

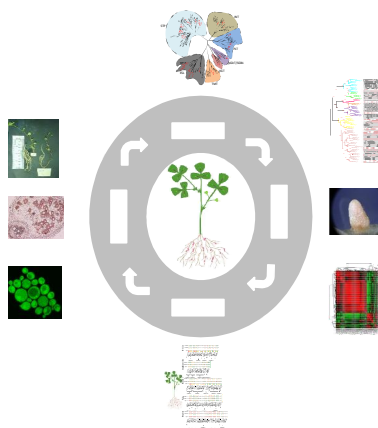


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**Μελέτη των Μοριακών και Βιοχημικών Μηχανισμών
Μεταβολισμού του Άνθρακα στα Αζωτοδεσμευτικά
Φυμάτια των Ψυχανθών**

ΦΩΤΙΟΣ Μ. ΚΩΜΑΙΤΗΣ



ΑΘΗΝΑ 2020

Επιβλέπων Καθηγητής: Εμμανουήλ Φλεμετάκης

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**Μελέτη των Μοριακών και Βιοχημικών Μηχανισμών
Μεταβολισμού του Άνθρακα στα Αζωτοδεσμευτικά
Φυμάτια των Ψυχανθών**

**Molecular and Biochemical Analysis of the mechanisms of
carbon metabolism in the nitrogen fixing nodules of the
legumes**

ΦΩΤΙΟΣ Μ. ΚΩΜΑΙΤΗΣ

Επιβλέπων Καθηγητής:

Εμμανουήλ Φλεμετάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Τριμελής συμβουλευτική Επιτροπή:

Εμμανουήλ Φλεμετάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Σπυρίδων Κίντζιος, Καθηγητής, Πρύτανης ΓΠΑ (μέλος)

Νικόλαος Λάμπρου, Καθηγητής ΓΠΑ (μέλος)

Επταμελής εξεταστική επιτροπή:

Εμμανουήλ Φλεμετάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Σπυρίδων Κίντζιος, Καθηγητής, Πρύτανης ΓΠΑ (μέλος)

Νικόλαος Λάμπρου, Καθηγητής ΓΠΑ (μέλος)

Πολυδεύκης Χατζόπουλος, Καθηγητής ΓΠΑ (μέλος)

Ηλίας Ηλιόπουλος, Καθηγητής ΓΠΑ (μέλος)

Ευστάθιος Φριλίγγος, Καθηγητής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (μέλος)

Σταμάτης Ρήγας, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ (μέλος)

**Η Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή ορίστηκε με απόφαση της Γ.Σ.Ε.Σ.,
Συνεδρία 15^η/27.6.2012. Το θέμα ορίστηκε με απόφαση της Γ.Σ.Ε.Σ. Συνεδρία
5^η/03.12.2012.**

Περίληψη

Τα ψυχανθή είναι ο ακρογωνιαίος λίθος της αειφόρου παραγωγής, λόγω της συμβιωτικής σχέσης που αναπτύσσουν με τα βακτήρια του εδάφους, που ονομάζονται ριζόβια, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός νέου φυτικού οργάνου που ονομάζεται φυμάτιο. Στα φυμάτια λαμβάνει χώρα η συμβιωτική αζωτοδέσμευση, η οποία αποτελεί μία εξαιρετικά απαιτητική ενεργειακά διαδικασία. Τα σάκχαρα που παράγονται στους φωτοσυνθετικούς ιστούς εισάγονται στα αγγεία του ηθμού και μεταφέρονται στους ιστούς καταβόθρες, ώστε να καλύψουν τις ενεργειακές τους ανάγκες. Η μεταφορά των σακχάρων διαμέσου της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του φυτικού κυττάρου, λαμβάνει χώρα μέσω εξειδικευμένων διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, τους μεταφορείς σακχάρων. Στη μελέτη αυτή, χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο συμβιωτικού συστήματος *Medicago truncatula*- *Sinorhizobium meliloti*, με στόχο να εντοπιστούν και να μελετηθεί ο ρόλος των γονιδίων που κωδικοποιούν για μεταφορείς μονοσακχαριτών στο ψυχανθές *M. truncatula*. Το *M. truncatula* χρησιμοποιείται ευρύτατα ως φυτικό μοντέλο σε τέτοιες μελέτες, λόγω των διαθέσιμων βάσεων δεδομένων που αφορούν την αλληλουχία του γονιδιώματος, τον Άτλαντα γονιδιακής έκφρασης, καθώς και τις διαθέσιμες *Tnt1* μεταλλαγμένες σειρές.

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε μια μεγάλη *in silico* ανάλυση, ώστε να ταυτοποιηθούν οι μεταφορείς μονοσακχαριτών του *M. truncatula* [Monosaccharide Sugar Transporters (MSTs)]. Παρουσιάζονται ακόμα δεδομένα που αφορούν τη φυλογενετική τους ταξινόμηση, τη γονιδιακή τους δομή, την αμινοξική τους αλληλουχία, και την πιθανή δευτεροταγή τους δομή. Επιπλέον, για τη μελέτη του βιοχημικού και φυσιολογικού ρόλου των μεταφορέων συνδυάστηκαν αποτελέσματα στοχευμένης μεταγραφομικής και μεταβολομικής ανάλυσης. Ολικό RNA απομονώθηκε από διάφορα όργανα και από φυμάτια σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης του *M. Truncatula*. Η έκφραση των MST-γονιδίων αναλύθηκε με την τεχνολογία RT-qPCR. Ομοίως και το μεταβολομικό τους περιεχόμενο υπό συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου και υπό συνεχές σκότος 24 h και 72 h, γεγονός το οποίο δημιουργεί συνθήκες έλλειψης άνθρακα. Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι η οργανοειδική ρύθμιση κυριάρχησε της ρύθμισης από τις συνθήκες παρατεταμένου σκοταδιού. Παρ' όλ' αυτά βρέθηκαν αρκετά MST-γονίδια, όπως τα: *MtSTP1_1*, *MtSTP3_2*, *MtSTP7_1*, *MtSTP7_4*, *MtSTP10_1*, *MtSTP10_2*, *MtSTP13_1*, *MtESL6_3*, *MtESL7*, *MtINT4_1*, *MtPMT5_1* και *MtTMT3_1* στα οποία η έκφρασή

τους φαίνεται να επηρεάζεται από τις συνθήκες παρατεταμένου σκοταδιού. Μελετήθηκε επίσης η χωροταξική έκφραση, ο υποκυτταρικός εντοπισμός, η δραστηριότητα της νιτρογενάσης και το λειτουργικό προφίλ δύο ισχυρά επαγόμενων ή εξειδικευμένων στα φυμάτια MST-γονιδίων, των *MtSTP13* και *MtPMT3_1*. Πραγματοποιήθηκε επίσης εκτίμηση των φαινοτυπικών τους χαρακτηριστικών με τη χρήση *Tnt1* μεταλλαγμένων σειρών φυτών, καθώς και του μεταβολομικού τους περιεχομένου, ώστε να μελετηθεί ο φυσιολογικός και ο βιολογικός ρόλος των συγκεκριμένων μεταφορέων. Πολλές αλλαγές εντοπίστηκαν μεταξύ των φυτών αγρίου τύπου και αυτών των μεταλλαγμένων σειρών τόσο σε μεταγραφομικό όσο και σε μεταβολομικό επίπεδο, όπως επίσης και στη δραστικότητα της νιτρογενάσης.

Επιστημονική περιοχή διδακτορικής διατριβής: Μοριακή Βιολογία

Λέξεις κλειδιά: κατανομή και διαμερισμός του άνθρακα, έλλειψη άνθρακα, γονιδιακή δομή, *Medicago truncatula*, μεταφορείς μονοσακχαριτών, συμβιωτική αζωτοδέσμευση, μεταλλαγμένες σειρές

Molecular and Biochemical Analysis of the mechanisms of carbon metabolism in the nitrogen fixing nodules of the legumes

Legumes are cornerstones of sustainable agriculture, as the symbiotic relation they form with soil bacteria, called rhizobia, results in nitrogen fixation (symbiotic nitrogen fixation – SNF). SNF takes place inside new plant organs that are developed for this reason, the legume root nodules. This is an extremely high energy demanding process. Sugars produced in photosynthetic tissues are loaded to phloem and transported to sink tissues covering their energy needs. Sugars cross the plasma membrane of the plant cell via specific transmembrane proteins, the sugar transporters, facilitating the appropriate conditions for nodule metabolism and for being potential sites of SNF regulation.

In this study, we have used the model symbiotic system of *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* in order to identify plant genes involved in carbon transport. *M. truncatula* is an excellent candidate for such studies, due to the available databases regarding the sequencing of the genome, the expression of genes, the active metabolic pathways, as well as the existence of established *Tnt1*-insertion mutant lines. *In silico* analysis was conducted for identifying *M.truncatula* Monosaccharide Transporters (MSTs). In this thesis, we present data concerning the phylogenetic taxonomy of these transporters, their gene structure, their amino acid sequence and a prediction of the topology/secondary structure for the corresponding encoded protein. Furthermore, a large transcriptomic and metabolomic analysis was conducted. Total RNA was extracted from different organs and nodule developmental stages of *M. Truncatula*. The expression of these genes, analysed by RT-qPCR, is depicted. The metabolite content of the detected MSTs organs, under normal photoperiod and under 24 h and 72 h of continuous darkness that resembles carbon starvation conditions was also investigated. The organ-specific regulation was predominant than that of stress-regulation. However several genes as *MtSTP1_1*, *MtSTP3_2*, *MtSTP7_1*, *MtSTP7_4*, *MtSTP10_1*, *MtSTP10_2*, *MtSTP13_1*, *MtESL6_3*, *MtESL7*, *MtINT4_1*, *MtPMT5_1* and *MtTMT3_1* were stress-regulated. We also studied the spatial expression, the subcellular localization, the nitrogenase activity and the functional profile of two nodule-induced or nodule-specifically expressed MSTs, *MtSTP13* and *MtPMT3_1*, as well as their phenotype using *Tnt1* mutant plants and their metabolites content, in

order to identify their physiological and biochemical role. Many differences were detected between mutants and wild plants in transcriptomic levels, in metabolites content and in nitrogenase activity.

Scientific area of the PhD thesis: Molecular Biology

Keywords: carbon allocation and partitioning, carbon starvation, gene structure, *Medicago truncatula*, Monosaccharide Sugar Transporters, Symbiotic Nitrogen Fixation, mutant lines

Ευχαριστίες

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και έχει χρηματοδοτηθεί από το Ίδρυμα Ωνάση.

Ευχαριστίες εκφράζονται σε όλους όσους με οποιονδήποτε τρόπο βοήθησαν και κατέστησαν δυνατή την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης και ιδιαίτερα στον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Εμμανουήλ Φλεμετάκη για την ανάθεση του θέματος και την πολύτιμη βοήθειά του καθ' όλα τα στάδια της μελέτης, στην εκτέλεση των πειραμάτων, στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων και τη συγγραφή της μελέτης μου.

Στον Πρύτανη του Γ.Π.Α., Καθηγητή κ. Σπυρίδων Κίντζιο, και τον Καθηγητή κ. Νικόλαο Λάμπρου, για τη βοήθειά τους σε οποιοδήποτε ζήτημα σχετικό με την παρούσα διατριβή, καθώς και σε όλα τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής για την κριτική ανάγνωση του κειμένου και τις παρατηρήσεις τους.

Το προσωπικό του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας, που χωρίς την πολύτιμη βοήθειά και συνεργασία τους η παρούσα διατριβή δε θα είχε ολοκληρωθεί. Ειδικές ευχαριστίες θα ήθελα να δώσω για την εκπαίδευση και την καθοδήγηση σε όλα τα στάδια της μελέτης στη δρ. Κατερίνα Καλλιαμπάκου. Επίσης θέλω να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την πολύτιμη βοήθειά τους σε διάφορες φάσεις του πειράματος και ιδιαίτερα στο δρ. Σκληρό Δημήτριο, στον υποψήφιο διδάκτορα Καραλιά Γεώργιο, στην υποψήφια διδάκτορα Αναστασίου Ιωάννα, στην υποψήφια διδάκτορα Μαρία Πατέλου, στην υποψήφια διδάκτορα Ζωγραφάκη Μαριέλα, στη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Κατερίνα Κωλέτη, καθώς και σε όλους όσους συνέβαλαν στην εκτέλεση αυτής της διατριβής, αλλά κυρίως στο ευχάριστο κλίμα που υπήρχε κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Ευστάθιο Φριλίγγο του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και τη συνεργαζόμενη ομάδα του. Η συνεισφορά τους στην εκτέλεση πειραμάτων πρόσληψης υποστρώματος με χρήση σημασμένων με ραδιενέργεια σακχάρων, στη μελέτη της γονιδιακής δομής, τη φυλογενετική ανάλυση και την ύπαρξη μοτίβων των μεταφορέων μονοσακχαριτών, καθώς και στη συγγραφή τόσο της δημοσίευσης όσο και της διδακτορικής διατριβής, ήταν πολύτιμη για την ολοκλήρωσή τους. Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω το δρ. Udvardi και το Ινστιτούτο Noble και τη Λία Κουρή, καθώς και τον καθηγητή Rennenberg και το

Πανεπιστήμιο του Φράιμπουργκ και τον Καθηγητή κ. Ιορδάνη Χατζηπαυλίδη για την πολύτιμη βοήθειά τους σε διάφορα στάδια εκτέλεσης των πειραμάτων. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή του ΑΠΘ κ. Αλέξιο Πολύδωρο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα το Ίδρυμα Ωνάση το οποίο χρηματοδότησε με τη μορφή υποτροφίας την εκπόνηση αυτής της μελέτης και ιδιαίτερα την κα Χαντζόλου Αντιγόνη, η οποία πάντα ήταν ιδιαίτερα φιλική και εξυπηρετική σε όλα τα διαδικαστικά θέματα που τυχόν προέκυπταν.

Τέλος το μεγαλύτερο ευχαριστώ είναι για την οικογένεια μου, για την ανεξάντλητη υπομονή και συμπαράσταση που μου έδειξαν κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περιεχόμενα

Περίληψη	3
Abstract.....	5
Ευχαριστίες	7
Περιεχόμενα	9
Δημοσιεύσεις.....	14
Αναρτημένες Ανακοινώσεις.....	14
1. Εισαγωγή.....	16
1.1. Γενικά.....	16
1.2. Σάκχαρα	16
1.2.1. Γλυκόζη	17
1.2.2. Φρουκτόζη	17
1.2.3. Σακχαρόζη	18
1.2.4. Γαλακτόζη	18
1.2.5. Λακτόζη	19
1.3. Πολυόλες.....	19
1.3.1. Μυο-ινοσιτόλη.....	19
1.3.2. Ριβιτόλη	20
1.3.3. Μαννιτόλη	20
1.4. Μεταφορείς δι- και μονοσακχαριτών	20
1.5. Διαμεμβρανικές περιοχές.....	21
1.6. Κύριοι τρόποι διαμεμβρανικής μεταφοράς.....	22
1.6.1. Παθητική Διάχυση	22
1.6.2. Διευκολυνόμενη διάχυση.....	22
1.6.3. Ενεργός μεταφορά.....	23
1.7. Κατηγορίες μεμβρανικών μεταφορέων.....	23
1.8. Υποοικογένεια των STPs.....	24
1.9. Υποοικογένεια των TMTs	25
1.10. Υποοικογένεια των VGTs.....	26
1.11. Υποοικογένεια των pGlcTs/SGB1	26
1.12. Υποοικογένεια των ESLs, ERD6-like.....	27
1.13. Υποοικογένεια των INTs	27
1.14. Υποοικογένεια των PMTs.....	28
1.15. MSTs και συμβιωτική αζωτοδέσμευση	30
1.16. Σημασία ψυχανθών στην παγκόσμια παραγωγή.....	31
1.17. Φυμάτια-ισχυρές μεταβολικές καταβόθρες	32
1.18. Στάδια σχηματισμού των ριζικών φυματίων	32
1.19. Κατηγορίες φυματίων	34

1.20. Συμβιωτική σχέση ριζοβίου-φυτού, παράγοντες Nod	35
1.21. Προσκόλληση και μόλυνση – Βακτηριοειδή.....	37
1.22. Σχηματισμός φυματίων.....	38
1.23. Το βακτήριο <i>Sinorhizobium meliloti</i>	38
1.24. Ο ρόλος του φωτοσυνθετικού άνθρακα στην αζωτοδέσμευση.....	39
1.25. Έλλειψη άνθρακα.....	40
1.26. Το ψυχανθές μοντέλο <i>Medicago truncatula</i>	40
1.27. Μεταθετά στοιχεία.....	42
1.27.1. Κατηγορίες μεταθετών στοιχείων	43
1.27.2. Πλεονεκτήματα της ένθεσης του <i>Tnt1</i> στο <i>M. truncatula</i>	45
1.28. Σκοπός της διδακτορικής διατριβής.....	45
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	48
2.1. <i>In silico</i> ανάλυση των γονιδίων που κωδικοποιούν για πιθανούς μεταφορείς μονοσακχαριτών του φυτού <i>M.truncatula</i>	48
2.2. Κατασκευή φυλογενετικού δέντρου MST-γονιδίων.....	49
2.3. Πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής και των διαμεμβρανικών περιοχών των MSTs γονιδίων	49
2.4. Εξαγωγή συντηρημένων μοτίβων.....	49
2.5. Αναζήτηση κατάλληλων εκκινητών για RT-qPCR	50
2.6. Ονομασία των MSTs γονιδίων.	51
2.7. Το ριζόβιο <i>S. meliloti</i> και το ψυχανθές <i>M. truncatula</i>	51
2.8. Προβλάστηση σπόρων.....	51
2.9. Συνθήκες ανάπτυξης φυτών.....	53
2.10. Μεταφορά σπόρων και ανάπτυξη φυτών.....	53
2.11. Εμβολιασμός με <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021.....	54
2.12. Συλλογή ιστού <i>M.truncatula</i>	54
2.13. Απομόνωση RNA	55
2.14. Καθαρισμός ολικού RNA	56
2.15. Ανάλυση νουκλεϊκών οξέων.....	58
2.15.1. Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων ..	58
2.15.2. Ανάλυση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αγαρόζης.....	58
2.16. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	59
2.17. Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου.....	61
2.17.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με μήτρα μόρια RNA (RT-PCR)	61
2.17.2. Ενίσχυση και ποσοτικός προσδιορισμός ακολουθιών cDNA με χρήση της μεθόδου PCR πραγματικού χρόνου (qPCR)	62
2.18. <i>In situ</i> RNA-RNA υβριδισμός	64
2.19. Προετοιμασία σημασμένου RNA probe	65
2.19.1. <i>In vitro</i> μεταγραφή (DIG RNA Labeling Kit).....	65
2.19.2. Καθαρισμός DIG-σημασμένου RNA.....	65

2.19.3. Υδρόλυση RNA	66
2.20. Μονιμοποίηση ιστού.....	66
2.20.1. Μονιμοποίηση φυματίων <i>M. truncatula</i>	66
2.20.2. Αφυδάτωση ιστού.....	67
2.20.3. Διαφανοποίηση ιστών	67
2.20.4. Διήθηση ιστού.....	68
2.21. Πραγματοποίηση τομών	68
2.22. Αποπαραφίνωση	69
2.23. Ενυδάτωση.....	70
2.24. Προϋβριδισμός.....	71
2.25. Υβριδισμός.....	72
2.26. Χειρισμός μετα-υβριδισμού.....	73
2.27. Εντοπισμός.....	74
2.27.1. Ανασύσταση των buffers DIG Wash και Block buffer set.....	74
2.27.2. Διαδικασία εντοπισμού	75
2.28. Προετοιμασία μέσου έγκλισης Mowiol 4-88.....	76
2.29. Έγκλιση αντικειμενοφόρων πλακών.....	76
2.30. Μετασηματισμός σε ζύμες.....	77
2.31. Ταυτοποίηση <i>TnlI</i> -μεταλλαγμένων σειρών <i>M. truncatula</i>	78
2.32. Προσδιορισμός της δραστηριότητας της νιτρογενάσης.....	81
2.33. Μεταβολομική ανάλυση	81
2.33.1. Γενικά.....	81
2.33.2 Χρωματογραφία	82
2.33.3. ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ (GC).....	83
2.33.4. ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	84
2.33.5. Φασματομετρία μαζών.....	86
2.33.6. Οργανολογία.....	86
2.33.7. Τετραπολικών μαζών (quadrupole analyzer)	86
2.33.8. Συλλογή Ιόντων και Καταγραφή.....	87
2.33.9. Εκχύλιση μεταβολιτών.....	87
2.33.10. Παραγωγοποίηση (derivatization).....	88
2.33.11. Αέριος χρωματογραφία-Φασματομετρία μάζας (GC-MS) στα πειράματα	89
2.34. Στατιστική ανάλυση.....	90
3. Αποτελέσματα-Μέρος 1ο	92
3.1. Η οικογένεια των γονιδίων μεταφορέων μονοσακχαριτών MSTs του <i>M. truncatula</i>	92
3.2. Εντοπισμός των MST-γονιδίων στα χρωμοσώματα του <i>M. truncatula</i>	97
3.3. Μήκος κωδικής και κωδικοποιούμενης αμινοξικής αλληλουχίας των MST- γονιδίων και αριθμός των διαμεμβρανικών τους περιοχών	100

3.4. Μοτίβα MST-γονιδίων.....	102
3.5. Μεταγραφομική ρύθμιση πιθανών MSTs γονιδίων στα φυμάτια, στις ρίζες, στους βλαστούς, στα ακροβλαστίδια και στα φύλλα κάτω από συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου.....	106
3.6. Προφίλ έκφρασης των MST-γονιδίων μετά από 24 h ή 72 h συνεχούς σκότους.....	108
3.6.1. PCA ανάλυση και κατά συστάδες (clustered heat map) του κατά ζεύγη συντελεστή συσχέτισης του Pearson μεταξύ των σχετικών επιπέδων έκφρασης των <i>MtMSTs</i> στα διαφορετικά όργανα των τριών ομάδων φυτών του <i>M. truncatula</i>	108
3.6.2. Προφίλ έκφρασης των MST-γονιδίων μετά από 24 h ή 72 h συνεχούς σκότους, έπειτα από στατιστική ανάλυση.....	112
3.7. Μεταβολομικό προφίλ υπό συνθήκες έλλειψης άνθρακα.....	116
3.8. PCA ανάλυση των εντοπισθέντων μεταβολιτών στα εξεταζόμενα όργανα των τριών ομάδων φυτών του <i>M. truncatula</i>	116
3.9. Κατηγορίες μεταβολιτών που εντοπίστηκαν μετά από GC-MS ανάλυση	118
3.9.1. Σάκχαρα	118
3.9.2. Πολυόλες	120
3.9.3. Αμινοξέα	122
3.9.4. Οργανικά οξέα	123
3.10. Ανάλυση αποτελεσμάτων φυτών του <i>M. truncatula</i> σε συνθήκες αλατότητας και ξηρασίας από τη βάση δεδομένων του MtGEA.....	124
4. Αποτελέσματα-Μέρος 2ο	126
4.1. <i>In silico</i> αναγνώριση γονιδίων μεταφορέων σακχάρων του <i>M. truncatula</i> που επάγονται ή εκφράζονται αποκλειστικά στα φυμάτια.....	126
4.2. Προσδιορισμός των επιπέδων της έκφρασης και εντοπισμός των mRNAs των προαναφερθέντων γονιδίων σε φυμάτια διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης, του <i>M. truncatula</i>	127
4.3. Πρόβλεψη διαμεμβρανικών περιοχών των <i>MtSTP13</i> και <i>MtPMT3_1</i>	130
4.4. Μελέτη του χωροταξικού προτύπου έκφρασης με εφαρμογή της τεχνικής του <i>in situ</i> RNA-RNA υβριδισμού.....	130
4.5. Υποκυτταρικός εντοπισμός των πιθανών μεταφορέων σακχάρων <i>MtSTP13</i> και <i>MtPMT3_1</i> στο σύστημα του <i>S. cerevisiae</i>	133
4.6. Ανάλυση του φυσιολογικού ρόλου των <i>MtSTP13</i> και <i>MtPMT3_1</i> , στη διαδικασία της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης, με χρήση φυτών που φέρουν μεταλλάξεις στα συγκεκριμένα γονίδια.	135
4.6.1. Ταυτοποίηση των μεταλλαγμένων <i>M. truncatula</i> με <i>Tnt1</i> -ένθεση για τα <i>MtSTP13</i> και <i>MtPMT3_1</i> που εκφράζονται αποκλειστικά ή επάγονται στην αζωτοδεσμευτική περιοχή του φυματίου που βρίσκεται σε συνθήκες υποξίας.....	135
4.6.2. Φαινοτυπικές παρατηρήσεις μεταξύ των αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων φυτών του <i>M. truncatula</i>	138
4.6.3. Προδιορισμός της δραστηριότητας της νιτρογενάσης και μέτρηση φαινοτυπικών χαρακτηριστικών στα αγρίου τύπου και στα μεταλλαγμένα φυτά του <i>M. truncatula</i>	141

4.6.4. Μεταβολομική ανάλυση μεταξύ των αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων φυτών του <i>M. truncatula</i>	145
5. Συζήτηση	154
5.1. Φυλογενετική ταξινόμηση και οργάνωση γονιδίων.....	154
5.2. Παρουσία συντηρημένων μοτίβων	156
5.3. Μεταγραφομικό και μεταβολομικό προφίλ των MSTs του <i>M. truncatula</i>	158
5.4. Οι MSTs παίζουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της κατανομής και του διαχωρισμού του C στα αζωτοδεσμετικά φυμάτια.....	165
5.5. Ο πιθανός φυσιολογικός ρόλος του μεταφορέα <i>MtPMT3_1</i> κατά τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση	167
5.6. Γενικά Συμπεράσματα	169
6. Παράρτημα	172
7. Βιβλιογραφία	205

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

Δημοσιεύσεις

Komaitis F., Kalliampakou K., Botou M., Nikolaidis M., Kalloniati C., Skliros D., Du B., Rennenberg H., Amoutzias G. D., Frillingos S. and Fletmetakis E. (2020). "Molecular and Physiological Characterization of the MST gene family in *Medicago truncatula*." Journal of Experimental Botany **71**(10): 3110-3125.

Komaitis F., Kalliampakou K., Botou M., Nikolaidis M., Kalloniati C., Skliros D., Du B., Rennenberg H., Amoutzias G. D., Frillingos S., Udvardi M.K. and Fletmetakis E. "Functional characterization of *MtSTP13* and *MtPMT3_1* transporters of *Medicago truncatula*." (in preparation).

Αναρτημένες Ανακοινώσεις

Fotios Komaitis, Katerina Kalliampakou, Georgios Karalias, Dimitrios Skliros, Emmanouil Fletmetakis,
Molecular identification of nodule-specific and nodule induced monosaccharide transporters (MSTs) in *Medicago truncatula*.
Proceedings of the 65th Congress of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology, Thessaloniki, Greece, 28-30 November, p.28, 2014.

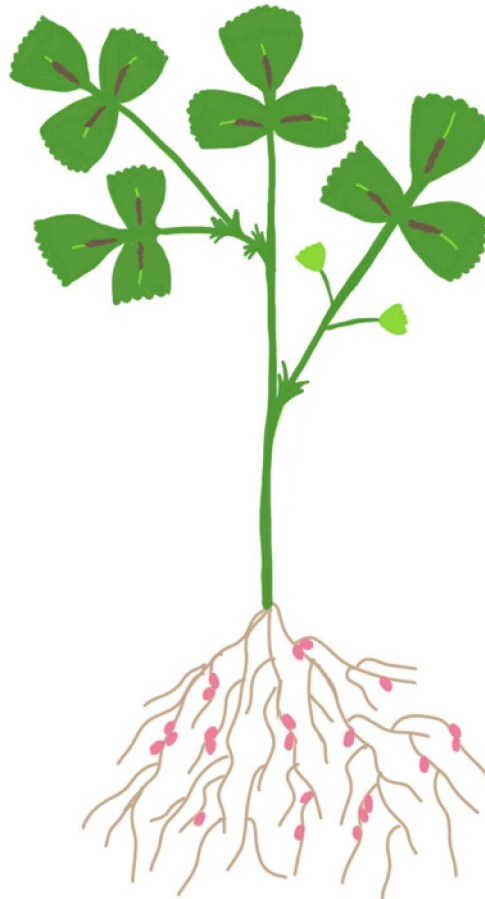
Fotios Komaitis, Georgios Karalias, Katerina I. Kalliampakou, Dimitrios Skliros, Michael K. Udvardi and Emmanouil Fletmetakis.
Nodule-specific and nodule-induced Monosaccharide Transporters (MSTs) in *Medicago truncatula*.
BioMicroWorld 2015. International Conference on Environmental Industrial and Applied Microbiology, Barcelona, Spain/ 28-30 October 2015. Book of Abstracts p.404.

Fotios Komaitis, Katerina Kalliampakou, Giorgos Karalias, Anastasiou Ioanna, Maria Patelou, Dimitris Skliros and Emmanouil Fletmetakis.
Physiological role of Monosaccharide Transporters (MSTs) of *Medicago truncatula* under carbon starvation.
68th Congress of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology, Athens 10-12 November 2017, p.32.

Fotios Komaitis, Katerina Kalliampakou, Chrysanthi Kalloniati, Ioanna Anastasiou, Maria Patelou, Dimitrios Skliros, Emmanouil Fletmetakis.
Profile of metabolites of *Medicago truncatula* under carbon starvation conditions. 69th Panhellenic Conference of the Hellenic Society for Biochemistry and Molecular Biology, Larissa/ 23-25 November 2018. Book of abstracts p.42.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1



1. Εισαγωγή

1.1. Γενικά

Τα φυτά αποτελούν την κυριότερη πηγή οργανικού άνθρακα για την επιβίωση και την ανάπτυξη των ζώων, συμπεριλαμβανομένων και των ανθρώπων. Τα φυτά έχουν την ικανότητα να μετατρέπουν το CO₂ σε σάκχαρα στους φωτοσυνθετικούς ιστούς (φύλλα) και να τα εξάγουν στο φλοιό κυρίως ως σακχαρόζη, ώστε να καλύψουν τις ενεργειακές και τις ανάγκες σε άνθρακα των ιστών καταβόθρων (άνθη, βλαστοί, ρίζες, φυμάτια), όπως επίσης και για την υποστήριξη των μηχανισμών απόκρισης σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις. Καθοριστικό ρόλο τόσο στη διακυτταρική όσο και στη μεγάλων αποστάσεων μεταφορά των σακχάρων στο φυτό παίζουν εξειδικευμένες μεμβρανικές πρωτεΐνες, οι μεταφορείς σακχάρων (Doidy et al. 2012, Julius et al. 2017). Οι μεμβρανικές αυτές πρωτεΐνες, παρουσιάζουν ομοιότητες στη δομή τους, διαθέτοντας θεωρητικά 12 διαμεμβρανικές περιοχές, όμως διαφέρουν σημαντικά στην αλληλουχία των αμινοξέων τους (Lemoine and Sauer 2000). Τα ανώτερα φυτά διαθέτουν δύο ξεχωριστές κατηγορίες μεταφορέων σακχάρων: μεταφορείς δισακχαριτών, οι οποίοι μεταφέρουν κυρίως σακχαρόζη (Lemoine 2000) και μεταφορείς μονοσακχαριτών, οι οποίοι μεταφέρουν πλήθος μονοσακχαριτών συμπεριλαμβανομένων και εκείνων που προέρχονται από την υδρόλυση της σακχαρόζης από τις ιμβερτάσες των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων. Στα ανώτερα φυτά, τα φωτοσυνθετικά παραγόμενα σάκχαρα, υπό τη μορφή λιγότερο ενεργών ή/και μεταβολικά περισσότερο σταθερών ενώσεων, μεταφέρονται οσμωτικά μέσω του αγγειακού συστήματος στα μέρη του φυτού που δε φωτοσυνθέτουν (καταβόθρες). Στις καταβόθρες συγκαταλέγονται τα κύτταρα της ρίζας, οι αναπαραγωγικοί ιστοί, τα αποταμιευτικά και αναπτυσσόμενα όργανα (Williams et al. 2000). Τα σάκχαρα μεταφέρονται μέσω των αγγείων υπό τη μορφή δισακχαριτών (σακχαρόζη και παράγωγα σακχαρόζης) και μονοσακχαριτών (σακχαροαλκοόλες). Αρκετά ετεροτροφικά κύτταρα επικοινωνούν συμπλασμικά με το αγγειακό σύστημα, σε όλες όμως τις υπόλοιπες περιπτώσεις η είσοδος των σακχάρων εξασφαλίζεται με τη βοήθεια ειδικών μεταφορέων (Truernit et al. 1994).

1.2. Σάκχαρα

Οι υδατάνθρακες ή σάκχαρα είναι η πλέον ευρέως διαδεδομένη θρεπτική ύλη στη φύση. Λόγω της αφθονίας τους δεν έχει οριστεί απαιτούμενο ποσό υδατανθράκων σε ημερήσια βάση. Ονομάστηκαν υδατάνθρακες, γιατί τα πρώτα χρόνια θεωρούνταν ότι αποτελούνται από άνθρακα και νερό C_x(H₂O)_y. Αυτό βέβαια

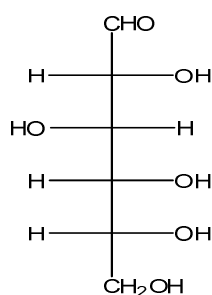
δεν ισχύει σήμερα, γιατί υπάρχουν αρκετές ουσίες που δεν αντιστοιχούν στο χημικό αυτό τύπο.

1.2.1. Γλυκόζη

Η γλυκόζη είναι ένας από τους πλέον γνωστούς υδατάνθρακες με σπουδαίους και ποικίλους ρόλους στον οργανισμό. Ονομάζεται επίσης και δεξτρόζη. Αποτελεί το κατ' εξοχήν καύσιμο του οργανισμού, όχι μόνο για τον άνθρωπο, αλλά και για κάθε ζωντανό φυτικό ή ζωικό οργανισμό. Αποθηκεύεται στα φυτά υπό μορφή αμύλου και στα ζώα υπό μορφή γλυκογόνου και είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη λειτουργία του εγκεφάλου.

Η γλυκόζη και τα ενδιάμεσα προϊόντα του μεταβολισμού της αποτελούν πρώτη ύλη για τη βιοσύνθεση συστατικών του οργανισμού μεγάλης βιολογικής αξίας, όπως τα συνένζυμα, τα νουκλεϊνικά οξέα κ.ά.

Η κανονική συγκέντρωση της γλυκόζης εντός και εκτός του κυττάρου παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της οσμωτικής ισορροπίας και στο μηχανισμό της ενεργής ή παθητικής μεταφοράς συστατικών μέσω των μεμβρανών και υπεισέρχεται αμέσως ή εμμέσως σε όλες τις λειτουργίες του οργανισμού. Παράγεται από τα φυτά και τα φύκια κατά τη διάρκεια της φωτοσύνθεσης από νερό και διοξείδιο του άνθρακα, χρησιμοποιώντας ενέργεια από το ηλιακό φως. Από υδατικά διαλύματα κρυσταλλώνεται σε τρεις μορφές: την α-γλυκοπυρανόζη, τη β-γλυκοπυρανόζη και την ένυδρη β-γλυκοπυρανόζη.

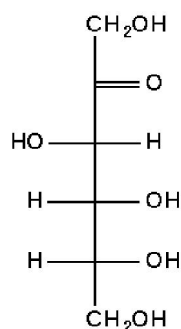


Εικόνα 1.1: Συντακτικός τύπος γλυκόζης.

1.2.2. Φρουκτόζη

Η φρουκτόζη είναι ο γλυκύτερος μονοσακχαρίτης που βρίσκεται ελεύθερος στη φύση. Τα φωσφορικά παράγωγα της φρουκτόζης, όπως η 1-φωσφορική φρουκτόζη και η 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη παίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των υδατανθράκων. Στο ήπαρ με την παρουσία του ενζύμου φρουκτοκινάση ή φωσφοφρουκτοκινάση, μετατρέπεται σε φωσφορική-1-

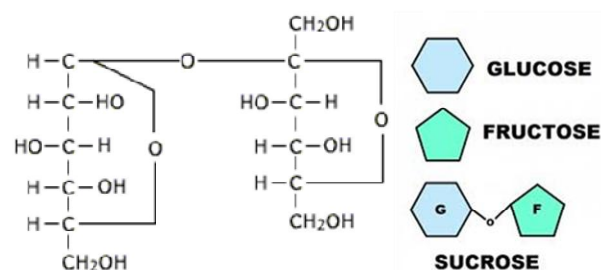
φρουκτόζη, η οποία στη συνέχεια διασπάται σε γλυκεραλδεΐδη και διυδροξυακετόνη, οι οποίες είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν από τους ιστούς ως πηγή ενέργειας (Quezada-Calvillo et al. 2006)



Εικόνα 1.2: Συντακτικός τύπος φρουκτόζης.

1.2.3. Σακχαρόζη

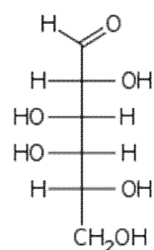
Η σακχαρόζη είναι μη ανάγον δισακχαρίτης που αποτελείται από γλυκόζη και φρουκτόζη.



Εικόνα 1.3: Συντακτικός τύπος σακχαρόζης.

1.2.4. Γαλακτόζη

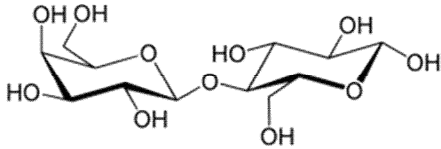
Η γαλακτόζη είναι μονοσακχαρίτης που δεν απαντάται σε μεγάλες συγκεντρώσεις ελεύθερος στη φύση. Ενωμένος με γλυκόζη σχηματίζει το δισακχαρίτη λακτόζη, που είναι από τα κύρια συστατικά του γάλακτος.



Εικόνα 1.4: Συντακτικός τύπος γαλακτόζης.

1.2.5. Λακτόζη

Η λακτόζη είναι δισακχαρίτης που αποτελείται από γλυκόζη και γαλακτόζη ενωμένες με β (1-4) γλυκοζιδικούς δεσμούς. Με το ένζυμο λακτάση (β -D-γλυκοζιδάση) διασπάται σε γλυκόζη και γαλακτόζη.

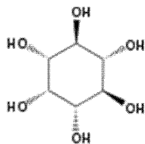


Εικόνα 1.5: Συντακτικός τύπος λακτόζης.

1.3. Πολυόλες

Οι πολυόλες είναι οργανικές ενώσεις που περιέχουν πολλές υδροξυλομάδες. Ένα μόριο με περισσότερες από δύο υδροξυλομάδες χαρακτηρίζεται ως πολυόλη. Οι πολυόλες είναι υδατάνθρακες μειωμένης θερμαντικής αξίας που προσδίδουν τη γεύση και την υφή της ζάχαρης, αλλά τις μισές περίπου θερμίδες. Χρησιμοποιούνται για την αντικατάσταση της ζάχαρης σε πολλά τρόφιμα και ποτά λόγω των λειτουργικών και υγειονομικών ωφελειών τους. Η σορβιτόλη είναι ένα ήπιο γλυκαντικό που χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία των τροφίμων.

1.3.1. Μυο-ινοσιτόλη



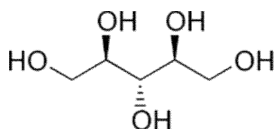
Εικόνα 1.6: Συντακτικός τύπος μυο-ινοσιτόλης.

Η ισομερής ινοσιτόλη είναι μια μεσοένωση και ως εκ τούτου είναι οπτικώς αδρανής, γιατί παρουσιάζει επίπεδο συμμετρίας. Συντίθεται από τη φωσφορο-6-γλυκόζη (G-6-P) σε δύο βήματα. Πρώτα η G-6-P ισομερίζεται από το ένζυμο ινοσιτολ-3-φωσφορική συνθάση (inositol-3-phosphate synthase π.χ. ISYNA1) σε 1-φωσφορική μυο-ινοσιτόλη, η οποία μετά αποφωσφορυλιώνεται (χάνει δηλαδή τη φωσφορική ομάδα) από ένα ειδικό ένζυμο ινοσιτολ-μονοφωσφατάση (inositol monophosphatase, π.χ. IMPA1) και παράγει ελεύθερη μυο-ινοσιτόλη. Στον άνθρωπο το μεγαλύτερο ποσό της ινοσιτόλης συντίθεται στα νεφρά σε μικρές ποσότητες λίγων mg ανά ημέρα (Parthasarathy et al. 2006). Η εξαφωσφορική ινοσιτόλη ή φυτικό οξύ (IP6), είναι η κύρια πηγή φωσφόρου σε πολλούς φυτικούς ιστούς, ειδικά σε σπόρους

και δημητριακά με υψηλή περιεκτικότητα σε ίνες. Τέλος, η 4-O-μεθυλο-μυο-ινοσιτόλη αποτελεί συστατικό της *Medicago Sativa* (McComb and Rendig 1962).

1.3.2. Ριβιτόλη

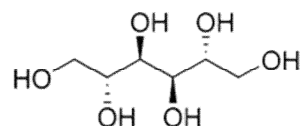
Η ριβιτόλη είναι πολυόλη ($C_5H_{12}O_5$) που σχηματίζεται από την αναγωγή μιας πεντόζης, της ριβόζης. Βρίσκεται στο φυτό *Adonis vernalis*, καθώς και στα κυτταρικά τοιχώματα μερικών Gram-positive βακτηρίων, υπό μορφή φωσφορικής ριβιτόλης.



Εικόνα 1.7: Συντακτικός τύπος ριβιτόλης.

1.3.3. Μαννιτόλη

Η μαννιτόλη είναι ισομερές της σορβιτόλης, μιας άλλης πολυόλης που διαφέρει ως προς τον προσανατολισμό της υδροξυλομάδας στον άνθρακα 2. Παράγεται από πληθώρα μικροοργανισμών βακτηρίων, ζυμών, μυκήτων, φυκών και πολλών φυτών. Ο κύκλος της μαννιτόλης γνωστός και ως μεταβολική οδός φρουκτόζης προς μαννιτόλη βρέθηκε σε μύκητες. Είναι πιθανόν και άλλοι μικροοργανισμοί να χρησιμοποιούν παρόμοια βιοχημικά μονοπάτια (Song and Vieille 2009)



Εικόνα 1.8: Συντακτικός τύπος μαννιτόλης.

