structural characterization of the chloroplast and cytosol enzymes from spinach leaf. *Arch. Biochem. Biophys.* 307: 272–285.
- Reuveny, Z., Dougall, D.K., and Trinity, P.M.** (1980). Regulatory coupling of nitrate and sulfate assimilation pathways in cultured tobacco cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 77: 6670–6672.

- Riemenschneider, A., Riedel, K., Hoefgen, R., Papenbrock, J., and Hesse, H.** (2005). Impact of reduced O-acetylserine(thiol)lyase isoform contents on potato plant metabolism. *Plant Physiol.* 137: 892–900.
- Roberts, D.M., and Tyerman, S.D.** (2002). Voltage-dependent cation channels permeable to  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ , and  $\text{Ca}^{2+}$  in the symbiosome membrane of the model legume *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* 128: 370-378.
- Robinson, D.L., Trepp, G.B., Gregerson, R.G., Twary, S.N., Roeven, R., Gantt, J. S., et al.** (1999). Cloning and developmental expression of a nodule-enhanced sucrose synthase cDNA from alfalfa. In: (E. Martinez and G. Hernandez, Eds.), *Highlights of nitrogen fixation research*, Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers/Plenum Press, 23-31.
- Ronson, C.W., Astwood, P.M., and Downie, J.A.** (1984). Molecular Cloning and Genetic Organization of  $\text{C}_4$ -Dicarboxylate Transport Genes from *Rhizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol.* 160: 903-909.
- Ronson, C.W., Lyttleton, P., and Robertson, J.G.** (1981).  $\text{C}_4$ -dicarboxylate transport mutants of *Rhizobium trifolii* form ineffective nodules on *Trifolium repens*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 78: 4284–4288.
- Rosendahl, L., Dilworth, M.J., and Glenn, A.R.** (1992). Exchange of metabolites across the peribacteroid membrane in pea root nodules. *Plant. Physiol.* 139: 635–638.
- Rosendahl, L., Mouritzen, P., and Rudbeck, A.** (2001). Nitrogen transfer in the interface between the symbionts in pea root nodules. *Plant Soil.* 230: 31–37.
- Rosendahl, L., Vance, C.P., and Pederson, W.B.** (1990). Products of dark  $\text{CO}_2$  fixation in pea root nodules support bacteroid metabolism. *Plant Physiol.* 93: 12-19.
- Rotte, C., and Leustek, T.** (2000). Differential subcellular localization and expression of the ATP sulfurylase and 5'-adenylylsulfate reductase during ontogenesis of Arabidopsis leaves indicates that cytosolic and plastid forms of ATP sulfurylase may have specialized functions. *Plant Physiol.* 124: 715–724.
- Rouached, H., Berthomieu, P., El Kassis, E., Cathala, N., Catherinot, V., Labesse, G., Davidian, J.-C., and Fourcroy, P.** (2005). Structural and functional analysis of the C-terminal STAS (sulfate transporter and anti-sigma antagonist) domain of the Arabidopsis thaliana sulfate transporter SULTR1.2. *J. Biol. Chem.* 280: 15976–15983.