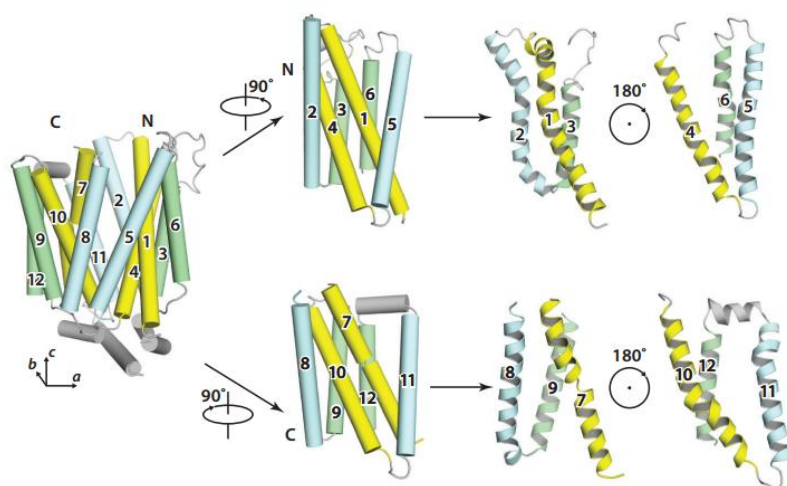
1.4. Μεταφορείς δι- και μονοσακχαριτών

Οι μεταφορείς δισακχαριτών (SUTs ή SUC) και μονοσακχαριτών (MSTs) είναι μέλη της κύριας υπερ-οικογένειας των MFS (Major Facilitator Superfamily). Στην οικογένεια των MFS ανήκει επίσης και η οικογένεια των μονοσακχαριτών SWEETs, οι οποίοι είναι μονομεταφορείς γλυκόζης. Η MFS είναι μία από τις δύο μεγαλύτερες οικογένειες των μεμβρανικών μεταφορέων που έχουν βρεθεί. Περιλαμβάνει μεταφορείς που είναι παρόντες σε όλες τις μορφές ζωής όπως είναι τα βακτήρια, αρχαία και ευκαρυώτες και αποτελείται από δεκαεπτά οικογένειες. Αποτελούνται από 400-600 αμινοξέα και η πλειοψηφία τους εκτιμάται να έχει μια κοινή δομή με 12 διαμεμβρανικές συνδεδεμένες περιοχές, οι οποίες συνδέονται με υδροφιλικούς βρόχους, οι οποίοι προέρχονται από διπλασιασμό και σύντηξη αρχέγονου μοτίβου 6 διαμεμβρανικών

περιοχών (Henderson 1990, Saier 1994, Büttner and Sauer 2000, Law et al. 2008). Τέλος, τα μέλη της οικογένειας MFS καλούνται επίσης και οικογένεια ‘μονομεταφορέων-συμμεταφορέων-αντιμεταφορέων’ (U.S.A., Uniporter Synporter Antiporter) (Büttner and Sauer 2000).

1.5. Διαμεμβρανικές περιοχές

Οι διαμεμβρανικές περιοχές παίζουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργία και τη δομή της πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, προκειμένου για τους μεταφορείς της οικογένειας MFS, κάθε πρώτη διαμεμβρανική έλικα (ή διαμεμβρανικό τμήμα, TM, transmembrane helix or transmembrane segment) κάθε δεκατίου τριών ελίκων (TM1, TM4, TM7 και TM10) τοποθετείται στο κέντρο του μεταφορέα και όλες μαζί δομούν το μονοπάτι μεταφοράς. Η πλειοψηφία των καταλοίπων εκεί λειτουργούν κυρίως για την πρόσδεση και συμμεταφορά του υποστρώματος. Εξωτερικά της κεντρικής αυτής δέσμης των ελίκων TM1, TM4, TM7 και TM10 βρίσκονται οι TM2, TM5, TM8 και TM11, οι οποίες μεσολαβούν για την επαφή των N και C domains (που αντιστοιχούν στις έλικες TM1-6 (N domain) και TM7-12 (C domain)), ενώ κάποια κατάλοιπα τους ίσως συμμετέχουν στη δέσμευση του υποστρώματος και τη συμμεταφορά του. Εξωτερικά των οκτώ αυτών ελίκων τοποθετούνται οι TM3, TM6, TM9 και TM12 ενισχύοντας έτσι τη δομική σταθερότητα του μεταφορέα (Yan 2015).



Εικόνα 1.9: Οι δύο διακριτές περιοχές N και C σχηματίζουν τη χαρακτηριστική δομή των 12 διαμεμβρανικών περιοχών και σχετίζονται με περιστροφή περίπου 180 μοιρών γύρω από τον άξονα y. Κάθε μία τέτοια περιοχή αποτελείται από δύο αναστροφές επαναλήψεις τριών διαμεμβρανικών ελίκων. Οι αντίστοιχες έλικες σε κάθε μονάδα έχουν το ίδιο χρώμα (Yan 2015).

1.6. Κύριοι τρόποι διαμεμβρανικής μεταφοράς

Οι κύριοι τρόποι διαμεμβρανικής μεταφοράς είναι η διευκολυνόμενη διάχυση (facilitated diffusion) και η ενεργός μεταφορά (active transport). Αρκετά μόρια είναι ικανά να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη με παθητική διάχυση (passive diffusion), δηλαδή χωρίς τη διαμεσολάβηση μεμβρανικών πρωτεϊνών, τα περισσότερα όμως δεν μπορούν και η μεταφορά τους γίνεται με διευκολυνόμενη διάχυση (facilitated diffusion) ή και με ενεργό μεταφορά (active transport) (Cooper and Hausman 2011).

1.6.1. Παθητική Διάχυση

Η παθητική διάχυση είναι μία μη επιλεκτική διαδικασία και αποτελεί τον πιο απλό τρόπο μετάβασης των μορίων από τη μία μεριά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης στην άλλη και η κατεύθυνση της κίνησης διαμέσου της μεμβράνης εξαρτάται από τη διαβάθμιση της συγκέντρωσης της ουσίας στις δύο πλευρές της μεμβράνης (από περιοχές υψηλής συγκέντρωσης προς περιοχές χαμηλής συγκέντρωσης). Μικρά μόνο και σχετικά υδρόφοβα μόρια μπορούν να κινηθούν με τον τρόπο αυτό με σημαντική ταχύτητα, ενώ μεγαλύτερα πολικά μη φορτισμένα μόρια, όπως η γλυκόζη, ή φορτισμένα μόρια οποιουδήποτε μεγέθους δεν μπορούν να πραγματοποιήσουν παθητική διάχυση (για την ακρίβεια, ο ρυθμός παθητικής διάχυσής τους δια μέσου της μεμβράνης είναι τόσο πολύ μικρός, ώστε δεν έχει φυσιολογικό νόημα σε ένα βιολογικό σύστημα), οπότε μεταφέρονται μέσω διευκολυνόμενης διάχυσης (Cooper and Hausman 2011).

1.6.2. Διευκολυνόμενη διάχυση

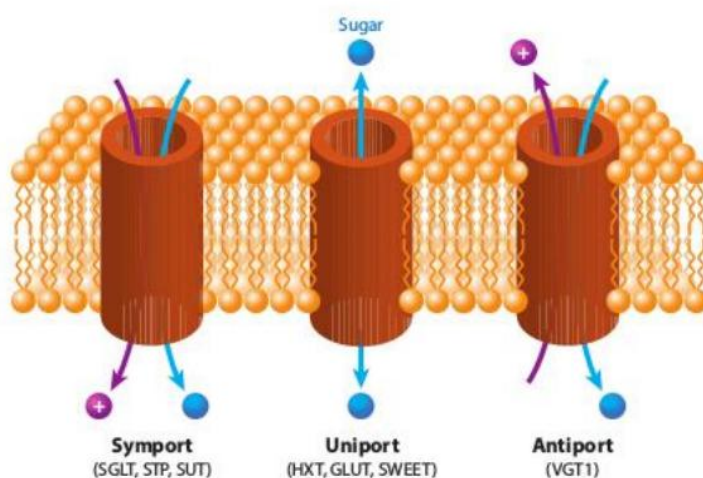
Η διευκολυνόμενη διάχυση πραγματοποιείται κι αυτή σύμφωνα τη συγκέντρωση των μορίων στις δύο πλευρές της μεμβράνης και χωρίς την παροχή εξωτερικής πηγής ενέργειας. Τα μόρια μεταφέρονται μέσω πρωτεϊνών, ώστε να μην έρχονται σε επαφή με τον υδρόφοβο πυρήνα της φωσφολιπιδικής διπλοστιβάδας. Οι πρωτεΐνες της διευκολυνόμενης διάχυσης μπορεί να είναι πρωτεΐνες-φορείς (carrier proteins) ή πρωτεΐνες-διάυλοι (channel proteins). Οι πρωτεΐνες-φορείς δεσμεύουν το μόριο για μεταφορά από τη μια μεριά της πλασματικής μεμβράνης στην άλλη και αλλάζουν τη διαμόρφωσή τους. Αντίθετα, οι πρωτεΐνες-διάυλοι, αποτελούν ανοικτούς πόρους και επιτρέπουν την ελεύθερη δίοδο μορίων μόνο σύμφωνα με το μέγεθος και το φορτίο τους. Το μοντέλο του μηχανισμού διευκολυνόμενης διάχυσης της γλυκόζης αντιπροσωπεύει χαρακτηριστικά τη δράση των πρωτεϊνών-φορέων, ενώ οι διάυλοι ιόντων αποτελούν χαρακτηριστικό παράδειγμα των πρωτεϊνών διαύλων (Cooper and Hausman 2011).

1.6.3. Ενεργός μεταφορά

Στην ενεργό μεταφορά, τα μόρια μεταφέρονται αντίθετα από τη διαβάθμιση συγκέντρωσής τους εκατέρωθεν της μεμβράνης και η μεταφορά αυτή απαιτεί ενέργεια, με την οποία θα πραγματοποιηθεί η μη ευνοούμενη ενεργειακά μεταφορά. Ενεργός μεταφορά που ωθείται άμεσα από την υδρόλυση του ATP, πραγματοποιείται χαρακτηριστικά από τις αντλίες ιόντων (ion pumps), π.χ. η ΑΤΡάση $\text{Na}^+ - \text{K}^+$. Υπάρχει όμως και η ενεργός μεταφορά που ωθείται από τη διαβάθμιση ιόντων (πρωτονίων ή ιόντων νατρίου) και στην οποία οι μεταφορείς για να μεταφέρουν μόρια προς τη μη ευνοϊκή ενεργειακά κατεύθυνση χρησιμοποιούν συζευγμένη μεταφορά αυτών με ένα ιόν, το οποίο μεταφέρεται ευνοϊκά είτε προς την ίδια είτε προς την αντίθετη κατεύθυνση (Cooper and Hausman 2011).

1.7. Κατηγορίες μεμβρανικών μεταφορέων

Υπάρχουν τρεις κατηγορίες μεμβρανικών μεταφορέων: α) οι συμμεταφορείς (symporters), που μεταφέρουν δύο μόρια ή ιόντα προς την ίδια κατεύθυνση, β) οι μονομεταφορείς (uniporters), που μεταφέρουν μόνο ένα μόριο ή ιόν είτε εσωτερικά είτε εξωτερικά της μεμβράνης και γ) οι αντιμεταφορείς (antiporters), οι οποίοι μεταφέρουν δύο μόρια ή ιόντα προς αντίθετες κατευθύνσεις (Cooper and Hausman 2011). Η μεταφορά των σακχάρων πραγματοποιείται από πρωτεΐνες μεταφορείς, οι οποίοι μεταφέρουν τα σάκχαρα είτε με διευκολυνόμενη διάχυση (facilitated diffusion) είτε με ενεργό μεταφορά εξαρτώμενη από διαβάθμιση ιόντων (ion-driven or secondary active transport) (Büttner 2007).



Εικόνα 1.10: Τρόποι μεταφοράς από πρωτεΐνες-φορείς. Στις παρενθέσεις παρουσιάζονται κάποιες ευκαρυωτικές πρωτεΐνες-φορείς που ανήκουν σε κάθε κατηγορία (Chen et al. 2015).

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν έναν μεγάλο αριθμό γονιδίων που κωδικοποιούν για πιθανούς μεταφορείς μονοσακχαριτών, μεταξύ των οποίων 53 MST-γονίδια στο *Arabidopsis thaliana*, 59 στην άμπελο (*Vitis vinifera*) και 65 στην όρυζα (*Oryza sativa*). Επιπλέον, υπάρχει πολύ μεγάλος όγκος πληροφοριών από μελέτες που αφορούν τον βιοχημικό χαρακτηρισμό των MST-γονιδίων έπειτα από έκφρασή τους σε ομόλογα και ετερόλογα συστήματα, προσδιορίζοντας το χρονικό και χωροταξικό πρότυπο έκφρασής τους κατά τη διάρκεια ανάπτυξης των φυτών σε συμβατικές συνθήκες ανάπτυξης ή σε συνθήκες βιοτικής ή αβιοτικής καταπόνησης, όπως επίσης και από μελέτες προσδιορισμού του φυσιολογικού ρόλου των MST-γονιδίων έπειτα από πειραματισμό με μεταλλαγμένες σειρές φυτών.

Οι γνωστοί μεταφορείς μονοσακχαριτών κατανέμονται σε επτά υποοικογένειες που περιλαμβάνουν: τους STPs (sugar transport proteins), τους PLTs (polyol/monosaccharide transporters), τους INTs (inositol transporters), τους VGTs (subcellular vacuolar glucose transporters), τους TMTs (tonoplast membrane transporters), τους pGlcTs (plastidic glucose transporters and suppressor of G Protein Beta 1 (SGB1)] και τους ESLs (early-responsive to dehydration six-like transporters) (Büttner 2007, Doidy et al. 2012).

1.8. Υποοικογένεια των STPs

Οι μεταφορείς που αποτελούν προϊόντα των STP-γονιδίων εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και γενικότερα λειτουργούν ως συμμεταφορείς H^+ /εξοζών ιστών καταβόθρων και φωτοσυνθετικών ιστών. Μεταφέρουν αλδόζες (εξόζες, πεντόζες) και κετόζες (φρουκτόζη) (Truernit et al. 1996, Schneidereit et al. 2003, Nørholm et al. 2006, Hofmann et al. 2009, Büttner 2010, Poschet et al. 2010, Rottman et al. 2018). Πιο συγκεκριμένα οι *AtSTP1*, *AtSTP2*, *AtSTP4*, *AtSTP6*, *AtSTP8*, *AtSTP10*, *AtSTP11*, *AtSTP12* και *AtSTP13* έχουν ευρεία εξειδίκευση για εξόζες και πεντόζες (Sauer et al. 1990, Boorer et al. 1994, Truernit et al. 1996; Scholz-Starke et al. 2003, Schneidereit et al. 2005, Rottmann et al. 2016, Rottmann et al. 2018), ενώ οι *AtSTP7*, *AtSTP9* και *AtSTP14* είναι εξειδικευμένοι για πεντόζες (D-ξυλόζη and L-αραβινόζη) (Rottman et al. 2018), D-γλυκόζη και γαλακτόζη, αντίστοιχα (Schneidereit et al. 2003). Οι *AtSTP1* (χαμηλές τιμές), *AtSTP6*, *AtSTP8* (χαμηλές τιμές), και *AtSTP13* μεταφέρουν και φρουκτόζη (Sherson et al. 2003, Scholz-Starke et al. 2003, Yamada et al. 2011, Rottmann et al. 2018). Ο *AtSTP3* έχει χαμηλή εξειδίκευση για εξόζες (D-γλυκόζη) (Büttner et al. 2000). Επιπλέον οι *AtSTP1* (Boorer et al. 1994) και *AtSTP14* (Poschet et

al. 2010) επάγονται στο παρατεταμένο σκοτάδι. Έχει αναφερθεί ότι ορισμένες συνθήκες, όπως το παρατεταμένο σκοτάδι ή η έλλειψη σακχάρων, οδηγούν στην κινητοποίηση των σακχάρων του κυτταρικού τοιχώματος, με τη δράση γλυκοσυλ- υδρολασών κι έτσι τα σάκχαρα αυτά μπορούν να εισέλθουν στο κύτταρο για τον περαιτέρω μεταβολισμό τους (Lee et al. 2007, Poschet et al. 2010). Οι STPs έχουν κάποιο είδος λειτουργίας ανάκτησης της σακχαρόζης που χάνεται από τα κύτταρα, η οποία αφού διασπαστεί σε φρουκτόζη και γλυκόζη μπορεί να επανεισαχθεί μέσω των υψηλής εξειδίκευσης μεταφορέων μονοσακχαριτών STPs (Rottman et al. 2016). Η πλειοψηφία των *AtSTPs* έχει ευρύ πρότυπο έκφρασης, αλλά κυρίως εκφράζονται σε μη φωτοσυνθετικά όργανα (Sauer et al. 1990, Boorer et al. 1994, Scholz-Starke et al. 2003, Schneidereit et al. 2005, Yamada et al. 2011, Rottmann et al. 2016, Rottmann et al. 2018), εκτός των *AtSTP3*, *AtSTP8* και *AtSTP14* του *A. thaliana* οι οποίοι εκφράζονται στα φύλλα (Büttner et al. 2000, Büttner and Sauer 2003, Poschet et al. 2010, Rottmann et al. 2018). Τέλος ο *Mtst1* κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη μεταφοράς με υψηλή εξειδίκευση για γλυκόζη και φρουκτόζη και εμπλέκεται στις αλληλεπιδράσεις των φυτών με τη μυκόριζα (Harrison 1996, Büttner and Sauer 2000), ενώ ο *MtSTP13* εκφράζεται στα φυμάτια (Kryvoruchko et al. 2016).

1.9. Υποοικογένεια των TMTs

Οι TMTs λειτουργούν ως αντιμεταφορείς σακχάρων/ H^+ εισάγοντας σάκχαρα στο χυμοτόπιο, το οποίο παίζει κεντρικό ρόλο στη μακροπρόθεσμη ή πρόσκαιρη αποθήκευση των σακχάρων (Wormit et al. 2006, Cho et al. 2010, Wingenter et al. 2010, Schulz et al. 2011). Μοναδικό χαρακτηριστικό τους είναι ο εκτεταμένος βρόχος μεταξύ της TM6 (διαμεμβρανική έλικα 6) και TM7 (διαμεμβρανική έλικα 7). Τα *AtTMT1* και *AtTMT2* παρουσιάζουν ιστο- και κυτταρο- ειδικό πρότυπο έκφρασης, σε αντίθεση με το *AtTMT3* που εκφράζεται ασθενώς σε όλους τους ιστούς. Το *AtTMT1* παρουσιάζει υψηλά επίπεδα έκφρασης κυρίως στα φύλλα και τα όργανα των ανθέων (π.χ. πέταλα). Κατανέμεται ομοίως στα κύτταρα της επιδερμίδας και του μεσοφύλλου. Το *AtTMT2* εκφράζεται κυρίως στους νεαρούς αναπτυσσόμενους ιστούς και στα κύτταρα της γύρης, κυρίως αυτά της επιδερμίδας (Wormit et al. 2006). Στο ρύζι αντίθετα, ο *OsTMT1* παρουσίασε τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στα κύτταρα των δεσμίδων και του περιβλήματος και ο *OsTMT2* στο αγγειώδες παρέγχυμα και τα συνοδά κύτταρα (Cho et al. 2010). Επίσης οι *AtTMT1* και *AtTMT2* αύξησαν τα επίπεδα έκφρασής τους ύστερα από ξηρασία και αλατότητα, όπως επίσης και ύστερα από συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας και έλλειψης σακχάρων. Οι TMTs λειτουργούν ως φορείς σακχάρων

(sugar carriers) που εμπλέκονται στην κυτταρική αντίδραση, έπειτα από οσμωτικά ερεθίσματα καταπόνησης (Neuhaus 2007). Ενώ οι *AtTMTs* παίζουν κύριο λόγο στην αντίδραση στην καταπόνηση, οι *OsTMTs* έχουν ως κύρια λειτουργία την ανάκτηση των σακχάρων κατά τη μετακίνησή τους (Cho et al. 2010).

1.10. Υποοικογένεια των VGTs

Οι VGTs λειτουργούν κι αυτοί ως αντιμεταφορείς σακχάρων/ H^+ εισάγοντας σάκχαρα στο χυμοτόπιο, για πρόσκαιρη ή μακροχρόνια αποθήκευσή τους (Aluri and Büttner 2007). Στα φύλλα, η συντριπτική πλειοψηφία της γλυκόζης βρίσκεται στο χυμοτόπιο. Στο *A. thaliana* υπάρχουν δύο μεταφορείς μονοσακχαριτών οι οποίοι βρίσκονται στο χυμοτόπιο. Το *AtVGT1* συμβάλλει στην ενεργή μεταφορά της γλυκόζης και φρουκτόζης, αλλά όχι της ξυλόζης και εκφράζεται στη γύρη και στα αρχικά στάδια της βλάστησης, ενώ δεν εντοπίζεται στη ρίζα, καταδεικνύοντας έτσι το σημαντικό του ρόλο στη βλάστηση των σπόρων και την άνθηση (Aluri and Büttner 2007).

1.11. Υποοικογένεια των pGlcTs/SGB1

Οι pGlcTs έχουν ως λειτουργία την εξαγωγή γλυκόζης, που προέρχεται από την αποτυχημένη διάσπαση του μεταφερόμενου αμύλου. Συνεισφέρει στην εκροή σακχάρων από το πλαστίδιο και είναι μια ενεργή διαδικασία που συνοδεύεται και με τη μεταφορά ενός πρωτονίου (Weber et al. 2000, Cho et al. 2010). Το μεταφερόμενο αυτό άμυλο κινητοποιείται τη νύχτα και κατά τη διάρκεια της επόμενης νυχτερινής περιόδου κινητοποιείται για να διατηρήσει ένα συνεχή εφοδιασμό των αναπτυσσόμενων ιστών καταβοθρών με άνθρακα, καθώς και ενέργεια για το μεταβολισμό στα φύλλα (Weber et al. 2000). Τα περισσότερα προϊόντα της αμυλολυτικής αποδόμησης που μεταφέρονται από τους χλωροπλάστες το βράδυ, είναι η γλυκόζη και η μαλτόζη, ενώ δε μεταφέρεται φρουκτόζη (Weber et al. 2000, Cho et al. 2010). Ο SGB1 ταυτοποιήθηκε ως ομόλογος μεταφορέας εξοζών και βρίσκεται στο Golgi. Οι pGlcTs και ο Mex1 (μεταφορέας μαλτόζης) συνεισφέρουν σημαντικά στην κινητοποίηση του αμύλου και κατά συνέπεια παίζουν σημαντικό ρόλο στην κατανομή του άνθρακα και στην ανάπτυξη των φυτών (Cho et al. 2010). Οι pGlcTs επίσης παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης στα φύλλα, αλλά εκφράζονται σε χαμηλότερα επίπεδα στη ρίζα, στο βλαστό, στα άνθη και στο μίσχο, φανερώνοντας έτσι το ρόλο τους στο μεταβολισμό του φωτοσυνθετικού άνθρακα. Η έκφρασή τους είναι χαμηλότερη στο τέλος της σκοτεινής και φωτεινής περιόδου και υψηλότερη στην αρχή τους (Weber et al. 2000, Cho et al. 2010). Τέλος, παρουσιάζουν

εκτεταμένο N-τελικό άκρο που μπορεί να αποτελεί στοχευμένο σήμα (Weber et al. 2000).

1.12. Υποοικογένεια των ESLs, ERD6-like

Οι ESLs εντοπίζονται στον τονοπλάστη και εμπλέκονται στην ενεργειακά εξαρτώμενη εκροή σακχάρων από το χυμοτόπιο, παίζοντας ρόλο στην επανακινητοποίηση των αποθηκευμένων σακχάρων έπειτα από βιοτική ή αβιοτική καταπόνηση (Kiyosue et al. 1998, Yamada et al. 2010, Poschet et al. 2011). Τα *AtERD6*-ομόλογα, πήραν αυτήν την ονομασία από το γονίδιο *ERD6* (early-responsive to dehydration ή γρήγορη αντίδραση στην αφυδάτωση), λόγω της υψηλής του έκφρασης έπειτα από την αντίδρασή του σε συνθήκες αφυδάτωσης και σε χαμηλές θερμοκρασίες (Kiyosue et al. 1998). Το *AtERD6* εκφράζεται τόσο σε φωτοσυνθετικούς όσο και σε μη φωτοσυνθετικούς ιστούς και όργανα, εντοπίζεται στον τονοπλάστη και μεσολαβεί για την εκροή της γλυκόζης από το χυμοτόπιο, ρυθμίζοντας έτσι την κυτταρική ομοιόστασή της. Η έκφραση του *AtERD6* επάγεται από παράγοντες που ενεργοποιούν δεξαμενές γλυκόζης, όπως είναι το σκοτάδι, η αφυδάτωση, η καταπόνηση στο κρύο και η πρόκληση τραυματισμού (Poschet et al. 2011). Ο *AtESL1* εκφράζεται κυρίως στο περικύκλιο και στο ξυλώδες παρέγχυμα και λειτουργεί ίσως ως μεταφορέας εξοζών από το χυμοτόπιο στο κυτταρόπλασμα και ως μηχανισμός που ελέγχει την επανακινητοποίηση των σακχάρων, όπως επίσης και την οσμωτική πίεση υπό αβιοτικές συνθήκες, όπως το κρύο και η ξηρασία (Yamada et al. 2010).

1.13. Υποοικογένεια των INTs

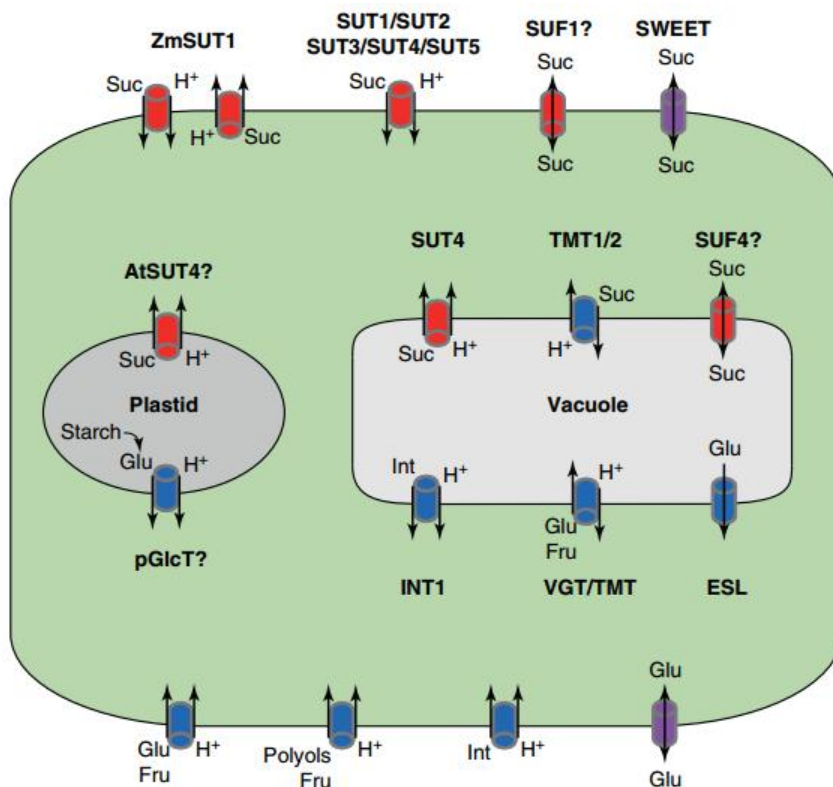
Οι INTs εντοπίζονται τόσο στην πλασματική μεμβράνη όσο και στις μεμβράνες του χυμοτοπίου και έχουν την ικανότητα να μεταφέρουν μυο-ινοσιτόλη (Schneider et al. 2006, Schneider et al. 2007, Schneider et al. 2008). Τα τέσσερα μέλη της οικογένειας των *AtINTs* στο *A.thaliana* παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία στους μεταφορείς μυο-ινοσιτόλης στη ζύμη και στον άνθρωπο, καθώς και με τους μεταφορείς μυο-ινοσιτόλης *MITR1* και *MITR2* στο *Mesembryanthemum crystallinum* (Chauhan et al. 2000). Σε αντίθεση με τους *MITR1* και *MITR2*, οι οποίοι θεωρούνται ότι καταλύουν τη συμμεταφορά Na^+ /μυο-ινοσιτόλης και βρίσκονται στον τονοπλάστη, στο *A.thaliana* ο *AtINT4* είναι υψηλά εξειδικευμένος μεταφορέας μυο-ινοσιτόλης/πρωτονίου και βρέθηκε στην πλασματική μεμβράνη. Εκφράζεται ισχυρά στους κόκκους της γύρης και στα συνοδά κύτταρα του φλοιού στα φύλλα, όπου ίσως εφοδιάζει το φλοιό με μυο-ινοσιτόλη, πιθανόν για τη σύνθεση ραφινόζης (Schneider

et al. 2006) . Ο *AtINT1* εντοπίζεται στον τονοπλάστη και μεταφέρει κι αυτός μυο-ινοσιτόλη. Παρουσιάζει χαμηλά ή υψηλά ποσοστά έκφρασης σε όλους τους ιστούς (Schneider et al. 2008). Ο *AtINT2*, βρίσκεται όπως κι ο *AtINT4* στην πλασματική μεμβράνη και είναι κι αυτός υψηλώς εξειδικευμένος μεταφορέας μυο-ινοσιτόλης/πρωτονίου. Εκφράζεται ασθενώς στον τάπητα των ανθήρων και στα αγγεία των φύλλων. Ο φυσιολογικός του ρόλος στα αγγεία, είναι ίσως η παροχή ινοσιτόλης για γαλακτινόλη και κατά συνέπεια για τη βιοσύνθεση ραφινόζης, ενώ στα μεσόφυλλα είναι απλά η ανάκτηση της ινοσιτόλης που διαχύθηκε έξω από τα κύτταρα (Schneider et al. 2007).

1.14. Υποοικογένεια των PMTs

Οι PMTs εντοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη, είναι συµμεταφορείς πρωτονίων και έχουν ευρεία εξειδίκευση σε υποστρώματα για πολυόλες, αλδόζες (εξόζες και πεντόζες) και κετόζες (φρουκτόζη) (Noiraud et al. 2001, Klepek et al. 2005, Pommerrenig et al. 2007, Dusotoit-Coucaud et al. 2010, Klepek et al. 2010). Όσον αφορά το *A. thaliana*, οι *AtPMT1*, *AtPMT2* και *AtPMT5* έχουν υψηλή εξειδίκευση για ευρύ φάσμα υποστρωμάτων, όπως πολυόλες, αλδόζες (εξόζες και πεντόζες), ενώ οι δύο πρώτοι και για κετόζες (φρουκτόζη). Επίσης και οι τρεις μεταφέρουν D-ξυλόζη ή D-σορβιτόλη σαν κύριο υπόστρωμα, εκφράζονται σε ιστούς καταβόθρες και όχι μόνο. Οι δύο πρώτοι εκφράζονται στους γυρεοσωλήνες και τα νεαρά κύτταρα του ξυλήματος, ιστοί και κύτταρα δηλαδή ταχέως αναπτυσσόμενα. Μία πιθανή λειτουργία τους μπορεί να είναι η ανάκτηση μορίων που χάθηκαν από κάποια κύτταρα με παθητική διάχυση, ενώ μια άλλη ίσως είναι ο εφοδιασμός των κυττάρων με φρουκτόζη. Ο *AtPMT5* εκφράζεται κυρίως στη ρίζα, ειδικά στη ζώνη επιμήκυνσης, εντοπίζεται όμως και στους αγγειώδεις ιστούς των φύλλων και σε συγκεκριμένα όργανα του άνθους. Μάλιστα, η έκφραση του *AtPMT5* επάγεται στα φύλλα ύστερα από πρόκληση τραυματισμού. Μία πιθανή λειτουργία του μπορεί να είναι η ανάκτηση σακχάρων από γηρασμένους τραυματισμένους ιστούς. Το πρότυπο έκφρασης και η εξειδίκευσή του στα υποστρώματα δείχνει επίσης ότι μπορεί να παίζει ρόλο στην παροχή των ιστών καταβόθρων με πολλούς υδατάνθρακες, οι οποίοι βρίσκονται στο φλοιό και θεωρούνται ότι μεταφέρονται στους ιστούς καταβόθρες (Klepek et al. 2005, Reinders et al. 2005, Klepek et al. 2010). Όσον αφορά το *Plantago major* οι αντίστοιχοι μεταφορείς που ανήκουν στην PLT υποοικογένεια, *PmPLT1* και *PmPLT2* είναι αγγειακοί μεταφορείς σορβιτόλης οι οποίοι αυξάνονται

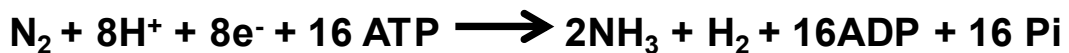
γρήγορα ως αντίδραση σε συνθήκες αλατότητας και εκφράζονται στα ώριμα συνοδά κύτταρα (Pommerenig et al. 2007). Οι πολυόλες, οι οποίες συχνά ονομάζονται και αλκοόλες σακχάρων, είναι απλοποιημένες μορφές αλδοζών και κετοζών. Οι συνηθέστερες πολυόλες είναι η μαννιτόλη, η σορβιτόλη, η γαλακτινόλη, αλλά και η ευρέως διαδεδομένη μυο-ινοσιτόλη. Η μαννιτόλη και η σορβιτόλη είναι άμεσα προϊόντα της φωτοσύνθεσης στα ώριμα φύλλα, ταυτόχρονα με τη σακχαρόζη. Έχουν παρόμοιες λειτουργίες, όπως είναι η μετακίνηση των σκελετών άνθρακα και ενέργειας μεταξύ των ιστών πηγών και καταβόθρων. Μερικές πολυόλες υπόκεινται σε μακράς απόστασης μετακίνηση, όπως φαίνεται από την ύπαρξή τους στο συλλεχθέντα χυμώδη φλοιό. Αυξημένη μεταφορά πολυολών, τόσο στο φλοιό όσο και στο ξύλημα συμβαίνει συνήθως, έπειτα από συνθήκες ξηρασίας ή αλατότητας. Ο πρώτος μεταφορέας πολυολών (μαννιτόλης) ήταν ο *AgMAT1* στο σέλινο (*Apium graveolens*) (Noiraud et al. 2001).



Εικόνα 1.11: Μοντέλο ενδοκυτταρικής κατανομής των μεταφορέων σακχάρων στα φυτά (Doidy et al. 2012).

1.15. MSTs και συμβιωτική αζωτοδέσμευση

Η οικογένεια των MST-γονιδίων στα φυτά είναι εξελικτικώς αρχαία και παρουσιάζει διαφορετικά πρότυπα έκφρασης μεταξύ των υποοικογενειών, όπως και διαφορετικούς τρόπους εξάπλωσης των γενεαλογικών τους σειρών (Johnson et al. 2006). Η ρύθμιση της έκφρασης και η δραστηριότητα των μεταφορέων σακχάρων στα φυτά αποκτά μεγάλη σημασία στα ψυχανθή, φυτά τα οποία σε συνθήκες έλλειψης ανόργανου αζώτου στο έδαφος αλληλεπιδρούν με βακτήρια (ριζόβια), ώστε να αναπτύξουν μια εξειδικευμένη ριζική κατασκευή (σε σχήμα όγκου), το φυμάτιο. Τα ριζόβια εσωκλείονται με μία μεμβράνη φυτικής προέλευσης, την περιβακτηριακή μεμβράνη, όπου διαφοροποιούνται σε βακτηριοειδή και καταλύουν την αναγωγή του μοριακού αζώτου σε αμμωνία, με χρήση του ενζυμικού συμπλέγματος της νιτρογενάσης, την οποία τα φυτικά κύτταρα ενσωματώνουν με τη μορφή των αμινοξέων γλουταμίνης και γλουταμικού οξέως. Σε αντάλλαγμα, το φυτό παρέχει στο συμβιώτη το φωτοσυνθετικό οργανικό άνθρακα που είναι απαραίτητος για τον πολλαπλασιασμό, την ανάπτυξη και τη λειτουργία του (Gordon 1995, Udvardi and Day 1997, Flemetakis et al. 2003, Prell and Poole 2006). Η διαδικασία αυτή αποκαλείται συμβιωτική αζωτοδέσμευση (Oldroyd et al. 2005). Η βακτηριακή νιτρογενάση καταλύει την ακόλουθη αντίδραση:



Στα αναπτυσσόμενα φυμάτια ένα σημαντικό ποσοστό των προϊόντων του καταβολισμού της σακχαρόζης χρησιμοποιούνται και για τη βιοσύνθεση κυτταρίνης και λιπιδίων. Η συμβιωτική αζωτοδέσμευση είναι το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης των ψυχανθών με τα ριζόβια που ανήκουν στα γένη *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* και *Azorhizobium*. Μέσα στο φυμάτιο αναπτύσσεται ένα εξειδικευμένο μικροπεριβάλλον, ώστε η βακτηριακή νιτρογενάση, η οποία είναι ένζυμο που απαιτεί μικροπεριβάλλον υποξίας (10-40 nM of O₂) και υψηλές τιμές ATP για τη δραστηριότητά της, να επιτύχει τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση (Appleby 1992, Minchin 1997).

Η νιτρογενάση είναι μια μεγάλη πρωτεΐνη δύο στοιχείων (σίδηρος και μολυβδαίνιο). Περιέχει τη Fe-δεσμεύουσα πρωτεΐνη και τη Mo/Fe-δεσμεύουσα πρωτεΐνη, οι οποίες από μόνες τους δεν είναι καταλυτικά ενεργές (Taiz and Zeiger, 2002). Είναι πολύ ευαίσθητη στο οξυγόνο, επομένως απαιτείται περιβάλλον χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου. Η νιτρογενάση των ριζικών φυματίων έχει παραπλήσια χαρακτηριστικά με την νιτρογενάση των μη συμβιωτικών αζωτοδεσμευτικών

βακτηρίων (ευαισθησία σε O_2 και ικανότητα αναγωγής του ακετυλενίου και του N_2). Εντοπίζεται μέσα στα βακτηροειδή και δεν απελευθερώνεται στο φυτικό κυτταρόπλασμα.

Τα βακτηροειδή εξαρτώνται πλήρως από το φυτό όσον αφορά τις απαραίτητες πηγές ενέργειας για τη δέσμευση του N_2 , καθώς και για την ανάπτυξη και συντήρησή τους (Vance and Heichel 1991). Οι κυριότερες οργανικές ενώσεις που μεταφέρονται μέσω της μεμβράνης του συμβιωσώματος στο ίδιο το βακτηροειδές είναι διάφοροι ενδιάμεσοι μεταβολίτες του κύκλου του κιτρικού οξέως, κυρίως τα οξέα C4 ηλεκτρικό, μηλικό και φουμαρικό. Τα οξέα αυτά χρησιμοποιούνται ως δότες ηλεκτρονίων κατά την παραγωγή ATP και ύστερα από τη μετατροπή τους σε πυροσταφυλικό, χρησιμεύουν ως τελική πηγή ηλεκτρονίων για την αναγωγή του N_2 . Το πρώτο σταθερό προϊόν της αζωτοδέσμευσης, όπως ειπώθηκε είναι η αμμωνία. Υπάρχουν αρκετές ενδείξεις ότι η αφομοίωση της αμμωνίας από οργανικές ενώσεις του αζώτου στο ριζικό φυμάτιο διενεργείται κυρίως από το φυτό. Τα βακτηροειδή μπορούν επίσης να αφομοιώσουν την αμμωνία σε οργανικές ενώσεις, αλλά τα επίπεδα των ενζύμων αφομοίωσης της αμμωνίας στο εσωτερικό τους είναι αρκετά χαμηλά.

Αντίθετα, το αμμωνιοαφομοιωτικό ένζυμο συνθετάση της γλουταμίνης βρίσκεται σε πολύ υψηλά επίπεδα στο κυτταρόπλασμα των φυτικών κυττάρων. Επομένως ότι η αμμωνία που μεταφέρεται από το βακτηροειδές στο φυτικό κύτταρο μπορεί να αφομοιωθεί από το φυτό υπό τη μορφή του αμινοξέος γλουταμίνη. Εκτός από τη γλουταμίνη, τα φυτικά κύτταρα συνθέτουν και άλλες αζωτούχες ενώσεις, κυρίως ορισμένα αμιδια αμινοξέων, όπως η ασπαραγίνη και η 4-μεθυλογλουταμίνη, καθώς και τα ουρεΐδια αλλαντοΐνη και αλλαντοϊκό οξύ, τα οποία μεταφέρονται μετά τη σύνθεσή τους στους υπόλοιπους φυτικούς ιστούς (Brock τόμος II 2007).

1.16. Σημασία ψυχανθών στην παγκόσμια παραγωγή

Η συμβίωση ψυχανθών-ριζοβίων είναι η σημαντικότερη σχέση στη βιολογική αζωτοδέσμευση, παράγοντας περίπου 200 εκατομμύρια τόνους αζώτου ετησίως (Vance 2001, Kalloniati et al. 2015) και καθιστά τα ψυχανθή ικανά να αναπτυχθούν σε εδάφη με έλλειψη αζώτου, μειώνοντας έτσι την ανάγκη για κοστοβόρα λιπάσματα αζώτου, αλλά και πιθανή μόλυνση των υδάτων (Graham and Vance 2003). Για το λόγο αυτό τα ψυχανθή θεωρούνται ακρογωνιαίος λίθος της αειφόρου γεωργίας. Επιπλέον, τα ψυχανθή αποτελούν περίπου το 1/3 της παγκόσμιας πρωτογενούς

παραγωγής, των ανθρώπινων διατροφικών πρωτεϊνών και των επεξεργασμένων φυτικών ελαίων (Benedito et al. 2008, Pislariu et al. 2012, Tang et al. 2014, Krishnakumar et al. 2015). Έχει υπολογισθεί ακόμα ότι αποταμιεύονται 10 δισεκατομμύρια δολάρια σε αζωτούχα λίπανση (Graham and Vance 2003).

Ψυχανθή που χρησιμοποιούνται ως τρόφιμα είναι τα: φασόλια (*Phaseolus vulgaris*), η σόγια (*Glycine max*), ο αρακάς (*Pisum sativum*), τα ρεβύθια (*Cicer arietinum*), τα κουκιά (*Vicia faba*), το μπιζέλι περιστεριού (*Cajanus cajan*), τα μαυρομάτικα φασόλια (*Vigna unguiculata*) και οι φακές (*Lens esculenta*). Το αλφάλφα (*Medicago sativa*), το τριφύλλι (*Trifolium spp.*) και κάποια άλλα ψυχανθή είναι σημαντικά κτηνοτροφικά φυτά. Τα ψυχανθή εκτός της χρήσης τους για τη διατροφή των ανθρώπων, αλλά και της κτηνοτροφικής τους χρήσης, χρησιμοποιούνται και για την προστασία του εδάφους, τη φυτοπροστασία και την υλοτομία. Ακόμα χρησιμοποιούνται ως καλλωπιστικά φυτά και ως θάμνοι, αλλά και για την εξαγωγή κόμμεων, ρητίνης, όπως και ως προσθετικά τροφίμων (Verdier et al. 2012).

1.17. Φυμάτια-ισχυρές μεταβολικές καταβόθρες

Το υψηλό κόστος σε οργανικό άνθρακα καθιστά το φυμάτιο μια ισχυρή μεταβολική καταβόθρα. Η λειτουργία των φυματίων είναι πρωταρχικά εξαρτώμενη από την είσοδο και το μεταβολισμό της σακχαρόζης, η οποία παρέχει την ενέργεια και τους σκελετούς άνθρακα που χρειάζονται για τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση (Flemetakis et al. 2003). Αυτή η θρεπτική ανταλλαγή καθορίζεται κυρίως από πληθώρα μεταφορέων που εντοπίζονται στη μεμβράνη του συμβιωσώματος, πολλοί από τους οποίους είναι εξειδικευμένοι στα φυμάτια (Benedito 2006, Benedito et al. 2008).

Με τον τρόπο αυτό λοιπόν, οι μεταφορείς σακχάρων παίζουν καθοριστικό ρόλο στο μεταβολισμό του φυματίου, λόγω της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης. Επιπλέον, οι συνθήκες υποξίας στα φυμάτια οδηγούν σε συνδυασμένες αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων, τις ιδιότητες των μεμβρανών και τις μεταβολικές δραστηριότητες τόσο στα φυτά όσο και στα ριζόβια (Fedorova et al. 2002, Ampe et al. 2003, Becker et al. 2004, Colebatch et al. 2004, El Yahyaoui et al. 2004, Küster et al. 2004, Kouchi et al. 2004, Uchiumi et al. 2004, Benedito et al. 2008).