- Rouached, H., Wirtz, M., Alary, R., Hell, R., Arpat, A.B., Davidian, J.-C., Fourcroy, P., and Berthomieu, P.** (2008). Differential regulation of the expression of two high-affinity sulfate transporters, SULTR1.1 and SULTR1.2, in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 147: 897–911.
- Rudbeck, A., Mouritzen, P., and Rosendahl, L.** (1999). Characterization of aspartate transport across the symbiosome membrane in pea root nodules. *Plant Physiol.* 155: 576–583.
- Ruffet, M.L., Lebrun, M., Droux, M., and Douce, R.** (1995). Subcellular distribution of serine acetyltransferase from *Pisum sativum* and characterization of an *Arabidopsis thaliana* putative cytosolic isoform. *Eur. J. Biochem.* 227: 500–509.
- Saalbach, G., Erik P., and Wienkoop S.** (2002). Characterisation by proteomics of peribacteroid space and peribacteroid membrane preparations from pea (*Pisum sativum*) symbiosomes. *Proteomics* 2: 325-337.
- Saito, K.** (2000). Regulation of sulfate transport and synthesis of sulfur-containing amino acids. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 188–195.
- Saito, K., Kurosawa, M., Tatsuguchi, K., Takagi, Y., and Murakoshi, I.** (1994). Modulation of cysteine biosynthesis in chloroplasts of transgenic tobacco overexpressing cysteine synthase [O-acetyl-serine(thiol)-lyase]. *Plant Physiol.* 106: 887–895.
- Saito, K., Yokoyama, H., Noji, M., and Murakoshi, I.** (1995). Molecular cloning and characterization of a plant serine acetyltransferase playing a regulatory role in cysteine biosynthesis from watermelon. *J. Biol. Chem.* 270: 16321–16326.
- Sanda, S., Leustek, T., Theisen, M.J., Garavito, R.M., and Benning, C.** (2001). Recombinant *Arabidopsis* SQD1 converts UDP-glucose and sulfite to the sulfolipid head group precursor UDP-sulfoquinovose in vitro. *J. Biol. Chem.* 276: 3941–3946.
- Sandal, N., Petersen, T.R., Murray, J., Umehara, Y., Karas, B., Yano, K., Kumagai, H., et al.** (2006). Genetics of symbiosis in *Lotus japonicus*: recombinant inbred lines, comparative genetic maps, and map position of 35 symbiotic loci. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19: 80–91.
- Sato, S., and Tabata, S.** (2006). *Lotus japonicus* as a platform for legume research. *Cur. Op. Plant Biol.* 9: 128-132.
- Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Asamizu, E., Kato, T., Nakao, M., Sasamoto, S., et al.** (2008). Genome structure of the legume, *Lotus japonicus*. *DNA Res.* 15: 227-239.

- Scharff, A.M., Egsgaard, H., Hansen, P.E., and Rosendahl, L.** (2003). Exploring symbiotic nitrogen fixation and assimilation in pea root nodules by *in vivo* <sup>15</sup>N nuclear magnetic resonance spectroscopy and liquid chromatography-mass spectrometry. *Plant Physiol.* 131: 367-378.
- Schmidt, A.** (1972). On the Mechanism of Photosynthetic Sulfate Reduction. An APS-sulfotransferase from *Chlorella*. *Arch. Microbiol.* 84: 77-86.
- Schmidt, A., and Trebst, A.** (1969). The mechanism of photosynthetic sulfate reduction by isolated chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 180: 529-535.
- Schmidt, J.S., Harper, J.E., Hoffman, T.K., and Bent, A.F.** (1999). Regulation of soybean nodulation independent of ethylene signaling. *Plant Physiol.* 119: 951-960.
- Schneider, A., Kreuzwieser, J., Schupp, R., Sauter, J.J., and Rennenberg, H.** (1994a). Thiol and amino acid composition of the xylem sap of poplar trees (*Populus×canadensis* "robusta"). *Can. J. Bot.* 72: 347-351.
- Schneider, A., Schatten, T., and Rennenberg, H.** (1994b). Exchange between phloem and xylem during long distance transport of glutathione in spruce trees (*Picea abies* [Karst.] L.). *J. Exp. Bot.* 45: 457-462.
- Schortemeyer, J., Atkin, O.K., McFarlane, N., and Evans, J.R.** (1999). The impact of elevated atmospheric CO<sub>2</sub> and nitrate supply on growth, biomass allocation, nitrogen partitioning and N<sub>2</sub> fixation of *Acacia melanoxylon*. *Australian J. Plant Physiol.* 26:737-747.
- Schubert, K.R.** (1982). The energetics of biological nitrogen fixation. In: *Workshop summaries I*. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists (30 pp.).
- Schubert, K.R.** (1986). Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis and transport, and metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37: 539-574.
- Schuller, K.A., and Werner, D.** (1993). Phosphorylation of soybean (*Glycine max* L) nodule-phosphoenolpyruvate carboxylase in vitro decreases sensitivity to inhibition by L-malate. *Plant Physiol.* 101: 1267-1273.
- Schuller, K.A., and Werner, D.** (1993). Phosphorylation of soybean (*Glycine max* L) nodulephosphoenolpyruvate carboxylase in vitro decreases sensitivity to inhibition by L-malate. *Plant Physiol.* 101: 1267-1273.