1.18. Στάδια σχηματισμού των ριζικών φυματίων

Τα στάδια σχηματισμού των φυματίων (εικόνα 1.12) είναι τα παρακάτω:

τους μια ειδική πρωτεΐνη προσκόλλησης που λέγεται ρικασυκολλιτίνη, η οποία είναι μια ασβεστοδεσμευτική πρωτεΐνη που πιθανόν να σχηματίζει σύμπλοκα ασβεστίου με την επιφάνεια των ριζικών τριχιδίων. Το ασβέστιο αποτελεί πολύ σημαντικό στοιχείο στη σηματοδότηση των παραγόντων nod. Σύμφωνα με μελέτες οι παράγοντες nod προκαλούν αλλαγές στα επίπεδα του ασβεστίου στα ριζικά τριχίδια. Στην προσκόλληση του βακτηρίου στο φυτό συμμετέχουν και ορισμένες άλλες ουσίες, όπως οι γλυκοπρωτεΐνες λεκτίνες (Enrhardt et al. 1996).

1.19. Κατηγορίες φυματίων

Στα ψυχανθή φυτά υπάρχουν δύο κατηγορίες φυματίων τα καθορισμένα και τα μη-καθορισμένα. Τα καθορισμένα φυμάτια εντοπίζονται στα ψυχανθή των τροπικών κλιμάτων, όπως τα γένη *Glycine*, *Phaseolus*, *Lotus* και *Vigna*. Τα φυμάτια αυτά μετά τη διαφοροποίηση τους χάνουν πολύ σύντομα τη μεριστωματική τους ιδιότητα, σταματούν την ανάπτυξή τους και φτάνουν στο στάδιο γήρανσης. Η ανάπτυξη λοιπόν των φυματίων αυτών οφείλεται μόνο στη διόγκωση των κυττάρων και όχι στις επιπλέον κυτταροδιαίρεσεις, δίνοντας σφαιρικό σχήμα στα ώριμα φυμάτια.

Τα μη-καθορισμένα φυμάτια εντοπίζονται σε εύκρατα ψυχανθή, όπως τα γένη *Pisum*, *Medicago*, *Trifolium* και *Vicia*. Ο όρος μη-καθορισμένα οφείλεται στο ότι διατηρούν ενεργό το ακραίο τους μερίστωμα, όπου γίνονται συνεχώς κυτταροδιαίρεσεις, κατά τη διάρκεια όλης της ζωής τους, δίνοντας τους έτσι το κυλινδρικό ωοειδές σχήμα τους. Τα μη-καθορισμένα φυμάτια είναι επίσης όργανα υψηλής δραστηριότητας με ημικαθορισμένη ανάπτυξη, που διαφοροποιούνται σε ζώνες περιφερειακών και κεντρικών ιστών οι οποίες οριοθετούν διαφορετικά στάδια ανάπτυξης/συμβίωσης. Οι ζώνες αυτές είναι:

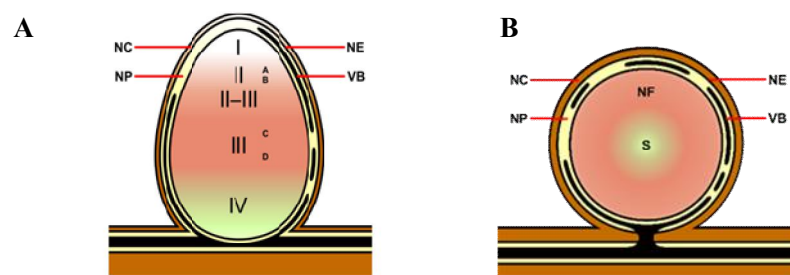
- **Ζώνη I:** ενεργό μερίστωμα. Πρόκειται για την περιοχή δραστηριοποίησης του φυματίου, όπου γίνονται συνεχείς κυτταροδιαίρεσεις προς σχηματισμό νέου ιστού στο φυμάτιο και στη συνέχεια ακολουθεί η διαφοροποίηση στις άλλες ζώνες.

- **Ζώνη II:** ζώνη μόλυνσης. Η ζώνη αυτή βρίσκεται στον κεντρικό ιστό του φυματίου και περιέχει διακυτταρικά μολυσματικά νημάτια. Τα φυτικά κύτταρα είναι μεγαλύτερα από αυτά της ζώνης I και η κυτταρική διαίρεση έχει σταματήσει.

- **Ενδιάμεση Ζώνη II-III.** Στην περιοχή αυτή τα βακτήρια έχουν εισέλθει στα φυτικά κύτταρα, επιμηκύνονται και ξεκινούν την καταληκτική τους διαφοροποίηση στα συμβιωτικά βακτηριοειδή, που έχουν τη δυνατότητα να καθιλώνουν το άζωτο.

- **Ζώνη III:** ζώνη καθήλωσης του αζώτου. Στη ζώνη αυτή κάθε κύτταρο περιέχει ένα κεντρικό κενोटόπιο και το κυτταρόπλασμα είναι γεμάτο με πλήρως διαφοροποιημένα βακτηριοειδή, τα οποία δεσμεύουν ενεργό άζωτο. Το φυτό παρέχει στα κύτταρα αυτά την ψυχανθο-αιμοσφαιρίνη, δίνοντας στα φυμάτια ένα εμφανές ροζ χρώμα. Περιέχει δύο είδη κυττάρων. Μεγάλα μολυσμένα κύτταρα (ICs) με την ικανότητα να αζωτοδεσμεύουν πλήρως διαφοροποιημένα βακτηριοειδή και μικρότερα μη μολυσμένα (UCs), τα οποία είναι διάσπαρτα στα ICs και η λειτουργία τους δεν είναι ακόμα γνωστή.

- **Ζώνη IV:** ζώνη γήρανσης. Τα φυτικά κύτταρα και τα βακτηριοειδή περιεχόμενά τους στη ζώνη αυτή, καταβολίζονται. Η αποσύνθεση της ψυχανθο-αιμοσφαιρίνης συνεπάγεται ένα εμφανές πρασίνισμα της βάσης του φυματίου (Van de Velde et al. 2006, Foucher and Kondorosi 2000, Monahan-Giovanelli et al. 2006).



Εικόνα 1.13: Σχηματική απεικόνιση των σταδίων διαφοροποίησης σε μη-καθορισμένο φυμάτιο (αριστερά) και σε καθορισμένο φυμάτιο (δεξιά). Οι ζώνες I-IV είναι οι ζώνες διαφοροποίησης του νέου ιστού που δημιουργείται. NC: ο φλοιός του φυματίου, NE: ενδοδερμίδα του φυματίου, NP: παρέγχυμα φυματίου, VB: αγγειακή δέσμη

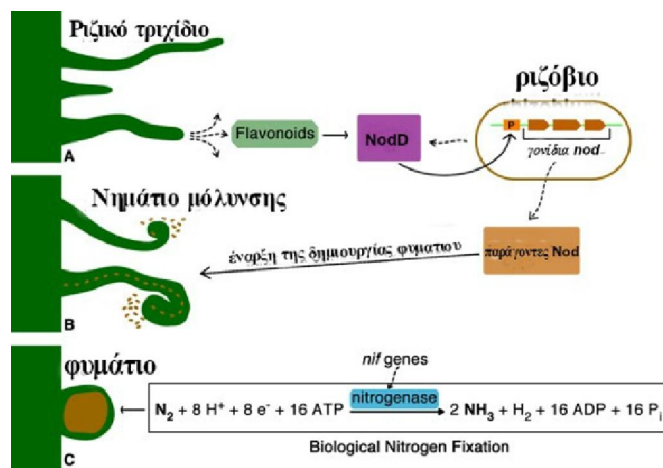
1.20. Συμβιωτική σχέση ριζοβίου-φυτού, παράγοντες Nod

Κατά τη σύναψη κάθε νέας πρωτογενούς συμβιωτικής σχέσης μεταξύ του ριζοβίου και του φυτού ξενιστή, τα βακτήρια εισέρχονται στο φλοιώδες παρέγχυμα της ρίζας, μέσω του νηματίου μόλυνσης και ύστερα από την ανάπτυξη της συμβιωτικής σχέσης ξεκινούν τη λειτουργία της αζωτοδέσμευσης (Sulieman and Tran 2014). Η διαδικασία αρχίζει με την πρόσληψη των κατάλληλων σημάτων του ξενιστή από τα ριζόβια και επιτελούνται από διάφορα φλαβονοειδή. Η σχέση μεταξύ φυτού και βακτηρίου, όσον αφορά την αλληλεπίδραση τους, είναι εξειδικευμένη. Ένας συγκεκριμένος τύπος βακτηρίου μολύνει έναν συγκεκριμένο τύπο φυτού. Ακόμα όμως και αν ένα εξειδικευμένο βακτηριακό στέλεχος μολύνει ένα φυτό ξενιστή αυτό δε σημαίνει ότι επάγεται ανάπτυξη συμβιωτικής σχέσης και δημιουργία λειτουργικών φυματίων στο ριζικό σύστημα του φυτού. Αυτό συμβαίνει γιατί ένα στέλεχος μπορεί

να μην είναι αποτελεσματικό ή λειτουργικό και τα φυμάτια που θα αναπτυχθούν δε θα παρουσιάσουν κανονική ανάπτυξη, θα είναι μικρά, μη λειτουργικά ανίκανα να δεσμεύσουν άζωτο και θα έχουν λευκοπράσινο χρωματισμό. Αν το στέλεχος είναι αποτελεσματικό και η μόλυνση του φυτού ξενιστή γίνει επιτυχημένα, τότε τα φυμάτια θα έχουν κανονική ανάπτυξη και θα είναι πλήρως λειτουργικά ως προς τη δέσμευση του ατμοσφαιρικού αζώτου, μεγάλα και με έντονο ροζ χρώμα. Η αποτελεσματικότητα της επιτυχούς μόλυνσης ενός φυτού ξενιστή καθορίζεται από τα *nod* γονίδια (nodulation, σχηματισμός φυματίων) του βακτηρίου, η μεταγραφή των οποίων επάγεται από τα φλαβονοειδή. Τα γονίδια αυτά διαιρούνται σε τέσσερις λειτουργικές κατηγορίες: i) τα γονίδια *nodD*, ii) τα γονίδια *nodA*, *nodB* και *nodC*, iii) τα γονίδια *hsn* (host-specific *nod* genes) και iv) άλλα *nod* γονίδια (Cooper 2007, Madigan and Martinko 2015)

Οι παράγοντες Nod, ή αλλιώς τα μόρια σηματοδότες των λιπο-χιτο-ολιγοσακχαριτών, είναι βακτηριακές ενώσεις οι οποίες λειτουργούν ως χημικά σήματα για την ενεργοποίηση της μεταγραφής μιας σειράς φυτικών γονιδίων των *ENOD* (early nodulation), των οποίων προϊόντα της έκφρασής τους αποτελούν οι πρώιμες φυματίνες (nodulins). Οι πρώιμες φυματίνες συμμετέχουν στην κάμψη των ριζικών τριχιδίων και στο σχηματισμό του νηματίου μόλυνσης, αλλά και της μεριστωματικής ζώνης των φυματίων. Οι φυματίνες που εκφράζονται αργότερα κατά τη φάση της οργανογένεσης και κατά τη λειτουργία των ώριμων πλέον φυματίων, συμμετέχουν στη βιοσύνθεση της ψυχανθο-αιμοσφαιρίνης που δεσμεύει το ελεύθερο οξυγόνο για προστασία της δράσης της νιτρογενάσης των βακτηριοειδών

Το γονίδιο *nodD* ανήκει στην οικογένεια *lysR* και ρυθμίζει τη μεταγραφή ενός συνόλου γονιδίων (οπερόνιο *nod*) που σχετίζεται με το σχηματισμό του φυματίου. Τα γονίδια *nodA*, *nodB* και *nodC*, κωδικοποιούν για ένζυμα που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση του βασικού σκελετού των παραγόντων Nod. Τα *nodH* και *nodL* γονίδια κωδικοποιούν ένζυμα τα οποία καταλύουν αντιδράσεις προσθήκης ομάδων που προσδίδουν στους παράγοντες Nod την απαιτούμενη εξειδίκευση για κάθε ξενιστή. Τα υπόλοιπα γονίδια *nod* κωδικοποιούν λειτουργίες που πιθανά σχετίζονται με την εξαγωγή σηματοδοτικών μορίων (Jones et al. 2007).



Εικόνα 1.14: Η ενεργοποίηση των παραγόντων Nod από τα φλαβονοειδή.

1.21. Προσκόλληση και μόλυνση – Βακτηριοειδή

Η αρχική είσοδος των βακτηρίων του γένους *Sinorhizobium* γίνεται από τα άκρο των ριζικών τριχιδίων (ακρορίζιο), όπου τα ριζικά τριχίδια ακόμα αυξάνονται, καθιστώντας το έτσι ευαίσθητο σε πιθανή μόλυνση από ριζόβια. Μετά την είσοδο τους στο φλοιώδες παρέγχυμα αρχίζουν να διακλαδώνονται σε ολόκληρο τον φλοιώδη ιστό (Stougaard 2000). Μετά την προσκόλληση, το ριζικό τριχίδιο λόγω της έκκρισης των χημικών σημάτων από το βακτήριο (παράγοντες Nod) κάμπτεται και αρχίζει η περιέλιξη των βακτηρίων σε αυτό. Τα ριζόβια εισέρχονται στα κύτταρα του φλοιού, όπου σχηματίζονται τα φυμάτια μέσω του νήματος μόλυνσης. Την ίδια στιγμή πραγματοποιείται διαίρεση των κυττάρων του φλοιού από ένα πρωτογενές φυμάτιο, εντός του οποίου ενεργοποιείται ένα νέο μερίστωμα και οδηγεί στην οργανογένεση φυματίου. Τα βακτήρια απελευθερώνονται από το νήμα μόλυνσης στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων του φλοιού μέσω ενδοκύττωσης, πολλαπλασιάζονται ταχύτατα και μετασχηματίζονται σε διογκωμένες, παραμορφωμένες και διακλαδισμένες δομές που ονομάζονται βακτηριοειδή. Η διαδικασία αυτή αφήνει τα βακτήρια περικυκλωμένα από μια κυτταροπλασματική προστατευτική μεμβράνη φυτικής προέλευσης, το κάθε ένα ξεχωριστά ή σε μικρές ομάδες. Στο εσωτερικό του τελικού οργανιδίου, που ονομάζεται συμβιώσωμα, τα βακτήρια πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε ώριμα φυμάτια που αζωτοδεσμεύουν. Τα κύτταρα του φλοιού τυπικά περιέχουν χιλιάδες συμβιωσώματα, όπου το καθένα περιέχει ένα ή μερικά βακτηριοειδή. Μόνο μετά το μετασχηματισμό του συμβιωσώματος μπορεί να ξεκινήσει η αζωτοδέσμευση.

Όταν το φυτό πεθάνει, τα φυμάτια αποδιατάσσονται και τα βακτήρια απελευθερώνονται στο έδαφος. Τα βακτηριοειδή δε μπορούν να αναπαραχθούν, αλλά κάθε φυμάτιο περιέχει ένα μικρό αριθμό ραβδόμορφων κυττάρων που βρίσκονται σε λήθαργο. Έτσι, όταν το φυτό πεθάνει, αυτά αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται

χρησιμοποιώντας ως θρεπτικές ουσίες προϊόντα αποικοδόμησης του φυματίου και του ίδιου φυτού. Τα νέα βακτήρια έτσι μπορούν να μολύνουν άλλες ρίζες ή να ζήσουν ελεύθερα στο έδαφος (Brock τόμος II 2007).

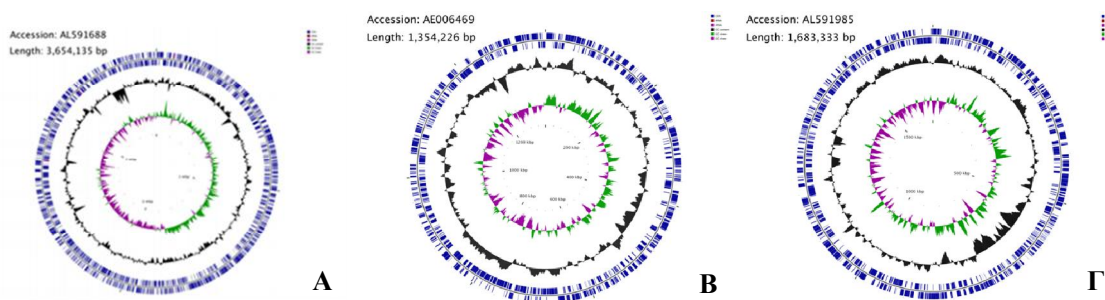
1.22. Σχηματισμός φυματίων

Τα γονίδια *nod* κατευθύνουν στάδια του σχηματισμού φυματίων στη συμβιωτική σχέση ψυχανθούς/ριζοβίου. Πολλά γονίδια *nod*, ακόμη και σε διαφορετικά είδη ριζοβίων εμφανίζουν εξελικτικά συντηρημένες περιοχές και βρίσκονται σε μεγάλα πλασμίδια, τα οποία ονομάζονται πλασμίδια συμβίωσης (pSym). Στα πλασμίδια Sym, εκτός από τα γονίδια *nod*, υπάρχουν και γονίδια εξειδίκευσης τα οποία έχουν ως βασική λειτουργία να συνταιριάζουν κάθε είδος ριζοβίου με συγκεκριμένο φυτό ξενιστή (Brock τόμος II 2007). Οι παράγοντες *nod* παίζουν σημαντικό ρόλο στην καθιέρωση της συμβιωτικής σχέσης μεταξύ του φυτού και του βακτηρίου. Η παραγωγή αυτού του μορίου σηματοδοτεί ενεργοποιείται από την απελευθέρωση φαινολικών ενώσεων από το φυτό, που ενεργοποιούν την παραγωγή των παραγόντων *nod* με την εισαγωγή ενός συνόλου γονιδίων *nod* στο κατάλληλο στέλεχος ριζοβίου. Ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο των φυματίων, εκκρίνονται διάφορες ουσίες της κατηγορίας των φλαβονοειδών όπως φαινολικά συστατικά φλαβόνες και ισοφλαβόνες (Peters et al. 1986, Redmond et al. 1986). Η φύση των φλαβονοειδών που λειτουργούν ως σινιάλα, καθώς και η δομή των παραγόντων *nod* είναι σημαντική για τη διατήρηση της εξειδίκευσης στην αλληλεπίδραση, και εξασφαλίζουν ότι το φυτό θα δεχθεί μόνο συμβατά στελέχη ριζοβίων. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν τις αντίστοιχες ρυθμιστικές πρωτεΐνες Nod. Η εξειδίκευση ως προς τον ξενιστή καθορίζεται από τη συγκεκριμένη δομή του παράγοντα *nod* που παράγει το εκάστοτε είδος ριζοβίου (Schultze and Kondorosi 1998).

1.23. Το βακτήριο *Sinorhizobium meliloti*

Το βακτήριο *Sinorhizobium meliloti* χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία συμβιωτικής σχέσης με το φυτό *M.truncatula*. Ανήκει στο γένος: *Sinorhizobium*, είδος: *Sinorhizobium meliloti*. Το *S. meliloti*, παλαιότερα γνωστό ως *Rhizobium meliloti* είναι ενδοσυμβιωτικό αζωτοδεσμευτικό βακτήριο του εδάφους και είναι ένα Gram⁻ βακτήριο του εδάφους και της ριζόσφαιρας. Είναι ιδιαίτερα σημαντικό βακτήριο στη γεωργία, λόγω της αζωτοδέσμευσης που επιτυγχάνεται με το σχηματισμό των φυματίων στο ριζικό σύστημα των φυτών

Medicago, *Melilotus* και *Trigonella*, συμπεριλαμβανομένου του φυτού-μοντέλου *M.truncatula*. Είναι ένα ταχέως αναπτυσσόμενο ριζόβιο με μικρό σχετικά γονιδίωμα, μεγέθους 6.7 εκατομμυρίων ζευγών βάσεων. Το γονιδίωμά του αποτελείται από τρία κυκλικά στοιχεία DNA, τα οποία είναι γνωστά ως ρεπλικόνια. Ένα χρωμόσωμα (3,65 Mb) και δύο μεγαπλασμίδια, pSymA (1.35Mb) και pSymB (1,68Mb) (Galibert et al. 2001). Κάθε ρεπλικόνιο συμβάλλει στη συμβίωση του βακτηρίου με το ψυχανθές-ξενιστή. Το χρωμόσωμα (εικόνα 1.15 Α) περιέχει τα γονίδια που ευθύνονται για τις μεταβολικές διαδικασίες του βακτηρίου. Μεταφέρει επίσης γονίδια που εμπλέκονται στις αλληλεπιδράσεις του φυτού, στην απόκριση σε συνθήκες καταπόνησης, στην κινητικότητα και στο χημειοτακτισμό. Το μικρότερο ρεπλικόνιο (pSymA) (εικόνα 1.15 Β) είναι υπεύθυνο για τις αζωτοδεσμευτικές ικανότητες του βακτηρίου. Το ρεπλικόνιο pSymB (εικόνα 1.15 Γ) μεταφέρει γονίδια που ευθύνονται για την πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων και την αποτελεσματική "εισβολή" στο φυτό-ξενιστή (diCenzo et al. 2013).



Εικόνα 1.15: Α) Το χρωμόσωμα του *S. meliloti*, Β) το μεγαπλασμίδιο pSymA του *S.meliloti*, Γ) το μεγαπλασμίδιο pSymB του *S.meliloti*

1.24. Ο ρόλος του φωτοσυνθετικού άνθρακα στην αζωτοδέσμευση

Η αζωτοδέσμευση απαιτεί μεγάλη ποσότητα άνθρακα από το φυτό στο φυμάτιο. Τα φωτοσυνθετικά προϊόντα μεταφέρονται στο φυμάτιο σε μορφή σακχαρόζης και εκεί αποθηκεύονται υπό μορφή αμύλου. Οποιαδήποτε περίσσεια αμύλου στους ιστούς σημαίνει ταυτόχρονα και περίσσεια υδατανθράκων (Minchin et al. 1981, Cralle and Heichel 1985, Gordon et al. 1985, Kouchi et al. 1985). Το άμυλο αποθηκεύεται κατά τη διάρκεια της ημέρας και κατά τη διάρκεια της νύχτας συνεχίζεται η δραστηριότητα της νιτρογενάσης, της οποίας η κύρια πηγή άνθρακα προέρχεται από δεξαμενές υδατανθράκων στο βλαστό (Gordon et al. 1985, Walsh et al. 1987). Τα αποθέματα αμύλου στα φυμάτια μεταβολίζονται μόνο σε περίπτωση που εξαντληθούν τα εξωτερικά αποθέματα, κυρίως εκείνα του βλαστού, ενώ αυτά της ρίζας δε φαίνεται να είναι διαθέσιμα (Kouchi et al. 1985, Walsh et al. 1987). Φαίνεται λοιπόν ότι τα

φωτοσυνθετικά προϊόντα που μεταφέρονται στο φυμάτιο είναι σε περίσσεια τόσο για τις αζωτοδεσμευτικές όσο και για τις αναπτυξιακές ανάγκες των άλλων οργάνων. Η δέσμευση του CO₂ στο σκοτάδι από την PEPC (phospho-enol-pyruvate carboxylase) αποτελεί μια ακόμα πηγή άνθρακα για τη λειτουργία του φυματίου, αποτελώντας το 12% των συνολικών απαιτήσεων σε άνθρακα, ενώ στη σόγια η μισή περίπου ποσότητα CO₂ ανακυκλώνεται με τη δράση της PEPC (Ta et al. 1987, Warembourg and Roumet 1989).

Τα φυμάτια των ψυχανθών έχουν την ικανότητα να αυξάνουν τη δραστηριότητα της νιτρογενάσης. Η παροχή των φωτοσυνθετικών προϊόντων φαίνεται πως είναι αρκετή τόσο για τη δράση όσο και για τη σύνθεσή της. Επίσης, παρά το ότι πηγές και καταβόθρες C και N ανταποκρίνονται στην αυξημένη παροχή φωτοσυνθετικών προϊόντων, η συσσώρευση N καθυστερεί τη συσσώρευση C, καθώς η φωτοσύνθεση αυξάνεται (Wilson et al. 1933). Παρόλο που η δράση της νιτρογενάσης φαίνεται να περιορίζεται μάλλον από το οξυγόνο, παρά από τον άνθρακα (Hunt and Layzell 1993, Vance and Heichel 1991), η αζωτοδέσμευση φαίνεται να είναι ισχυρά εξαρτώμενη με την παροχή άνθρακα (Voisin et al. 2003).

1.25. Έλλειψη άνθρακα

Η αζωτοδέσμευση εξαρτάται από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως είναι η αποφύλλωση, η έλλειψη νερού, το συνεχές σκοτάδι και η λίπανση με νιτρικά. Στις περισσότερες περιπτώσεις, σε συνθήκες καταπόνησης η αρχική μείωση της δραστηριότητας της νιτρογενάσης οφείλεται στη μειωμένη συγκέντρωση οξυγόνου που φτάνει στα μολυσμένα κύτταρα και βακτηριοειδή. Οι παρατεταμένες συνθήκες καταπόνησης οδηγούν στην πρόωρη γήρανση του φυματίου, η οποία σχετίζεται με αυξημένη παραγωγή οξειδωτικών ουσιών, μειώνοντας ταυτόχρονα την αντιοξειδωτική προστασία. Γενικότερα όμως η έρευνα έχει δείξει ότι οι αντιδράσεις των οργάνων των φυτών σε συνθήκες μειωμένης φωτοσύνθεσης ποικίλουν ανάμεσα στα διάφορα ψυχανθή. (Sarath et al. 1986, Layzell, et al. 1990, Gordon, et al. 1993, Iannetta et al. 1993, Popova and Riddle 1996, Gogorcena et al. 1997, Brouquisse et al. 1998, Sokolov et al. 1998, Matamoros et al. 1999, Lin and Wu 2004, Ishizaki et al. 2005, Miyashita and Good 2008, D'haeseleer et al. 2010, Graf, et al. 2010, Pérez Guerra et al. 2010, Vauclare et al. 2010; Fotelli et al. 2011, Fukao et al. 2012, Tsikou et al. 2013).

1.26. Το ψυχανθές μοντέλο *Medicago truncatula*

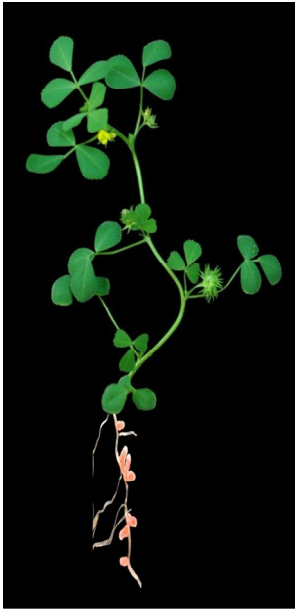
Τα τελευταία χρόνια έχει συντελεστεί σημαντική ερευνητική πρόοδος όσον αφορά στη μελέτη των μοριακών μηχανισμών που αφορούν τόσο στα επιμέρους στάδια

αναγνώρισης των δύο συμβιωτών, όσο και στο σχηματισμό και τη λειτουργία του φυματίου (Jones et al. 2007).

Το *M. truncatula* είναι ένα ψυχανθές, άμεσα συσχετιζόμενο με το *M. sativa*. Η καταγωγή του είναι από τη Μεσογειακή λεκάνη και καλλιεργείται σε ετήσια βάση, κυρίως στην Αυστραλία. Στην περίπτωση των ψυχανθών που σχηματίζουν μη-καθορισμένα φυμάτια (μηδική, μπιζέλι), χρησιμοποιείται ευρύτατα ως φυτικό μοντέλο, το διπλοειδές ψυχανθές *M. truncatula*, λόγω αρκετών πλεονεκτημάτων που εμφανίζει, όπως το μικρό του μέγεθος και ο σχετικά μικρός κύκλος ζωής, η αυτογονιμότητα, το μικρό μέγεθος του γονιδιώματος και η σχετικά εύκολη δημιουργία διαγονιδιακών φυτών. Σημαντικό πλεονέκτημα για τη χρήση του συγκεκριμένου φυτού αποτελεί η αλληλούχηση του συνόλου σχεδόν του γονιδιώματός του, το οποίο είναι ελεύθερα διαθέσιμο μέσω των διεθνών βάσεων μοριακών δεδομένων (<http://mtgea.noble.org/v2>, <http://www.medicago.org/genome>, NCBI). Επιπλέον, χιλιάδες αλληλουχίες έκφρασης από συμβιωτικά και μη-συμβιωτικά όργανα του φυτού (<http://mtgea.noble.org/v2>), καθώς και τα ενεργά μεταβολικά μονοπάτια (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) είναι διαθέσιμα στις διεθνείς βάσεις.

Πίνακας 1.1: Φυλογενετική ταξινόμηση του φυτού *Medicago truncatula*

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



Εικόνα 1.16: Το φυτό μοντέλο *M.truncatula*.

1.27. Μεταθετά στοιχεία

Η πλειοψηφία των ψυχανθών διαθέτει μεγάλο και περίπλοκο γονιδίωμα και παρουσιάζει δυσκολία στη γενετική και μοριακή μελέτη. Παρ' όλα αυτά, ο όγκος των μεγαλύτερων γονιδιωμάτων έχει συντεθεί από μεταθετά στοιχεία και μη-κωδικοποιημένα DNA, προτείνοντας μια συσχέτιση των πλούσια γονιδιακά περιοχών ανάμεσα στα μικρότερα και τα μεγαλύτερα γονιδιώματα των ψυχανθών (Taddege et al. 2005). Τα μεταθετά στοιχεία (retrotransposons) αντιστοιχούν σε τμήματα του γονιδιώματος που έχουν την ικανότητα να μεταπηδούν από μία χρωμοσωμική θέση σε άλλη. Περιβάλλονται από μια ανεστραμμένη και επαναλαμβανόμενη αλληλουχία βάσεων (inverted terminal repeats) στα άκρα τους, η οποία αναγνωρίζεται από το ένζυμο της τρανσποζάσης. Σε περίπτωση που τα μεταθετά στοιχεία περιέχουν το γονίδιο που κωδικοποιεί για το ένζυμο αυτό, χαρακτηρίζονται ως ενεργά, ενώ αν δεν το παράγουν τα ίδια ονομάζονται ανενεργά.

Απομόνωση μεταθετών στοιχείων έχει γίνει από αρκετούς οργανισμούς και έχουν χρησιμοποιηθεί ως φορείς γονιδίων. Τα πρώτα και πιο γνωστά μεταθετά στοιχεία που απομονώθηκαν είναι τα στοιχεία P της *Drosophila melanogaster*, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν με επιτυχία για τη μεταφορά γονιδίων σε συγγενή είδη δροσόφιλας (Kaminker et al. 2002). Έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί και για τη μελέτη του γονιδιώματος των οργανισμών στους οποίους μπορούν να ενσωματωθούν. Αυτό γιατί, όταν ένα μεταθετό στοιχείο ενσωματώνεται σε μια θέση στο γονιδίωμα μπορεί να διαταράξει τη λειτουργία κάποιου γονιδίου στη θέση αυτή και να οδηγήσει στην εμφάνιση νέου φαινοτύπου. Επίσης υπάρχει η δυνατότητα επαναφοράς του αγρίου

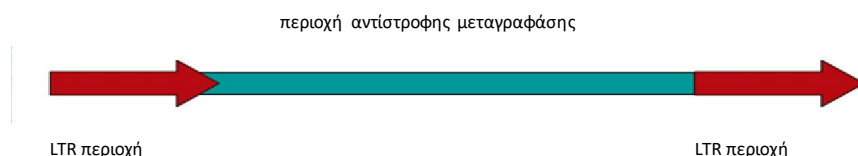
τύπου φαινοτύπου ενός οργανισμού, ύστερα από εντοπισμό της ένθεσης του μεταθετού στοιχείου και απαλείφοντάς το με συνεχείς διασταυρώσεις, επιτυγχάνοντας έτσι την καλύτερη εκτίμηση της δράσης και της έκφρασης του γονιδίου. Τα μεταθετά στοιχεία επίσης αποτελούν μία εναλλακτική λύση για την παραγωγή μεγάλου αριθμού μεταλλαγμάτων από ένθεση, γιατί ο αριθμός των διαγονιδιακών σειρών που πρέπει να παραχθούν δεν είναι περιοριστικός παράγοντας. Τέλος ο μεγάλης κλίμακας μετασχηματισμός με διήθηση κενού (vacuum infiltration), η T-DNA μεταλλαξιγένεση και η κορεσμένη μεταλλαξιγένεση (saturation mutagenesis) δεν αποτελούν κατάλληλες τεχνικές για τη δημιουργία μεγάλου αριθμού μεταλλαγμένων οργανισμών (D' Erfurth et al., 2003).

1.27.1. Κατηγορίες μεταθετών στοιχείων

Δύο κύριες κατηγορίες απαρτίζουν το σύνολο των μεταθετών στοιχείων. Η πρώτη (class I), είναι τα retrotransposons που μεταφέρονται μέσω ενός RNA ενδιάμεσου (RNA intermediate), το οποίο αντιγράφεται ανάστροφα σε ένα γραμμικό διπλής έλικας DNA πριν από την ενσωμάτωσή του στο γονιδίωμα του ξενιστή (μηχανισμός αντιγραφής-επικόλλησης). Η δεύτερη (class II), είναι τα μεταθετά DNA (DNA transposons) που μεταφέρονται μέσω ενός ενδιάμεσου DNA (μηχανισμός αποκοπής-επικόλλησης) (D' Erfurth et al. 2003).

Η πρώτη κατηγορία των μεταθετών στοιχείων χωρίζεται σε δύο υποκατηγορίες: τα LTR μεταθετά στοιχεία που φέρουν μεγάλες τελικές επαναλήψεις (δύο ευθείες επαναλήψεις και στα δύο άκρα) και τα non-LTR transposons που δε φέρουν αυτές τις επαναλήψεις. Τα LTR retrotransposons σχετίζονται με τους ρετροϊούς αφού έχουν την ίδια δομή DNA και οι κύκλοι ζωής τους είναι παραπλήσιοι. Τα αυτόνομα LTR retrotransposons κωδικοποιούν λειτουργίες απαραίτητες για την αντιγραφή και τη μεταφορά τους, όπως είναι η πρωτεΐνη του καψιδίου (gag protein), μια πρωτεάση (PR), μια ιντεγκράση (IN) και μια αντίστροφη μεταγραφάση-RNaseH (RT). Ως μέλη αυτής της κατηγορίας των μεταθετών στοιχείων, μεταφέρονται διαμέσου ενός μηχανισμού αποκοπής και επικόλλησης, και είναι ικανά να εισβάλουν σε διάφορα γονιδιώματα ξενιστή (π.χ. καλαμπόκι). Η μεταφορά μερικών εκ αυτών των στοιχείων ενεργοποιείται από βιοτικά ή αβιοτικά ερεθίσματα και από την ιστοκαλλιέργεια. Διαφορετικά λοιπόν μεταθετά στοιχεία έχουν χρησιμοποιηθεί για μεγάλης κλίμακας μεταλλαξιγένεση ένθεσης σε διάφορα φυτά μοντέλα, λόγω της ικανότητάς τους να μεταφέρονται κατά τη διάρκεια

ιστοκαλλιέργειας. Έρευνες έδειξαν ότι τα retrotransposons μεταφέρονται αποτελεσματικά μέσα στα γονίδια των ετερόλογων ξενιστών και ότι ακολουθίες που στοχεύουν σε συγκεκριμένη περιοχή παρουσιάζουν μέτρια ή καθόλου ομολογία. Επίσης, δε μεταφέρονται σε περιοχές που γειτνιάζουν με την αρχική τοποθεσία ένθεσης, αλλά είναι περισσότερο διασκορπισμένα στο γονιδίωμα, ως αποτέλεσμα του τρόπου της μετάθεσης που απαιτεί κυττοπλασμική φάση.



Εικόνα 1.17: Η γενική δομή του *Tnt1* μεταθετού στοιχείου του καπνού είναι η παραπάνω. Η LTR περιοχή αντιπροσωπεύεται από τα κόκκινα βέλη και η περιοχή της αντίστροφης μεταγραφάσης αντιπροσωπεύεται από το μπλε χρώμα. Είναι αξιοσημείωτο ότι τα δύο LTR είναι πανομοιότυπα στην ακολουθία.

Η ένθεση του μεταθετού στοιχείου *Tnt1* στη σειρά αγρίου τύπου του *M. truncatula* R108, ξεκίνησε με τη χρήση ενός πολύ αποτελεσματικού πρωτοκόλλου μετασχηματισμού-αναγέννησης για το *M. truncatula*, χρησιμοποιώντας το LTR retrotransposon *Tnt1* του καπνού (Trinh et al. 1998). Το *Tnt1* απομονώθηκε πρώτη φορά μετά από την μεταφορά του μέσα στο *NiaD* γονίδιο του καπνού (Grandbastien et al. 1998). Πρόκειται για ένα αυτόνομο 5,3 kb μεγάλου μήκους αντιγραφής LTR στοιχείο που δημιουργεί μια 5 bp επανάληψη πάνω στην ένθεση. Η *Tnt1* μεταφέρθηκε επαγωγικά σε καλλιέργειες πρωτοπλαστών καπνού κατά τη διάρκεια του *in vitro* μετασχηματισμού του *A. thaliana*. Η ενσωμάτωσή του φαίνεται να είναι τυχαία, αλλά σταθερή. Οι ενθέσεις στις περισσότερες περιπτώσεις είναι ασύνδετες ως αποτέλεσμα του κύκλου πολλαπλασιασμού των LTR retrotransposons. Υπάρχουν περισσότερες από 10.000 σειρές *Tnt1*-ενθέσεων μεταλλαγμένων πληθυσμών *Medicago*, καθεμία από τις οποίες περιέχει 20 περίπου *Tnt1* ενθέσεις τυχαία διασκορπισμένες στο γονιδίωμα (Taddege et al. 2008). Ο πληθυσμός λοιπόν περιλαμβάνει περίπου 200.000 *Tnt1* ενθέσεις στο γονιδίωμα, καθιστώντας έτσι την έρευνα στη μηδική εύκολη για την εύρεση σειρών για τα περισσότερα γονίδια ενδιαφέροντος (Flanking Sequence Tags databases, FST database: (<http://bioinfo4.noble.org/mutant/>)). Το *Tnt1* αντιγράφεται σε διαφορετικά επίπεδα σε διαφορετικά όργανα του *M. truncatula*. Το επίπεδο αντιγραφής είναι υψηλότερο στις ρίζες από τα ώριμα φύλλα και χαμηλότερο στα νεαρά φύλλα και τα άνθη. Τα

δεδομένα αυτά συσχετίζονται με την έκφραση του *Tnt1* που παρατηρήθηκε στον αυθεντικό του ξενιστή (καπνός) ή σε ετερόλογους ξενιστές, όπως το *Arapidopsis* και η τομάτα. Τα παραπάνω δημιουργούν υψηλούς στόχους για την εφαρμογή της μεθόδου μεταλλαξιγένεσης με ένθεση του *Tnt1* και σε άλλους οργανισμούς (D'Erfurth et al. 2003).

1.27.2. Πλεονεκτήματα της ένθεσης του *Tnt1* στο *M. truncatula*.

Το *Tnt1* πρόκειται για μια τυχαία και σταθερή ένθεση στο γονιδίωμα του φυτού. Παρέχει σειρές που μπορούν να πολλαπλασιαστούν και να δημιουργήσουν μεγάλους πληθυσμούς. Υπάρχει η δυνατότητα ένθεσης του *Tnt1* σε γονίδια. Μεταφέρεται νωρίς κατά τη διάρκεια του *in vitro* μετασχηματισμού του *M.truncatula* και μπορεί να επανεργοποιηθεί. Οι *Tnt1* ενθέσεις επιπροσθέτως είναι γενετικά ανεξάρτητες και ακολουθούν τον μενδελιανό διαχωρισμό. Τέλος, δε μεταφέρεται πια μετά την αναγέννηση του φυτού, αλλά μπορεί να εκφράζεται στη σειρά του *M.truncatula* Jemalong J5 (D' Erfurth et al., 2003).

1.28. Σκοπός της διδακτορικής διατριβής

Τα τελευταία χρόνια, πραγματοποιείται σημαντική ερευνητική προσπάθεια για τη μελέτη των μεταφορέων σακχάρων, κυρίως μέσω της κλωνοποίησης των αντίστοιχων γονιδίων, του προσδιορισμού της χωροχρονικής έκφρασης τους στους φυτικούς ιστούς και του καθορισμού της λειτουργίας τους με χρήση ετερόλογων συστημάτων (Fillion et al. 1999, Weschke et al. 2000, Williams et al. 2000, Gao et al. 2003, Juchaux-Cachau et al. 2007, Klepek et al. 2005, Reinders et al. 2005, Schneider et al. 2006, Afoufa-Bastien et al. 2010, Rottmann et al. 2016, Rottmann et al. 2018). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η έκφραση των μεταφορέων σακχάρων υπόκειται σε πολλά στάδια ελέγχου και μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του φυτού, καθώς και κάτω από συνθήκες βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων (Gahrtz et al. 1996, Lemoine et al. 1999, Baud et al. 2005, Wright et al. 2003, Meyer et al. 2004, Noiraud et al. 2000, Ramsperger-Gleichner et al. 2004, Stadler et al. 2003, Truernit et al. 1996).

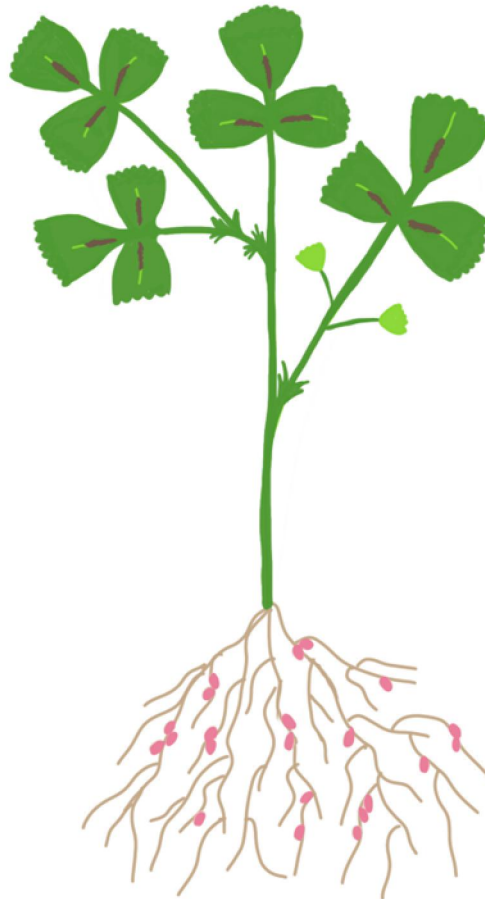
Συνεπώς, γίνεται αντιληπτό ότι για να είμαστε σε θέση να χειριστούμε τις πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις που διέπουν τη ρύθμιση της μεταφοράς σακχάρων από τους φωτοσυνθετικά ενεργούς ιστούς στους ιστούς καταβόθρες, προς όφελος της αγροτικής παραγωγής, είναι ζωτικής σημασίας η κατανόηση των διαδικασιών που επιτρέπουν τη διαμεμβρανική μεταφορά των σακχάρων. Αυτό προϋποθέτει τον

προσδιορισμό των μεταφορέων σακχάρων που εμπλέκονται, τον καθορισμό της χωροχρονικής έκφρασής τους και της σχέσης της δομής-λειτουργίας.

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε το συμβιωτικό σύστημα *Medicago truncatula*– *Sinorhizobium meliloti* για τον εντοπισμό των MST-γονιδίων, πραγματοποιήθηκαν φυλογενετικές αναλύσεις, εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης σε διάφορα φωτοσυνθετικά και μη όργανα του φυτού σε συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου, αλλά και σε συνθήκες έλλειψης άνθρακα, ενώ επίσης πραγματοποιήθηκαν και μεταβολομικές μελέτες, ώστε να εντοπιστούν και να συσχετιστούν τυχόν αλλαγές στις συγκεντρώσεις μεταβολιτών υπό συνθήκες σκότους. Επίσης μελετήθηκε ο υποκυτταρικός και βιοχημικός προσδιορισμός δύο γονιδίων που επάγονται στα φυμάτια των *MtSTP13* και *MtPMT3_1*, καθώς και ο προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασής τους και ο εντοπισμός των mRNAs τους σε διάφορα στάδια των φυματίων και άλλων οργάνων. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση του φυσιολογικού τους ρόλου με χρήση φυτών που φέρουν μεταλλάξεις στα συγκεκριμένα γονίδια.

Υλικά και Μέθοδοι

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2



2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1. *In silico* ανάλυση των γονιδίων που κωδικοποιούν για πιθανούς μεταφορείς μονοσακχαριτών του φυτού *M.truncatula*.

Η αναζήτηση και ο εντοπισμός των γονιδίων που κωδικοποιούν για πιθανούς μεταφορείς μονοσακχαριτών έγινε με χρήση της βάσης δεδομένων του Ιδρύματος του Noble (<http://mtgea.noble.org>) και του Ινστιτούτου του J. Craig Venter (JCVI, <http://jcv.org/medicago>). Με βάση τα Probesets ID των γονιδίων εντοπίστηκαν το προφίλ, οι τιμές έκφρασής τους, το πιθανό τους όνομα και η λειτουργία τους. Εντοπίστηκαν ακόμα οι δομές των γονιδίων (εσώνια και εξώνια), οι νουκλεοτιδικές τους αλληλουχίες, οι κωδικές τους περιοχές (cds) και οι πρωτεϊνικές τους αλληλουχίες. Οι αλληλουχίες αυτές χρησιμοποιήθηκαν για να βρεθούν ομοιότητες με άλλα είδη και το ποσοστό ομοιότητας με τη βοήθεια του αλγορίθμου blast. Ο αλγόριθμος BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) δημιουργήθηκε από τους Altschul et al. το 1990 και βασίζεται στην εύρεση κοινών υπο-ακολουθιών ίδιου μήκους (segment pairs) που εμφανίζονται τόσο στη δοσμένη ακολουθία μικρού μήκους (input query sequence) όσο και στο σύνολο των ακολουθιών μιας βάσης δεδομένων με βάση μια συγκεκριμένη συνάρτηση ομοιότητας (scoring threshold). Ο αλγόριθμος αρχικά αναζητά λέξεις συγκεκριμένου μήκους "w" που εμφανίζονται στη ζητούμενη ακολουθία, χρησιμοποιώντας ένα δεδομένο πίνακα υποκαταστάσεων (substitution matrix). Οι επιτυχείς λέξεις που έχουν score T ή μεγαλύτερο επεκτείνονται και προς τις δύο κατευθύνσεις σε μια απόπειρα να παραχθούν στοιχίσεις που να υπερβαίνουν το προκαθορισμένο κατώφλι (threshold) "S". Οι περιοχές που ικανοποιούν αυτή τη συνθήκη ονομάζονται HSP (High-scoring Segment Pair). Η παράμετρος "T" καθορίζει την ταχύτητα και την ευαισθησία της αναζήτησης. Μια παραλλαγή του βασικού αλγορίθμου δημιουργήθηκε από τους Altschul et al. το 1997 και επιτρέπει την εισαγωγή κενών (gaps) στις δημιουργούμενες στοιχίσεις. Μια πλήρης λίστα των παραλλαγών του αλγορίθμου φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 2.1: Λίστα των παραλλαγών του αλγορίθμου.

Αλγόριθμος	Είδος Αιτήματος	Είδος Αλληλουχίας
BLASTP	Πρωτεΐνη	Πρωτεΐνη
BLASTN	Νουκλεοτίδιο	Νουκλεοτίδιο
BLASTX	Νουκλεοτίδιο	Πρωτεΐνη
TBLASTN	Πρωτεΐνη	Νουκλεοτίδιο

TBLASTX	Νουκλεοτίδιο	Νουκλεοτίδιο
---------	--------------	--------------

2.2. Κατασκευή φυλογενετικού δέντρου MST-γονιδίων

Κατόπιν εντοπίστηκαν οι ομόλογες αλληλουχίες (αμινοξικές) μεταξύ των MSTs γονιδίων του φυτού *M. truncatula* και του φυτού *Arabidopsis thaliana* με ClustalW multiple alignment. Η πρωτεϊνική τους στοίχιση προσαρμόστηκε με χρήση του προγράμματος Bioedit και του αλγόριθμου BLASTP και τέλος κατασκευάστηκε το φυλογενετικό τους δέντρο χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA-X). Το δενδρόγραμμα κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ML (maximum likelihood) με το μοντέλο JTT (Jones, Taylor and Thornton) και τη μέθοδο αυτοδυναμίας (bootstrapping), για να υπολογιστεί η "στατιστική βαρύτητα" των εσωτερικών κλάδων των συστάδων του δενδρογράμματος. Η ακριβής στατιστική ερμηνεία της μεθόδου αυτοδυναμίας αποτελεί ακόμη αντικείμενο μελέτης, αλλά ο γενικός κανόνας είναι πως εσωτερικοί κλάδοι οι οποίοι έχουν τιμή αυτοδυναμίας μεγαλύτερη του 70 % είναι πολύ πιθανό να είναι σωστοί για επίπεδο σημαντικότητας 5 %. (Hillis and Bull 1993). Στο συγκεκριμένο δενδρόγραμμα για την ανάλυση bootstrap έγινε χρήση 1000 αντιγράφων.

2.3. Πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής και των διαμεμβρανικών περιοχών των MSTs γονιδίων

Η πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής και των διαμεμβρανικών περιοχών των γονιδίων που κωδικοποιούν πιθανούς μεταφορείς μονοσακχαριτών έγινε χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων TMHMM v. 2.0 (Center of Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark) και των προγραμμάτων TMpred (ExPASy, Swiss Institute of Bioinformatics).

2.4. Εξαγωγή συντηρημένων μοτίβων

Για την εξαγωγή συντηρημένων μοτίβων, έγινε στοίχιση των αμινοξικών αλληλουχιών των MSTs γονιδίων των φυτών *M. truncatula* και *Arabidopsis* με ClustalW multiple alignment με σκοπό τον εντοπισμό κοινών ή παρόμοιων μοτίβων στα δύο αυτά φυτά, καθώς και αξιοποίηση της διαθέσιμης βιβλιογραφίας σχετικά με την ύπαρξη συντηρημένων μοτίβων μεταφορέων σακχάρων (Pao et al. 1998, Shimokawa et al. 2002, Wang et al. 2016, Wolfenstetter et al. 2012, Yamada et al. 2017).

2.5. Αναζήτηση κατάλληλων εκκινητών για RT-qPCR

Χρησιμοποιώντας τις αλληλουχίες των εξονίων για κάθε γονίδιο βρέθηκαν οι κατάλληλοι εκκινητές για RT-qPCR με χρήση του προγράμματος Primer Express 2.0 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) και επιλογή των ειδικών εκκινητών για τα γονίδια με χρήση του αλγορίθμου Blast (NCBI), ώστε να ελεγχθεί η ειδικότητά τους. Έπειτα, με χρήση του εργαλείου OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA, USA) ελέγχθηκαν: το % GC περιεχόμενο, η θερμοκρασία τήξης του κάθε εκκινητή, καθώς και το αν τυχόν δημιουργούν διμερή ανά ζεύγος (<http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>). Οι εκκινητές που επιλέχθηκαν τελικά φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 2.2: Τα ζευγάρια εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις διάφορες RT-qPCR αντιδράσεις. Το R108 στην παρένθεση σε τρία γονίδια είναι τα διαφορετικά ζευγάρια εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τις RT-qPCR με τα φυτά αγρίου τύπου R108 σε σχέση με αυτά που χρησιμοποιήθηκαν και για τις RT-qPCR με τα φυτά αγρίου τύπου A17.

Όνομα γονιδίου	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')
MiSTP1_1	GATGTGCTGGAGTCCCGC	CAATGAACCTGGCGAATCGG
MiSTP1_2	TGCATTGCTGTGTGATAGGC	CCAAGACCATGCGAATCCC
MiSTP1_3	ATCGTTTGGAGGCGTCTCA	AACCATTCAAGGACGACCA
MiSTP1_4	GCCGTCCTGCAATATGATT	CGCTCGATCAAGAACTTGGC
MiSTP1_5	CCCAGAACATTGCGATGCT	CGACTGATTGGCACATCAA
MiSTP1_6	GCCATGAACATTGCGATGCT	GCCTGATTGGCACACCCA
MiSTP1_7	TGGAGTTGAGTTGGGTGG	TCCGGAAGGACTATTGATCAAT
MiSt1	ACCCCGAAACCTCACTCT	GCCAAAGATCAAAACCCCAT
MiSTP3_1	CCAAGCAATGGAAGAGGATACAAT	GTGGCAGCCACCATACAGAG
MiSTP3_2	GTCCAGCCATCTATCGTTG	AAAAGCTGCACCTCAAGGG
MiSTP5_1	GGAGGTGTACAACGATGGTGC	GCACTGGCTTCCTTCCAG
MiSTP5_2	CGAGCACATGGAGACTCT	CGAGGCGCAATTGTCTATTA
MiSTP5_3	ACAACGATGTTGGTGGGAGA	TTAATTGCACCAACAGCAAGG
MiSTP5_4	ATCGGGTGGTGGAGAGTCT	GCCACCGCAATTGACTGAT
MiSTP7_1	GCCTTGGCGATTACCTCT	GGGATGCGACTAAACCAGCA
MiSTP7_2	GTGCTGTTCAAAGCATGGGA	AGAAGCCAGGTTAAAGCC
MiSTP7_3	GCATGCCAGCGTTCAGAT	GCTTTGAAATAGCACGGGAGC
MiSTP7_4	TTGGAAATCAGGCTATCCCG	CATGTTCAAGGCTCTCGAA
MiSTP7_5	GGTATGGTTTCACTTCCGGTA	CACCTTCAACGCAATTATCAC
MiSTP7_6	GTGCAACACGTTGGGAT	CCCCAGGGTTGAATCTGTTT
MiSTP10_1	TCCTTCAACCACTTACCGGCA	GGACGGGAGCTAAAACATGA
MiSTP10_2	TCCTTCAACCACTTACCGGCA	GGACGGGAGCTAAAACATGA
MiSTP10_3	TTGCAAAAGATTGCGCAAT	GCTTCTCTGCTAGCATGAT
MiSTP13	CTTGGTAGTGACACCCCAA	TTGTCAGTGCACCCGTTCA
MiSTP13_1	TTTAGCAGGACCCCTTAGCCT	GATTGGCGAAACCAACCA
MiSTP13_2	CATCTTTCACCTTGGCCCT	TTTGGCTCTAGCTTCTGTTT
MiSTP13_3	GCGGAGGTGAATTTGAGG	ACCACCGGTAGCAGCCATAA
MiSTP14_1	GCTGAAATGTTCTGTGATGGT	AAATGTTTCCATGCCCAA
MiSTP14_2	AGGTTTAGCAACAGTTCAGCAATA	GACTGTTTGGTGTTCGGACAAAA
MiSTP14_3	AATGGCTCAGCTAGCAGCC	TCAAGTTCCAGCAGATGTTGT
MiINT1_1	CATGAACGCTGTGGAAACAA	AAAGGGCTAATTTTTCCGCC
MiINT1_2	CCGCGCTGATCCTTACAT	GACAGGGCAATGCCAGAC
MiINT1_3	ATGGATGCTGGAGTTCGG	GCGATTCAAGGAGGAAAGAGC
MiINT1_4	CGGTGCCATGGACTGTGAAC	AGCTGACATGCCCCACATA
MiINT2_1	TTCACTGGCCGGTTTTG	TGCATTGAGGCCCAAGTGTAT
MiINT2_2	AGGTGTGCGAGCTAGCCGG	ACCAACGAGGCGATTCTGG
MiINT2_3	ATCATGGCTGCTGCAACAG	AAAAACAGGCCACGATG
MiINT4_1	TCGAAATCTATGACCCGGGA	TTCTCGGCTCAATGGATTAT
MiINT4_2	CCTTCACTCCACAGCACTTG	GCTCAATATAGTCCCAAGGCA
MiTM2_1	GTGGGTGATGGTCAAGCAAA	GAGAGGCTGCTGAGATCCA
MiTM2_2	CATGGCAATCCGAGTGGTC	CCGGGAGCTTCTCATGAAC
MiTM2_3	CCCAACAGTGTCTGGGAC	TGACGGCCAAAGTCAAAAC
MiTM2_4	GAGTGTGCCAAACCGCTG (R108)	ATGCACGCTTGACTCCAGT (R108)
MiTM2_5	TGATGATGCAATGGGTGGG	CAGCCGCAAGGATCATGACT
MiTM2_6	AACTGATCCAAAGCTTGAAGGA	CCAGTGAGAAATGACATGGACACA
MiPMT3_1	GTGCTGTGTGTAGCTGCCAC	TGCTCCAGCCATCACTGTTG
MiPMT4_1	TTTTTTCGGTGGACTCGGC	AGCACGCACTGTAAAGGGA
MiPMT4_2	TTTTTTCGGTGGACTCGGC	AGCACGCACTGTAAAGGGA
MiPMT4_3	TTGGGTAGTTTAACTGGCGGA	AGTGTCTGTAACCAATGTTCT
MiPMT5_1	CGCCGTTACACCATGCTCC	TTGGGAGAGATCCCATGAGG
MiPMT5_2	CCGGCCGAACCTCTGACT (R108)	GCTTGCAGAAAGATGGAGC (R108)
MiPMT5_3	TGATGCTGGAGTAGGTGCA	GGTACTCTGGCATGGCTAA
MiPMT5_4	CTGTCCAAACGCTACCCAT	AAAGTCCAGCCGCAATTGC
MiPMT6_1	GGCTTGCACCTGTACTTGGC	ACTAACCCCTTGTGCCCTTAACTT
MiPMT6_2	CACAAGAAAGCCAACTCGTTT (R108)	TTCTGCTTGAATTTCTGCTC (R108)
MiPMT6_3	CCTTAGCTTACCGTGGTGG	TTGCGCATGATCAAGGATCA
MiPMT6_4	TGGCAGTGCCTTATTGGGC	CCACATGGGCTTTTCACTGTA
MiESL5_1	ACCTCCGACACTATCGGACGA	TGTGGCTGCTGTAAGACGA
MiESL5_2	ATCTGGCACTCGTGGTGT	ACCCAGGGTATTCTCCCATG
MiESL5_3	TTCTTGGATTGCTGCCAT	CCCTTGTCTCAGGAACCAATT
MiESL6_1	ATTGAGCCCTTATTGGTGGC	GCAATAGCTCCATTTCCAAAG
MiESL6_2	TAGATGGTTGGCCGAAATGG	CCTTGGTCTGCTAAAGATTGTA
MiESL6_3	GTGGCAAAAGTGGCGGGA	CGAGAAAGGCTGGCTGATT
MiESL6_4	ATGTTGAGCCATGGTGGG	CAATGACCCCTTGGCTCCG
MiESL7	TGGGAGCAATCCATGGGT	TATGCTTCTGCTGCTCCCT
MiESL7_1	CGCCAAAGAACGACGAGG	TGACCCAGATGCCCACTAAC
MiESL16_1	TGCTTTAACCAGGAGTTGCTT	GCTAATGTTGGCCCACTCAA
MiESL16_2	TGGAATGGGACCGGTTCC	TCCAGCAGTTCCTTACATG
MtpGlcT1	CTGGCCCTGAACTGGCATC	GTGCTCTGGTGGCTGAAGCT
MtpGlcT2	ATTTGCTCTGGAGCTGGC	TGGCTCTGATTCGACTGGGA
MtpGlcT3	TTTGTCTTGGTGGCTGGTC	TTGGCTCTGATTCGACAGG
MtpGlcT4	TGCTTGGCTTGGAGCTTTT	TGGCAAGGTAAGGAGGACCC
MtpGlcT4_1	ACCATACTCCGCACTCTTG	ACCAGCAACAGGAGAGGAGG
MtVGT2_1	CAACGCCAATACGTGGACAA	ATACCCGGCAACAATTCCG
Medtr5g014320 (Housekeeping)	ACACGCCATCAGAGGAGG	AAGGCTCAGTGTGAACGATC

2.6. Ονομασία των MSTs γονιδίων.

Η ονομασία των γονιδίων που κωδικοποιούν για πιθανούς μεταφορείς μονοσακχαριτών έγινε σύμφωνα με το σύστημα του *A. thaliana*. Ένα μονοσήμαντο όνομα δημιουργήθηκε για το κάθε MST γονίδιο το οποίο αποτελείται από το Mt στην αρχή, μετά ακολουθεί το όνομα της υποοικογένειας στην οποία ανήκει και στο τέλος ένας αριθμός με ή χωρίς πάυλα (_), (π.χ., *MtSTP1_1*).

2.7. Το ριζόβιο *S. meliloti* και το ψυχανθές *M. truncatula*

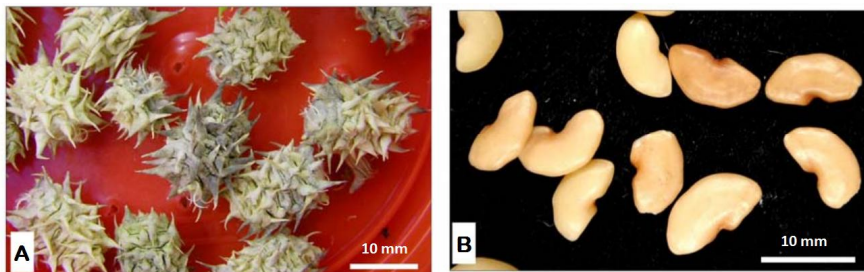
Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε το συμβιωτικό αζωτοδεσμευτικό βακτήριο *S. meliloti* στέλεχος 1021. Επίσης χρησιμοποιήθηκε το ψυχανθές *M. truncatula* που χρησιμοποιείται ως φυτικό μοντέλο για τη μελέτη της συμβιωτικής σχέσης ψυχανθών-ριζοβίων. Εμπεριέχει το πλασμίδιο pXLGD4 που έχει το *lacZ* υπό τον έλεγχο του βασικού promoter *hemA* (*hemA::LacZ* reporter) (Leong et al. 1985) και ήταν μια ευγενική χορηγία από τον Dr Udvardi (Noble Foundation). Οι σπόροι για τα φυτά *M. truncatula* με οικότυπο A17 ήταν προσφορά από τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Πολύδωρο και το εργαστήριο Γενετικής και Βελτίωσης Φυτών της Σχολής Γεωπονίας, Δασολογίας και Φυσικού Περιβάλλοντος του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Οι σπόροι για τα φυτά *M. truncatula* με οικότυπο R108 καθώς και σπόροι από τις μεταλλαγμένες σειρές του *M. truncatula*: NF4778_insertion_7, NF14435_high_54, NF4652_insertion_8, NF11816_high_7, NF3151B_insertion_22, NF9381_low_10, NF9381_low_61, NF8855_low_9 στη βάση δεδομένων του *Tnt1*-μεταλλαγμένου πληθυσμού του Ινστιτούτου Noble (Plant Biology Division, Noble Foundation, Oklahoma, USA).

2.8. Προβλάστηση σπόρων

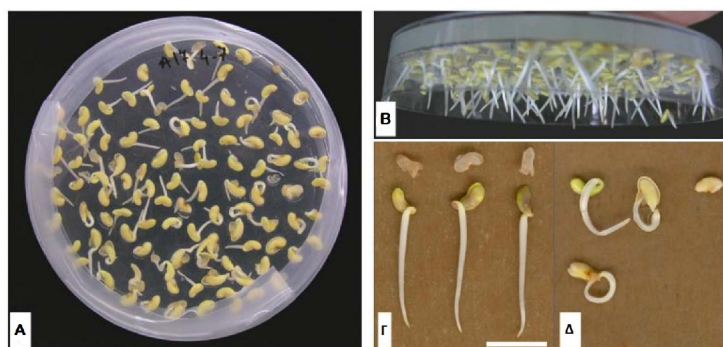
Το υδρόφοβο κηρώδες επίστρωμα του σπόρου του *M. truncatula* πρέπει να υποστεί σκαριφισμό, ώστε να επιτραπεί η εισροή νερού και οξυγόνου που ενεργοποιεί τη βλάστηση, καθώς ακέραιοι σπόροι δε θα βλαστήσουν ακόμα και αν παραμείνουν μία βδομάδα σε κανονικές συνθήκες προβλάστησης. Αναλυτικά τα βήματα που χρησιμοποιήθηκαν για την προβλάστηση σπόρων είναι τα ακόλουθα:

- Αφαίρεση των σπόρων από τους χέδρωπες (pods) (κάθε χέδρωπας περιέχει συνήθως 5-8 σπόρους).

- Χημικός σκαριφισμός σε απαγωγό. Μεταφορά των σπόρων σε γυάλινο δοχείο τύπου beaker και προσθήκη άνυδρου θειικού οξέος (H_2SO_4) (έως την κάλυψη των σπόρων).
- Περιοδική ανακίνηση των σπόρων και παρακολούθηση της πορείας του σκαριφισμού έως ότου να εμφανιστούν 3-5 μαύρα στίγματα στην επιφάνεια κάθε σπόρου (συνήθως μέσα σε 10-15 λεπτά).
- Αφαίρεση όλου του H_2SO_4 με γυάλινη πιπέτα Pasteur και 5 πλύσεις με απιονισμένο, αποστειρωμένο νερό. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η απομάκρυνση όλου του H_2SO_4 , ώστε να αποφευχθεί τοπική θέρμανση κατά την προσθήκη του νερού και να μην τραυματιστούν οι σπόροι.
- Απολύμανση των σπόρων σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής. Κάλυψη των σπόρων στο γυάλινο δοχείο τύπου beaker με 3 % διαλύμα χλωρίου για 1.5-2 λεπτά.
- Γρήγορη αφαίρεση της χλωρίνης και καλό ξέπλυμα των σπόρων 8 φορές με απιονισμένο, αποστειρωμένο νερό.
- Μεταφορά των σπόρων σε τρυβλία τύπου Petri με αποστειρωμένο 0.8 % άγαρ (20-30 σπόροι/τρυβλίο) με τη βοήθεια αποστειρωμένης λαβίδας. Σφράγιση των τρυβλίων με parafilm και άνοιγμα 2-3 τρυπών με μία βελόνα, ώστε να επιτυγχάνεται ανταλλαγή αερίων. Τύλιγμα των τρυβλίων με αλουμινόχαρτο (σκοτάδι) και τοποθέτησή τους ανάποδα στους 4 °C για 1-3 ημέρες και στη συνέχεια μεταφορά τους στους 20 °C (σε σπόρους καλής ποιότητας θα πρέπει να έχουμε ποσοστό βλαστικότητας 80-90 % και μήκος ριζιδίου 0.5-1 cm 24-36 h μετά τη μεταφορά των σπόρων στους 20 °C).



Εικόνα 2.1: (Α) Ωριμοί χέδρωπες *M. truncatula*, (Β) Σπόροι *M. truncatula* μετά τη διάρρηξη του χέδρωπα.



Εικόνα 2.2: (Α) Πάνω όψη ανεστραμμένου και σφραγισμένου τρυβλίου άγαρ μετά από επώαση 24 h στους 20 °C. Οι περισσότεροι σπόροι έχουν βλαστήσει. (Β) Πλαϊνή όψη του τρυβλίου με τα κάθετα ριζίδια των καλώς ανεπτυγμένων σπόρων ορατά. (Γ) Εμφάνιση καλώς βλαστημένων σπόρων; Το περισπέρμιο (πάνω) έχει αφαιρεθεί χειροκίνητα από τα φυτά; Μπάρα= 10 mm. (Δ) Σπόροι με ακανόνιστη βλάστηση που συνήθως καταλήγουν σε παύση της ανάπτυξης του φυταρίου.

2.9. Συνθήκες ανάπτυξης φυτών

Τα φυτά *M. truncatula* μπορούν να αναπτυχθούν επιτυχώς σε διάφορα υποστρώματα (υγρό χαρτί, άγαρ, υγρό μέσο, έδαφος, κλπ.) και συστήματα ανάπτυξης (χάρτινη σακούλα, τρυβλία, θάλαμο ανάπτυξης, υδροπονικό/αεροπονικό σύστημα, θερμοκήπιο, κλπ.). Η επιλογή του συστήματος εξαρτάται από το είδος του πειράματος για το οποίο θα χρησιμοποιηθούν τα φυτά (αν απαιτούνται φυτάρια, μεγάλα φυτά με ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης, κλπ.)

2.10. Μεταφορά σπόρων και ανάπτυξη φυτών

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για τη μεταφορά σπόρων και ανάπτυξης φυτών ήταν τα ακόλουθα:

- Προετοιμασία πλαστικών παλετών φυτωρίου με αποστειρωμένο και νοτερό μίγμα περλίτη και άμμου (1:1), (ο περλίτης πρέπει να ξεπλένεται πριν τη χρήση (με αποιονισμένο νερό), καθώς το pH του μπορεί να είναι >8 κάτι που θα επιδράσει αρνητικά στην ανάπτυξη των φυτών).
- Μεταφορά των σπόρων που έχουν βλαστήσει από τα τρυβλία στα γλαστράκια και ελαφριά κάλυψη των σπόρων με το μίγμα άμμου/περλίτη.
- Μεταφορά σε ειδικό θάλαμο ανάπτυξης με φωτοπερίοδο 16 ώρες φως/8 ώρες σκοτάδι και θερμοκρασία 22 °C.
- Πότισμα φυτών ανά 2-3 μέρες με διάλυμα B&D (με χαμηλό άζωτο για φυτά με φυμάτια) και dH₂O εναλλάξ. Στα διαλύματα ποτίσματος είναι απαραίτητη η χρήση

απιονισμένου νερού για να αποφευχθεί η συγκέντρωση αλάτων και οι συνθήκες αλατότητας που θα προκαλέσει.



Εικόνα 2.3: Θάλαμος ανάπτυξης φυτών *M. truncatula* σε στερεό θρεπτικό υλικό (περλίτης/άμμος) με θερμοκρασία 20-25 °C και φωτοπερίοδο 16 h φως/8 h σκοτάδι.

2.11. Εμβολιασμός με *Sinorhizobium meliloti* 1021

Για την παρουσία φυματίων, τα φυτά εμβολιάστηκαν με υγρή καλλιέργεια ριζοβίων *Sinorhizobium meliloti* 1021. Προετοιμάστηκε σε κωνική φιάλη θρεπτικό διάλυμα YMB και μετά την αποστείρωση προστέθηκαν 5 μg/ml τετρακυκλίνης. Υπό ασηπτικές συνθήκες εμβολιάστηκε η καλλιέργεια με *S. meliloti* 1021 και αναπτύχθηκε στους 30 °C για 2 μέρες. Τα φυτάρια εμβολιάστηκαν την ημέρα της φύτευσης με 1 ml καλλιέργειας *S. meliloti* (οπτικής πυκνότητας 0.6). Ο εμβολιασμός επαναλήφθηκε μετά από επτά ημέρες.



Εικόνα 2.4: Φυμάτιο *M. truncatula* R108 εμβολιασμένου με ριζόβιο *S. meliloti* 1021.

2.12. Συλλογή ιστού *M. truncatula*

Ο ιστός ο οποίος στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε είτε για απομόνωση DNA είτε για απομόνωση του RNA συλλέχθηκε παρουσία υγρού αζώτου και υπό ασηπτικές συνθήκες. Η διαδικασία συλλογής φυματίων, ρίζας, βλαστών, φύλλων και ακροβλαστιδίων από φυτά *M. truncatula* γινόταν σε σύντομο χρονικό διάστημα. Οι ιστοί αποθηκεύθηκαν στους -80 °C μέχρι την επόμενη χρησιμοποίησή τους.

Για το πείραμα που έγινε καταπόνηση στο σκοτάδι χρησιμοποιήθηκαν φυτά αγρίου τύπου A17 η συλλογή έγινε σε τρεις διαφορετικές περιόδους. Φυτά συλλέχθηκαν πριν ακριβώς αρχίσει να σκοτεινιάζει (κανονική φωτοπερίοδος), άλλα φυτά συλλέχθηκαν αφού πέρασαν 24 h σκοταδιού και άλλα αφού πέρασαν 72 h συνεχούς σκότους. Τα όργανα των φυτών, που υποβλήθηκαν σε 24 h και 72 h συνεχούς σκότους, συλλέχθηκαν στο σκοτάδι κάτω από ειδικό πράσινο φως για την αποφυγή επίδρασης του φωτός (Fukao et al. 2012, Tsikou et al. 2013). Να σημειωθεί επίσης ότι τα όργανα που μαζεύτηκαν από τα φυτά με κανονική περίοδο, καθώς και αυτά από φυτά που βρίσκονταν 24 h κάτω από συνεχές σκοτάδι μαζεύτηκαν την ίδια ακριβώς στιγμή, ενώ την ίδια ώρα μαζεύτηκαν και αυτά που βρίσκονταν για 72 h υπό συνεχές σκοτάδι.

2.13. Απομόνωση RNA

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την απομόνωση του RNA ήταν τα εξής:

- Τα φύλλα, ο βλαστός, και η ρίζα, τα φυμάτια και τα ακροβλαστίδια ομογενοποιήθηκαν σε γουδί λειοτρίβησης παρουσία υγρού αζώτου.
- Το δείγμα μεταφέρθηκε με αποστειρωμένη σπάτουλα σε σωλήνα eppendorf, προστέθηκαν 250 μl αντιδραστηρίου TRIzol και έγινε ομογενοποίηση με έμβολο.
- Προστέθηκαν άλλα 250 μl TRIzol και πραγματοποιήθηκε καλή ανάδευση (vortex) για περίπου 2 min.
- Φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm, για 12 min, στους 4 °C.
- Το υπερκείμενο υγρό μεταφέρθηκε σε νέο eppendorf (προσοχή στα κυτταρικά θραύσματα).
- 5 min επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, προσθήκη 100 μl χλωροφορμίου και ισχυρή ανακίνηση (15 sec).
- 2-3 min επώαση σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm, για 15 λεπτά, στους 4 °C.
- Προσεκτική μεταφορά της πάνω φάσης σε νέο eppendorf, προσθήκη 250 μl ισοπροπανόλης και ανακίνηση.
- 10 min επώαση σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm, για 12 min, στους 4 °C.
- Απόρριψη υπερκείμενου και ξέπλυμα ιζήματος με 75% αιθανόλη (100-150 μl).

- Φυγοκέντρηση στις 12,000 rpm, για 10 min, στους 4 °C και απόρριψη υπερκειμένου υγρού.
- Το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει σε απαγωγό για περίπου 10 min και έπειτα επαναδιαλύθηκε σε 50 µl ddH₂O.
- Με μέτρηση NanoDrop εκτιμήθηκε η ποσότητα του RNA και με gel αγαρόζης η ποιότητά του.
- Το RNA αποθηκεύθηκε στους -80 °C μέχρι την επόμενη χρήση.

2.14. Καθαρισμός ολικού RNA

Κατά τη διαδικασία απομόνωσης του RNA από τους φυτικούς ιστούς και τα βακτηριακά κύτταρα απομονώνεται και μέρος του γονιδιωµατικού DNA αυτών. Για την αποφυγή λήψης λανθασμένων αποτελεσµάτων κατά τη µελέτη της µεταγραφής και έκφρασης γονιδίων απαιτείται ο καθαρισµός του RNA από το γονιδιωµατικό DNA. Η διαδικασία που ακολουθείται βασίζεται σε ένζυµα που κόβουν/καταστρέφουν το DNA και αφήνουν ανέπαφο το RNA. Τα στάδια λοιπόν που ακολουθήθηκαν για τον καθαρισµό του RNA ήταν τα εξής:

- Σε σωλήνα eppendorf τοποθετήθηκαν:
 - 10 µg ολικό RNA,
 - 5 µl TURBO DNase buffer,
 - 0.5 µl TURBO DNase,
 - 1 µl RNase inhibitor, και
 - Συμπληρώθηκαν με ddH₂O μέχρι τα 50 µl.
- Το µίγµα επώαστηκε στους 37 °C για 30 min.
- Προστέθηκαν επιπλέον 0.5 µl TURBO DNase (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), έγινε ανάµιξη με πιπετάρισμα και επώαση για 30 min στους 37 °C.
- Μετά τον καθαρισµό του RNA πραγµατοποιήθηκε αντίδραση PCR (µε primers που ενισχύουν DNA) για να ελεγχθεί η καθαρότητα του δείγµατος.

Το επόµενο βήµα ήταν η απενεργοποίηση των DNases στο δείγµα µας. Το 95 % περίπου µπορεί να απενεργοποιηθεί με θέρµανση (5-10 min) στους 75 °C, αλλά για ολική απενεργοποίηση (και απενεργοποίηση πιθανών RNases) προτείνεται ένα πρωτόκολλο απενεργοποίησης με χρήση µίγµατος φαινόλης/χλωροφορµίου το οποίο και ακολουθήθηκε και περιελάµβανε τα ακόλουθα βήµατα:

- Στο δείγμα RNA προστέθηκαν ddH₂O έως τα 200 μl.
- Προστέθηκε ίσος όγκος μίγματος φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης 25:24:1 (PIC).
- Το μίγμα αναδεύτηκε καλά (vortex) και φυγοκεντρήθηκε στις 13.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
- Η υπερκείμενη φάση μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα και προστέθηκε ίσος όγκος χλωροφορμίου (προσοχή: κρατάμε την πάνω υδατική φάση που περιέχει τα νουκλεϊκά οξέα και προσέχουμε να μην πάρουμε τη μεσόφαση που περιέχει κυτταρικά θραύσματα, μεμβράνες, και DNA).
- Το μίγμα αναδεύτηκε καλά (vortex) και φυγοκεντρήθηκε στις 13.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
- Η υπερκείμενη φάση μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα eppendorf και προστέθηκε 1/2 του όγκου διάλυμα 3 M οξικού νατρίου pH 5,2 και 2x του όγκου αιθανόλη 100 % (για κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων).
- Το δείγμα επώαστηκε στους -80 °C όλο το βράδυ.
- Μετά το πέρας της επώασης το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 13.000 rpm για 30 λεπτά στους 4 °C.
- Το υπερκείμενο διάλυμα αφαιρέθηκε και το ίζημα ξεπλύθηκε με 100-150 μl αιθανόλης 75 %.
- Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 13.000 rpm για 15 λεπτά στους 4 °C.
- Το υπερκείμενο διάλυμα αφαιρέθηκε και το ίζημα στέγνωσε σε συνθήκες κενού (προσοχή: το pellet του RNA να μην «ξηραθεί», καθώς δυσκολεύει την επαναδιάλυση).
- Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 20-25 μl ddH₂O.
- Έγινε προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA σε φασματοφωτόμετρο NanoDrop και το δείγμα αναλύθηκε σε 2 % πηκτή αγαρόζης (προσοχή: το gel και το ρυθμιστικό διάλυμα TAE πρέπει να είναι αποστειρωμένα, και το gel να μην «τρέξει» παραπάνω από 10-15 λεπτά, ώστε να μειωθεί ο κίνδυνος αποδιάταξής του).

2.15. Ανάλυση νουκλεϊκών οξέων

2.15.1. Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων σε υδατικό διάλυμα γίνεται με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου NanoDrop. Αναλύοντας 1 μl δείγματος, το φασματόμετρο NanoDrop μπορεί να μας δώσει τα εξής δεδομένα:

- i) τη συγκέντρωση των επιθυμητών νουκλεϊκών οξέων (DNA ή RNA),
- ii) την καθαρότητα του δείγματος ως προς τις πρωτεΐνες (δείκτης $OD_{260/280}$), και
- iii) την καθαρότητα του δείγματος ως προς άλλες ουσίες όπως EDTA, υδρογονάνθρακες, φαινόλες κ.ά. (δείκτης $OD_{260/230}$).

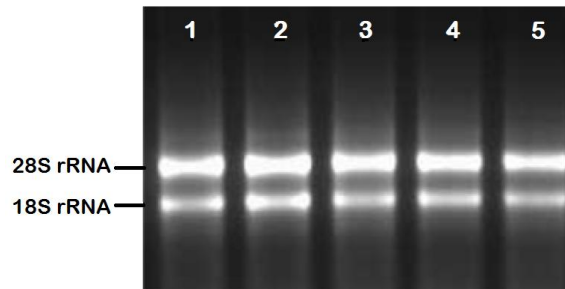
Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων σε υδατικό διάλυμα αρχικά μεταφέρεται 1 μl ddH₂O στην υποδοχή της συσκευής για το μηδενισμό (blank measurement). Στη συνέχεια 1 μl από το δείγμα μεταφέρεται στην υποδοχή της συσκευής, η οποία μετρά την οπτική πυκνότητα του δείγματος στα μήκη κύματος 230, 260 και 280 nm. Τέλος, η συσκευή εμφανίζει τη συγκέντρωση του DNA ή RNA και τους λόγους OD_{260}/OD_{280} OD_{260}/OD_{230} . Για να θεωρείται ένα δείγμα νουκλεϊκών οξέων καθαρό, ο δείκτης $OD_{260/280}$ πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 1.8-2.0, ενώ ο δείκτης $OD_{260/230}$ πρέπει να κυμαίνεται σε μεγαλύτερα επίπεδα, μεταξύ 2.0-2.2.

2.15.2. Ανάλυση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αγαρόζης

Ο διαχωρισμός των δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων γίνεται με βάση το μέγεθος και τη διαμόρφωσή τους με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Στην περίπτωση διαχωρισμού γραμμικών μορίων DNA/RNA, ο διαχωρισμός είναι ανάλογος του μεγέθους του. Το εύρος των μεγεθών που μπορεί να διαχωριστούν στην πηκτή αγαρόζης εξαρτάται από την συγκέντρωση της αγαρόζης (**πίνακας 2.3**).

- Η πηκτή παρασκευάζεται με προσθήκη αγαρόζης σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1xTAE, με αναλογίες που εξαρτώνται από την επιθυμητή τελική συγκέντρωση της πηκτής.
- Η αγαρόζη διαλύεται με θέρμανση του μίγματος σε φούρνο μικροκυμάτων και αφού κρυώσει ελαφρά προστίθεται διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (10 mg/ml) σε τελική συγκέντρωση 0.5 μg/ml και αναμιγνύεται καλά.

- Το διάλυμα τοποθετείται στο καλούπι της συσκευής ηλεκτροφόρησης προκειμένου να πήξει και στη συνέχεια μεταφέρονται τα δείγματα προς ανάλυση (αναμεμιγμένα με ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης) στα "πηγαδάκια" που σχηματίστηκαν.
- Το κύκλωμα κλείνει με διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1xTAE και τόσο η τάση του ηλεκτρικού πεδίου όσο και ο χρόνος εφαρμογής του εξαρτώνται από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των δειγμάτων που πρόκειται να αναλυθούν.



Εικόνα 2.5: Ευκαρυωτικό RNA με την ανάλυση σε πηκτή αгарόζης. Η πάνω ζώνη αντιπροσωπεύει το 28S και η κάτω το 18S ριβοσωμικό RNA.

Πίνακας 2.3: Συγκέντρωση αгарόζης ανάλογα με το επιθυμητό εύρος διαχωρισμού.

Αγαρόζη (%)	Εύρος διαχωρισμού γραμμικών μορίων νουκλεϊκών οξέων (kb)
0.3	1.7-70
0.5	0.7-45
0.8	0.4-20
1	0.3-10
1.2	0.2-8
1.5	0.2-6
2	0.1-5

2.16. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Πρόκειται για τεχνική που αποτελεί μέθοδο ενίσχυσης ακολουθιών DNA και RNA, *in vitro* ή και *in situ*. Η βασική αρχή της PCR βασίζεται σε συγκεκριμένα χαρακτηριστικά της αντιγραφής του DNA. Το εκμαγείο του DNA αρχικά αποδιατάσσεται σε θερμοκρασία 94-98 °C σε δύο μονόκλωνες αλυσίδες. Δύο μονόκλιωνα ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές), τα οποία καθορίζουν τα σημεία έναρξης της αντιγραφής, υβριδίζονται με το εκμαγείο, ένα με κάθε αλυσίδα.

Κατόπιν, μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί ως μήτρα το μονόκλωνο DNA για τη σύνθεση μιας καινούργιας συμπληρωματικής αλυσίδας κατά την κατεύθυνση 5'-3', ξεκινώντας από το τμήμα του μορίου που είναι δίκλωνο. Για τη σύνθεση αυτή απαραίτητη είναι η παρουσία μίγματος νουκλεοτιδίων, ιόντων Mg^{+2} και μιας θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης.

Στη συνέχεια, οι αρχικές αλυσίδες, καθώς και οι νεοσυντιθέμενες, αφού πρώτα αποδιαταχθούν με θέρμανση, μπορούν να χρησιμεύσουν ξανά ως μήτρες αντιγραφής όπου θα υβριδίσουν οι εκκινητές. Η εκθετική συσσώρευση των προϊόντων της αντίδρασης πραγματοποιείται εφ' όσον δεν υφίστανται περιοριστικοί παράγοντες, όπως η έλλειψη νουκλεοτιδίων και εκκινητών και η παραγωγή παρεμποδιστών της πολυμεράσης. Η εξειδίκευση του προϊόντος εξαρτάται κυρίως από τη θερμοκρασία υβριδισμού και από την εξειδίκευση των θέσεων υβριδισμού των συγκεκριμένων εκκινητών στη μήτρα του DNA.

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

Στα συγκεκριμένα πειράματα πραγματοποιήθηκαν PCR για να επαληθευτεί η δράση των DNases. Τα δείγματα είναι θεωρητικά καθαρά από DNA, άρα δε θα πρέπει να υπάρχουν προϊόντα μετά την ολοκλήρωση της PCR.

Η αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε ως εξής:

1. Σε ειδικό σωλήνα erpendorf προστέθηκαν:

- Μήτρα DNA/RNA 0.5 μl
- Εκκινητής ευθείας κατεύθυνσης Forward (10 μM) 0,5 μl
- Εκκινητής αντίστροφης κατεύθυνσης Reverse (10 μM) 0,5 μl
- Μίγμα dNTPs (10 mM) 0.5 μl
- 10x PCR ρυθμιστικό διάλυμα 2.5 μl
- *Taq* DNA πολυμεράση (2 units/ μl) 0,5 μl
- ddH₂O 20 μl για $V_{\text{τελ}}=25 \mu l$

2. Οι συνθήκες πραγματοποίησης της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης είναι:

- Βήμα 1: Αρχική αποδιάταξη στους 94 °C για 4 λεπτά
- Βήμα 2: Αποδιάταξη στους 94 °C για 1 λεπτό
- Βήμα 3: Υβριδισμός εκκινητών στους 58 °C για 1 λεπτό
- Βήμα 4: Επιμήκυνση στους 72 °C για 1 λεπτό/1.3-15 kb
- Επανάληψη βημάτων 2-4 για 30 κύκλους
- Βήμα 5: Τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 10 λεπτά

2.17. Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου

2.17.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με μήτρα μόρια RNA (RT-PCR)

Για να χρησιμοποιηθεί το RNA σε ποσοτική αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου πρέπει πρώτα να μετατραπεί σε cDNA το οποίο θα χρησιμοποιηθεί ως μήτρα στην qPCR. Η αντίδραση ενίσχυσης τμημάτων RNA με την μέθοδο RT-PCR περιλαμβάνει δυο στάδια. Στο πρώτο στάδιο το RNA μεταγράφεται σε cDNA με την δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης. Η μεταγραφή ξεκινά από τον κατάλληλο εκκινητή, που μπορεί να είναι dT-ολιγονουκλεοτίδιο όταν μεταγράφεται το σύνολο των mRNA ή εξειδικευμένο νουκλεοτίδιο για το συγκεκριμένο τμήμα RNA που επιθυμούμε να ενισχύσουμε. Στο δεύτερο στάδιο, τα μόρια του cDNA που δημιουργήθηκαν με τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης, ενισχύονται σε μια τυπική αντίδραση PCR, με την παρουσία μη-εξειδικευμένων εκκινητών.