- Schuller, K.A., Turpin, D.H., and Plaxton, W.C.** (1990). Metabolite regulation of partially purified soybean nodule phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* 94: 1429–1435.
- Schuller, K.A., Turpin, D.H., Plaxton, W.C.** (1990). Metabolite regulation of partially purified soybean nodule phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* 94: 1429–1435.
- Schultze, M., and Kondorosi, A.** (1998). Regulation of symbiotic root nodule development. *Annu. Rev. Genet.* 32: 33-57.
- Schulze, J., Tesfaye, M., Litzjens, R.H.M.G., Bucciarelli, B., Trepp, G., Miller, S., et al.** (2002). Malate plays a central role in plant nutrition. *Plant Soil.* 247: 133-139.
- Schupp, R., and Rennenberg, H.** (1989). Light-dependent changes in the glutathione content of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.). *Annales des Sciences Forestieres* 46: 837–841.
- Schupp, R., and Rennenberg, H.** (1990). Diurnal changes in the thiol composition of spruce needles. In: Rennenberg, H., Brunold, Ch., de Kok, L., Stulen, I., eds. Sulfur nutrition and sulfur assimilation in higher plants; fundamental, environmental, and agricultural aspects. The Hague, The Netherlands: SPB Academic Publishing, 249–253.
- Schupp, R., Glavac, V., and Rennenberg, H.** (1991). Thiol composition of xylem sap of beech trees. *Phytochemistry* 30: 1415–1418.
- Selker, J.M.L.** (1988). Three-dimensional organization of uninfected tissue in soybean root nodules and its relation to cell specialization in the central region. *Protoplasma.* 147: 178–190.
- Shaw, S.L., and Long, S.R.** (2003). Nod factor elicits two separable calcium responses in *Medicago truncatula* root hair cells. *Plant Physiol.* 131: 976-984.
- Shi, L., Twary, S.N., Yoshioka, H., Gregerson, R.G., Miller, S.S., Samac, D.A., Gantt, J.S., Unkefer, P.J., and Vance, C.P.** (1997). Nitrogen assimilation in alfalfa: isolation and characterization of an asparagine synthetase gene showing enhanced expression in root nodules and dark-adapted leaves. *Plant Cell.* 9: 1339–1356.
- Shibagaki, N., Rose, A., McDermott, J.P., Fujiwara, T., Hayashi, H., Yoneyama, T., and Davis, J.P.** (2002). Selenate-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* identified SULTR1;2 a sulfate transporter required for efficient transport sulfate into roots. *Plant J.* 29: 475–486.

- Simon-Rosin, U., Wood, C., and Udvardi, M.K.** (2003). Molecular and cellular characterisation of LjAMT2;1, an ammonium transporter from the model legume *Lotus japonicus*. *Plant Mol. Biol.* 51: 99-108.
- Singh, R., Karamdeep, L., Bhullar, S.S., and Gupta, A.K.** (1994). Metabolism of free sugars in relation to the activities of enzymes involved in sucrose metabolism and nitrogen assimilation in the developing nodules of chickpea. *Plant Physiol. Biochem.* 32: 875–882.
- Smeekens, S.** (2000). Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 49-81.
- Smith, F.W., Ealing, P.M., Hawkesford, M.J., and Clarkson, D.T.** (1995). Plant members of a family of sulfate transporters reveal functional sub-types. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 92: 9373–9377.
- Smith, F.W., Hawkesford, M.J., Ealing, P.M., Clarkson, D.T., Van den Berg, P.J., Belcher, A.R., and Warrilow, A.G.S.** (1997). Regulation of expression of a cDNA from barley roots encoding a high affinity sulphate transporter. *Plant J.* 12: 875–884.
- Smith, I.K.** (1980). Regulation of sulfate assimilation in tobacco cells. Effect of nitrogen and sulfur nutrition on sulfate permease and O-acetylserine sulfhydrylase. *Plant Physiol.* 66: 877–883.
- Smith, K.S., and Ferry, J.G.** (1999). A plant-type (beta-class) carbonic anhydrase in the thermophilic methanoeocyte *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J. Bacteriol.* 181: 6247-6253.
- Smith, P.M.C., and Atkins, C.A.** (2002). Purine biosynthesis. Big in cell division, even bigger in nitrogen assimilation. *Plant Physiol.*, 128, 793-802.
- Soussana, J.F., and Hartwig, U.A.** (1996). The effect of elevated CO<sub>2</sub> on symbiotic N<sub>2</sub> fixation: a link between the carbon and nitrogen cycles in grassland ecosystems. *Plant and Soil.* 187: 321-332.
- Spaink, H.P., Sheeley, D.M., Van Brussel, A.A., Glushka, J., York, W.S., Tak, T., Geiger, O., Kennedy, E.P., Reinhold, V.N., and Lugtenberg, B.J.** (1991). A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature.* 354:125-30.
- Sprent, J.I.** (1980). Root nodule anatomy, type of export product, and evolutionary origin in some Leguminosae. *Plant Cell Environ.* 3: 35-43.