Σε σωλήνα eppendorf λοιπόν προστέθηκαν τα εξής:

- RNA 1.5 μg
- Random primers 1 μl
- Μίγμα dNTPs (10mM) 1μl
- ddH₂O έως τελικό όγκο 10 μl

Στη συνέχεια το RNA αποδιατάχθηκε με θέρμανση στους 65 °C για 5 λεπτά, οπότε και πραγματοποιήθηκε ο υβριδισμός εκκινητή-RNA. Το δείγμα μεταφέρθηκε αμέσως σε πάγο για να διατηρηθεί σε μονόκλωνη κατάσταση.

Ακολούθησε η προσθήκη στο eppendorf:

- 5X First-Strand Buffer 4 μl

- DTT (0,1M) 2 μ l
- RNase out (40 units/ μ l) 1 μ l

Το μίγμα ανακατεύτηκε ελαφρώς (με χρήση πιπέτας) και επώαστηκε στους 42 °C για 2 λεπτά.

Στη συνέχεια προστέθηκε 1 μ l ενζύμου SuperScript™II RT (200units/ μ l), το μίγμα ανακατεύτηκε ελαφρώς και ακολούθησε επώαση στους 42 °C για 50 λεπτά και η αντίδραση απενεργοποιήθηκε με θέρμανση στους 70 °C για 15 λεπτά.

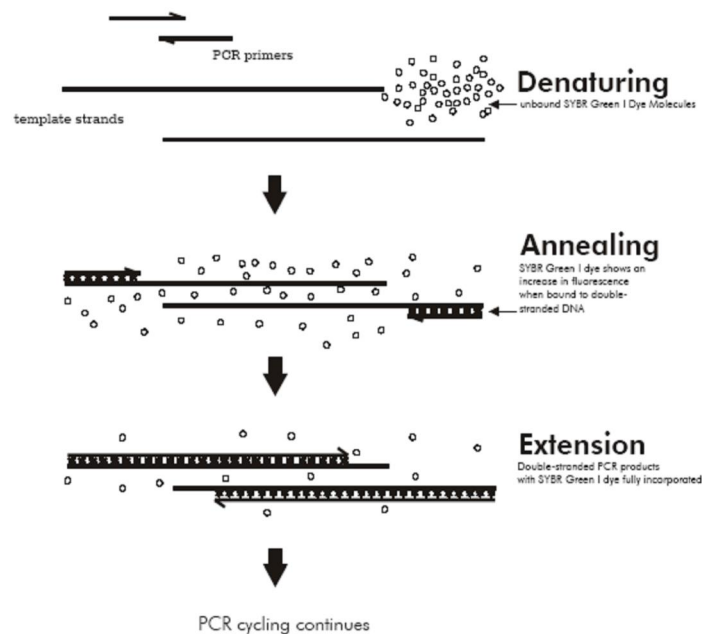
Το cDNA που προέκυψε μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μήτρα για την ενίσχυση των επιθυμητών τμημάτων. Η ενίσχυση αυτή πραγματοποιείται με μια αντίδραση qPCR και τη χρήση εξειδικευμένων εκκινήτων.

2.17.2. Ενίσχυση και ποσοτικός προσδιορισμός ακολουθιών cDNA με χρήση της μεθόδου PCR πραγματικού χρόνου (qPCR)

Η αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου είναι μία μέθοδος λογαριθμικής ενίσχυσης και ποσοτικού προσδιορισμού ακολουθιών DNA που δίνει τη δυνατότητα παρακολούθησης της πορείας της αλυσιδωτής αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο. Η ικανότητα παρακολούθησης της εξέλιξης της αντίδρασης δίνεται από τη μέτρηση των επιπέδων φθορισμού της χρωστικής SYBR Green, η οποία έχει την ικανότητα να φθορίζει κατά την πρόσδεση της στα δίκλιωνα μόρια του DNA (dsDNA). Πραγματοποιούνται λοιπόν μετρήσεις των επιπέδων του φθορισμού στο τέλος κάθε κύκλου της αντίδρασης με τη χρήση σαρωτή. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται συχνά σε συνδυασμό με τη μέθοδο της RT-PCR, για τον ποσοτικό προσδιορισμό μικρών αλληλουχιών mRNA που έχουν μετατραπεί σε cDNA, κάνοντας έτσι εφικτή τη μελέτη της έκφρασης γονιδίων σε συγκεκριμένους ιστούς, κύτταρα ή αναπτυξιακά στάδια.

Κατά τη διάρκεια της φάσης της αποδιάταξης της διπλής έλικας του DNA, η SYBR Green βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή και ο φθορισμός που παράγει είναι μικρός. Στις φάσεις της πρόσδεσης των εκκινήτων και της επιμήκυνσης, όπου υπάρχει διπλή έλικα DNA, η SYBR Green προσδένεται σε αυτή και ο φθορισμός που παράγει αυξάνεται σημαντικά (έως και 1000 φορές). Η αύξηση του σήματος του φθορισμού εξαρτάται από την αρχική ποσότητα της μήτρας του DNA που υπάρχει στην έναρξη της αντίδρασης της PCR. Η ανίχνευση του φθορισμού που παράγεται πραγματοποιείται από ένα ειδικό φωτόμετρο που ανιχνεύει το φθορισμό που παράγεται στα 520 nm. Η SYBR Green παράγει φθορισμό όταν προσδένεται σε

οποιοδήποτε δίκλωνο μόριο DNA, όπως διμερή εκκινητών ή ανεπιθύμητα προϊόντα της αντίδρασης του PCR. Γι' αυτό είναι απαραίτητος ο σχεδιασμός των κατάλληλων εκκινητών και οι προσεκτικοί χειρισμοί κατά την διάρκεια των πειραμάτων για την αποφυγή μολύνσεων και παραλαβή εσφαλμένων μετρήσεων φθορισμού.



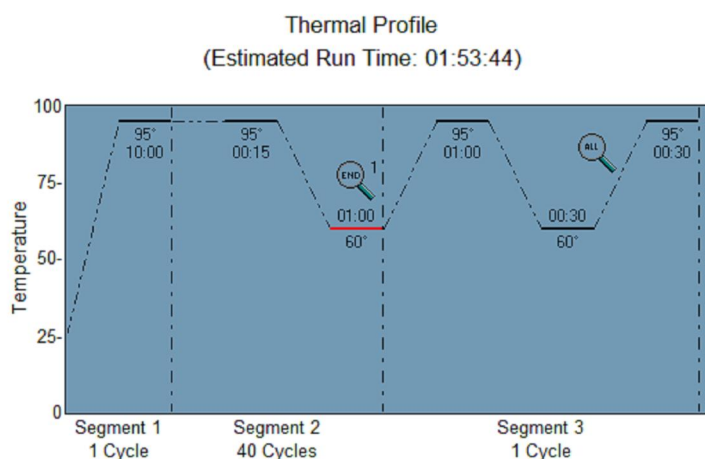
Εικόνα 2.6: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας πρόσδεσης της χρωστικής SYBR Green στη δίκλωνη έλικα του DNA κατά την διάρκεια των βημάτων του PCR.

Για την εκτέλεση της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Mx3005P (Stratagene) για το πείραμα με τα φυτά R108 και τις μεταλλαγμένες σειρές και η συσκευή StepOnePlusTM Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Austin, TX, USA) για το πείραμα με τα φυτά A17. Τα δείγματα τοποθετούνταν σε πλακέτα ειδική για αυτή τη χρήση.

Για μία τυπική αντίδραση τελικού όγκου 10 μl αναμιγνύονταν:

- 2X Fast Start SYBR-GREEN Master ROX (Roche) ή SYBR Select Master Mix (Applied Biosystems, Austin, TX, USA): 5 μl,
- cDNA (χρησιμοποιείται ως εκμαγείο): 1 μl, και
- Μίγμα (Forward+Reverse) εξειδικευμένων εκκινητών (0.5 μM): 4 μl.

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα και τα στάδια της αντίδρασης φαίνονται στην παρακάτω εικόνα και περιλαμβάνει: 10 min επώαση στους 95 °C και ακολουθούσαν 40 κύκλοι με 95 °C για 15 s και 60 °C για 1 min.



Εικόνα 2.7: Στάδια και θερμοκρασιακό πρόγραμμα Real Time PCR.

Η εξειδίκευση των εκκινητών και ο σχηματισμός διμερών των εκκινητών ελέγχθηκε για κάθε ζεύγος χωριστά από την ανάλυση της καμπύλης αποδιάταξης στο τέλος της αντίδρασης. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου (TC97716, Medtr5g014320) (Benedito et al. 2008) χρησιμοποιήθηκαν ως εσωτερικός έλεγχος για να γίνει κανονικοποίηση στις μικρές διαφορές που παρουσιάζονταν στις ποσότητες του cDNA.

Τα επίπεδα έκφρασης του κάθε γονιδίου (X) υπολογίστηκαν σε αναλογία προς τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου Medtr5g014320 (y). Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης υπολογίστηκαν από τον τύπο $(1+E)^{-\Delta Ct}$, όπου ΔCt είναι η διαφορά $Ct^x - Ct^y$ και E η αποδοτικότητα της αντίδρασης PCR, η οποία υπολογίστηκε από τη γραμμική συνάρτηση του λογαρίθμου της απορρόφησης ανά κύκλο αντίδρασης χρησιμοποιώντας το λογισμικό LinRegPCR (Ramakers et al. 2003).

Όλες οι αντιδράσεις qPCR πραγματικού χρόνου πραγματοποιήθηκαν σε τρεις βιολογικές επαναλήψεις.

2.18. *In situ* RNA-RNA υβριδισμός

Με τον *in situ* RNA-RNA υβριδισμό καθορίζεται η τοπολογία των mRNAs των γονιδίων-στόχων. Για το σκοπό αυτό, το ολικό RNA φυματίων του *M. truncatula* χρησιμοποιείται σε αντιδράσεις αντίστροφης μεταγραφής (παραγωγή cDNA) και συγκεκριμένες περιοχές (π.χ. 3' UTRs) των υπό εξέταση γονιδίων ενισχύονται (PCR) από το cDNA και κλωνοποιούνται σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς που επιτρέπουν την *in vitro* μεταγραφή των κλωνοποιημένων τμημάτων. Με τη βοήθεια της *in vitro* μεταγραφής των κλωνοποιημένων τμημάτων παράγονται σημασμένοι με διγοξigenίνη RNA ανιχνευτές (αλληλουχίες), που αντιστοιχούν είτε στην *in vivo*

παραγόμενη αλληλουχία (μάρτυρας) είτε στην αντίστροφα συμπληρωματική της. Οι ανιχνευτές αυτοί χρησιμοποιούνται σε πειράματα *in situ* RNA-RNA υβριδισμού, με χρήση ιστού από λεπτές τομές διαφόρων φυτικών οργάνων.

2.19. Προετοιμασία σημασμένου RNA probe

2.19.1. *In vitro* μεταγραφή (DIG RNA Labeling Kit)

Για την πραγματοποίηση της *in vitro* μεταγραφής πραγματοποιήθηκαν τα παρακάτω:

- Σε σωλήνα erpendorf αναμίχθηκαν:
 - 1 μg καθαρού DNA,
 - 2 μl 10xNTP μίγματος σήμανσης,
 - 2 μl 10x buffer μεταγραφής,
 - 1 μl Παρεμποδιστή RNases,
 - 2 μl RNA πολυμεράσης T7 ή SP6, και
 - RNase-free H₂O έως τα 20 μl.
- Ανάμιξη και spin-down.
- Επώαση για 2 h στους 37 °C.
- Προσθήκη 2 μl DNase (RNase-free), ανάμιξη, και spin-down.
- Επώαση για 15 min στους 37 °C.

2.19.2. Καθαρισμός DIG-σημασμένου RNA

Για τον καθορισμό DIG-σημασμένου RNA έγιναν τα ακόλουθα:

- Προσθήκη RNase-free H₂O μέχρι τα 100 μl στο RNA δείγμα.
- Προσθήκη 250 μl Binding Solution και ανάμιξη με vortex.
- Προσθήκη 200 μl 95-100 % αιθανόλης και ανάμιξη με vortex για 10 sec.
- Τοποθέτηση στήλης καθαρισμού στον παρεχόμενο σωλήνα συλλογής.
- Μεταφορά (έως 600 μl) δείγματος στη στήλη και φυγοκέντρηση για 1 min στις 13.000 rpm.
- Απόρριψη εκλούσματος. Αν το δείγμα είναι περισσότερο των 600 μl επαναλαμβάνεται το πέρασμα από τη στήλη.
- Τοποθέτηση 400 μl Wash Solution στη στήλη και φυγοκέντρηση για 1 min στις 13.000 rpm. Οπτικός έλεγχος της στήλης για επιβεβαίωση διέλευσης όλης της ποσότητας του διαλύματος έκλουσης (Wash Solution) από τη στήλη.

- Απόρριψη εκλούσματος, ανασυγκρότηση της στήλης με το σωλήνα συλλογής και επανάληψη του προηγούμενου βήματος 2 φορές.
- Φυγοκέντρηση της στήλης για 2 min στις 13.000 rpm για να «στεγνώσει». Απόρριψη του σωλήνα συλλογής.
- Τοποθέτηση της στήλης σε νέο σωλήνα έκλουσης 1.7 ml που παρέχεται με το kit.
- Προσθήκη 50 μl RNA Elution Buffer στη στήλη. Για υψηλές συγκεντρώσεις RNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί και μικρότερη ποσότητα (ελάχιστη ποσότητα είναι τα 20 μl).
- Φυγοκέντρηση για 2 min στα 200 g και μετά για 1 min στα 14.000 g. Αν δεν έχει γίνει έκλυση όλης της ποσότητας πραγματοποιείται περαιτέρω φυγοκέντρηση για 1 min στα 14.000 g.

2.19.3. Υδρόλυση RNA

- Για probes μεγαλύτερα των 500 νουκλεοτιδίων, υδρολύεται 1 μg RNA με προσθήκη ίσου όγκου RNase-free H₂O και 2x όγκους carbonate buffer (60 mM Na₂CO₃, 40 mM NaHCO₃, pH 10.2). Επώαση στους 60 °C. Ο χρόνος επώασης υπολογίζεται ως εξής:
 - $t = (L_o - L_f) / (k \times L_o \times L_f)$,
 - L_o = αρχικό μέγεθος μεταγραφήματος (σε kb),
 - L_f = επιθυμητό μέγεθος probe (σε kb), και
 - k = σταθερά = 0.11 kb/min.
- Τερματισμός αντίδρασης με προσθήκη ίσου όγκου buffer αδρανοποίησης υδρόλυσης (3 M sodium acetate, 1 % (v/v) acetic acid, pH 6).
- Ακολουθεί ο καθαρισμός του RNA.

2.20. Μονιμοποίηση ιστού

2.20.1. Μονιμοποίηση φυματίων *M. truncatula*

Για τη μονιμοποίηση φυματίων του *M. Truncatula* έγιναν τα ακόλουθα:

- Συλλογή φυματίων (με νυστέρι) σε τρυβλίο με RNase-free ddH₂O και άμεση μεταφορά τους σε buffer μονιμοποίησης.
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 50 λεπτά και εφαρμογή κενού για 10 min για βελτίωση περατότητας και απαέρωσης των ιστών.
- Επανάληψη βήματος άλλες 3 φορές.

- Αλλαγή buffer μονιμοποίησης και επώαση στους 4 °C O/N.

2.20.2. Αφυδάτωση ιστού

Για την αφυδάτωση του ιστού έγιναν τα εξής:

- Προσθήκη 1x fixation buffer (pH 7) και επώαση στους 4 °C για 30 min υπό ελαφριά ανάδευση.
- Αφαίρεση buffer, προσθήκη 10 % αιθανόλης (σε RNase-free ddH₂O) και επώαση στους 4 °C για 20 min υπό ελαφριά ανάδευση.
- Αφαίρεση 10 % αιθανόλης, προσθήκη 20 % αιθανόλης και επώαση στους 4 °C για 20 min υπό ελαφριά ανάδευση.
- Αφαίρεση 20 % αιθανόλης, προσθήκη 30 % αιθανόλης και επώαση στους 4 °C για 20 min υπό ελαφριά ανάδευση.
- Αφαίρεση 30 % αιθανόλης, προσθήκη 40 % αιθανόλης και επώαση στους 4 °C για 20 min υπό ελαφριά ανάδευση.
- Αφαίρεση 40 % αιθανόλης, προσθήκη 50 % αιθανόλης και επώαση στους 4 °C για 20 min υπό ελαφριά ανάδευση.
- Αφαίρεση 50 % αιθανόλης, προσθήκη 60 % αιθανόλης και επώαση στους 4 °C για 20 min υπό ελαφριά ανάδευση.
- Αφαίρεση 60 % αιθανόλης, προσθήκη 70 % αιθανόλης και επώαση στους 4 °C για 20 min έως O/N υπό ελαφριά ανάδευση.
- Αφαίρεση 70 % αιθανόλης, προσθήκη 80 % αιθανόλης + 0.5% σαφρανίνης και επώαση στους 4°C για 1 h υπό ελαφριά ανάδευση.
- Αφαίρεση 80 % αιθανόλης, προσθήκη 90 % αιθανόλης και επώαση στους 4°C για 1 h υπό ελαφριά ανάδευση.
- Αφαίρεση 90 % αιθανόλης, προσθήκη 100 % αιθανόλης και επώαση στους 4 °C για 1 h υπό ελαφριά ανάδευση.
- Αφαίρεση 100 % αιθανόλης, προσθήκη 100 % αιθανόλης και επώαση στους 4 °C για 1 h υπό ελαφριά ανάδευση.

2.20.3. Διαφανοποίηση ιστών

Για τη διαφανοποίηση των ιστών έγινε:

- Αφαίρεση 100 % αιθανόλης, προσθήκη 25 % ξυλενίου (σε αιθανόλη) και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 h ή όλο το βράδυ στους 4 °C.

- Αφαίρεση 25 % ξυλενίου, προσθήκη 50 % ξυλενίου και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 h.
- Αφαίρεση 50 % ξυλενίου, προσθήκη 75 % ξυλενίου και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 h.
- Αφαίρεση 75 % ξυλενίου, προσθήκη 100 % ξυλενίου και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 h.
- Αφαίρεση 100 % ξυλενίου, προσθήκη 100 % ξυλενίου και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 h.

2.20.4. Διήθηση ιστού

Για τη διήθηση του ιστού πραγματοποιήθηκε:

- Προετοιμασία λιωμένης παραφίνης: θέρμανση κομματιών παραφίνης στους 65 °C έως ότου λιώσουν, φιλτράρισμα σε χαρτί Whatman (για αφαίρεση σκόνης) και διατήρηση στους 65 °C σε κλειστό δοχείο.
- Προσθήκη 2-3 σταγόνων παραφίνης στους ιστούς που βρίσκονται στο ξυλένιο και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30-60 min.
- Προσθήκη σταγόνων έως ότου η παραφίνη να φτάσει περίπου το μισό όγκο του ξυλενίου (4-16 h).
- Μεταφορά στους 42 °C και προσθήκη σταγόνων παραφίνης ανά 30-60 min έως ότου ο όγκος της παραφίνης να είναι διπλάσιος από αυτόν του ξυλενίου.
- Μεταφορά δοχείων στους 60 °C, προσθήκη αρκετών σταγόνων παραφίνης, γρήγορη αφαίρεση διαλύματος παραφίνης/ξυλενίου, αντικατάστασή του με παραφίνη και επώαση για 48 h στους 60 °C. Σε αυτό το διάστημα η παραφίνη θα πρέπει να αλλαχθεί τουλάχιστον 4 φορές.
- Προθέρμανση τρυβλίου στους 60 °C και προσθήκη λίγης παραφίνης. Μεταφορά των φυματίων από τα δοχεία στο τρυβλίο. και προσαρμογή των θέσεων τους με μια προθερμασμένη βελόνα. Γρήγορη μεταφορά του τρυβλίου σε παγωμένη επιφάνεια. Οι ιστοί στην παραφίνη μπορούν να διατηρούνται για αρκετά χρόνια στους 4 °C.

2.21. Πραγματοποίηση τομών

Για την πραγματοποίηση των τομών έγιναν τα ακόλουθα:

- Το κομμάτι της παραφίνης που περιείχε το δείγμα που προοριζόταν για τομές, κόπηκε με τέτοιο τρόπο, ώστε η επιφάνεια τομής να έχει τραπεζοειδές σχήμα.

- Το κομμάτι τοποθετήθηκε στο μικροτόμο έτσι ώστε η τομή να πραγματοποιείται από τη «μεγάλη» προς τη «μικρή» πλευρά του τραπεζοειδούς.
- Οι τομές πραγματοποιήθηκαν με την ειδική λεπίδα μικροτόμου και ήταν 7-10 μm σε πάχος. Η «λωρίδα παραφίνης» που κόπηκε, μπορεί να αποθηκευτεί σε χαρτί χωρίς σκόνη μέσα σε σφραγισμένο αποστειρωμένο πλαστικό κουτί έως μία εβδομάδα στους 4 °C.
- Έγινε επιλογή των επιθυμητών τομών, τοποθετήθηκαν στις ειδικές επικαλυπτόμενες αντικειμενοφόρες πλάκες με τη "γυαλιστερή" πλευρά προς τα κάτω και καλύφθηκαν με RNase-free ddH₂O.
- Οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετήθηκαν σε hot-plate στους 60 °C για 5-20 sec, για να «τεντώσουν» οι ιστοί.
- Η περίσσεια του ddH₂O αφαιρείται είτε με αποστειρωμένο χαρτί Whatman είτε με πιπέτα.
- Οι πλάκες αφέθηκαν όλο το βράδυ σε hot-plate στους 42 °C για άριστη προσκόλληση των τομών. Σε αντίθετη περίπτωση, οι τομές μπορεί να χαθούν και τη διαδικασία υβριδισμού. Τέλος, οι πλάκες αποθηκεύθηκαν στους 4 °C ή -20 °C σε σφραγισμένο πλαστικό κουτί.

2.22. Αποπαραφίνωση

Κατά την εργασία με υλικό που περιέχει ιδιαιτέρως κενοτοποιημένα κύτταρα, είναι σημαντικό να αφαιρεθεί το μέσο μονιμοποίησης ακριβώς πριν τον προ-υβριδισμό. Αντίθετα, κατά την εργασία με λιγότερα ευαίσθητο υλικό (π.χ. φυμάτια) και μετά την αφαίρεση του μέσου μονιμοποίησης, οι πλάκες μπορούν (αφού στεγνώσουν) να αποθηκευθούν στους 4 °C ή -20 °C σε σφραγισμένα δοχεία.

- Γενικότερα οι πλάκες αφήνονται να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου. Αν έχουν αποθηκευθεί στους -20 °C, πρέπει να παραμείνουν τουλάχιστον 1 h σε θερμοκρασία δωματίου πριν ανοιχθεί το σφραγισμένο δοχείο, ώστε να μην υγρανθούν οι πλάκες. Κατόπιν ακολουθεί:
- Τοποθέτηση αντικειμενοφόρων πλακών σε ειδικό δίσκο για τη συγκράτησή τους.
- Μεταφορά δίσκου σε δοχείο που περιέχει 100 % ξυλένιο και επώαση για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση.
- Μεταφορά δίσκου σε νέο δοχείο που περιέχει 100 % ξυλένιο. Επώαση για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση.

- Μεταφορά δίσκου σε δοχείο με 50 % ξυλένιο (σε αιθανόλη). Επώαση για 25 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση.
- Μεταφορά δίσκου σε δοχείο με 100 % αιθανόλη και επώαση για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση.
- Σε περίπτωση εργασίας με φυμάτια, οι πλάκες μπορούν να στεγνώσουν και να αποθηκευτούν στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ή στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.23. Ενυδάτωση

- Σε περίπτωση που οι πλάκες αποθηκεύθηκαν στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ή στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, πρέπει να μείνουν σε θερμοκρασία δωματίου, έως ότου αποκτήσουν αυτή τη θερμοκρασία.
- Τοποθέτηση των πλακών στο δίσκο συγκράτησης και μεταφορά σε δοχείο που περιέχει 100 % αιθανόλη. Επώαση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση.
- Μεταφορά δίσκου σε νέο δοχείο που περιέχει 100 % αιθανόλη και επώαση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση.
- Μεταφορά δίσκου με τις πλάκες σε δοχείο που περιέχει 90 % αιθανόλη (σε RNase-free ddH₂O) και επώαση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση.
- Μεταφορά δίσκου σε δοχείο με 70 % αιθανόλη και επώαση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση.
- Μεταφορά δίσκου σε δοχείο με 50 % αιθανόλη και επώαση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση.
- Μεταφορά δίσκου σε δοχείο με 30 % αιθανόλη και επώαση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση.
- Μεταφορά δίσκου σε δοχείο με 10 % αιθανόλη και επώαση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση.
- Μεταφορά δίσκου σε δοχείο που περιέχει RNase-free ddH₂O και επώαση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μεταφορά δίσκου σε δοχείο που περιέχει RNase-free ddH₂O και επώαση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μεταφορά δίσκου σε δοχείο που περιέχει RNase-free ddH₂O και επώαση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου.

2.24. Προϋβριδισμός

Για τον προϋβριδισμό έγιναν τα εξής:

- Μεταφορά του δίσκου με τις αντικειμενοφόρες πλάκες σε δοχείο που περιέχει Protease K buffer και 2 $\mu\text{g/ml}$ Proteinase K. Επώαση για 30 min στους 37 °C.
- Μεταφορά του δίσκου με τις αντικειμενοφόρες πλάκες σε δοχείο που περιέχει 1xTBS και επώαση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μεταφορά του δίσκου με τις αντικειμενοφόρες πλάκες σε δοχείο που περιέχει 1xTBS και επώαση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μεταφορά του δίσκου με τις αντικειμενοφόρες πλάκες σε δοχείο που περιέχει 1xTBS και επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μεταφορά δίσκου σε δοχείο που περιέχει 0.1M τρι-αιθανολ-αμίνη, 0.25 (v/v) οξικό ανυδρίτη σε RNase-free ddH₂O, pH 8 (5.2 ml τρι-αιθανολ-αμίνη, 1.6 ml HCl, 391.2 ml H₂O, 2 ml οξικός ανυδρίτης) για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση, ώστε να ακετυλιωθούν θετικά φορτία που πιθανόν να προκαλέσουν μη-ειδική πρόσδεση. Ο οξικός ανυδρίτης είναι ιδιαίτερα ασταθής και πρέπει να προστίθεται σε διάλυμα αμέσως πριν τη χρήση του. Απενεργοποιεί επίσης τις RNάσες.
- Μεταφορά του δίσκου με τις πλάκες σε δοχείο με 0.1 M τρι-αιθανολ-αμίνη, 0.25 (v/v) οξικό ανυδρίτη σε RNase-free ddH₂O, pH 8 και επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
- Μεταφορά του δίσκου σε δοχείο που περιέχει 2x SSC για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
- Μεταφορά του δίσκου σε δοχείο με 10 % αιθανόλη για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
- Μεταφορά του δίσκου σε δοχείο με 30 % αιθανόλη για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
- Μεταφορά του δίσκου σε δοχείο με 50 % αιθανόλη για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
- Μεταφορά του δίσκου σε δοχείο με 70 % αιθανόλη για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
- Μεταφορά του δίσκου σε δοχείο με 90 % αιθανόλη για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.

- Μεταφορά του δίσκου σε δοχείο με 100 % αιθανόλη για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
- Στέγνωμα των τομών για τουλάχιστον 1 h και αποθήκευσή τους μέχρι τον υβριδισμό.

2.25. Υβριδισμός

Για τον υβριδισμό χρειάστηκε πρώτα να γίνουν:

- Προετοιμασία 50 % Dextran sulfate: διαλυτοποίηση 5 g Dextran sulfate (MW=500.000) σε 8 ml RNase-free H₂O, ανακίνηση O/N στους 4 °C, και προσθήκη RNase-free H₂O έως τελικό όγκο 10 ml.
- Προετοιμασία buffer προ-υβριδισμού (ανά 50 ml): 25 ml απιονισμένο φορμαμίδιο, 3 ml NaCl 5M, 100 μl Tris-HCl 1M pH 7.5, 1 ml Denhardt's 50x, 11.25 μl tRNA (10 mg/ml), 21 ml RNase-free ddH₂O (το φορμαμίδιο μειώνει τη θερμική σταθερότητα των δεσμών και έτσι ο υβριδισμός μπορεί να πραγματοποιηθεί σε χαμηλότερες θερμοκρασίες).

Στη συνέχεια για τον υβριδισμό ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

- Τοποθέτηση χαρτιού Whatman σε πλαστικό κουτί (σφραγιζόμενο) και διάβροχη με διάλυμα SSC 2x.
- Μεταφορά του δίσκου με τις αντικειμενοφόρες πλάκες σε δοχείο που περιέχει SSC 2x για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
- Μεταφορά πλακών και τοποθέτησή τους στο βρεγμένο χαρτί Whatman μέσα στο πλαστικό κουτί.
- Επικάλυψη κάθε πλάκας με περίπου 1 ml buffer προϋβριδισμού και επώαση για τουλάχιστον 10 min στους 45 °C.
- Προετοιμασία διαλύματος υβριδισμού (100 μl ανά πλάκα):
 - Προετοιμασία διαλυμάτων A (90 μl ανά πλάκα) και B (5 μl ανά πλάκα) για n+2 πλάκες:
 - Διάλυμα A: 50 μl απιονισμένο φορμαμίδιο, 6 μl NaCl 5M, 2 μl Denhardt's 50x, 20 μl 50% Dextran sulfate, 10 μl TE 10x pH 7.5, 2 μl ddH₂O.
 - Διάλυμα B: 1.5 μl tRNA (10 μg/μl), 1.5 μl poly(A) (20 μg/μl), 1 μl ddH₂O
 - Προετοιμασία probe:
 - Για κάθε πλάκα γίνεται ανάμιξη ίσης ποσότητας (20-50 ng) DIG-σημασμένου probe και υδρολυμένου DIG-σημασμένου probe.

- Προσαρμογή όγκου probe στα 5 μl ανά πλάκα με προσθήκη RNase-free ddH₂O.
- Ανάμιξη probe με 5 μl διαλύματος B και επώαση για 5 min στους 80 °C για μετουσίωση RNA και μετά άμεση μεταφορά στον πάγο.
- Ανάμιξη 90 μl διαλύματος A με το μίγμα probe/διάλυμα B.
- Αφαίρεση με πιπέτα του buffer προ-υβριδισμού από τις πλάκες.
- Μεταφορά (με πιπέτα) buffer υβριδισμού στις πλάκες.
- Κάλυψη πλάκας και διαλύματος με Parafilm και σφράγισμα κουτιού.
- Επώαση όλο το βράδυ στους 42 °C σε σκοτάδι.

2.26. Χειρισμός μετα-υβριδισμού

Κατόπιν ακολουθεί πέψη με RNase, οπότε όλα τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στο χειρισμό μετα-υβριδισμού, χρησιμοποιήθηκαν μόνο για την εκτέλεση αυτού του βήματος. Γενικότερα σε χαμηλές συγκεντρώσεις NaCl (0-100 mM) η RNaseA κόβει ssRNA, dsRNA, και RNA σε RNA-DNA υβρίδια. Σε συγκεντρώσεις NaCl άνω των 300 mM κόβει αποκλειστικά ssRNA.

Για το χειρισμό λοιπόν του μετα-υβριδισμού έγιναν τα εξής:

- Τοποθέτηση αντικειμενοφόρων πλακών στον ειδικό δίσκο συγκράτησης.
- Μεταφορά του δίσκου σε δοχείο που περιέχει SSC 4x για 5-10 min για να «γλιστρήσει» το parafilm.
- Μεταφορά του δίσκου σε δοχείο που περιέχει RNase buffer για 2 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
- Μεταφορά δίσκου σε δοχείο με προθερμασμένο RNase buffer και 50 μg RNase A/ml RNase buffer, ώστε να απομακρυνθεί το μη-υβριδισμένο RNA, και επώαση στους 37 °C για 30 min υπό ανάδευση (η άριστη συγκέντρωση RNase εξαρτάται από το φυτικό υλικό).
- Μεταφορά του δίσκου σε δοχείο με RNase buffer για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση (εκτέλεση αυτού του βήματος 3 φορές.)
- Μεταφορά του δίσκου σε δοχείο με SSC 2x για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
- Μεταφορά του δίσκου σε δοχείο με SSC 0.2x για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.

- Μεταφορά του δίσκου σε δοχείο με SSC 0.2x για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.



Εικόνα 2.8: Δοχείο και σκεύος συγκράτησης αντικειμενοφόρων πλακών που χρησιμοποιούνται στον RNA-RNA *in situ* υβριδισμό.

2.27. Εντοπισμός

Καταρχήν έγινε προετοιμασία 10% πολυβίνυλ-αλκοόλης 89-98 kD (ενίσχυση σήματος) σε buffer εντοπισμού 1x ως εξής:

Ανά 100ml :

- Ισχυρή ανακίνηση buffer εντοπισμού 10x και αραιώση 1:10 σε ddH₂O.
- Ανάμιξη 10 gr πολυβίνυλ-αλκοόλης 89-98 kD με buffer εντοπισμού 1x σε τελικό όγκο 100 ml.
- Θέρμανση στους 90 °C υπό ανάδευση για να διαλυθεί η πολυβίνυλ-αλκοόλη.
- Επαναφορά σε θερμοκρασία δωματίου.

2.27.1. Ανασύσταση των buffers DIG Wash και Block buffer set

- Για την προετοιμασία του washing buffer 1x (100 mM μαλαϊκό οξύ, 150 mM NaCl, pH 7.5 με NaOH, 0.3-0.5 % Tween 20) έγινε ισχυρή ανακίνηση του μητρικού washing Buffer 10x πριν τη χρήση και κατόπιν ακολούθησε αραιώση 1:10 με RNase-free ddH₂O.
- Για την προετοιμασία του buffer μαλαϊκού οξέος 1x (100 mM μαλαϊκό οξύ, 150 mM NaCl, pH 7.5 με NaOH) έγινε ανακίνηση και αραιώση 1:10 με RNase-free ddH₂O του buffer μαλαϊκού οξέος 10x.
- Για την προετοιμασία του Blocking Solution 1x (διάλυμα αποκλεισμού – μείωση θορύβου) έγινε ισχυρή ανακίνηση μητρικού Blocking Solution 10x πριν από κάθε χρήση και στη συνέχεια ακολούθησε αραιώση 1:10 με RNase-free ddH₂O. Το Blocking Solution πρέπει να είναι φρέσκο σε κάθε χρήση του.

- Για την προετοιμασία του buffer εντοπισμού 1x (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl) έγινε ισχυρή ανακίνηση του μητρικού detection buffer 10x πριν από κάθε χρήση και ακολούθησε αραιώση 1:10 με RNase-free ddH₂O.

2.27.2. Διαδικασία εντοπισμού

Για τη διαδικασία εντοπισμού έγιναν τα παρακάτω:

- Μεταφορά του δίσκου με τις αντικειμενοφόρες πλάκες σε δοχείο που περιέχει Washing Buffer 1x για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
- Μεταφορά του δίσκου με τις πλάκες σε δοχείο με Blocking Solution 1x για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
- Τοποθέτηση χαρτιού Whatman νοτισμένου με Washing Buffer 1x στον πάτο πλαστικού κουτιού (το οποίο μπορεί να σφραγιστεί).
- Μεταφορά των πλακών στο κουτί και οριζόντια τοποθέτησή τους στο χαρτί Whatman.
- Μεταφορά με πιπέτα 1 ml Blocking Solution 1x που περιέχει anti-digoxigenin-AP 1:500 (150 mU/ml) και επώαση για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου.
- Τοποθέτηση των αντικειμενοφόρων πλακών στον ειδικό δίσκο, μεταφορά σε δοχείο που περιέχει Washing Buffer 1x και επώαση για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
- Μεταφορά του δίσκου με τις πλάκες σε δοχείο με Washing Buffer 1x και επώαση για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
- Μεταφορά του δίσκου σε δοχείο με Detection Buffer 1x για 3 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
- Μεταφορά των αντικειμενοφόρων πλακών και οριζόντια τοποθέτησή τους σε φωτοστεγανό πλαστικό κουτί.
- Προετοιμασία διαλύματος χρώσης αμέσως πριν τη χρήση: αραιώση μητρικού διαλύματος NBT/BCIP 1:50 (ή προετοιμασία μητρικών διαλυμάτων: NBT 75 mg/ml σε 70% διμέθυλ-φορμαμίδιο, BCIP 50 mg/ml σε H₂O και προσθήκη 45 μl μητρικού διαλύματος NBT+35 μl μητρικού διαλύματος BCIP ανά 10 ml Detection Buffer 1x που προαιρετικά περιέχει 10% πολυβίνυλ-αλκοόλη 89-98 kD) σε Detection Buffer 1x με 10% πολυβίνυλ-αλκοόλη 89-98 kD (όχι χρήση MgCl₂ για αποφυγή στικτού φόντου).

- Προσθήκη 1 ml διαλύματος χρώσης σε κάθε πλάκα και επώαση στο σκοτάδι (χωρίς ανακίνηση) έως την εμφάνιση μπλε χρώματος στις τομές (από 30 min έως όλο το βράδυ).
- Όταν εμφανιστεί η χρώση, οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετούνται στον ειδικό δίσκο συγκράτησης και μεταφέρονται σε δοχείο που περιέχει TE. Οι πλάκες μπορούν να διατηρηθούν στο διάλυμα έως την έγκλιση, αλλά όχι περισσότερο από μία εβδομάδα. Για παν ενδεχόμενο, καλό είναι να λαμβάνουμε μερικές φωτογραφίες σε αυτό το στάδιο, καθώς μερικές φορές χάνεται μέρος της χρώσης κατά τη διάρκεια της έγκλισης.

2.28. Προετοιμασία μέσου έγκλισης Mowiol 4-88

Για την πραγματοποίηση αυτού του βήματος έγιναν τα εξής:

- Προσθήκη 4.758 ml γλυκερόλης σε σωλήνα τύπου Falcon των 50 ml.
- Προσθήκη 2.4 g Mowiol 4-88 και ανακίνηση μέχρι ομογενοποίηση.
- Προσθήκη 6 ml ddH₂O και παραμονή για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου με ταυτόχρονη ανακίνηση.
- Προσθήκη 12 ml 0.2 M Tris (pH 8.5) και επώαση στους 50 °C έως τη διάλυση του Mowiol. Σποραδική ανακίνηση.
- Διαχωρισμός με φυγοκέντρηση στις 4,000-5,000 rpm για 20 min.
- Μεταφορά υπερκευμένου σε γυάλινους σωλήνες με βιδωτά καπάκια (περίπου 1 ml στον καθένα). Αποθήκευση στους -20 °C.

2.29. Έγκλιση αντικειμενοφόρων πλακών

Για την έγκλιση των αντικειμενοφόρων πλακών πραγματοποιήθηκε:

- Προθέρμανση σε θερμοκρασία δωματίου των σωλήνων που περιέχουν το μέσο έγκλισης Mowiol 4-88. Οι ανοιγμένοι σωλήνες μπορούν να αποθηκευθούν στους 4°C για περίπου ένα μήνα. Απόρριψη υλικού στο οποίο παρατηρείται κρυσταλλοποίηση.
- Τοποθέτηση 15-20 μl μέσου Mowiol 4-88 στις τομές όταν γίνεται χρήση καλυπτρίδας 22x22 mm και 40-50 μl μέσου Mowiol 4-88 για χρήση καλυπτρίδας 22x50 mm. Προσοχή στο μη σχηματισμό φυσαλίδων.
- Οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τις καλυπτρίδες αφήνονται στο σκοτάδι όλο το βράδυ για να πήξουν.

2.30. Μετασηματισμός σε ζύμες

Πριν το βιοχημικό χαρακτηρισμό των γονιδίων-στόχων στο σύστημα του *Saccharomyces cerevisiae*, είναι απαραίτητο να γίνει ο υποκυτταρικός τους εντοπισμός και στα κύτταρα της ζύμης. Για το λόγο αυτό, για το κάθε γονίδιο-στόχο, παρήχθησε αλληλουχία DNA που αντιστοιχεί στην υβριδική πρωτεΐνη-GFP με βοήθεια πλασμιδίων. Η αλληλουχία αυτή ενισχύθηκε με τη χρήση PCR και κατάλληλων εκκινητών και κλωνοποιήθηκε σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα ικανό να εκφράσει την υβριδική πρωτεΐνη στη ζύμη, υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του ισχυρού υποκινητή ζύμης PMA1. Ο υποκυτταρικός εντοπισμός του μεταφορέα αναλύθηκε με τη βοήθεια συνεστιακού σαρωτικού μικροσκοπίου laser. Πιο αναλυτικά:

- Αρχικά έγινε μία προκαλλιέργεια *S. cerevisiae* σε θρεπτικό υλικό YPD (0.5 g yeast extract, 1 g πεπτόνης, 1 g γλυκόζης ανά 50 ml) στους 30 °C.
- Ακολούθησε εμβολιασμός 4 ml από την προκαλλιέργεια της ζύμης σε 50 ml θρεπτικού YPD και επώαση για περίπου 4 h στους 30 °C (όχι παραπάνω από 5 h) και κατόπιν πραγματοποιήθηκε:
- Φυγοκέντρηση των ζυμών στις 2500 rpm για 10 min στους 20 °C.
- Επαναδιάλυση σε 40 ml TE 1x.
- Φυγοκέντρηση στις 2500 rpm για 10 min στους 20 °C.
- Επαναδιάλυση σε 2 ml οξικό λίθιο (CH₃COOLi) 1x/TE 0.5x.
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min.
- Για κάθε μετασηματισμό πραγματοποιήθηκε αποδιάταξη με θέρμανση 5 min (στους 100 °C) 100 μg κομμένου salmon sperm DNA και μεταφορά αυτού αμέσως στον πάγο. (Η προσθήκη του salmon sperm DNA αυξάνει την πιθανότητα να «επιβιώσει» το πλασμιδιακό DNA που χρησιμοποιείται. Μεγαλύτερη ποσότητα DNA αυξάνει την πιθανότητα να μην υποστεί ενζυμική πέψη ή να μην προσκολληθεί σε κυτταρική μεμβράνη το πλασμιδιακό DNA).
- Μετά την επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min, ακολούθησε:
- Μεταφορά 100 μl από την καλλιέργεια της ζύμης σε σωλήνα eppendorf.
- Προσθήκη 100 μg αποδιεταγμένου salmon sperm DNA, PEG-3350 40 %/TE 1x/700 μl CH₃COOLi 1x και ανάδευση με πιπέτα.
- Προσθήκη 1 μg του χρησιμοποιούμενου πλασμιδίου.

- Επώαση για 30 min στους 30 °C σε υδατόλουτρο.
- Προσθήκη 88 µl DMSO (για αύξηση της περατότητας των μεμβρανών) και καλή ανάδευση με πιπέτα.
- Επώαση για 7 min στους 42 °C σε heat-block (heat-shock).
- Αναμονή 1-2 min για ελάττωση της θερμοκρασίας.
- Φυγοκέντρηση για 12 sec στις 13.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου (spin-down).
- Αφαίρεση υπερκείμενου και αναδιάλυση ιζήματος ζυμών σε 1 ml TE 1x.
- Φυγοκέντρηση για 12 sec στις 13.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου.
- Αφαίρεση υπερκείμενου και επαναδιάλυση σε 100 µl TE 1x.
- «Στρώσιμο» σε τρυβλία με θρεπτικό MC (0.34 g yeast nitrogen base w/o amino acids, 0.09 g yeast synthetic drop-out medium w/ouracil, 1 g γλυκόζη ανά 50 ml) 1.5 % agar.