- Stougaard, J.** (2000). Regulators and Regulation of Legume Root Nodule Development. *Plant Physiol.* 124: 531-540.
- Sturm, A., and Tang, G.Q.** (1999). The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends Plant Sci.* 4: 401-407.
- Suganuma, N., Tamaoki, M., and Kouchi, H.** (1995). Expression of nodulin genes in plant-determined ineffective nodules of pea. *Plant Mol. Biol.* 28: 1027-1038.
- Suliman, S., and Schulze, J.** (2010). The efficiency of nitrogen fixation of the model legume *Medicago truncatula* (Jemalog A17) is low compared to *Medicago sativa*. *J. Plant Physiol.* 167:683–692.
- Sullivan, J.T., and Ronson, C.W.** (1998). Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 5145-5149.
- Suter, M., von Ballmoos, P., Kopriva, S., Op den Camp, R., Schaller, J., Kuhlemeier, C., Schürmann, P., and Brunold, C.** (2000). Adenosine 5'-phosphosulfate sulfotransferase and adenosine 5'-phosphosulfate reductase are identical enzymes. *J. Biol. Chem.* 275: 930–936.
- Swart, S., Logman, T.J., Smit, G., Lugtenberg, B.J., and Kijne, J.W.** (1994). Purification and partial characterization of a glycoprotein from pea (*Pisum sativum*) with receptor activity for rhicadhesin, an attachment protein of Rhizobiaceae. 1: 171-83.
- Sy, A., Giraud, E., Jourand, P., Garcia, N., Willems, A., de Lajudie, P., Prin, Y., Neyra, M., Gillis, M., Boivin-Masson, C., and Dreyfus, B.** (2001). Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J. Bacteriol.* 183: 214–220.
- Szafran, M.M., and Haaker, H.** (1995). Properties of the peribacteroid membrane ATPase of pea root-nodules and its effect on the nitrogenase activity. *Plant Physiol.* 108: 1227–1232.
- Szczyglowski, K., Kapranov, P., Hamburger, D., and de Bruijn, F.J.** (1998). The *Lotus japonicus* LjNOD70 nodulin gene encodes a protein with similarities to transporters. *Plant Mol. Biol.* 37: 651–661.
- Ta, T.C., Faris, M.A., and Macdowall, F.D.H.** (1986). Pathways of nitrogen metabolism in nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.), *Plant Physiol.* 80: 1002-1005.



- Tabe, L., and Higgins, T.J.** (1998). Engineering plant protein composition for improved nutrition. *Trends Plant Sci.* 3: 282–286.
- Tabe, L., Venables, I., Grootemaat, A., and Lewis, D.** (2003). Sulfur transport and assimilation in developing embryos of chickpea (*Cicer arietinum*). In *Sulfur Transport and Assimilation in Plants*, J. Davidian, D. Grill, L. De Kok, I. Stulen, M. Hawkesford, E. Schnug, and H. Rennenberg, eds (Leiden: Backhuys Publishers), pp. 335–337.
- Taiz, L., and Zeiger, E.** (1998). *Plant physiology*. Sunderland: Sinauer Associates Publishers.
- Tajima, S., Nomura, M., and Kouchi, H.** (2004). Ureide biosynthesis in legume nodules. *Front.Biosci.* 9: 1374-1381.
- Takahashi, H., Kopriva, S., Giordano, M., Saito, K., and Hell, R.** (2011). Sulfur assimilation in photosynthetic organisms: molecular functions and regulations of transporters and assimilatory enzymes. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62: 157–184.
- Takahashi, H., Yamazaki, M., Sasakura, N., Watanabe, A., Leustek, T., Engler, J.D.A., Engler, G., Van Montagu, M., and Saito, K.** (1997). Regulation of sulfur assimilation in higher plants: A sulfate transporter induced in sulfate-starved roots plays a central role in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 94: 11102–11107.
- Takahashi, H., Watanabe-Takahashi, A., Smith, F.W., Blake-Kalff, M., Hawkesford, M.J., and Saito, K.** (2000). The roles of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 23: 171–182.
- Tashian, R.E.** (1989). The carbonic anhydrases: widening perspectives on their evolution, expression and function. *BioEssays.* 10: 186-192.
- Tate, R., A. Riccio, E. Caputo, M. Iaccarino, and E. J. Patriarca.** (1999). The *Rhizobium etli metZ* gene is essential for methionine biosynthesis and nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12: 24–34.
- Tate, R., Riccio, A., Iaccarino, M., and Patriarca, E.J.** (1997). A *cysG* mutant strain of *Rhizobium etli* pleiotropically defective in sulfate and nitrate assimilation. *J. Bacteriol.* 179: 7343–7350.
- Temple, S.J., Vance, C.P., and Gantt, J.S.** (1998). Glutamate synthase and nitrogen assimilation. *Trends Plant Sci.* 3: 51–56.
- Thomas, D., and Surdin-Kerjan, Y.** (1997). Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 503- 532.

- Thöny-Meyer, L., and Kunzler, P.** (1996). The *Bradyrhizobium japonicum* aconitase gene (*acnA*) is important for free-living growth but not for an effective root-nodule symbiosis. *J. Bacteriol.* 178: 6166–6172.
- Timmers, A.C.J., Auriac, M.C., and Truchet, G.** (1999). Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium-Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development.* 126: 3617–3628.
- Tomatsu, H., Takano, J., Takahashi, H., Watanabe-Takahashi, A., Shibagaki, N., and Fujiwara, T.** (2007). An *Arabidopsis thaliana* high affinity molybdate transporter required for efficient uptake of molybdate from soil. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 104: 18807–18812.
- Tricot, F.** (1993). Mise en place des nodosites du pois proteagineux de printemps (*Pisum sativum* L.). Influence de la nutrition carbonnee. PhD thesis, Universite Paris-Sud Orsay, France.
- Trinick, M.J.** (1979). Structure of nitrogen-fixing nodules formed by *Rhizobium* on roots of *Parasponia andersonii*. *Planch. Can. J. Microbiol.* 5: 565–78.
- Tripp, B.C., Smith, K., and Ferry, J.G.** (2001). Carbonic anhydrase: new insights for an ancient enzyme. *J. Biol. Chem.* 276: 48615–48618.
- Tsikou, D., Kalloniati, C., Fotelli, M.N., Nikolopoulos, D., Katinakis, P., Udvardi, M.K., Rennenberg, H., and Flegmetakis, E.** (2013). Cessation of photosynthesis in *Lotus japonicus* leaves leads to reprogramming of nodule metabolism. *J. Exp. Bot.* 64: 1317–32.
- Tsikou, D., Stedel, C., Kouri, E.D., Udvardi, M.K., Wang, T.L., Katinakis, P., Labrou, N.E., Flegmetakis, E.** (2011). Characterization of two novel nodule-enhanced  $\alpha$ -type carbonic anhydrases from *Lotus japonicus*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1814: 496–504.
- Tyerman, S.D., Whitehead, L.F., and Day, D.A.** (1995). A channel-like transporter for  $\text{NH}_4^+$  on the symbiotic interface of  $\text{N}_2$ -fixing plants. *Nature.* 378: 629–632.
- Udvardi, M., and Poole, P.S.** (2013). Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64: 781–805.
- Udvardi, M.K., and Day, D.A.** (1989). Electrogenic ATPase activity on the peribacteroid membrane of soybean (*Glycine max* L) root-nodules. *Plant Physiol.* 90: 982–987.