2.31. Ταυτοποίηση *Tnt1*-μεταλλαγμένων σειρών *M. truncatula*

Για το γονίδιο-στόχος εντοπίστηκαν μεταλλαγμένες σειρές *M. truncatula* στη βάση δεδομένων του *Tnt1*-μεταλλαγμένου πληθυσμού του Ινστιτούτου Noble (Plant Biology Division, Noble Foundation, Oklahoma, USA) Flanking Sequence Tags (FST database (<http://bioinfo4.noble.org/mutant>)). Χρησιμοποιώντας το εργαλείο BLAST εντοπίστηκαν μεταλλαγμένες σειρές στις οποίες το *Tnt1* ρετροτρανσποζόνιο έχει εισαχθεί και διακόψει την αλληλουχία του γονιδίου-στόχου.

Το *Tnt1* είναι ένα αυτόνομο ρετροτρανσποζόνιο 5.3 kB το οποίο έχει απομονωθεί από το φυτό του καπνού και δημιουργεί μια επανάληψη βάσεων στο σημείο εισαγωγής του. Η εισαγωγή του είναι τυχαία, αλλά διακόπτει συχνά γονίδια δείχνοντας μια «προτίμηση» σε περιοχές ευχρωματίνης και σε ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια. Στη μηδική το *Tnt1* ρετροτρανσποζόνιο προκαλεί 4 έως 40 εισαγωγές ανά μετασηματισμένο φυτό που είναι σταθερές κατά τον κύκλο ζωής του φυτού.

Μετά την παραλαβή των μετασηματισμένων σειρών, οι σπόροι φυτεύθηκαν και αναπτύχθηκαν, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Όταν φυτά αναπτύχθηκαν επαρκώς (3-4 εβδομάδες) έγινε απομόνωση γενωματικού DNA, ώστε τα φυτά να ελεγχθούν για ομοζυγωτία στη μετάλλαξη (απενεργοποίηση γονιδίου).

Η απομόνωση του γενωματικού DNA έγινε ως εξής:

- Λειοτρίβηση τριών φύλλων από κάθε φυτό σε γουδί με χρήση υγρού αζώτου.

- Προσθήκη στο γουδί 200 μl CTAB [(cetyl trimethyl ammonium bromide) extraction buffer (0.1 M Tris-HCl με pH=8, 0.02 M EDTA (Ethylene diamine tetra acetic acid) pH=8, 1.4 M NaCl, 2 % w/v CTAB, 1 % w/v PVP-40 (Polyvinyl pyrrolidone με μέσο μοριακό βάρος 40.000)] το οποίο έχει προθερμανθεί στους 65°C.
- Λόγω της μικρής ποσότητας του ιστού, έγινε και λειοτρίβηση με πλαστικό έμβολο μέσα σε eppendorf, παρουσία 200 μl CTAB extraction buffer (ρυθμιστικό εκχύλισης).
- Ανακίνηση και επώαση στους 65 °C για 10-30 min.
- Προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος Sevag (χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη=24:1) και καλή ανάμιξη με χρήση vortex.

Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 2 min σε θερμοκρασία δωματίου

- Μεταφορά της υδατικής (πάνω) φάσης σε νέο eppendorf.
- Προσθήκη 0.7 όγκου ισοπροπανόλης. Ανάμιξη με αναστροφή του eppendorf (10-15 φορές) και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min.
- Φυγοκέντρηση για 15 min στις 13.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου και αφαίρεση υπερκειμένου.
- Πλύσιμο ιζήματος DNA με 200-300 μl 70 % αιθανόλης.
- Φυγοκέντρηση για 5 min στις 13.000 rpm στους 4 °C.
- Αφαίρεση υπερκειμένου με προσοχή (το ίζημα αποχωρίζεται εύκολα).
- Επαναφυγοκέντρηση (spin down) για την αφαίρεση όσο το δυνατόν περισσότερης αιθανόλης.
- Ξήρανση ιζήματος σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 10 min.
- Επαναδιάλυση ιζήματος σε 40-50 μl ddH₂O ή TE.
- Επώαση στον πάγο για 10 min, vortex, spin down, και αποθήκευση στους -20 °C.

Το απομονωμένο DNA χρησιμοποιήθηκε σε τεχνική PCR με 3 διαφορετικά ζεύγη εκκινητών για ταυτοποίηση ομοζυγωτίας:

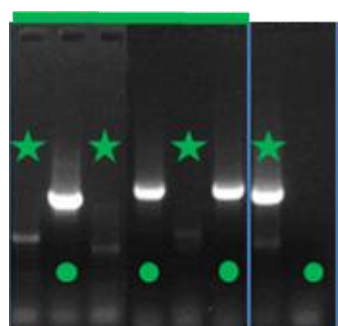
- Ένα ζεύγος που υβριδίζει έξω από την περιοχή εισαγωγής, ώστε να ενισχυθεί το γονίδιο αν δεν έχει διακοπεί από το *Tnt1* (το ένθετο στοιχείο είναι 5.3 kB, οπότε σε περίπτωση που έχει εισαχθεί στο γονίδιο δεν μπορεί να ενισχυθεί λόγω του μεγέθους του και των συνθηκών της PCR).

- Ένα ζεύγος όπου ο ένας εκκινητής (forward) υβριδίζει πριν τη θέση της ένθεσης και ο άλλος (reverse) εντός του μεταθετού στοιχείου (Tnt109–GCATTCAAACCTAGAAGACGATGCTACC).
- Ένα ζεύγος που ο ένας εκκινητής (forward) υβριδίζει εντός του μεταθετού στοιχείου (Tnt109) και ο άλλος (reverse) μετά τη θέση του μεταθετού στοιχείου (σε περίπτωση που η ένθεση έχει γίνει με αντίθετη κατεύθυνση).

Το πρόγραμμα PCR που χρησιμοποιήθηκε:

- Αρχική αποδιάταξη του DNA σε θερμοκρασία 94 °C για 3 min.
- Κύκλος που επαναλαμβάνεται 35 φορές και αποτελείται από τα βήματα:
 - Θερμική αποδιάταξη στους 94 °C για 4 min,
 - Υβριδισμό του εκκινητή στους 57 °C για 1 min (ανάλογα το T_m των εκκινητών),
 - Επιμήκυνση του εκκινητή για σύνθεση νέου κλώνου στους 72 °C για 1 min και 50 sec και
- Τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 5 min.

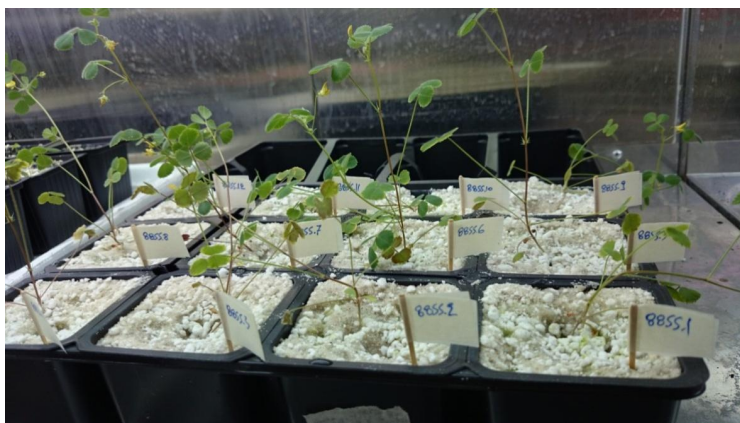
Κατά συνέπεια, μετά από ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης τα φυτά που εμφανίζουν ζώνη με το 2^ο ή το 3^ο ζεύγος εκκινητών, αλλά όχι με το 1^ο είναι ομοζυγωτά για τη μετάλλαξη. Στην **εικόνα 2.9** φαίνεται ένας τέτοιος έλεγχος, όπου το wild type (WT) φυτό εμφανίζει μία ζώνη με το ζεύγος εκκινητών που ενισχύει το γονίδιο, ενώ τα ομοζυγωτά μεταλλαγμένα φυτά εμφανίζουν ζώνη με το ζεύγος εκκινητών γονιδίου-*Tnt1*.



★ ★ : Gene primers
● ● : Gene-Tnt1 primers

Εικόνα 2.9: Ανάλυση gel αγαρόζης.

Τα φυτά τα οποία βρέθηκαν να είναι ομοζυγωτά για την εκάστοτε μετάλλαξη αναπτύχθηκαν μέχρι τη συλλογή σπόρων.



Εικόνα 2.10: *Tnt1* μεταλλαγμένες σειρές *M. truncatula* R108 σε παλέτα με γλαστράκια στο θάλαμο ανάπτυξης.

2.32. Προσδιορισμός της δραστηριότητας της νιτρογενάσης

Η δραστηριότητα της νιτρογενάσης των ριζοβίων εκτιμήθηκε με τη μέθοδο αναγωγής του ακετυλενίου, όπως αυτή περιγράφεται από τους Hardy et al. 1973. Η μέθοδος στηρίζεται στην αναγωγή του ακετυλενίου προς αιθυλένιο, η οποία καταλύεται από το ενζυμικό σύστημα της νιτρογενάσης που υπάρχει στους αζωτοδεσμευτικούς οργανισμούς. Η νιτρογενάση καταλύει αναγωγικές ATP-εξαρτώμενες αντιδράσεις μορίων που περιέχουν τριπλούς δεσμούς ($N\equiv N, CH\equiv CH$). Το παραγόμενο αιθυλένιο ανιχνεύεται με τη βοήθεια αέριο-χρωματογράφου.

Τα φυτά του *M. truncatula* τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια όγκου 28 ml (universal bottles) και κλείστηκαν αεροστεγώς με πώματα σιλικόνης (silicon rubber). Έπειτα, εισήχθη σε κάθε φιαλίδιο ακετυλένιο, ώστε η περιεκτικότητα να είναι περίπου στο 10 %. Τα φιαλίδια επωάζονταν στους 28 °C. Η δειγματοληψία έγινε από την αέρια φάση των δειγμάτων μετά από 1 h, 2 h και 3 h και ο προσδιορισμός του παραγόμενου αιθυλενίου έγινε σε αέριο-χρωματογράφο.

Ο αέριος-χρωματογράφος που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο Perkin-Elmer 8500 (GC) με ανιχνευτή φλόγας ιονισμού (FID), στήλη χρωματογραφίας Poropak-R 2 m με τις ακόλουθες συνθήκες ανάλυσης: θερμοκρασία εισόδου 200 °C, θερμοκρασία φούρνου 60 °C, φέρον αέριο He με ροή 20 ml/λεπτό. Η δραστηριότητα της νιτρογενάσης εκφράζεται σε ppm αιθυλενίου/h.mg νωπού βάρους φυματίων.

2.33. Μεταβολομική ανάλυση

2.33.1. Γενικά

Μεταβολομική ορίζεται ως η μεγάλης κλίμακας ποιοτική και ποσοτική μελέτη ενός δοθέντος βιολογικού συστήματος. Αντίθετα με τα μεταγραφήματα και τις

πρωτεΐνες, η μοριακή ταυτότητα δεν μπορεί να συναχθεί από γενωμικές πληροφορίες. Έτσι η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση πρέπει να βασιστεί σε σύγχρονα όργανα, όπως είναι η φασματογραφία μάζας MS (mass spectrometry), ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός NMR (nuclear magnetic resonance) και η ανίχνευση επαγόμενου από laser φθορισμού LIF (laser induced fluorescence). Η επιλογή κάθε τεχνολογίας εξαρτάται από το στόχο κάθε μελέτης και συνήθως είναι ένας συμβιβασμός μεταξύ ευαισθησίας, επιλεκτικότητας και ταχύτητας.

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

2.33.2 Χρωματογραφία

Η χρωματογραφία είναι μια σύγχρονη μέθοδος διαχωρισμού μέρους ή όλων των συστατικών ενός δείγματος με διαδοχικές δεσμεύσεις και αποδεσμεύσεις αυτών στην επιφάνεια μιας στερεής ή υγρής φάσης με τη βοήθεια ρευστού που κινείται προς ορισμένη κατεύθυνση.

Η χρωματογραφία χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη δύο φάσεων μιας στατικής και μιας κινητής. Η στατική φάση μπορεί να είναι στερεή ή υγρή, ενώ η κινητή μπορεί να είναι υγρή ή αέρια. Αν η στατική φάση είναι στερεή, η χρωματογραφική μέθοδος χαρακτηρίζεται χρωματογραφία προσρόφησης. Αν είναι υγρή χαρακτηρίζεται χρωματογραφία κατανομής.

Από το συνδυασμό των δύο φάσεων δημιουργούνται τέσσερις τύποι χρωματογραφίας.

- α. Χρωματογραφία υγρού – στερεού.
- β. Χρωματογραφία αερίου – στερεού.
- γ. Χρωματογραφία υγρού – υγρού.
- δ. Χρωματογραφία αερίου – υγρού.

Ανάλογα με το φυσικό φαινόμενο που λαμβάνει χώρα διακρίνονται τα ακόλουθα είδη χρωματογραφίας.

1. Χρωματογραφία κατανομής (partition).
2. Χρωματογραφία προσρόφησης (adsorption).
3. Χρωματογραφία ιονανταλλαγής (ion-exchange).

Ανάλογα με το είδος της συσκευής έχουμε τα ακόλουθα είδη χρωματογραφίας.

- Χρωματογραφία χάρτου ή χαρτοχρωματογραφία (Paper chromatography) .
- Χρωματογραφία στήλης (Column chromatography).
- Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin layer chromatography) .
- Χρωματογραφία αερίου (Gas chromatography)
- Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC)

Η χρωματογραφία χρησιμοποιείται:

α. Για το διαχωρισμό των συστατικών πολύπλοκων μιγμάτων, ακόμη και ισομερών ή ουσιών με παραπλήσια χημική σύσταση.

β. Για καθαρισμό μιγμάτων ή ουσιών.

γ. Για ποιοτικούς σκοπούς.

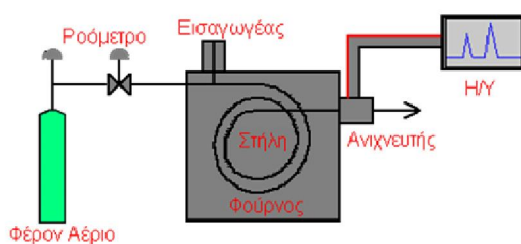
δ. Για ποσοτικούς σκοπούς.

ε. Για παρασκευαστικούς σκοπούς.

2.33.3. ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ (GC)

Αέρια χρωματογραφία είναι η μέθοδος διαχωρισμού ενός μίγματος στα συστατικά του με τη βοήθεια μιας στατικής φάσης (υγρής ή στερεής) και μιας αέριας που κινείται μέσα σε ειδική στήλη.

Η αέρια χρωματογραφία εφαρμόζεται για αναλύσεις οργανικών ουσιών με τάση ατμών τουλάχιστον 10 mm Hg, και σημεία ζέσεως θεωρητικά μέχρι 400 °C πρακτικά μέχρι 350 °C. Δε χρησιμοποιείται για προσδιορισμούς ανόργανων συστατικών.



Εικόνα 2.11: Σχηματικό διάγραμμα αεριοχρωματογράφου.

Τα κύρια μέρη του αεριοχρωματογράφου είναι :

α. Φέρον αέριο

Είναι αδρανές αέριο N_2 , He ή Ar το οποίο δεν αντιδρά με τη στατική φάση. Μεταφέρει τα συστατικά του μίγματος μέσα στη στήλη, όπου διαχωρίζονται το ένα μετά το άλλο.

Είναι αέρια υψηλής καθαρότητας τα οποία περνούν από μοριακά κόσκινα για να απαλλαγούν και από το τελευταίο ίχνος υγρασίας.

β. Ρυθμιστής πίεσης

Η διαφορά πίεσης παίζει καθοριστικό ρόλο στο διαχωρισμό. Συνήθως στην είσοδο της στήλης είναι 2-3 mm Hg, ενώ στην έξοδο ισούται με την ατμοσφαιρική.

γ. Θάλαμος εξαέρωσης

Είναι ο θάλαμος, όπου το δείγμα θερμαίνεται στην κατάλληλη θερμοκρασία για να εξαερωθεί.

δ. Στήλη

Η στήλη κατασκευάζεται συνήθως από ανοξείδωτο χάλυβα αλουμίνιο ή γυαλί. Το μήκος της κυμαίνεται από 1 m έως 100 m (τριχοειδείς στήλες). Η διάμετρος της ποικίλλει από 3/8 της ίντσας (παρασκευαστική) έως 1/8 ίντσες για ειδικούς διαχωρισμούς. Οι στήλες διακρίνονται σε στήλες πλήρωσης (Packed) και επικάλυψης (Coated).

ε. Ανιχνευτής

Με αυτόν ανιχνεύονται οι ουσίες που εξέρχονται από τη στήλη. Τα κυριότερα χαρακτηριστικά του είναι: α) η ευαισθησία $\Delta R/\Delta Q$, όπου R η απόκριση και Q η ποσότητα της ουσίας, β) η γραμμικότητα, το όριο της οποίας ορίζεται από το σημείο στο οποίο αρχίζει να αποκλίνει η ευθεία γραμμή, γ) η σταθερότητα, δ) ο χρόνος απόκρισης, ε) η χημική δραστηριότητα

Οι σπουδαιότεροι ανιχνευτές είναι: i) ο ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας (TCD), ο ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (FID) και ο ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD).

2.33.4. ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η ποιοτική ανάλυση στηρίζεται στον ανηγμένο χρόνο κατακράτησης t_R ή τον ανηγμένο όγκο κατακράτησης V_R . Ως χρόνος κατακράτησης ορίζεται ο χρόνος που μεσολαβεί από τη στιγμή της εισόδου του δείγματος στο θάλαμο εξαέρωσης μέχρι του μεγίστου της κορυφής που αντιστοιχεί στο συστατικό.

Όγκος κατακράτησης V_R ορίζεται το γινόμενο του χρόνου κατακράτησης επί τον όγκο του φέροντος αερίου που πέρασε από το σύστημα από τη στιγμή της εισόδου του δείγματος μέχρι το μέγιστο της κορυφής.

$$V_R = t_r \cdot V$$

Για τον ποιοτικό προσδιορισμό χρησιμοποιούνται οι χρόνοι κατακράτησης (retention times, t_r). Υπάρχει ο απόλυτος και ο σχετικός χρόνος κατακράτησης.

Ως απόλυτος χρόνος κατακράτησης t_x ορίζεται ο χρόνος που μεσολαβεί από τη στιγμή της εισόδου του δείγματος στη συσκευή μέχρι το μέγιστο της κορυφής που αντιστοιχεί στη συγκεκριμένη ουσία.

Ο σχετικός χρόνος κατακράτησης t_r είναι ο λόγος του χρόνου κατακράτησης μιας ουσίας προς το χρόνο κατακράτησης ενός πρότυπου συστατικού t_s

$$t_r = t_x / t_s$$

Για την ερμηνεία των χρωματογραφημάτων χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο ο σχετικός χρόνος κατακράτησης, γιατί ο απόλυτος χρόνος κατακράτησης εξαρτάται από τις συνθήκες λειτουργίας του οργάνου.

Για την **ποιοτική ανίχνευση** των διαφόρων ουσιών στην αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιούνται και οι λεγόμενοι δείκτες Kovats I.

Ο δείκτης Kovats ορίζεται ως εξής:

$$I = 100z + 100 \{(\log t_{r,x} - \log t_{r,z}) / (\log t_{r,z+1} - \log t_{r,z})\}$$

Κατά τη μέθοδο αυτή μαζί με την άγνωστη ουσία συγχρωματογραφούνται δύο αλκάνια με z και $z+1$ άτομα άνθρακα που είναι τέτοια ώστε ο χρόνος κατακράτησης της υπό εξέταση ουσίας $t_{r,x}$ να είναι μεταξύ των χρόνων κατακράτησης των αλκανίων $t_{r,z} < t_{r,x} < t_{r,z+1}$. Εφαρμόζοντας τον παραπάνω τύπο υπολογίζεται ο δείκτης Kovats της άγνωστης ουσίας x και από πίνακες δεδομένων ταυτοποιείται η ουσία. Ο δείκτης αυτός είναι σταθερός και χαρακτηριστικός για κάθε ουσία εφόσον χρησιμοποιείται η ίδια στήλη. Εξ' ορισμού ο δείκτης Kovats είναι $100z$ για όλους τους κανονικούς υδρογονάνθρακες. Το $I/100$ είναι ο κλασματικός αριθμός των ατόμων του άνθρακα σε ένα υποθετικό αλκάνιο που έχει τον ίδιο χρόνο κατακράτησης με την εξεταζόμενη ένωση.

Χάρην ευκολίας (σε γραμμικό θερμοκρασιακό πρόγραμμα ανάλυσης) χρησιμοποιούνται οι γραμμικοί δείκτες κατακράτησης (linear retention index) που δεν απαιτούν χρήση λογαρίθμων και απαιτούνται οι απόλυτοι χρόνοι κατακράτησης και όχι οι ανηγμένοι

$$LRI = 100z + 100 \{ (t_{rx} - t_{rz}) / (t_{rz+1} - t_{rz}) \}$$

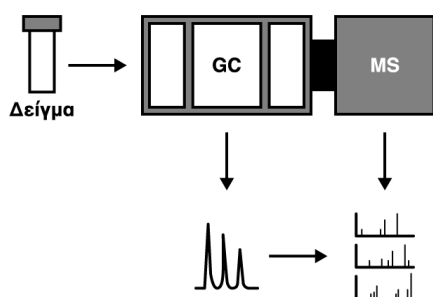
2.33.5. Φασματομετρία μαζών

Η φασματομετρία μάζας είναι μια μέθοδος κατά την οποία ηλεκτρόνια σχετικά υψηλής ενεργειακής στάθμης προσκρούουν σε μόρια μιας ένωσης που βρίσκεται στην αέρια φάση και παράγουν ιόντα με θετικό συνήθως φορτίο. Τα παραχθέντα ιόντα διαχωρίζονται στη συνέχεια ανάλογα με το λόγο μάζας προς το φορτίο m/z . Πρόκειται για μια σύγχρονη τεχνική με μεγάλες δυνατότητες και εφαρμογές. Μπορεί να συνδυαστεί με αεριοχρωματογραφία GC ή υγρή χρωματογραφία LC δίνοντας έτσι συνδυασμένες τεχνικές GC/MS ή LC/MS.

Τα κυριότερα πλεονεκτήματά της είναι η αυξημένη ευαισθησία της και η υψηλή ικανότητα ταυτοποίησης ουσιών. Μειονέκτημα είναι το μεγάλο κόστος των οργάνων και της συντήρησης.

2.33.6. Οργανολογία

Τα κυριότερα μέρη του φασματογράφου μαζών φαίνονται στο παρακάτω σχήμα.



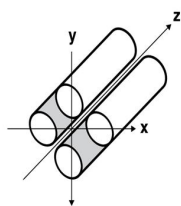
Εικόνα 2.12: Σχηματική παράσταση αεριοχρωματογράφου-φασματογράφου μαζών.

Ο φασματογράφος μάζας αποτελείται από το σύστημα εισαγωγής, την πηγή ιόντων, τον αναλυτή μαζών [διαχωρίζει τα ιόντα σύμφωνα με τις μάζες τους (m/z)], τον ανιχνευτή και τον καταγραφέα (αναλύεται περιληπτικά ο τετραπολικός αναλυτής).

2.33.7. Τετραπολικών μαζών (quadrupole analyzer)

Αποτελούνται από 4 πόλους συμμετρικά τοποθετημένους ως προς τη δέσμη των ιόντων και συνδεδεμένους μεταξύ τους ηλεκτρικά (διαγώνια σύνδεση). Κάθε ζεύγος συνδέεται με τον πόλο τάσης που περιέχει μια συνεχή και μια εναλλασσόμενη υψίσυχνη συνιστώσα. Για ορισμένες τιμές V_1 και V_2 μόνο ορισμένα ιόντα διέρχονται από τον τετραπολικό αναλυτή, ενώ τα άλλα χάνουν το φορτίο τους προσκρούοντας στους πόλους.

Οι μάζες που μπορούν να αναλυθούν έχουν μέγιστη τιμή 1200, αλλά πλεονεκτεί στο ότι επιτρέπει τη λήψη φάσματος μαζών σε ελάχιστο χρόνο.



Εικόνα 2.12: Σχηματικό διάγραμμα τετράπολου

2.33.8. Συλλογή Ιόντων και Καταγραφή

Για τη συλλογή των ιόντων και την καταγραφή τους υπάρχουν δύο μέθοδοι: i) η ηλεκτρονική, όπου οι δέσμες ιόντων συλλέγονται σ' έναν πολλαπλασιαστή ηλεκτρονίων, ενισχύεται το σήμα και καταγράφεται και ii) η φωτογραφική, όπου η ένταση των ιόντων που φθάνουν στον ανιχνευτή καταγράφεται και παρουσιάζεται με τη μορφή του συνόλου των εντάσεων των ιόντων (TIC, total ion current) ως γράφημα παρόμοιο με αυτό ενός τυπικού αέριου χρωματογράφου. Στον άξονα Y καταγράφεται η ένταση του συνόλου των ιόντων που φθάνουν στον ανιχνευτή, ενώ στον άξονα X παρουσιάζεται ο χρόνος ή οι αριθμοί σάρωσης (scan numbers). Σε κάθε αριθμό σάρωσης το όργανο έχει 'σαρώσει' ένα πλήρες εύρος περιοχής λόγων m/z (π.χ 40-500 m/z). Οι φασματογράφοι μαζών μπορούν να ρυθμιστούν έτσι ώστε να σαρώνουν ένα εύρος m/z από 10 μέχρι 1 φορά/s. Επομένως κάθε αριθμός σάρωσης αντιστοιχεί με ένα φάσμα μάζας σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή. Με αυτόν τον τρόπο λαμβάνουμε τα φάσματα μάζας ολικής σάρωσης (full scan).

Ένας άλλος τρόπος ανάλυσης με φασματογράφο μάζας είναι η τεχνική σάρωσης ιόντων με συγκεκριμένο λόγο m/z και όχι ολόκληρης περιοχής m/z . Αυτή αναφέρεται ως SIM (Single Ion Monitoring). Με τον τρόπο αυτόν αυξάνεται σημαντικά η ευαισθησία, η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα, αλλά χάνονται οι πληροφορίες που αφορούν τη δομή της ανιχνευόμενης ουσίας (Γαλανού και Βουδούρη 1975, Βουδούρης και Κοντομηνάς 1987, Πολυχρονιάδου-Αληχανίδου 1990, Pomeranz and Meloan 1994, Χατζηγιωάννου 1996, Skoog et al. 1998).

2.33.9. Εκχύλιση μεταβολιτών

Για την εκχύλιση των μεταβολιτών έγιναν τα παρακάτω:

- Λειοτρίβηση του φυτικού ιστού με υγρό άζωτο.
- Προσθήκη 395 μ l μεθανόλης και 5 μ l ριβιτόλης (1mg/ml) σε 20 mg φυματίων.

- Επώαση για 15 λεπτά στους 70 °C με συνεχή ανακίνηση.
- Προσθήκη 200μl γλωροφορμίου και vortex.
- 5 λεπτά στους 37 °C υπό συνεχή ανακίνηση
- Προσθήκη 400 μl ddH₂O και vortex.
- Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 5 λεπτά.
- Τοποθέτηση της υπερκείμενης φάσης σε νέα erpendorf (κλάσματα των 250 μl).
- Εξάτμιση των δειγμάτων σε αέριο άζωτο.

2.33.10. Παραγωγοποίηση (derivatization)

Με την παραγωγοποίηση επιτυγχάνεται η μετατροπή μιας χημικής ένωσης σε ένα νέο προϊόν παρόμοιας χημικής σύστασης με νέες χημικές ιδιότητες, οι οποίες καθιστούν τα μόρια καταλληλότερα για διαχωρισμό και ποσοτικοποίηση κατά τη χρωματογραφική ανάλυση. Με την τεχνική του GC-MS μπορεί να γίνει ανάλυση μόνο ενώσεων που είναι πτητικές και θερμοσταθερές. Η χημική παραγωγοποίηση των δειγμάτων στόχευσε στην απόδοση των προς ανάλυση ουσιών των δύο αυτών ιδιοτήτων και για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν οι ακόλουθοι χειρισμοί. Προστέθηκε η ομάδα CH₃-O-NH₂ (μεθοξυαμίνη), ώστε να επιτευχθεί η σταθεροποίηση των καρβονυλικών ομάδων (=C=O) και να παρεμποδιστεί ο κετο-ενολ ταυτομερισμός και ο σχηματισμός πολλαπλών ακέτυλ- ή κέτυλ- δομών. Προστέθηκε επίσης πυριτική ομάδα (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, -NH₂, -SH από την ομάδα -Si(CH₃)₃. Έτσι μη πτητικές ενώσεις μπορούν να μετασχηματιστούν σε περισσότερο πτητικά προϊόντα, αφού με την προσθήκη μιας νέας ομάδας μετατρέπονται σε λιγότερο πολικές ενώσεις.

Η παραγωγοποίηση πραγματοποιήθηκε ως εξής:

- Προσθήκη σε κάθε δείγμα 25 μl MOX (σε 1ml άνυδρης πυριδίνης διαλύονται 20 mg υδροχλωρική μεθοξυαμίνη).
- Τοποθέτηση των δειγμάτων σε θερμο-αναδευτήρα και ανάδευση στις 1200 rpm για 90 min στους 30 °C.
- Σύντομη φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 30 s.

- Προσθήκη 75μl MSTFA [N-methyl-n- (trimethylsilyl) trifluoroacetamide) σε κάθε δείγμα.
- Επώαση των δειγμάτων στους 37 °C για 30 min με ήπια ανάδευση στις 1200 rpm.
- Σύντομη φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm για 2 min στους 20 °C.
- Μεταφορά του υπερκειμένου σε 100 μl glass micro-inserts (0,1mm x 15mm, VMR, Darmstadt, Germany) και τοποθέτηση των micro-inserts σε 1,5 ml γυάλινα φιαλίδια αέριας χρωματογραφίας (VMR, Darmstadt, Germany), τα οποία με τη βοήθεια ειδικού εργαλείου σφραγίστηκαν αεροστεγώς με ειδικά καπάκια (VMR, Darmstadt, Germany).
- Τα δείγματα έμειναν σε ηρεμία για 2 ώρες πριν εγχυθούν στο GC-MS.

2.33.11. Αέριος χρωματογραφία-Φασματομετρία μάζας (GC-MS) στα πειράματα

Η αεριοχρωματογραφική ανάλυση για τα φυτά A17 και R108 του *M. truncatula* πραγματοποιήθηκε με αέριο χρωματογράφο Agilent (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) GC 7890N, ο οποίος είναι εξοπλισμένος με τετραπολικό φασματογράφο μάζας ως ανιχνευτή 5975C Inert XL EI/CI (Agilent Technologies, Palo Alto, USA). Έγινε έγχυση 1μl δείγματος 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 min και αύξηση στους 325 °C με ρυθμό 5 °C/min, όπου διατηρείται για 10 min. Ο συνολικός χρόνος διέλευσης ήταν 61 min. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν: HP-5MS 5 % Phenyl Methyl Silox, μήκους: 30 m, διαμέτρου: 0,25 mm και πάχους: 0,25 μm (Agilent Technologies, Palo Alto, USA).

Για την ανάλυση των χρωματογραφημάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution & 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 τη βιβλιοθήκη Golm με βάση το χρόνο έκλυσης από τη χρωματογραφία και την ομοιότητα των φασμάτων μαζών. Η επαναληψιμότητα των μεταβολιτών ελέγχθηκε για κάθε έναν μεταβολίτη χωριστά και κάποιος μεταβολίτης απορριπτόταν σε περίπτωση που δεν επαναλαμβανόταν σε τουλάχιστον 60 % των επαναλήψεων. Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι

τιμές του εμβαδού της κορυφής κάθε μεταβολίτη (X_i). Η κανονικοποίηση έγινε ως προς την τιμή που λήφθηκε για τη ριβιτόλη, η οποία είχε προστεθεί σε όλα τα δείγματα ως μεταβολίτης αναφοράς, καθώς 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.

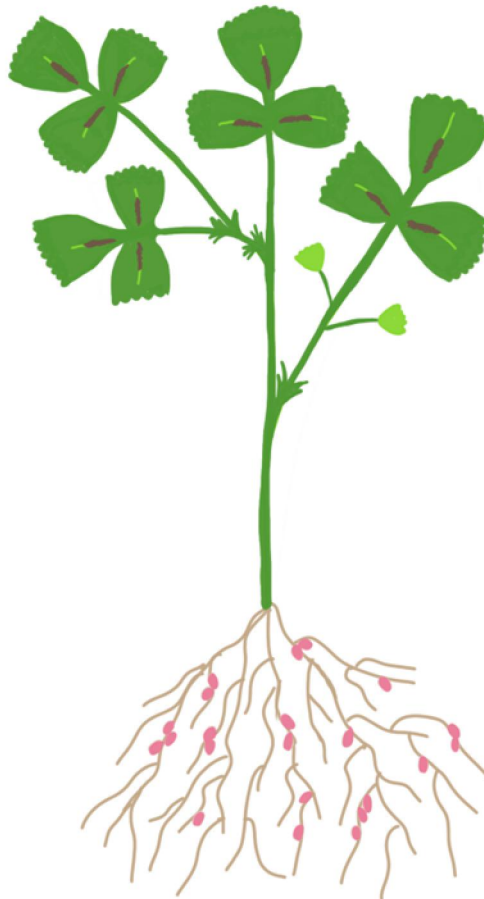
2.34. Στατιστική ανάλυση

Η μεταγραφομική και μεταβολομική ανάλυση πραγματοποιήθηκαν σε τρία ή πέντε αντίστοιχα σετ φυτών τα οποία αναπτύχθηκαν ανεξάρτητα χρησιμοποιώντας τα ως βιολογικές επαναλήψεις. Η στατιστική επεξεργασία έγινε με χρήση του προγράμματος SPSS Statistics Software 23 (IBM Corporation, Armonk, New York, USA) και ανάλυση δοκιμασίας (one-way ANOVA) για 95 % επίπεδο σημαντικότητας με τη χρήση του post-hoc Tukey HSD (Honestly Significant Difference) ανά ζεύγος. Πραγματοποιήθηκε επίσης 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. Η κατασκευή επίσης των διαγραμμάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος SigmaPlot 12.0. Τέλος, οι θερμικοί χάρτες και οι κατά συστάδες ταξινόμηση (clustered heat map) του κατά ζεύγη συντελεστή συσχέτισης του Pearson, μεταξύ των σχετικών επιπέδων έκφρασης των *MtMSTs*, έγινε με χρήση της διαδικτυακής πλατφόρμας MetaboAnalyst version 3.0 (Systat Software Inc.) (Xia and David 2016).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μέρος 1ο

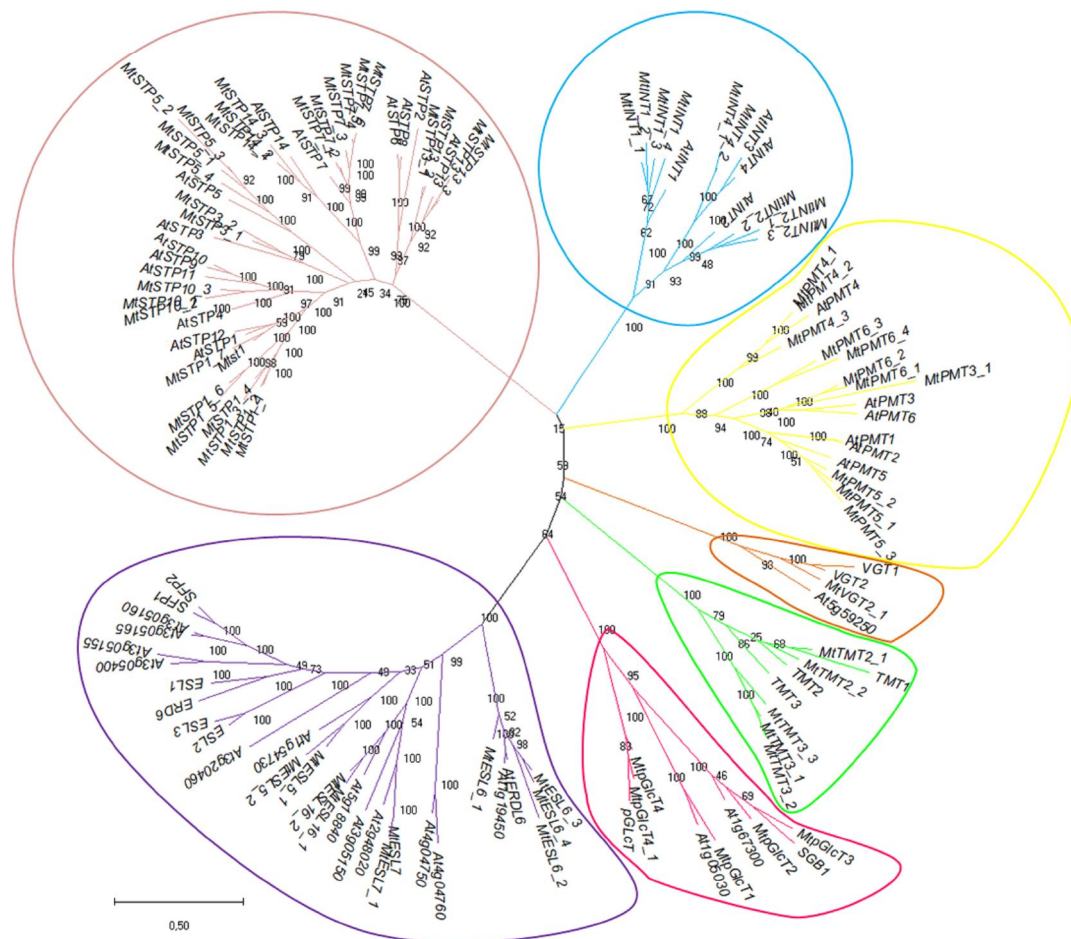
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3



3. Αποτελέσματα-Μέρος 1ο

3.1. Η οικογένεια των γονιδίων μεταφορέων μονοσακχαριτών MSTs του *M.truncatula*

Πραγματοποιήθηκε εκτεταμένη *in silico* αναγνώριση γονιδίων μεταφορέων μονοσακχαριτών (MSTs) του *M.truncatula* με τη χρήση των διεθνών βάσεων δεδομένων από τον Άτλαντα Γονιδιακής Έκφρασης του *M.truncatula* (MtGEA, <http://mtgea.noble.org/v2>) που αφορά στα επίπεδα της μεταγραφής των γονιδίων του *M. truncatula* στα διαφορετικά φυτικά όργανα, και NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) και IMGAG (<http://www.medicago.org/genome>) που αφορούν στο γονιδίωμα του φυτού. Σαν αποτέλεσμα αυτής της έρευνας φάνηκε ότι η οικογένεια των MSTs αποτελείται από 71 γονίδια στο *M.truncatula* και τα οποία όπως διαπιστώθηκε από την ανακατασκευή των φυλογενετικών τους σχέσεων με τη χρήση της μεθόδου ML (maximum likelihood) και της μεθόδου αυτοδυναμίας (bootstrapping) (Εικόνα 3.1) χωρίζονται σε 7 υποοικογένειες οι οποίες περιλαμβάνουν: 30 γονίδια η οικογένεια των STPs, 9 γονίδια η οικογένεια των INTs, 11 αυτή των PMTs, 10 των ESLs, 5 των TMTs, 5 των pGlcTs και 1 των VGTs. Ο πίνακας 3.1 περιέχει αναλυτικές πληροφορίες για τα παραπάνω γονίδια.



Εικόνα 3.1: Φυλογενετικό δένδρο της οικογένειας των μεταφορέων μονοσακχαριτών του *M. truncatula* και του *Arabidopsis thaliana* (STP: sugar transport protein, PMT: polyol/monosaccharide transporter, INT: inositol transporter, TMT: tonoplast membrane transporter, VGT: vacuolar glucose transporter, pGlcT/SGB1: plastidic glucose transporter/suppressor of G Protein Beta 1, ESL: early-responsive to dehydration six-like). Το δενδρόγραμμα δημιουργήθηκε με τη χρήση ML και JTT μοντέλου και 100 αντιγράφων αυτοδυναμίας (bootstrap replicates). Τα νούμερα σε κάθε κλάδο αντιστοιχούν στις τιμές αυτοδυναμίας (bootstrapping) τους.

Πίνακας 3.1: Αριθμός καταχώρησης, όνομα γονιδίου, και θεωρητική λειτουργία των γονιδίων που κωδικοποιούν για μεταφορείς μονοσακχαριτών.