- Udvardi, M.K., and Day, D.A.** (1990). Ammonia ( $^{14}\text{C}$ -Methylamine) Transport across the Bacteroid and Peribacteroid Membranes of Soybean Root Nodules. *Plant Physiol.* 94: 71-76.
- Udvardi, M.K., and Day, D.A.** (1997). Metabolite transport across symbiotic membranes of legumes nodules. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 493-523.
- Udvardi, M.K., Salom, C.L., and Day, D.A.** (1988). Transport of L-glutamate across the bacteroid membrane but not the peribacteroid membrane from soybean root nodules. *Mol. Plant Microbe Interact.* 1: 250-254.
- Urbanski, D.F., Malolepszy, A., Stougaard, J., Andersen, S.U.** (2012). Genome-wide LORE1 retrotransposon mutagenesis and high-throughput insertion detection in *Lotus japonicus*. *Plant J.* 69: 731-741.
- Van de Velde, W., Pérez Guerra, J.C., De Keyser, A., De Rycke, R., Maunoury, N., Mergaert, P., et al.** (2006). Aging in legume symbiosis: a molecular view on nodule senescence in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 141: 711-720.
- Van de Wiel, C., Scheres, B., Franssen, H., Van Lierop, M.-J., Van Lammeren, A., Van Kammen, A., and Bisseling, T.** (1990). The early nodulin transcript ENOD2 is located in the nodule parenchyma (inner cortex) of pea and soybean root nodules. *EMBO J.* 9: 1-7.
- Van der Weerden, N.L., and Anderson, M.A.** (2013). Plant defensins: Common fold, multiple functions. *Fungal Biol. Rev.* 26: 121-131.
- Van Kammen, A.** (1984). Suggested nomenclature for plant genes involved in nodulation and symbiosis. *Plant Mol. Biol. Rep.* 2:43-45.
- Van Spronsen, P.C., Bakhuizen, R., Van Brussel, A.A.N., and Kijne, J.W.** (1994). Cell wall degradation during infection thread formation by the root nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum* is a two-step process. *Eur. J. Cell Biol.* 64: 88-94.
- Van Spronsen, P.C., Grønlund, M., Pacios Bras, C., Spaink, H.P., and Kijne, J.W.** (2001). Cell biological changes of outer cortical root cells in early determinate nodulation. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14: 839-847.
- Vance, C.P.** (2000). Amide biosynthesis in root nodules of temperate legumes. In (E.W. Triplett, Ed.), *Prokaryotic nitrogen fixation: A model system for analysis of a biological process*, Wymondham, UK: Horizon Scientific Press. 589-608.

- Vance, C.P.** (2008). Carbon and nitrogen metabolism in legume nodules, In: (Dilworth M.J., James, E.K., Sprent, J.I. and Newton, W.E, Eds.), *Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses*, Springer.
- Vance, C.P., and Heichel, G.H.** (1991). Carbon in N<sub>2</sub> fixation: Limitation or exquisite adaptation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 373-392.
- Vance, C.P., Gregerson, R.G., Robinson, D.L., Miller, S.S., and Gantt, J.S.** (1994). Primary assimilation of nitrogen in alfalfa nodules: molecular features of the enzymes involved. *Plant Sci.* 101: 51-64.
- Vance, C.P., Heichel, G.H., Barnes, D.K., Bryan, J.W. and Johnson, L.E.** (1979). Nitrogen fixation, nodule development, and vegetative regrowth of alfalfa (*Medicago sativa* L.) following harvest. *Plant Physiol.* 64: 1–8.
- Vance, C.P., Miller, S.S., Driscoll, B.T., Robinson, D.L., Trepp, G., Gantt, J.S., and Samas, D.A.** (1997). Nodule carbon metabolism: organic acids for N<sub>2</sub> fixation. P. In: (Elmerich, C., Kondorosi, A., Newton, W.E., Eds.) *Biological Nitrogen Fixation for 21<sup>th</sup> Century*. Kluwer Academic Publishers, London. 443-448.
- Vance, C.P., Miller, S.S., Driscoll, B.T., Robinson, D.L., Trepp, G., Gant, J.S., and Samas, D.A.** (1998). Nodule carbon metabolism: organic acids for N<sub>2</sub> fixation. I. Elmerich C et al. eds. *Biological nitrogen fixation for the 21st century*. Paris: Kluwer Academic Publishers, 443-448.
- Vandenbosch, K.A., and Stacey G.** (2003). Summaries of legume genomics projects from around the globe. *Community resources for crops and models. Plant Physiol.*, 131, 840-865.
- Vauclare, P., Kopriva, S., Fell, D., Suter, M., Sticher, L., von Ballmoos, P., Krähenbühl, U., Op den Camp, R., and Brunold, C.** (2002). Flux control of sulphate assimilation in *Arabidopsis thaliana*: adenosine 5'-phosphosulphate reductase is more susceptible than ATP sulphurylase to negative control by thiols. *Plant J.* 31: 729–740.
- Vidmar, J.J., Tagmount, A., Cathala, N., Touraine, B., and Davidian, J.-C.** (2000). Cloning and characterization of root specific sulfate transporter from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 475: 65–69.