Αριθμός καταχώρησης	Όνομα γονιδίου	Θεωρητική λειτουργία
Medtr3g093010	<i>MtSTP1_1</i>	μεταφορέας εξοζών 1, πρωτεΐνη μεταφορέας (carrier) σακχάρων c
Medtr3g007910	<i>MtSTP1_2</i>	μεταφορέας εξοζών
Medtr3g093060	<i>MtSTP1_3</i>	μεταφορέας εξοζών, πρωτεΐνη μεταφορέας (carrier) σακχάρων c
Medtr5g041550	<i>MtSTP1_4</i>	μεταφορέας εξοζών 1, πρωτεΐνη μεταφορέας σακχάρων 1
Medtr3g023480	<i>MtSTP1_5</i>	μεταφορέας εξοζών 1, πρωτεΐνη μεταφορέας σακχάρων 1
Medtr0009s0370	<i>MtSTP1_6</i>	μεταφορέας σακχάρων (SP) οικογένειας MFS, πρωτεΐνη μεταφορέας (carrier) σακχάρων c
Medtr4g090600	<i>MtSTP1_7</i>	πρωτεΐνη μεταφορέας (carrier) σακχάρων c, μεταφορέας πολυσακχαριτών/πολυολών 1
Medtr4g091370	<i>Mtst1</i>	πρωτεΐνη μεταφορέας σακχάρων 1
Medtr3g008160	<i>MtSTP3_1</i>	πρωτεΐνη μεταφορέας (carrier) εξοζών HEX6
Medtr3g008170	<i>MtSTP3_2</i>	πρωτεΐνη μεταφορέας (carrier) εξοζών HEX6
Medtr3g074390	<i>MtSTP5_1</i>	πρωτεΐνη μεταφοράς σακχάρων 5, πιθανός συμμεταφοράς μονοσακχαριτών-H ⁺
Medtr3g074400	<i>MtSTP5_2</i>	πιθανός συμμεταφοράς

		μονοσακχαριτων-H+
Medtr3g074410	<i>MtSTP5_3</i>	πρωτεΐνη μεταφοράς σακχάρων 5, πιθανός συμμεταφορέας μονοσακχαριτων-H ⁺
Medtr3g074270	<i>MtSTP5_4</i>	πρωτεΐνη μεταφοράς σακχάρων 5, πιθανός συμμεταφορέας μονοσακχαριτων-H ⁺
Medtr5g094760	<i>MtSTP7_1</i>	μεταφορέας εξοζών, πρωτεΐνη μεταφοράς σακχάρων 7
Medtr7g091690	<i>MtSTP7_2</i>	μεταφορέας εξοζών, πρωτεΐνη μεταφορέας σακχάρων 7
Medtr0204s0020	<i>MtSTP7_3</i>	πρωτεΐνη μεταφορέας σακχάρων 7
Medtr4g116790	<i>MtSTP7_4</i>	μεταφορέας εξοζών, πρωτεΐνη μεταφορέας σακχάρων 7
Medtr4g116770	<i>MtSTP7_5</i>	μεταφορέας εξοζών, πρωτεΐνη μεταφορέας σακχάρων 7
Medtr0204s0040	<i>MtSTP7_6</i>	μεταφορέας εξοζών, πρωτεΐνη μεταφοράς σακχάρων 7
Medtr1g038600	<i>MtSTP10_1</i>	μεταφορέας σακχάρων (SP) οικογένειας μεταφορών MFS
Medtr1g038630	<i>MtSTP10_2</i>	πρωτεΐνη μεταφορέας σακχάρων 10
Medtr5g082540	<i>MtSTP10_3</i>	πρωτεΐνη μεταφορέας σακχάρων 10
Medtr1g104780	<i>MtSTP13</i>	μεταφορέας εξοζών, πρωτεΐνη μεταφορέας σακχάρων 13
Medtr1g104750	<i>MtSTP13_1</i>	μεταφορέας εξοζών, πρωτεΐνη μεταφορέας σακχάρων 13
Medtr1g104770	<i>MtSTP13_2</i>	μεταφορέας εξοζών, πρωτεΐνη μεταφορέας σακχάρων 13
Medtr5g006070	<i>MtSTP13_3</i>	μεταφορέας εξοζών, πρωτεΐνη μεταφορέας σακχάρων 13
Medtr6g088375	<i>MtSTP14_1</i>	πρωτεΐνη μεταφορέας

		σακχάρων 14
Medtr6g087040	<i>MtSTP14_2</i>	πρωτεΐνη μεταφορέας σακχάρων 14
Medtr8g102860	<i>MtSTP14_3</i>	πρωτεΐνη μεταφορέας σακχάρων 14
Medtr7g005910	<i>MtINT1_1</i>	μεταφορέας ινοσιτόλης 1, μεταφορέας γενικού υποστρώματος
Medtr1g116660	<i>MtINT1_2</i>	μεταφορέας ινοσιτόλης 1, μεταφορέας γενικού υποστρώματος
Medtr1g116650	<i>MtINT1_3</i>	μεταφορέας ινοσιτόλης, μεταφορέας σακχάρων (SP) οικογένειας MFS
Medtr3g084110	<i>MtINT1_4</i>	μεταφορέας ινοσιτόλης 1, μεταφορέας γενικού υποστρώματος
Medtr2g048720	<i>MtINT2_1</i>	πιθανός μεταφορέας ινοσιτόλης 2, μεταφορέας γενικού υποστρώματος
Medtr2g049020	<i>MtINT2_2</i>	πιθανός μεταφορέας ινοσιτόλης 2, μεταφορέας υδατανθράκων/μεταφορέας σακχάρων
Medtr5g077580	<i>MtINT2_3</i>	μεταφορέας ινοσιτόλης
Medtr2g026140	<i>MtINT4_1</i>	μεταφορέας μυο-ινοσιτόλης
Medtr2g026160	<i>MtINT4_2</i>	μεταφορέας ινοσιτόλης 4
Medtr3g116060	<i>MtTMT2_1</i>	πρωτεΐνη μεταφορέας εντοπισμού 2
Medtr3g118530	<i>MtTMT2_2</i>	πρωτεΐνη μεταφορέας εντοπισμού 2
Medtr5g024740	<i>MtTMT3_1</i>	πρωτεΐνη μεταφορέας εντοπισμού 3
Medtr5g044910	<i>MtTMT3_2</i>	πρωτεΐνη μεταφορέας εντοπισμού 2
Medtr8g073100	<i>MtTMT3_3</i>	πρωτεΐνη μεταφορέας εντοπισμού 2
Medtr5g019870	<i>MtPMT3_1</i>	πιθανή πρωτεΐνη μεταφορέας πολυολών 3
Medtr6g007340	<i>MtPMT4_1</i>	μεταφορέας μαννιτόλης, πιθανός μεταφορέας πολυολών 4
Medtr7g446340	<i>MtPMT4_2</i>	μεταφορέας μαννιτόλης, πιθανός μεταφορέας πολυολών 4

Medtr2g013310	<i>MtPMT4_3</i>	πιθανός μεταφορέας πολυολών 4
Medtr3g116240	<i>MtPMT5_1</i>	μεταφορέας μαννιτόλης, μεταφορέας πολυολών 5
Medtr4g069500	<i>MtPMT5_2</i>	μεταφορέας πολυολών 5, μεταφορέας μονοσακχαριτών/πολυολών
Medtr4g072030	<i>MtPMT5_3</i>	σορβιτόλη-like μεταφορέας, μεταφορέας πολυολών 5
Medtr5g075300	<i>MtPMT6_1</i>	πιθανός μεταφορέας πολυολών 6
Medtr8g077890	<i>MtPMT6_2</i>	πιθανός μεταφορέας πολυολών 6
Medtr6g088450	<i>MtPMT6_3</i>	μεταφορέας μυο-ινοσιτόλης, μεταφορέας πολυολών 5
Medtr8g103500	<i>MtPMT6_4</i>	πιθανός μεταφορέας πολυολών 6, μεταφορέας πολυολών 5
Medtr7g113960	<i>MtESL5_1</i>	μεταφορέας σακχάρων ERD6-like 5
Medtr7g113970	<i>MtESL5_2</i>	μεταφορέας σακχάρων ERD6-like 5, μεταφορέας γενικού υποστρώματος
Medtr1g022315	<i>MtESL6_1</i>	μεταφορέας σακχάρων ERD6-like 6
Medtr8g077300	<i>MtESL6_2</i>	μεταφορέας σακχάρων ERD6-like 6
Medtr8g077310	<i>MtESL6_3</i>	μεταφορέας σακχάρων ERD6-like 6
Medtr5g020270	<i>MtESL6_4</i>	μεταφορέας σακχάρων ERD6-like 6
Medtr7g094110	<i>MtESL7</i>	μεταφορέας σακχάρων ERD6-like 7
Medtr7g094450	<i>MtESL7_1</i>	μεταφορέας σακχάρων (SP) οικογένειας MFS
Medtr2g020710	<i>MtESL16_1</i>	μεταφορέας σακχάρων ERD6-like 16
Medtr4g118610	<i>MtESL16_2</i>	μεταφορέας σακχάρων ERD6-like 16
Medtr3g080240	<i>MtpGlcT1</i>	πιθανός μεταφορέας γλυκόζης πλαστιδίου 1
Medtr6g087910	<i>MtpGlcT2</i>	πιθανός μεταφορέας γλυκόζης πλαστιδίου 2
Medtr4g013205	<i>MtpGlcT3</i>	πιθανός μεταφορέας γλυκόζης πλαστιδίου 3

Medtr7g082270	<i>MtpGlcT4</i>	μεταφορέας εξοζών, μεταφορέας γλυκόζης πλαστιδίου 4
Medtr6g018790	<i>MtpGlcT4_1</i>	μεταφορέας γλυκόζης πλαστιδίου 4
Medtr4g077740	<i>MtVGT2_1</i>	συμμεταφορέας D-ξυλόζης- H ⁺ 2

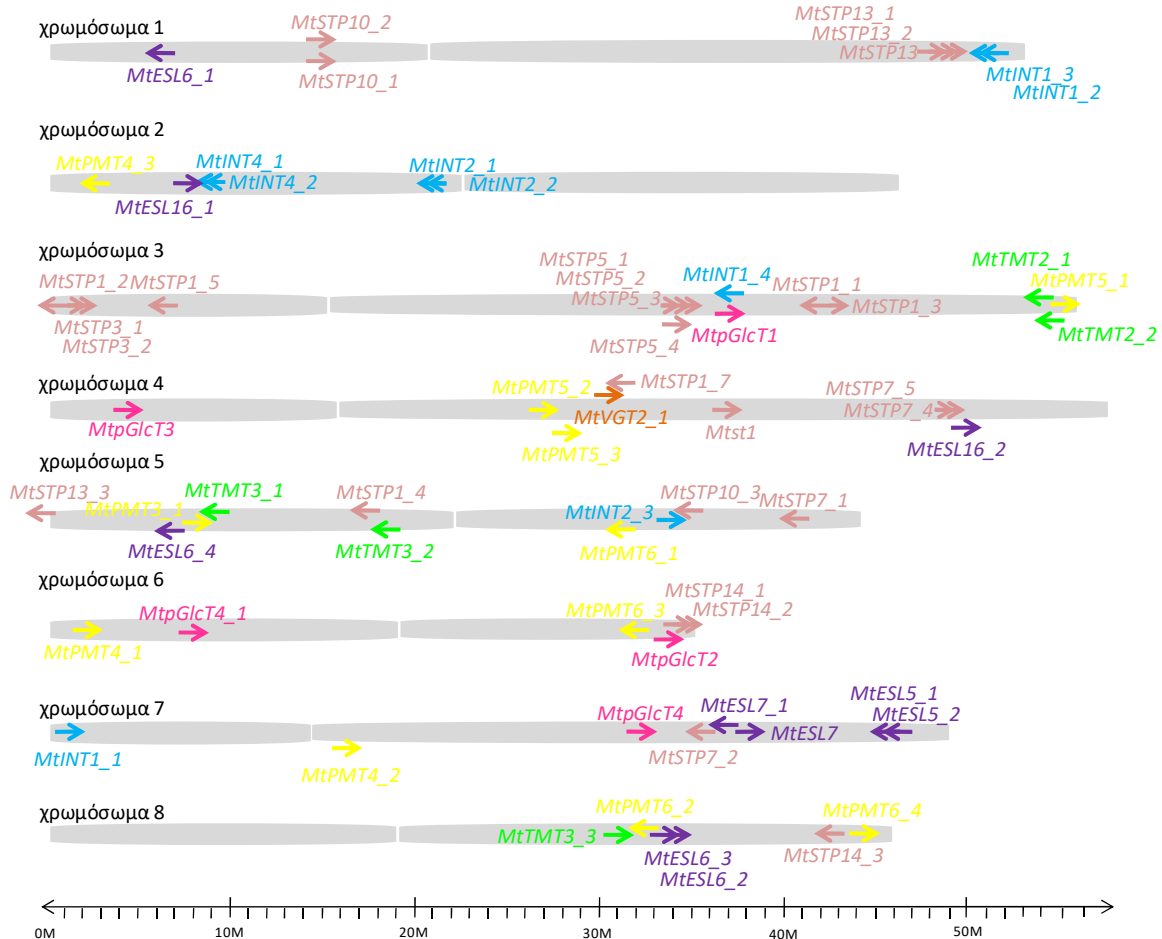
3.2. Εντοπισμός των MST-γονιδίων στα χρωμοσώματα του *M. truncatula*

Τα 71 γονίδια που κωδικοποιούν για πιθανούς μεταφορείς μονοσακχαριτών (MSTs) ταξινομήθηκαν και στα οχτώ χρωμοσώματα του *M. truncatula* (εικόνα 3.2). Παρ' όλα αυτά δεν περιλαμβάνουν όλα τα χρωμοσώματα γονίδια από τις μεγάλες υποοικογένειες (STPs, INTs, PMTs και ESLs). Το χρωμοσώματα 2 δεν περιλαμβάνει STP-γονίδια, τα χρωμοσώματα 4, 6 και 8 δεν περιέχουν INT-γονίδια. Στο χρωμοσώμα 1 δεν εντοπίστηκε PMT-γονίδιο, όπως και ESL-γονίδια στα χρωμοσώματα 3 και 6. Το μοναδικό VGT-γονίδιο εντοπίστηκε στο χρωμοσώμα 4, ενώ τα πέντε pGlcT-γονίδια είναι διασκορπισμένα σε τρία διαφορετικά χρωμοσώματα (3, 4, 6 και 7). Επιπλέον, παρά το ότι στην **εικόνα 3.2**, οι τοποθεσίες εντοπισμού των MST-γονιδίων στα χρωμοσώματα του *M. truncatula* δεν αναπαριστώνται λεπτομερώς, είναι φανερό ότι υπάρχει η τάση στα γονίδια αυτά να συγκεντρώνονται σε μικρές ή μεγαλύτερες ομάδες και οι οποίες μπορεί να εκτείνονται σε αρκετά kbs σε μήκος. Εντούτοις, 20 MST γονίδια από τρεις υποοικογένειες (STPs, INTs και ESLs) θα μπορούσαν να ταξινομηθούν σε 9 όχι πολύ εκτεταμένες ομάδες.

Οι 9 αυτές διακριτές ομάδες εντοπίστηκαν σε όλα τα χρωμοσώματα εκτός του χρωμοσώματος 5. Όλα τα γονίδια που περιλαμβάνονται σε κάθε ομάδα ανήκουν στην ίδια υποοικογένεια, βρίσκονται το ένα δίπλα στο άλλο και κωδικοποιούνται από το ίδιο σκέλος του χρωμοσώματος (είχαν την ίδια κατεύθυνση στο χρωμοσώμα). Οι μισές από αυτές τις ομάδες περιλαμβάνουν STP-γονίδια.

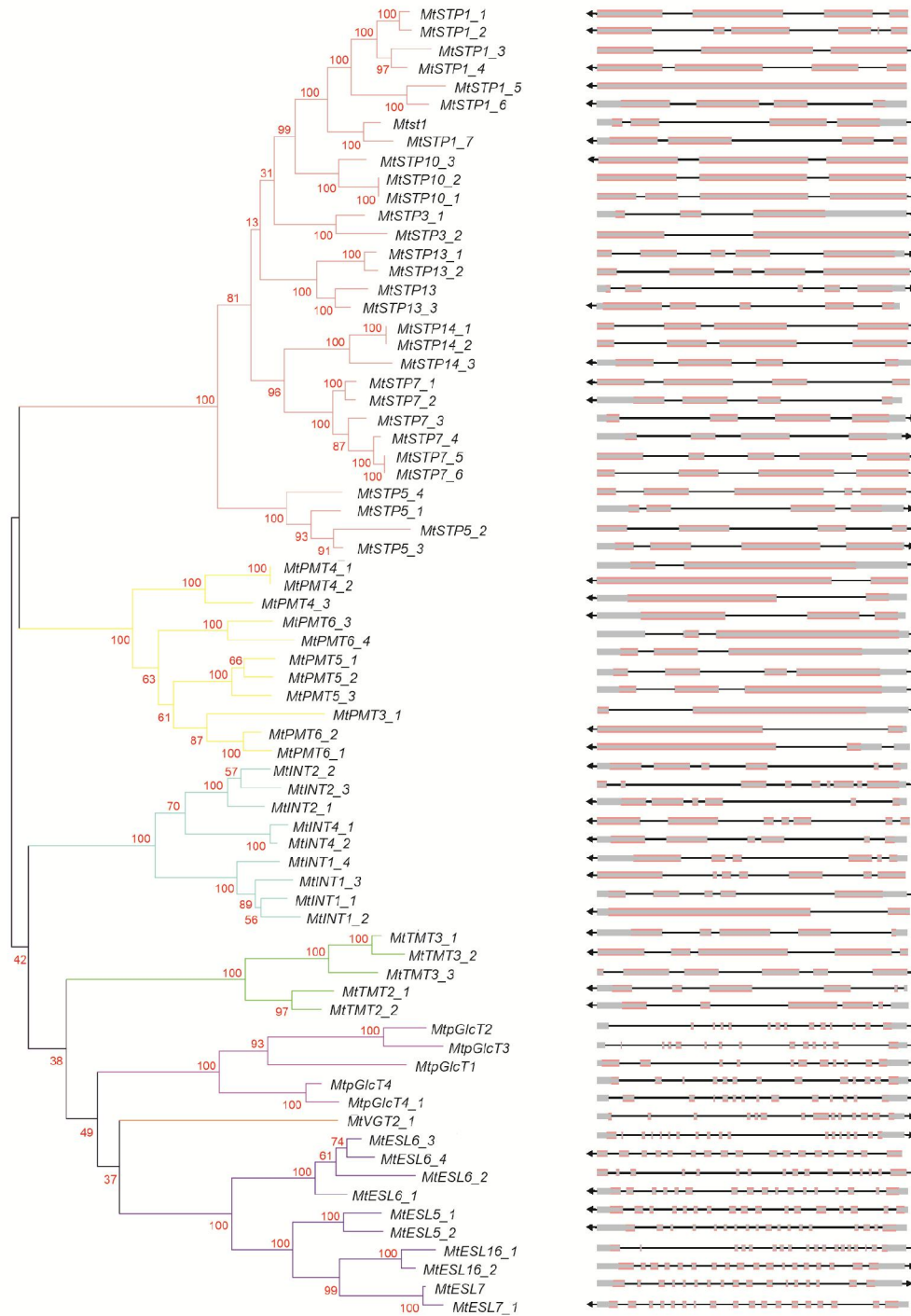
Επτά ομάδες περιλαμβάνουν δύο γονίδια η κάθε μία, ενώ δύο ομάδες περιλαμβάνουν τρία. Δύο ομάδες ταξινομούνται στο χρωμοσώμα 1 (*MtSTP13*, *MtSTP13_1*, *MtSTP13_2* και *MtINT1_2*, *MtINT1_3*), δύο στο χρωμοσώμα 3 (*MtSTP3_1*, *MtSTP3_2* και *MtSTP5_1*, *MtSTP5_2* και *MtSTP5_3*, ενώ όλα τα άλλα χρωμοσώματα, με εξαίρεση το χρωμοσώμα 5 περιλαμβάνουν μία ομάδα: *MtINT4_1*, *MtINT4_2* στο χρωμοσώμα 2, και *MtSTP7_4*, *MtSTP7_5*, όπως και *MtSTP14_1*, *MtSTP14_2* στα χρωμοσώματα 4 και 6 αντίστοιχα και τέλος *MtESL5_1*, *MtESL5_2*

και *MtESL6_2*, *MtESL6_3* στα χρωμοσώματα 7 και 8 αντίστοιχα. Τα γονίδια αυτά πιθανόν να μοιράζονται μεταγραφικούς παράγοντες (ενισχυτές) ρύθμισης, οι οποίοι ίσως επιτρέπουν τη συνδυασμένη έκφραση των γονιδίων αυτών σε διαφορετικούς ιστούς ή ως αντίδραση σε συγκεκριμένες συνθήκες.



Εικόνα 3.2: Θέσεις των γονιδίων των μεταφορέων μονοσακχαριτών (MSTs) στα χρωμοσώματα του *M. truncatula*.

Η *in silico* ανάλυση της δομής των MST-γονιδίων (από το κωδικόνιο έναρξης μέχρι το κωδικόνιο λήξης) αποκάλυψε διαφορές στο μέγεθος και την οργάνωση των γονιδίων (αριθμός και μέγεθος εξωνίων/εσωνίων). Έτσι μέλη των υποοικογενειών STP, PMT, TMT και INT έχουν γονιδιακή δομή που χαρακτηρίζεται από λίγα (1-9) σχετικά μεγάλα εξώνια. Αντίθετα, μέλη των ESL, pGlcT και VGT υποοικογενειών έχουν πολλά (11-18) μικρού μεγέθους εξώνια. Επιπλέον, σχετικά με το μέγεθος γονιδίων, τα PMT-γονίδια γενικά παρουσιάζουν το μικρότερο μήκος (μέχρι 3005 bp), τα STP και INT γονίδια φτάνουν σε μήκος μέχρι τα 3655 bp και 5182 bp αντίστοιχα. Τα ESL και TMT γονίδια φτάνουν τα 6921 bp και 6111 bp αντίστοιχα σε μήκος, ενώ τα pGlcT και VGT γονίδια παρουσιάζουν μήκη που φτάνουν τα 7496 bp.



Εικόνα 3.3: Φυλογενετικό δέντρο των μεταφορέων μονοσακχαριτών του *M. truncatula* και η γονιδιακή τους δομή. Το δενδρόγραμμα δημιουργήθηκε με τη χρήση ML και JTT μοντέλου και 100 αντιγράφων αυτοδυναμίας (bootstrap replicates). Τα νούμερα σε κάθε κλάδο αντιστοιχούν στις τιμές αυτοδυναμίας (bootstrapping) τους.

Επιπλέον, γονίδια της ESL υποοικογένειας δείχνουν τη μεγαλύτερη κατανομή σε μήκος γονιδίων (3655 bp), ενώ αντίθετα γονίδια των PMT και rGlcT υποοικογενειών τη χαμηλότερη (1379 bp και 2082 bp αντίστοιχα). Γονίδια που ανήκουν σε 3 από τις

9 ομάδες έχουν την τάση να μοιράζονται την ίδια γονιδιακή οργάνωση. *MtSTP13*, *MtSTP13_1* και *MtSTP13_2* έχουν κοινή δομή με 5 εξώνια/4 εσώνια, *MtSTP5_1*, *MtSTP5_2*, *MtSTP5_3* έχουν κοινή δομή με 4 εξώνια/3 εσώνια, *MtSTP14_1* και *MtSTP14_2* έχουν διάταξη με 4 εξώνια /3 εσώνια. Τα PMT γονίδια έχουν ένα μεγάλο εξώνιο στο 3' άκρο τους, ενώ τα TMT, pGlcT και VGT γονίδια παρουσίασαν μεγαλύτερες διαφορές στο 5' άκρο τους. Συνεπώς, φαίνεται πως για αρκετούς μεταφορείς μονοσακχαριτών η γένεσή τους συνδέεται κυρίως με κάποιο σχετικό γεγονός γενετικού διπλασιασμού. Η γονιδιακή δομή των MST γονιδίων φαίνεται στην **εικόνα 3.3**.

3.3. Μήκος κωδικής και κωδικοποιούμενης αμινοξικής αλληλουχίας των MST-γονιδίων και αριθμός των διαμεμβρανικών τους περιοχών

Οι κωδικοποιούμενες αμινοξικές αλληλουχίες των MST γονιδίων κατατάσσονται σε δύο μεγάλες ομάδες, με βάση το μέγεθός τους (aa). Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει αμινοξικές αλληλουχίες που κυμαίνονται μεταξύ 424-582 aa, ενώ η δεύτερη ομάδα, η οποία περιλαμβάνει τα μέλη της TMT υποοικογένειας περιλαμβάνει αλληλουχίες μεταξύ 716-744 aa. Ανεξάρτητα από το μήκος τους, όλα τα πλήρη MST γονίδια μοιράζονται μια κοινή δομή, με 12 διαμεμβρανικές περιοχές (TMs) που συνδέονται με υδροφιλικούς βρόχους (**πίνακας 3.2**). Ο εκτεταμένος υδροφιλικός βρόχος μεταξύ των διαμεμβρανικών περιοχών 6 και 7 των TMT γονιδίων, εντοπίζεται στις μεγαλύτερες αμινοξικές αλληλουχίες αυτών των μεταφορέων.

Το μήκος όλων των MST-γονιδίων, καθώς και το μήκος της κωδικής και της κωδικοποιούμενης αμινοξικής τους αλληλουχίας, καθώς και ο αριθμός των διαμεμβρανικών τους περιοχών παρουσιάζονται στον **πίνακα 3.2**.

Πίνακας 3.2: Μήκος γονιδίου, κωδικής περιοχής (cds), πρωτεϊνών και ο αριθμός των διαμεμβρανικών περιοχών

Όνομα γονιδίου	Μήκος γονιδίου (bp)	Μήκος κωδικής περιοχής (bp)	Μήκος πρωτεϊνών (aa)	Διαμεμβρανικές έλικες
<i>MtSTP1_1</i>	2169	1539	512	12
<i>MtSTP1_2</i>	2550	1437	478	12
<i>MtSTP1_3</i>	1742	1380	459	12
<i>MtSTP1_4</i>	2202	1545	514	12
<i>MtSTP1_5</i>	1536	1536	511	12

<i>MtSTP1_6</i>	2653	1539	512	12
<i>MtSTP1_7</i>	2998	1545	514	12
<i>Mtst1</i>	2957	1557	518	12
<i>MtSTP3_1</i>	3097	1530	509	12
<i>MtSTP3_2</i>	2142	1533	510	12
<i>MtSTP5_1</i>	3556	1539	512	12
<i>MtSTP5_2</i>	3199	1275	424	12
<i>MtSTP5_3</i>	2255	1530	509	12
<i>MtSTP5_4</i>	2166	1449	482	12
<i>MtSTP7_1</i>	2833	1515	504	12
<i>MtSTP7_2</i>	3655	1515	504	12
<i>MtSTP7_3</i>	3166	1482	493	12
<i>MtSTP7_4</i>	3320	1572	523	12
<i>MtSTP7_5</i>	2540	2106	701	12
<i>MtSTP7_6</i>	2540	1518	505	12
<i>MtSTP10_1</i>	1794	1485	494	12
<i>MtSTP10_2</i>	1793	1539	512	12
<i>MtSTP10_3</i>	1752	1533	510	12
<i>MtSTP13</i>	5535	1572	523	12
<i>MtSTP13_1</i>	2583	1500	499	12
<i>MtSTP13_2</i>	2234	1503	500	12
<i>MtSTP13_3</i>	3326	1566	521	12
<i>MtSTP14_1</i>	2664	1533	510	12
<i>MtSTP14_2</i>	2515	1533	510	12
<i>MtSTP14_3</i>	3337	1554	517	12
<i>MtINT1_1</i>	3645	1503	500	12
<i>MtINT1_2</i>	2047	1527	508	12
<i>MtINT1_3</i>	3173	1605	534	12
<i>MtINT1_4</i>	4832	1491	496	12
<i>MtINT2_1</i>	5182	1713	570	12
<i>MtINT2_2</i>	4693	1743	580	12
<i>MtINT2_3</i>	4632	1710	569	12
<i>MtINT4_1</i>	3679	1704	567	12
<i>MtINT4_2</i>	4164	1749	582	12
<i>MtTMT2_1</i>	6111	2193	730	12
<i>MtTMT2_2</i>	4956	2235	744	12
<i>MtTMT3_1</i>	4646	2181	726	12
<i>MtTMT3_2</i>	3093	2175	724	12

<i>MtTMT3_3</i>	3832	2151	716	12
<i>MtPMT3_1</i>	2526	1491	496	12
<i>MtPMT4_1</i>	1822	1593	530	12
<i>MtPMT4_2</i>	1822	1593	530	12
<i>MtPMT4_3</i>	2433	1572	523	12
<i>MtPMT5_1</i>	1913	1545	514	12
<i>MtPMT5_2</i>	2688	1569	522	12
<i>MtPMT5_3</i>	2082	1563	520	12
<i>MtPMT6_1</i>	2053	1503	500	12
<i>MtPMT6_2</i>	2561	1506	501	12
<i>MtPMT6_3</i>	3005	1548	515	12
<i>MtPMT6_4</i>	1626	1497	498	12
<i>MtESL5_1</i>	4244	1446	481	12
<i>MtESL5_2</i>	5130	1509	502	12
<i>MtESL6_1</i>	3886	1470	489	12
<i>MtESL6_2</i>	4833	1440	479	12
<i>MtESL6_3</i>	5749	1461	486	12
<i>MtESL6_4</i>	3701	1470	489	12
<i>MtESL7</i>	4341	1434	477	12
<i>MtESL7_1</i>	3721	1428	475	12
<i>MtESL16_1</i>	6921	1458	485	12
<i>MtESL16_2</i>	3266	1473	490	12
<i>MtpGlcT1</i>	5414	1608	535	12
<i>MtpGlcT2</i>	7496	1473	490	12
<i>MtpGlcT3</i>	6595	1437	478	12
<i>MtpGlcT4</i>	6319	1521	506	12
<i>MtpGlcT4_1</i>	5858	1641	546	12
<i>MtVGT2_1</i>	7448	1506	501	12

3.4. Μοτίβα MST-γονιδίων

Η στοίχιση των αμινοξικών αλληλουχιών (ClustalW) των μελών κάθε υποοικογένειας φανέρωσε την ύπαρξη μερικών συντηρημένων μοτίβων. Το συντηρημένο μοτίβο PESP που σχετίζεται με την πρόσληψη γλυκόζης από το μεταφορέα σακχάρων-A [transporter-A, (Past-A)] (Shimokawa et al. 2002) εντοπίστηκε στην πλειοψηφία των MSTs του *M. truncatula*, εκτός των STPs. Το μοτίβο RXGRR, που είναι κοινό σε πολλά μέλη των MFS (Major Facilitator

Superfamily) (Pao et al. 1998) και βρίσκεται μεταξύ των TM2 και TM3, εντοπίστηκε σε αρκετά *MtSTPs*, όπως επίσης και το C-τελικό WXXHXXW, ένα σημαντικό τρι-αρωματικό μοτίβο για την πρόσληψη σακχάρων από τους μεταφορείς STP υποοικογένειας (Yamada et al. 2017). Τέσσερα ακόμη συντηρημένα μοτίβα εντοπίστηκαν στην υποοικογένεια των STPs. Πρόκειται για τα: (S/T)GGV στο τέλος της TM1, TGXN και FY(A/S)P στο εσωτερικό της TM7 και D(K/R)XGRR μεταξύ των TM8 και TM9.

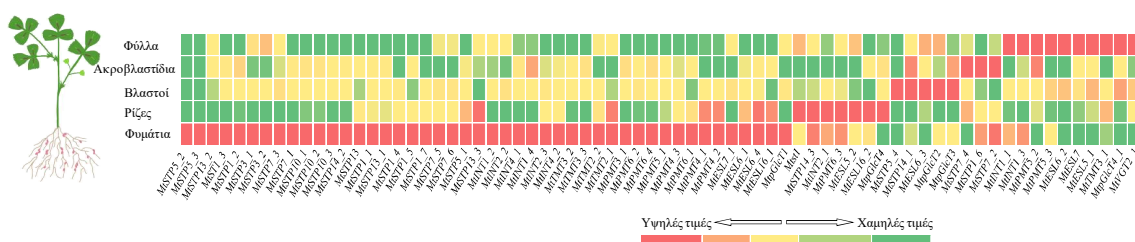
Στην υποοικογένεια των INTs, η οποία αντιπροσωπεύεται από λιγότερα μέλη ανιχνεύθηκε ισχυρή συντήρηση για μακρύτερες αμινοξικές αλληλουχίες. Αυτές ήταν οι: GG(F/L)LFGYDTGVISGA(L/S)LYI(R/K)D(D/E)F η οποία αντιπροσωπεύει τα περισσότερα αμινοξέα της TM1, LQX(A/T)IVS στο εσωτερικό της TM2, VG(I/L)GVGXAS στην TM4, IT(G/S)GQ(F/L)XSY(L/V)(I/V)NLXFT στην TM5, PGTWRWMLGV που ξεκινά πριν και εκτείνεται εντός της TM6, YYX(T/P) στο εσωτερικό της TM7, VPWXXNSE(I/V)YP μέσα και μετά την TM10, VPET(K/Q)G μετά την TM12 και EVEKLL μετά την TM12 για τα *MtINT4_1* και *MtINT4_2*. Επίσης το C-τελικό συντηρημένο μοτίβο WKERA εντοπίστηκε κι αυτό μετά την TM12, στα *MtINT1_1*, *MtINT1_2*, *MtINT1_3* και *MtINT1_4*. Επιπλέον τέσσερα παρόμοια συντηρημένα μοτίβα εντοπίστηκαν στην υπογένεια των PMTs: i) VM(S/A)GA ακριβώς μετά την TM1, ii) GXG(I/V)G(F/Y) στο εσωτερικό της TM4, iii) WRXML εντός της TM6 και iv) (S/T)EIFP(L/M)(R/K)(L/V)RAQ πριν την TM11. Επιπροσθέτως πέντε παρόμοια μοτίβα εντοπίστηκαν στην υποοικογένεια των ESLs. i) IXGWL μέσα στην TM3, ii) S(Y/F)VVP(V/I)(Y/F)(I/V)AE στο τέλος της TM4, iii) (I/V)PW(V/L)XMSE(I/V)(F/L)P μετά την TM10, iv) KGXAGS ακριβώς πριν την TM11 και v) VPETK (όπως και στην υποοικογένεια των INTs) μετά την TM12.

Οι *MtTMTs* οι οποίοι έχουν τις μεγαλύτερες αμινοξικές αλληλουχίες μεταξύ των MSTs του *M.truncatula*, είναι κι αυτοί υψηλά συντηρημένοι και παρουσιάζουν μεγάλο αριθμό συντηρημένων μοτίβων. Σε αυτά περιλαμβάνονται τα: AAX(I/L)GN(F/L)L και TIAG στο εσωτερικό της TM1, (L/V)EGL(I/V)V ακριβώς πριν την TM2, LVM(L/F)W στην TM3, P(L/V)YISEXAP στην TM4, IRGXLNTL ακριβώς μετά την TM4, PSWRXML μεταξύ των TM5 και TM6, DV(S/A)GE(L/M)ALL και IGGGW μεταξύ των TM6 και TM7, PGVK(H/R)AL(F/I/V)VG(I/V)G(I/L)Q(I/V)LQQ μετά την TM7, GING στην TM8, PQIL(E/D)(E/Q)AGV στο τέλος και πέρα από την TM8, RLMD(I/V)XGRR στο

Εικόνα 3.4: Στοίχιση (alignment) και διαμεμβρανικές περιοχές των μελών της TMT-υποοικογένειας των MSTs του *M. truncatula*.

3.5. Μεταγραφομική ρύθμιση πιθανών MSTs γονιδίων στα φυμάτια, στις ρίζες, στους βλαστούς, στα ακροβλαστίδια και στα φύλλα κάτω από συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου.

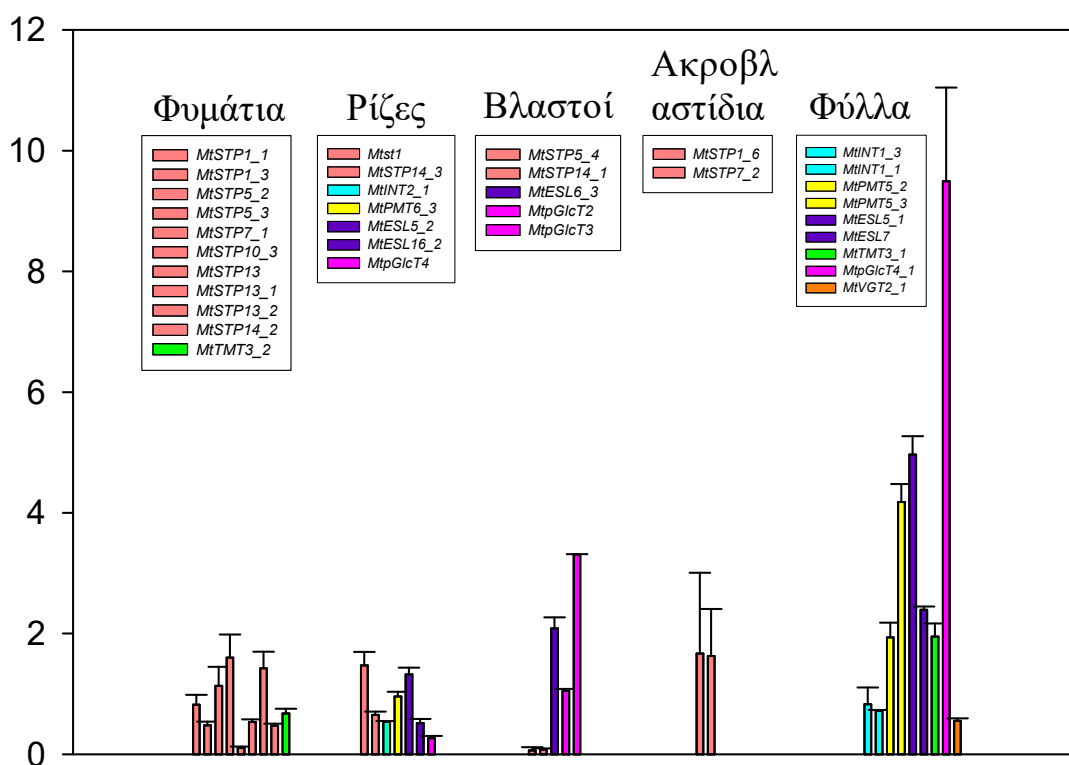
Με σκοπό να κατανοήσουμε τους πιθανούς φυσιολογικούς ρόλους των MSTs του *M. truncatula* έγινε ανάλυση των επιπέδων σχετικής έκφρασης των MST-γονιδίων εξετάστηκαν με χρήση της τεχνολογίας RT-qPCR. Η **εικόνα 3.5** παρουσιάζει το θερμικό χάρτη (heat map) των σχετικών επιπέδων έκφρασης των MST-γονιδίων σε όλα τα εξεταζόμενα όργανα στο τέλος της κανονικής φωτοπεριόδου. Όπως φάνηκε η συντριπτική πλειοψηφία αυτών των γονιδίων παρουσίασαν ισχυρή οργανοειδική εξειδίκευση σε σχέση με τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης. Συγκεκριμένα στα μη φωτοσυνθετικά όργανα 40 και 7 γονίδια εντοπίστηκαν να είναι ισχυρά επαγόμενα ή εξειδικευμένα στα φυμάτια και στις ρίζες αντίστοιχα.



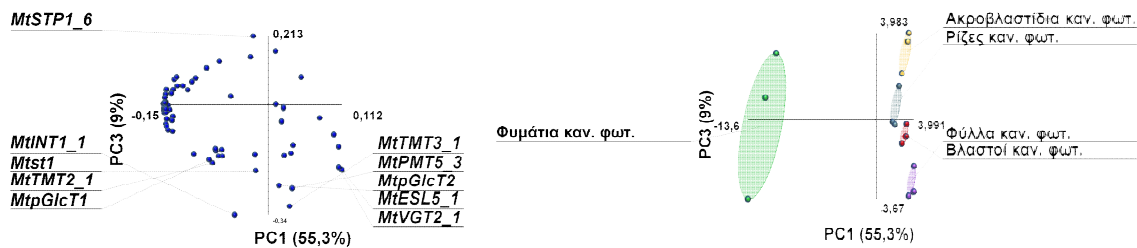
Εικόνα 3.5: Θερμικός χάρτης (heatmap) των σχετικών επιπέδων έκφρασης των MSTs γονιδίων *M.truncatula* στα εξεταζόμενα όργανα της ομάδας I (ομάδα I: κανονική φωτοπερίοδος). Τρεις βιολογικές επαναλήψεις χρησιμοποιήθηκαν για τη μεταγραφομική ανάλυση του κάθε οργάνου του *M.truncatula*. Για κάθε γονίδιο, η κατασκευή του θερμικού χάρτη έγινε με βάση την τιμή των επιπέδων mRNA του συγκεκριμένου γονιδίου σε όλα τα όργανα του φυτού του.

Όσον αφορά τα φωτοσυνθετικά όργανα πέντε (*MtSTP5_4*, *MtSTP14_1*, *MtESL6_3*, *MtpGlcT2*, *MtpGlcT3*), τρία (*MtSTP7_4*, *MtSTP1_6*, *MtSTP7_2*) και δέκα (*MtINT1_1*, *MtINT1_3*, *MtPMT5_2*, *MtPMT5_3*, *MtESL6_2*, *MtESL7*, *MtESL5_1*, *MtTMT3_1*, *MtpGlcT4_1*, *MtVGT2_1*) γονίδια παρουσίασαν ισχυρή συσσώρευση μεταγραφημάτων στους βλαστούς, στα ακροβλαστίδια και στα φύλλα αντίστοιχα. Λίγα γονίδια παρουσίασαν επαγωγή σε περισσότερα από ένα όργανα. Τα *MtSTP13_3*, *MtTMT2_1*, *MtPMT4_1*, *MtPMT4_2*, *MtESL6_4* και *MtESL16_1* παρουσίασαν ισχυρή έκφραση και στα δύο μη φωτοσυνθετικά όργανα. Μάλιστα τα *MtSTP14_1* και *MtSTP14_2* (ομάδα στο χρωμόσωμα 6) ήταν μεταξύ των γονιδίων με τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στους βλαστούς και στα φυμάτια αντίστοιχα (**εικόνα 3.6**). Ενδιαφέρον παρουσίασε το ότι τα *MtSTP13*, *MtSTP13_1* και

MtSTP13_2 και τα *MtSTP5_1*, *MtSTP5_2*, *MtSTP5_3* που ταξινομήθηκαν στην ίδια ομάδα του χρωμοσώματος 1 και 3 αντίστοιχα επάγονταν ισχυρά στα φυμάτια. Η μεταγραφομική ανάλυση επίσης, έδειξε ότι τα *MtINT4_1*, *MtINT4_2* και *MtSTP3_1*, *MtSTP3_2* που εντοπίστηκαν στην ίδια ομάδα των χρωμοσωμάτων 2 και 3 αντίστοιχα, επάγονταν κι αυτά ισχυρά στα φυμάτια. Γενικά, τα μέλη της κάθε MST-υποοικογένειας φαίνεται να παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης σε συγκεκριμένα όργανα. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται κυρίως στους μεταφορείς της STP-υποοικογένειας οι οποίοι παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης στα φυμάτια και δευτερευόντως στα ακροβλαστίδια, στους βλαστούς και στις ρίζες. Επιπλέον η PCA ανάλυση διαχώρισε ξεκάθαρα όλα τα εξεταζόμενα όργανα σύμφωνα με τα αντίστοιχα μεταγραφομικά τους προφίλ, όπως φαίνεται από την πρώτη και την τρίτη κύρια συνιστώσα που αντιπροσωπεύουν το 64,3 % της συνολικής παραλλακτικότητας (εικόνα 3.7).



Εικόνα 3.6: Τα MSTs γονίδια του *M. truncatula* που παρουσίασαν υψηλά επίπεδα σχετικής έκφρασης στα διάφορα όργανα του φυτού.



Εικόνα 3.7: PCA ανάλυση των σχετικών εκφράσεων των *MtMSTs* σε συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου του *M. truncatula* μεταξύ όλων των οργάνων του φυτού, i) διάγραμμα των βαρών (loadings) των συνιστωσών που δείχνουν τα *MtMSTs* που παρουσίασαν τη μεγαλύτερη μεταγραφομική διακύμανση υπό τις εξεταζόμενες πειραματικές συνθήκες, ii) διάγραμμα των κύριων συνιστωσών 1 και 3, που αντιπροσωπεύουν το 64,3% της συνολικής παραλλακτικότητας που παρατηρήθηκε στα σχετικά επίπεδα έκφρασης των *MtMSTs* σε συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου μεταξύ όλων των οργάνων του φυτού. Για την ανάλυση κύριων συνιστωσών χρησιμοποιήθηκαν μετρήσεις από τρεις ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις από κάθε όργανο από κάθε ομάδα φυτών.

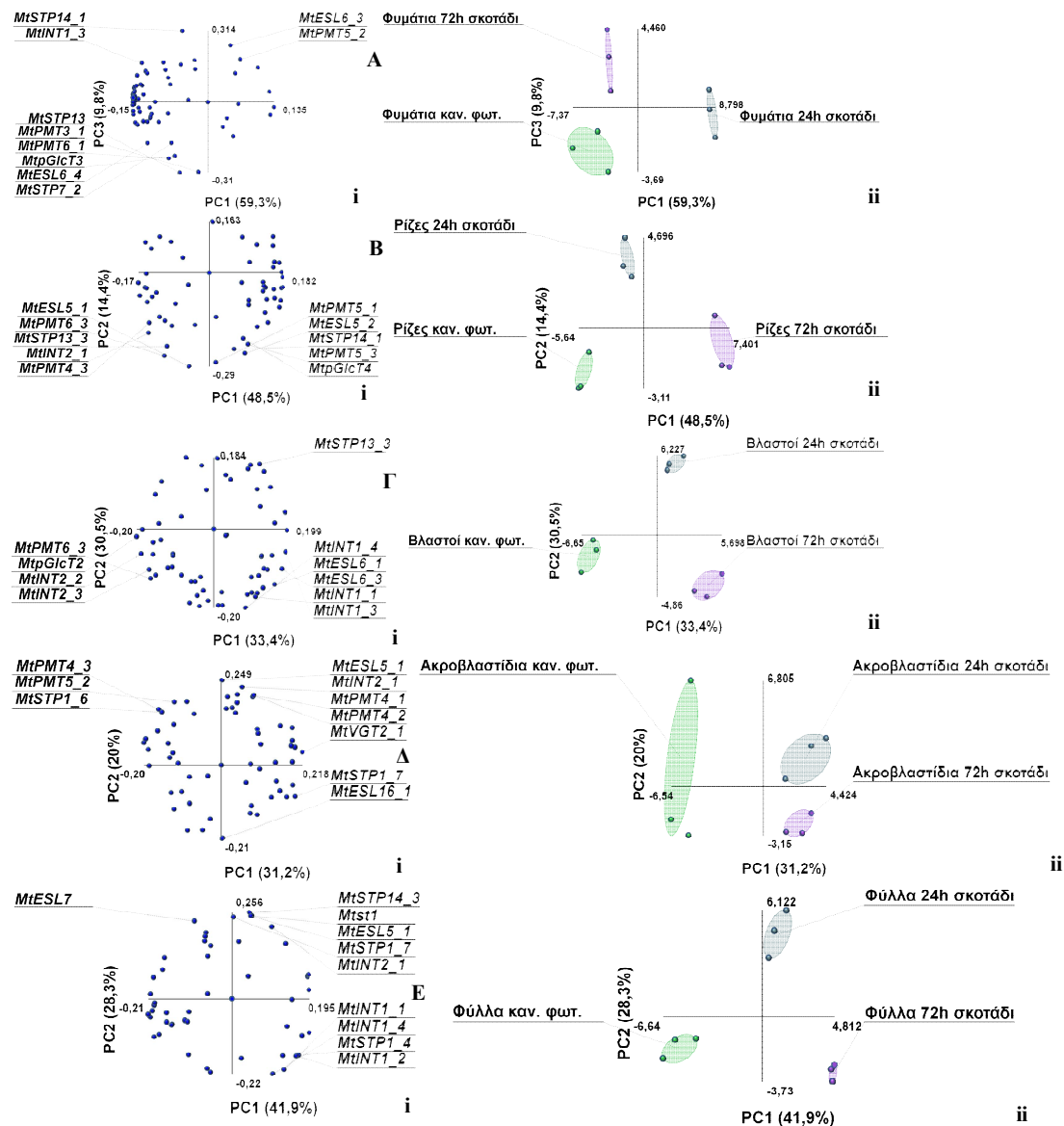
3.6. Προφίλ έκφρασης των MST-γονιδίων μετά από 24 h ή 72 h συνεχούς σκότους.