- Voisin, A.S., Salon, C., Jeudy, C., and Warembourg, F.R.** (2003). Symbiotic N<sub>2</sub> fixation activity in relation to C economy of *Pisum sativum* L. as a function of plant phenology. *J. Exp. Bot.* 54: 2733-44.
- Wachter, A., Wolf, S., Steininger, H., Bogs, J., and Rausch, T.** (2005). Differential targeting of GSH1 and GSH2 is achieved by multiple transcription initiation: implications for the compartmentation of glutathione biosynthesis in the Brassicaceae. *Plant J.* 41: 15–30.
- Walsh, K.B., Vessey, J.K., and Layzell, D.B.** (1987). Carbohydrate supply and N<sub>2</sub> fixation in soybean: the effect of varied daylength and stem girdling. *Plant Physiol.* 85: 137-44.
- Warembourg, F.R., and Roumet, C.** (1989). Why and how to estimate the cost of symbiotic N<sub>2</sub> fixation? A progressive approach based on the use of <sup>14</sup>C and <sup>15</sup>N isotopes. *Plant and Soil.* 115:167-177.
- Warrilow, A.G., and Hawkesford, M.J.** (2000). Cysteine synthase (O-acetylserine(thiol)lyase) substrate specificities classify the mitochondrial isoform as a cyanoalanine synthase. *J. Exp. Bot.* 51: 985–993.
- Watanabe, M., Kusano, M., Oikawa, A., Fukushima, A., Noji, M., and Saito, K.** (2008b). Physiological roles of the beta-substituted alanine synthase gene family in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 146: 310–320.
- Watanabe, M., Mochida, K., Kato, T., Tabata, S., Yoshimoto, N., Noji, M., and Saito, K.** (2008a). Comparative genomics and reverse genetics analysis reveal indispensable functions of the serine acetyltransferase gene family in Arabidopsis. *Plant Cell* 20: 2484–2496.
- Waters, J.K., Hughes, B.L., Purcell, L.C., Gerhardt, K.O., Mawhinney, T.P., and Emerich, D.W.** (1998). Alanine, not ammonia, is excreted from N<sub>2</sub>-fixing soybean nodule bacteroids. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 95: 12038–12042.
- Wedding, R. T.** (1989). Malic enzymes of higher plants. *Plant Physiol.* 90: 367-371.
- Werner, D.** (1992). Physiology of nitrogen-fixing legume nodules: compartments and functions. In: (Stacey G, Burris R, Evans H, Eds.), *Biological nitrogen fixation*. New York: Chapman & Hall, 399–431.

- Westerman, S., Stulen, I., Suter, M., Brunold, C., and De Kok, L.J.** (2001). Atmospheric H<sub>2</sub>S as sulfur source for *Brassica oleracea*: consequences for the activity of the enzymes of the assimilatory sulfate reduction pathway. *Plant Physiol. Biochem.* 39: 425–432.
- White, J., Prell, J., James E.K., and Poole P.** (2007). Nutrient Sharing between Symbionts. *Plant Physiol.* 144: 604-614.
- Widmer, F., B. T. Shaffer, L. A. Porteous, and R. J. Seidler.** (1999). Analysis of *nifH* gene pool complexity in soil and litter at a Douglas fir forest site in the Oregon Cascade mountain range. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 374–380.
- Wienkoop, S., and Saalbach, G.** (2003). Proteome analysis. Novel proteins identified at the peribacteroid membrane from *Lotus japonicus* root nodules. *Plant Physiol.* 131: 1080–1090.
- Wilson, P.W., Fred, E.B., and Salmon, M.R.** (1933). Relation between carbon dioxide and elemental nitrogen assimilation in leguminous plants. *Soil Sci.* 35: 145-165.
- Wirtz, M. et al.** (2010). Structure and function of the hetero-oligomeric cysteine synthase complex in plants. *J. Biol. Chem.* 285: 32810–32817.
- Wisniewski, J.P., and Delmotte, F.M.** (1996). Modulation of carbohydrate-binding capacities and attachment ability of *Bradyrhizobium* sp. (lupinus) to white lupin roots. *Can. J. Microbiol.* 42: 234-42.
- Witty, J.F.** (1991). Microelectrode measurements of hydrogen concentrations and gradients in legume nodules. *J. Exp. Bot.* 42: 765–771.
- Witty, J.F., Keay, P.J., Frogatt, P.J., and Dart, P.J.** (1979). Algal nitrogen fixation on temperate arable fields. The Broadbalk experiment. *Plant Soil.* 52: 151-164.
- Witty, J.F., Minchin, F.R., Skøt, L., and Sheehy, J.E.** (1986). Nitrogen fixation and oxygen in legume root nodules. *Oxf. Surv. Plant Mol. Cell Biol.* 3: 275–314.
- Xiang, C., and Oliver, D. J.** (1998). Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 10: 1539–1550.
- Yamaguchi, Y., Nakamura, T., Harada, E., Koizumi, N., and Sano, H.** (1999). Differential accumulation of transcripts encoding sulfur assimilation enzymes upon sulfur and / or nitrogen deprivation in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63: 762–766.

- Yoshimoto, N., Inoue, E., Saito, K., Yamaya, T., and Takahashi, H.** (2003). Phloem localizing sulfate transporter, Sultr1;3, mediates re-distribution of sulfur from source to sink organs in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 131: 1511–1517.
- Yoshimoto, N., Takahashi, H., Smith, F.W., Yamaya, T., and Saito, K.** (2002). Two distinct high-affinity sulfate transporters with different inducibilities mediate uptake of sulfate in Arabidopsis roots. *Plant J.* 29: 465–473.
- Yurgel, S.N., and Kahn, M.L.** (2004). Dicarboxylate transport by rhizobia. *FEMS Microbiol. Rev.* 28: 489–501.
- Zaat, S.A.J., Van Brussel, A.A.N., Tak, T., Lugtenberg, B.J.J., and Kijne, J.W.** (1989). The ethylene inhibitor aminoethoxyvinylglycine restores normal nodulation by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* on *Vicia sativa* subsp. *nigra* by suppressing the ‘thick and short roots’ phenotype. *Planta.* 177: 141-150.
- Zehr, J. P., Jenkins, B. D. , Short, S. M., and Steward, G. F.** (2003). Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environ. Microbiol.* 5: 539–554.
- Zhang, B., Pasini, R., Dan, H., Joshi, N., Zhao, Y., Leustek, T., et al.** (2014). Aberrant gene expression in the Arabidopsis SULTR1;2 mutants suggests a possible regulatory role for this sulfate transporter in response to sulfur nutrient status. *Plant J.* 77: 185–197.
- Zhang, X.Q., Li, B., and Chollet, R.** (1995). *In vivo* regulatory phosphorylation of soybean nodulephosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* 108: 1561–1568.
- Zhang, Y., Aono, T., Poole, P.S., and Finan, T.M.** (2012). NAD(P)<sup>+</sup>-malic enzyme mutants of *Sinorhizobium* sp. strain NGR234, but not *Azorhizobium caulinodans* ORS571, maintain symbiotic N<sub>2</sub> fixation capabilities. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 2803–2812.
- Zhao, F.J., Hawkesford, M.J., and McGrath, S.P.** (1999). Sulphur assimilation and effects on yield and quality of wheat. *J. Cereal Sci.* 30: 1–17.
- Zheng, L., White, R.H., Cash, V.L., Jack, R.F., and Dean, D.R.** (1993). Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 90: 2754–2758.
- Zuber, H., Davidian, J.-C., Aubert, G., Aimé, D., Belghazi, M., Lugan, R., Heintz, D., Wirtz, M., Hell, R., Thompson, R., and Gallardo, K.** (2010). The seed composition of

Arabidopsis mutants for the group 3 sulfate transporters indicates a role in sulfate translocation within developing seeds. *Plant Physiol.* 154: 913–926.

**Δροσόπουλος, Ι.** (1992). Στοιχεία ανόργανης διατροφής των φυτών. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

**Δροσόπουλος, Ι.** (1998). Η φυσιολογία των φυτών. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.