Για την ανάλυση του ρόλου των μελών της MST-οικογένειας στην κατανομή και στο διαχωρισμό του υπό συνθήκες έλλειψης C, μελετήσαμε τα μεταγραφομικά τους προφίλ σε συνθήκες παρατεταμένου σκότους. Σε συνθήκες έλλειψης άνθρακα λοιπόν, φυτά *M.truncatula* ηλικίας 5 εβδομάδων υποβλήθηκαν στους παρακάτω τρεις χειρισμούς πριν τη συλλογή τους: κανονική φωτοπερίοδος και συλλογή στο τέλος της περιόδου με φως (ομάδα I), μια περίοδος 24 h συνεχούς σκότους (ομάδα II) και μία περίοδο 72 h συνεχούς σκότους (ομάδα III). Τα επίπεδα έκφρασης των MST-γονιδίων αναλύθηκαν με RT-qPCR ύστερα από όλικη απομόνωση RNA.

3.6.1. PCA ανάλυση και κατά συστάδες (clustered heat map) του κατά ζεύγη συντελεστή συσχέτισης του Pearson μεταξύ των σχετικών επιπέδων έκφρασης των *MtMSTs* στα διαφορετικά όργανα των τριών ομάδων φυτών του *M. truncatula*.

Η PCA ανάλυση, η οποία επιτρέπει την ταξινόμηση των δειγμάτων σε ομάδες, ανέδειξε μεγάλη παραλλακτικότητα στα μεταγραφομικά επίπεδα των εξεταζόμενων οργάνων των τριών ομάδων φυτών του *M. truncatula*. Οι πρώτες δύο κύριες συνιστώσες στα φυμάτια διαχώρισαν επαρκώς τα φυτά που υποβλήθηκαν σε 72 h σκοτάδι, από αυτά που συλλέχθηκαν σε συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου και αυτά που υποβλήθηκαν σε 24 h σκοτάδι. Η πρώτη και η τρίτη κύρια συνιστώσα που αντιπροσωπεύουν το 69,1 % της συνολικής παραλλακτικότητας που παρατηρήθηκε στα σχετικά επίπεδα έκφρασης των *MtMSTs* στα φυμάτια, (εικόνα 3.8 A) έδειξε

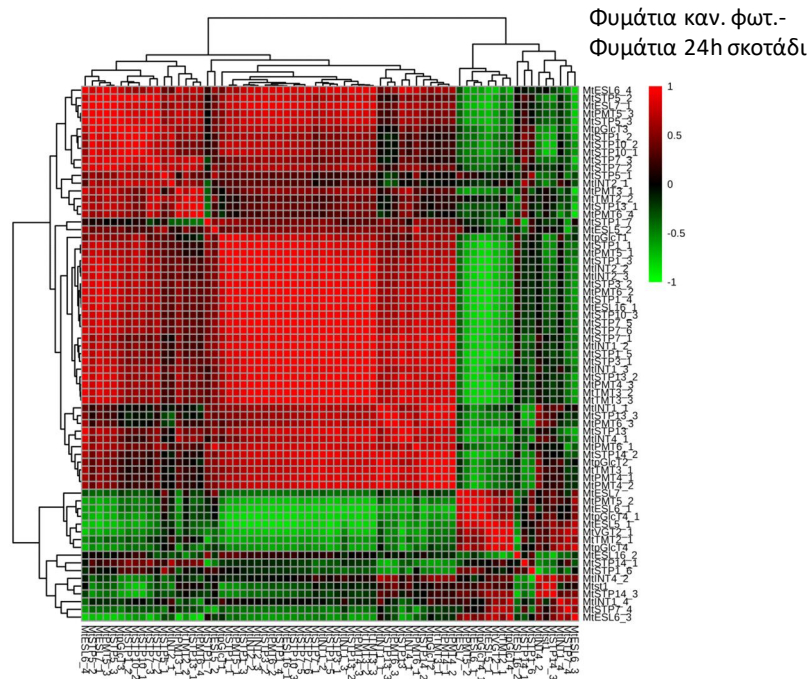
μεγάλες διαφοροποιήσεις μεταξύ όλων των ομάδων φυτών (I, II, III). Οι δύο πρώτες κύριες συνιστώσες αντιπροσώπευαν το 62,9 % (εικόνα 3.8 Β), 63,9 % (εικόνα 3.8 Γ), 51,2 % (εικόνα 3.8 Δ) και 70,2 % (εικόνα 3.8 Ε), της παραλλακτικότητας που παρατηρήθηκε στα σχετικά επίπεδα έκφρασης των *MtMSTs* στις ρίζες, στους βλαστούς, στα ακροβλαστίδια και στα φύλλα, αντίστοιχα και επέτρεψε τη διαφοροποίηση των δειγμάτων των φυτών που υποβλήθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες φωτοπεριόδου.



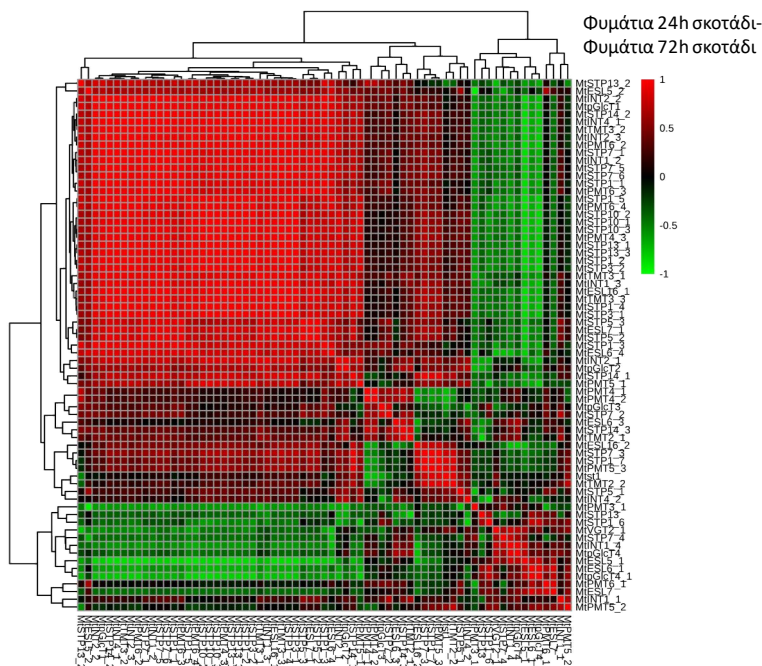
Εικόνα 3.8: PCA ανάλυση των σχετικών εκφράσεων των *MtMSTs* των τριών διαφορετικών ομάδων του *M. truncatula*, **A**) στα φυμάρια, **i**) διάγραμμα των βαρών (loadings) των συνιστωσών που δείχνουν τα *MtMSTs* που παρουσίασαν τη μεγαλύτερη μεταγραφομική διακύμανση υπό τις εξεταζόμενες πειραματικές συνθήκες, **ii**) διάγραμμα των κύριων συνιστωσών 1 και 3, που αντιπροσωπεύουν το 69,1 % της συνολικής παραλλακτικότητας που παρατηρήθηκε στα σχετικά επίπεδα έκφρασης των *MtMSTs*,

B) στις ρίζες, i) διάγραμμα των βαρών (loadings) των συνιστωσών που δείχνουν τα *MtMSTs* που παρουσίασαν τη μεγαλύτερη μεταγραφομική διακύμανση υπό τις εξεταζόμενες πειραματικές συνθήκες, ii) διάγραμμα των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών, που αντιπροσωπεύουν το 62,9 % της συνολικής παραλλακτικότητας που παρατηρείται στα σχετικά επίπεδα έκφρασης των *MtMSTs*, **Γ)** στους βλαστούς, i) διάγραμμα των βαρών (loadings) των συνιστωσών που δείχνουν τα *MtMSTs* που παρουσίασαν τη μεγαλύτερη μεταγραφομική διακύμανση υπό τις εξεταζόμενες πειραματικές συνθήκες, ii) διάγραμμα των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών, που αντιπροσωπεύουν το 63,9 % της συνολικής παραλλακτικότητας που παρατηρείται στα σχετικά επίπεδα έκφρασης των *MtMSTs*, **Δ)** στα ακροβλαστίδια, i) διάγραμμα των βαρών (loadings) των συνιστωσών που δείχνουν τα *MtMSTs* που παρουσίασαν τη μεγαλύτερη μεταγραφομική διακύμανση υπό τις εξεταζόμενες πειραματικές συνθήκες, ii) διάγραμμα των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών, που αντιπροσωπεύουν το 51,2 % της συνολικής παραλλακτικότητας που παρατηρείται στα σχετικά επίπεδα έκφρασης των *MtMSTs*, **Ε)** στα φύλλα, i) διάγραμμα των βαρών (loadings) των συνιστωσών που δείχνουν τα *MtMSTs* που παρουσίασαν τη μεγαλύτερη μεταγραφομική διακύμανση υπό τις εξεταζόμενες πειραματικές συνθήκες, ii) διάγραμμα των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών, που αντιπροσωπεύουν το 70,2 % της συνολικής παραλλακτικότητας που παρατηρείται στα σχετικά επίπεδα έκφρασης των *MtMSTs*. Για την ανάλυση κύριων συνιστωσών χρησιμοποιήθηκαν μετρήσεις από τρεις ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις από κάθε όργανο από κάθε ομάδα φυτών (I, II, III).

Κατασκευάστηκε ακόμα θερμικός χάρτης κατά συστάδες (clustered heat map) του κατά ζεύγη συντελεστή συσχέτισης του Pearson μεταξύ των σχετικών επιπέδων έκφρασης των *MtMSTs* σε όλα τα εξεταζόμενα όργανα των τριών διαφορετικών ομάδων φυτών. Υψηλές θετικές συσχετίσεις ($r > 0,50$) βρέθηκαν για το 65,8 % των *MSTs* μεταξύ των σχετικών επιπέδων έκφρασης των φυτών στα φυμάτια για τις ομάδες I και II (εικόνα 3.9). Το 51,8 % και 70 % των *MST* γονιδίων έδειξαν υψηλές θετικές συσχετίσεις μεταξύ των σχετικών επιπέδων έκφρασης των φυτών των ομάδων I-III και II-III (εικόνα 3.10), αντίστοιχα. Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των *MSTs* στη ρίζα έδειξαν ένα 53,1 %, ένα 47,7 % και ένα 49,4 % υψηλά σημαντικής σχετικής συσχέτισης μεταξύ των φυτών των ομάδων I-II, I-III και II-III, αντίστοιχα. Σχετικά με τα επίπεδα έκφρασης των *MtMSTs* στα φύλλα, το 50,2 %, το 52,5 % και το 53,1 % αυτών έδειξαν υψηλά σημαντικές θετικές συσχετίσεις μεταξύ των φυτών των ομάδων I-II, I-III και II-III, αντίστοιχα. Υψηλά σημαντικά θετικές συσχετίσεις παρατηρήθηκαν και για το 49,2 %, 52 % και 53,1 % των *MtMSTs* στους βλαστούς για τα φυτά των ομάδων I-II, I-III και II-III, αντίστοιχα. Τέλος, αναλύοντας τα αποτελέσματα από τις σχετικές εκφράσεις των *MST*-γονιδίων στα ακροβλαστίδια, βρέθηκε ότι το 49,9 %, το 54,9 % και το 45,1 % αυτών έδειξε σημαντικά θετικές συσχετίσεις μεταξύ των φυτών των ομάδων I-II, I-III και II-III, αντίστοιχα.



Εικόνα 3.9: Θερμικός χάρτης κατά συστάδες (clustered heat map) του κατά ζεύγη συντελεστή συσχέτισης του Pearson μεταξύ των σχετικών επιπέδων έκφρασης των *MtMSTs* στα φυμάτια σε συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου και 24 h συνεχούς σκότους. Η ταξινόμηση κατά συστάδες έγινε με χρήση ιεραρχικής απλής-σύνδεσης (hierarchical single-linkage) με μία Ευκλείδεια μέτρηση απόστασης (Euclidean distance measure). Στην κόκκινη/πράσινη περιοχή, τα ορθογώνια παραλληλόγραμμα δείχνουν τις τιμές (r) του συντελεστή συσχέτισης του Pearson (βλέπε αντιστοίχιση βασικού χρώματος). Τα κόκκινα κουτιά αντικατοπτρίζουν τις υψηλές τιμές συσχέτισης και τα πράσινα τις χαμηλές συσχετίσεις. Τρεις βιολογικές επαναλήψεις χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση του συντελεστή συσχέτισης του Pearson στα φυμάτια.



Εικόνα 3.10: Θερμικός χάρτης κατά συστάδες (clustered heat map) του κατά ζεύγη συντελεστή συσχέτισης του Pearson μεταξύ των σχετικών επιπέδων έκφρασης των *MtMSTs* στα φυμάτια σε συνθήκες 24 h και 72 h συνεχούς σκότους. Η ταξινόμηση κατά συστάδες έγινε με χρήση ιεραρχικής

απλής-σύνδεσης (hierarchical single-linkage) με μία Ευκλείδεια μέτρηση απόστασης (Euclidean distance measure). Στην κόκκινη/πράσινη περιοχή, τα ορθογώνια παραλληλόγραμμα δείχνουν τις τιμές (r) του συντελεστή συσχέτισης του Pearson, (βλέπε αντιστοίχιση βασικού χρώματος). Τα κόκκινα κουτιά αντικατοπτρίζουν τις υψηλές τιμές συσχέτισης και τα πράσινα τις χαμηλές συσχετίσεις. Τρεις βιολογικές επαναλήψεις χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση του συντελεστή συσχέτισης του Pearson στα φυμάτια.

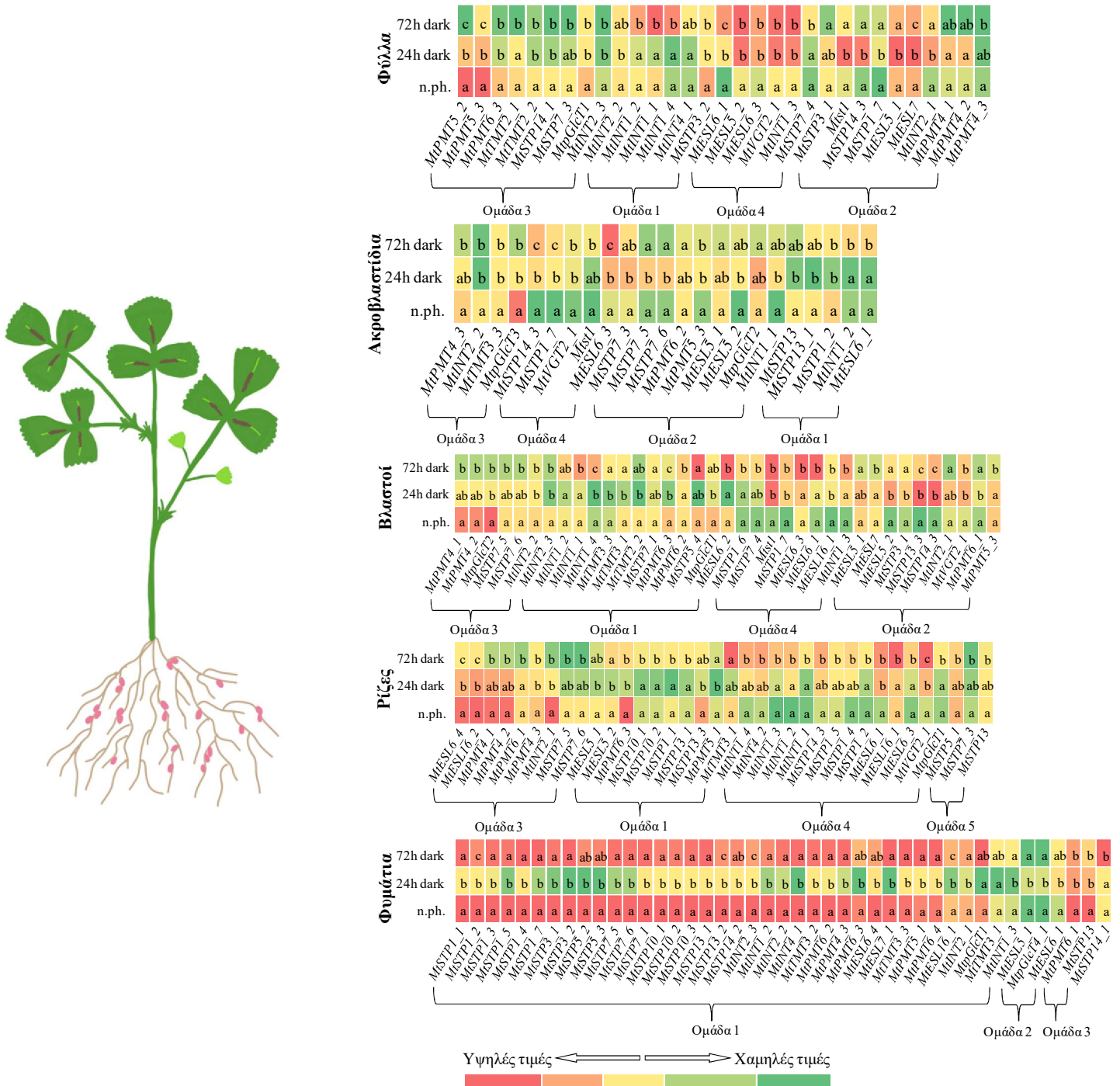
3.6.2. Προφίλ έκφρασης των MST-γονιδίων μετά από 24 h ή 72 h συνεχούς σκότους, έπειτα από στατιστική ανάλυση

Η ανάλυση με τη χρήση ANOVA και post-hoc Tukey HSD ανέδειξε αρκετά γονίδια (43 MSTs γονίδια στα φυμάτια, 36 στις ρίζες, 37 στους βλαστούς, 23 στα ακροβλαστίδια και 31 στα φύλλα), που επηρεάστηκαν από την παραμονή των φυτών στο σκοτάδι για 24 h ή/και για 72 h στο σκοτάδι. Μόνο τρία MST-γονίδια (*MtSTP7_2*, *MtPMT3_1*, *pGlcT4*) των οποία τα υψηλότερα επίπεδα σχετικής έκφρασής τους βρέθηκαν στα ακροβλαστίδια, τα φυμάτια και τη ρίζα αντίστοιχα, δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές στο μεταγραφομικό τους προφίλ σε κανένα όργανο, ύστερα από την υποβολή των φυτών στο σκοτάδι. Από την άλλη, τα *MtESL5_1* και *MtESL6_1* and *MtINT1_2* τα οποία παρουσίασαν τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασής τους στα φύλλα στα φυμάτια και στα φυμάτια αντίστοιχα, παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές μετά από την έλλειψη άνθρακα σε όλα τους εξεταζόμενα όργανα (**εικόνα 3.11**). Επίσης, όπως φαίνεται από την **εικόνα 3.6** τα *pGlcT4* και *MtESL5_1* ήταν μεταξύ των MSTs που παρουσίασαν τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στις ρίζες και τα φύλλα, αντίστοιχα.

Όλες οι τιμές των σχετικών επιπέδων έκφρασης των MST-γονιδίων των τριών διαφορετικών ομάδων φυτών, καθώς και οι τιμές στατιστικής σημαντικότητά τους (p-value) φαίνονται στο **Παράρτημα (πίνακες Π2-Π6)**.

Η επίδραση του σκότους στα επίπεδα έκφρασης των MST-γονιδίων του *M. truncatula* θα μπορούσε να καταλείψει τα γονίδια αυτά που έδειξαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές στο μεταγραφομικό τους επίπεδο υπό την επίδραση της καταπόνησης σε 5 διακριτές ομάδες: γονίδια των οποίων η έκφραση μειώθηκε τις πρώτες 24 h στο σκοτάδι, αλλά παρουσίασε σημαντική επαγωγή μετά από 72 h (Ομάδα 1), γονίδια των οποίων η έκφραση έδειξε τελείως διαφορετική αντίδραση κατά την παραμονή τους στο σκοτάδι από τα παραπάνω (Ομάδα 2), γονίδια των οποίων τα μεταγραφήματα παρουσίασαν σταδιακή μείωση (Ομάδα 3) ή αύξηση (Ομάδα 4) και τέλος, γονίδια των οποίων η έκφραση γενικότερα επηρεάστηκε

ασθενώς από την παραμονή στο σκοτάδι (Ομάδα 5) (εικόνα 3.11). Κάθε ομάδα αντιπροσωπεύθηκε με διαφορετικό νούμερο γονιδίων στα διάφορα όργανα του φυτού.



Εικόνα 3.11: Θερμικός χάρτης (heat map) των μεταγραφομικών αλλαγών των MSTs γονιδίων του *M.truncatula* στα εξεταζόμενα όργανα των φυτών των ομάδων I, II και III (ομάδα I: κανονική φωτοπερίοδος, ομάδα II: 24h σκοτάδι, ομάδα III: 72h σκοτάδι). Τα a,b,c δείχνουν το επίπεδο σημαντικότητας με τη χρήση ANOVA και post-hoc Tukey HSD. Η στατιστική σημαντικότητα

μετρήθηκε για $p \leq 0.05$. Τρεις βιολογικές επαναλήψεις χρησιμοποιήθηκαν για τη μεταγραφομική ανάλυση κάθε οργάνου του *M.truncatula* των φυτών των ομάδων I, II και III. Για κάθε γονίδιο, ο χρωματισμός του θερμικού χάρτη έγινε με βάση την τιμή των επιπέδων mRNA του συγκεκριμένου γονιδίου σε όλα τα όργανα του φυτού του και σε όλες τις πειραματικές συνθήκες.

Στα φυμάτια, τα μεταγραφήματα των περισσότερων MST-γονιδίων μειώθηκαν μετά από 24 h στο σκοτάδι, περιλαμβανομένων μελών των υποοικογενειών: STP, PMT, INT και TMT, αλλά σχεδόν αποκατέστησαν τα επίπεδα έκφρασής τους μετά από 72 h στο σκοτάδι (Ομάδα 1). Τα *MtSTP13* και *MtPMT6_1* (και τα δύο στην Ομάδα 3) ήταν τα μόνα MST-γονίδια που παρουσίασαν σταδιακή μείωση της έκφρασής τους μετά από το καταπόνηση στο σκοτάδι.

Στη ρίζα, οι περισσότεροι MSTs παρουσίασαν μεγαλύτερη διασπορά μεταξύ των πέντε διακριτών ομάδων, με την πλειοψηφία να ανήκει στην Ομάδα 4 (*MtINT1_2*, *MtINT1_3*, *MtINT1_4*, *MtINT1_1*, *MtINT4_2*, *MtSTP1_2*, *MtSTP1_5*, *MtSTP1_4*, *MtSTP14_3*, *MtESL6_1*, *MtESL6_3*, *MtESL16_1*, *MtpGlcT1* και *MtVGT2_1*). Τα *MtINT1_2*, *MtINT1_3*, *MtINT4_2* και *MtESL6_1* ήταν τα MST-γονίδια που αύξησαν περισσότερο τα επίπεδα έκφρασής τους μετά από 72 h στο σκοτάδι (12 φορές, 13 φορές, 10 φορές και 10 φορές αντίστοιχα). Παρ' όλα αυτά υπήρχαν εννιά MST-γονίδια (*MtESL6_4*, *MtESL16_2*, *MtPMT4_1*, *MtPMT4_2*, *MtPMT4_3*, *MtPMT6_1*, *MtINT2_1*, *MtSTP7_5* και *MtSTP7_6*) τα οποία μείωσαν τα επίπεδα έκφρασής τους μετά την υποβολή τους στο παρατεταμένο σκοτάδι (Ομάδα 3). Μάλιστα δύο από αυτά, τα *MtPMT6_1* και *MtESL16_2* μείωσαν 21 και 31 φορές αντίστοιχα τα επίπεδα έκφρασής τους.

Τα φωτοσυνθετικά όργανα παρουσίασαν μια ευρύτερη κατανομή των γονιδίων. Στο βλαστό, η Ομάδα 1 περιελάμβανε τα περισσότερα (13) MST-γονίδια που παρουσίασαν παρόμοια αντίδραση στο σκοτάδι. Αυτά ήταν τα: *MtINT1_1*, *MtINT1_2*, *MtINT1_4*, *MtINT2_3*, *MtTMT3_1*, *MtTMT3_3*, *MtTMT2_2*, *MtPMT6_2*, *MtPMT6_3*, *MtSTP5_4*, *MtSTP7_1*, *MtESL6_2* και *MtpGlcT1*. Από την άλλη, τα *MtSTP1_7*, *MtESL6_1* και *MtESL16_1* της Ομάδας 4 παρουσίασαν την υψηλότερη αύξηση (13 φορές, 17 φορές, 13 φορές αντίστοιχα) στα μεταγραφήματά τους μετά από την παραμονή τους στο σκοτάδι. Στα ακροβλαστίδια εννιά MST-γονίδια αποτέλεσαν τη μεγαλύτερη Ομάδα 2 (*MtSTP7_3*, *MtSTP7_5*, *MtSTP7_6*, *MtPMT5_3*, *MtPMT6_2*, *MtESL5_1*, *MtESL5_2*, *MtINT1_1* και *MtpGlcT2*). Αντίθετα το *MtSTP1_2* της Ομάδας 1 παρουσίασε 61 φορές μειωμένα επίπεδα έκφρασης μετά από 24 h στο σκοτάδι. Τέλος στα φύλλα, εννιά MST-γονίδια παρουσίασαν σταδιακή

μείωση των τρανσκριπτομάτων τους μετά από την έλλειψη άνθρακα [*MtSTP7_3* (10-φορές), *MtSTP14_1*, *MtPMT5_2* (24-φορές), *MtPMT5_3*, *MtPMT6_3*, *MtTMT2_1*, *MtTMT2_2*, *MtINT2_3* και *MtpGlcT1*]. Αντιθέτως έξι μέλη των MSTs αύξησαν σταδιακά τα επίπεδα έκφρασής τους (Ομάδα 4) μετά από την παραμονή τους σε συνθήκες σκότους: *MtESL5_2*, *MtESL6_1* (145-φορές), *MtESL6_3*, *MtINT1_3*, *MtSTP7_4* και *MtVGT2_1*.

Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι τα περισσότερα MST-γονίδια άλλαξαν ομάδα ανάλογα με το όργανο του φυτού, όπως τα *MtSTP13*, *MtPMT6_1*, *MtINT2_1*, *MtpGlcT1* κ.ά. Αντίθετα, λίγα γονίδια ήταν αυτά για τα οποία η έκφρασή τους ακολούθησε πάντα μια συγκεκριμένη ομάδα ανεξάρτητα από το όργανο του φυτού. Αυτά ήταν τα: *MtSTP7_4* και *MtESL6_3* (Ομάδα 4), *MtESL7* (Ομάδα 2) και επίσης τα *MtSTP1_1*, *MtSTP3_2*, *MtSTP7_1*, *MtSTP10_1*, *MtSTP10_2*, *MtSTP13_1*, *MtINT4_1*, *MtPMT5_1* και *MtTMT3_1* (Ομάδα 1). Επίσης η καταπόνηση που προκλήθηκε από την παραμονή σε σκοτάδι επηρέασε διαφορετικά την έκφραση των MST-γονιδίων της ίδιας ομάδας *MtSTP13*, *MtSTP13_1* και *MtSTP13_2*, καθώς τα μεταγραφομικά τους προφίλ τα ταξινόμησαν σε διαφορετικές ομάδες ακόμα και στο ίδιο όργανο.

Επιπλέον, τα *MtSTP1_3*, *MtSTP10_3*, *MtSTP14_2* τα οποία παρουσίασαν ένα εξειδικευμένο στα φυμάτια μεταγραφομικό προφίλ βρέθηκαν να ανήκουν στην Ομάδα 1. Τα MST-γονίδια που παρουσίασαν την υψηλότερη έκφραση στα διάφορα όργανα του φυτού στο τέλος της φωτεινής περιόδου της κανονικής φωτοπεριόδου (**εικόνα 3.11**), ανήκαν όλα εκτός των *MtSTP13* και *MtPMT6_1* στην Ομάδα 1 όσον αφορά τα φυμάτια, ενώ στα υπόλοιπα όργανα διασκορπίστηκαν στις Ομάδες 1-4. Επιπλέον τα TMT-γονίδια των οποίων τα προϊόντα προβλέπονται να λειτουργούν ως μεταφορείς (carriers) μονοσακχαριτών, παρουσίασαν γενικότερα μειωμένη έκφραση τουλάχιστον τις πρώτες 24 h υπό συνεχές σκοτάδι και βρέθηκαν να ανήκουν συνήθως στις Ομάδες 1 και 3.

Τα μέλη της κάθε ομάδας παρουσίασαν σημαντικά υψηλές θετικές συσχετίσεις με τις υψηλότερες τιμές να εντοπίζονται στα φυμάτια για τα μέλη της Ομάδας 1 μεταξύ των φυτών που συλλέχθηκαν σε κανονική φωτοπερίοδο και αυτών που υποβλήθηκαν σε 24 h συνεχές σκοτάδι, καθώς και μεταξύ αυτών που υποβλήθηκαν σε 24 h και 72h παρατεταμένο σκότος (**εικόνα 3.9 και 3.10**).

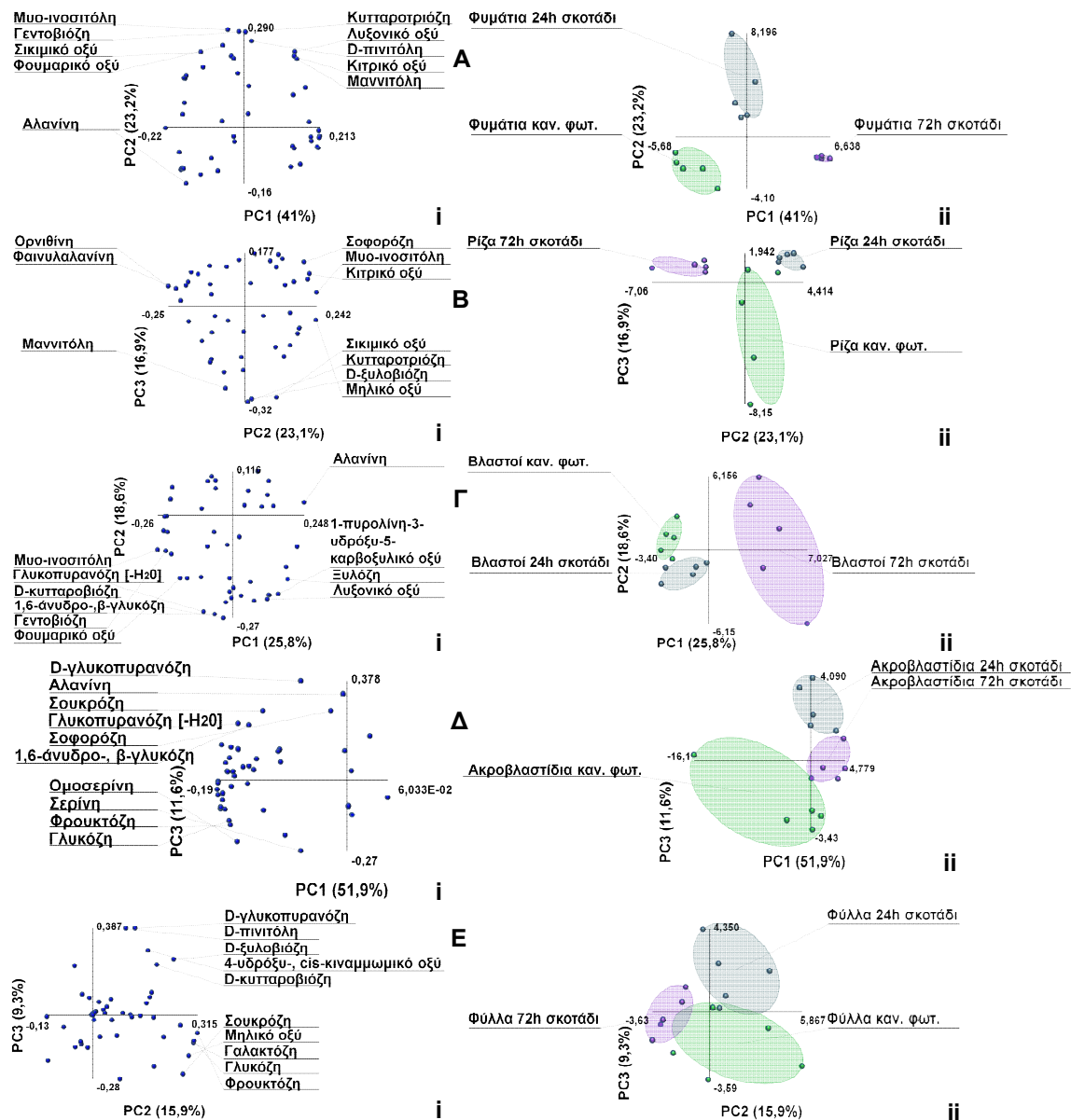
3.7. Μεταβολομικό προφίλ υπό συνθήκες έλλειψης άνθρακα

Για να συσχετίσουμε τα μεταγραφομικά προφίλ των μεταφορέων μονοσακχαριτών της οικογένειας των MSTs υπό συνθήκες έλλειψης C με το μεταβολομικό περιεχόμενο υπό τις ίδιες εξεταζόμενες συνθήκες, έγινε χρήση της GC-MS μεταβολομικής ανάλυσης. Η GC-MS ανάλυση στα φυμάτια, στις ρίζες, στους βλαστούς, στα ακροβλαστίδια και στα φύλλα των φυτών των τριών ομάδων (I, II, III), εντόπισε μεταβολίτες που ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες και περιλαμβάνουν αμινοξέα, σάκχαρα, πολυόλες, οργανικά οξέα και ένα ανόργανο οξύ. Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ANOVA για τους 47 μεταβολίτες που ταυτοποιήθηκαν. 35 από αυτούς παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p \leq 0,05$) στα φυμάτια, 16 στις ρίζες, 8 στα φύλλα, 21 στους βλαστούς και 20 στα ακροβλαστίδια. Όλοι οι μεταβολίτες που εντοπίστηκαν, οι μέσες τιμές έκφρασής τους (mean ratios), το τυπικό τους σφάλμα (SE), καθώς και οι στατιστικές τιμές τους (p-values) φαίνονται παρακάτω στο **παράρτημα (πίνακες Π7-Π11)**.

3.8. PCA ανάλυση των εντοπισθέντων μεταβολιτών στα εξεταζόμενα όργανα των τριών ομάδων φυτών του *M. truncatula*

Η PCA ανάλυση, η οποία επιτρέπει την ταξινόμηση των δειγμάτων σε ομάδες, ανέδειξε μεγάλη παραλλακτικότητα στο μεταβολικό πρότυπο των εξεταζόμενων οργάνων των τριών ομάδων φυτών του *M. truncatula* (I, II, II). Οι πρώτες δύο κύριες συνιστώσες που αντιπροσωπεύουν το 64,2 % της συνολικής παραλλακτικότητας που παρατηρήθηκε στους μεταβολίτες που εντοπίστηκαν στα φυμάτια των *MtMSTs* υπό συνθήκες έλλειψης άνθρακα (**εικόνα 3.12 Α**), διαχώρισαν ευκρινώς τα δείγματα των τριών διαφορετικών ομάδων φυτών. Στις ρίζες, οι πρώτες δυο κύριες συνιστώσες διαχώρισαν ξεκάθαρα τα φυτά που υποβλήθηκαν σε 72 h σκοτάδι από αυτά της κανονικής φωτοπεριόδου και αυτά που υποβλήθηκαν σε 24 h σκοτάδι, τα οποία με τη σειρά τους διαχωρίστηκαν ευκρινώς με τις κύριες συνιστώσες 2 και 3 και οι οποίες αντιπροσωπεύουν το 40 % της συνολικής παραλλακτικότητας (**εικόνα 3.12 Β**). Οι πρώτες δύο κύριες συνιστώσες επίσης που αντιπροσωπεύουν το 44,4 % της συνολικής παραλλακτικότητας του μεταβολικού προφίλ στους βλαστούς επέτρεψαν το διαχωρισμό μεταξύ των τριών διαφορετικών ομάδων φυτών (**εικόνα 3.12 Γ**). Στα ακροβλαστίδια, οι πρώτες δύο συνιστώσες διαχώρισαν ευκρινώς τα φυτά που υπέστησαν 72 h έλλειψη άνθρακα από τα υπόλοιπα φυτά, ενώ οι κύριες συνιστώσες 1

και 3 που αντιπροσωπεύουν το 63,5 % της συνολικής παραλλακτικότητας (εικόνα 3.12 Δ), διαχώρισαν ευκρινώς όλες τις ομάδες φυτών. Τέλος, η PCA ανάλυση των μεταβολιτών στα φύλλα του *M.truncatula* έδειξε μια ασθενή διαφοροποίηση των διαφόρων ομάδων φυτών, μόνο έπειτα από σύγκριση των κύριων συνιστωσών 2 και 3 (εικόνα 3.12 Ε).



Εικόνα 3.12: PCA ανάλυση των μεταβολιτών που εντοπίστηκαν στις τρεις ομάδες των φυτών: **A)** στα φυμάτια, **i)** διάγραμμα των βαρών (loadings) των συνιστωσών που δείχνει τους μεταβολίτες με τη μεγαλύτερη διακύμανση υπό τις εξεταζόμενες πειραματικές συνθήκες, **ii)** διάγραμμα των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών, που αντιπροσωπεύουν το 64,2 % της συνολικής παραλλακτικότητας που παρατηρήθηκε στο μεταβολομικό προφίλ μετά από GC-MS ανάλυση, **B)** στις ρίζες, **i)** διάγραμμα των βαρών (loadings) των συνιστωσών που δείχνει τους μεταβολίτες με τη μεγαλύτερη διακύμανση υπό τις εξεταζόμενες πειραματικές συνθήκες, **ii)** διάγραμμα των κύριων συνιστωσών 2 και 3, που

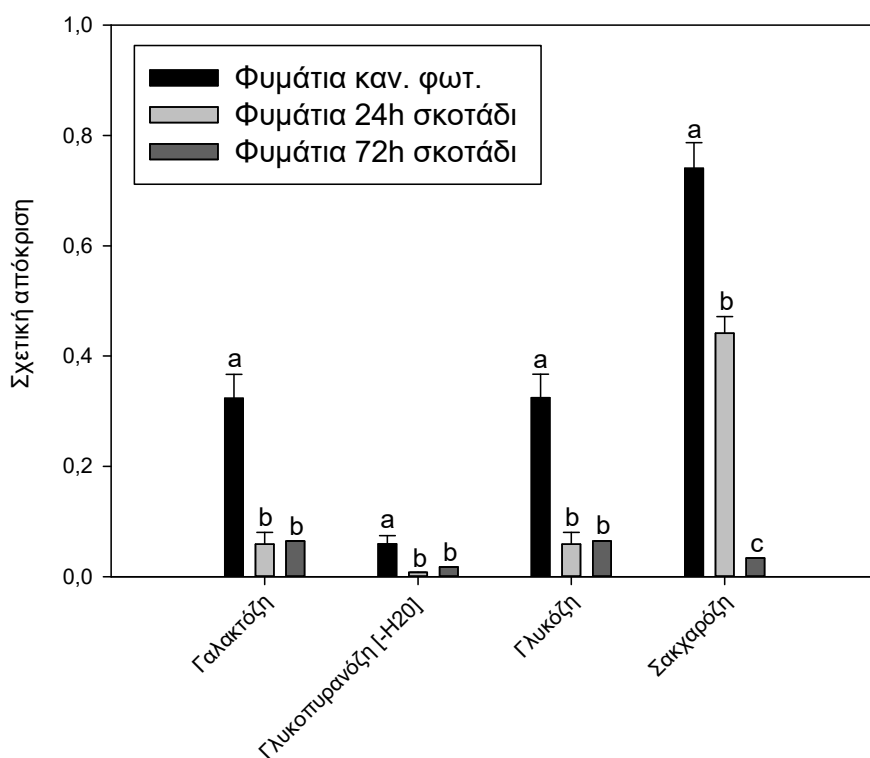
αντιπροσωπεύουν το 40 % της συνολικής παραλλακτικότητας που παρατηρήθηκε στο μεταβολομικό προφίλ μετά από GC-MS ανάλυση, **Γ**) στους βλαστούς, i) διάγραμμα των βαρών (loadings) των συνιστωσών που δείχνει τους μεταβολίτες με τη μεγαλύτερη διακύμανση υπό τις εξεταζόμενες πειραματικές συνθήκες, ii) διάγραμμα των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών, που αντιπροσωπεύουν το 44,4 % της συνολικής παραλλακτικότητας που παρατηρήθηκε στο μεταβολομικό προφίλ μετά από GC-MS ανάλυση, **Δ**) στα ακροβλαστίδια, i) διάγραμμα των βαρών (loadings) των συνιστωσών που δείχνει τους μεταβολίτες με τη μεγαλύτερη διακύμανση υπό τις εξεταζόμενες πειραματικές συνθήκες, ii) διάγραμμα των κύριων συνιστωσών 1 και 3, που αντιπροσωπεύουν το 63,5 % της συνολικής παραλλακτικότητας που παρατηρήθηκε στο μεταβολομικό προφίλ μετά από GC-MS ανάλυση, **Ε**) στα φύλλα, i) διάγραμμα των βαρών (loadings) των συνιστωσών που δείχνει τους μεταβολίτες με τη μεγαλύτερη διακύμανση υπό τις εξεταζόμενες πειραματικές συνθήκες, ii) διάγραμμα των κύριων συνιστωσών 2 και 3, που αντιπροσωπεύουν το 25,2 % της συνολικής παραλλακτικότητας που παρατηρήθηκε στο μεταβολομικό προφίλ μετά από GC-MS ανάλυση. Για την ανάλυση κύριων συνιστωσών χρησιμοποιήθηκαν μετρήσεις από πέντε ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις από κάθε όργανο από κάθε ομάδα φυτών.

3.9. Κατηγορίες μεταβολιτών που εντοπίστηκαν μετά από GC-MS ανάλυση

3.9.1. Σάκχαρα

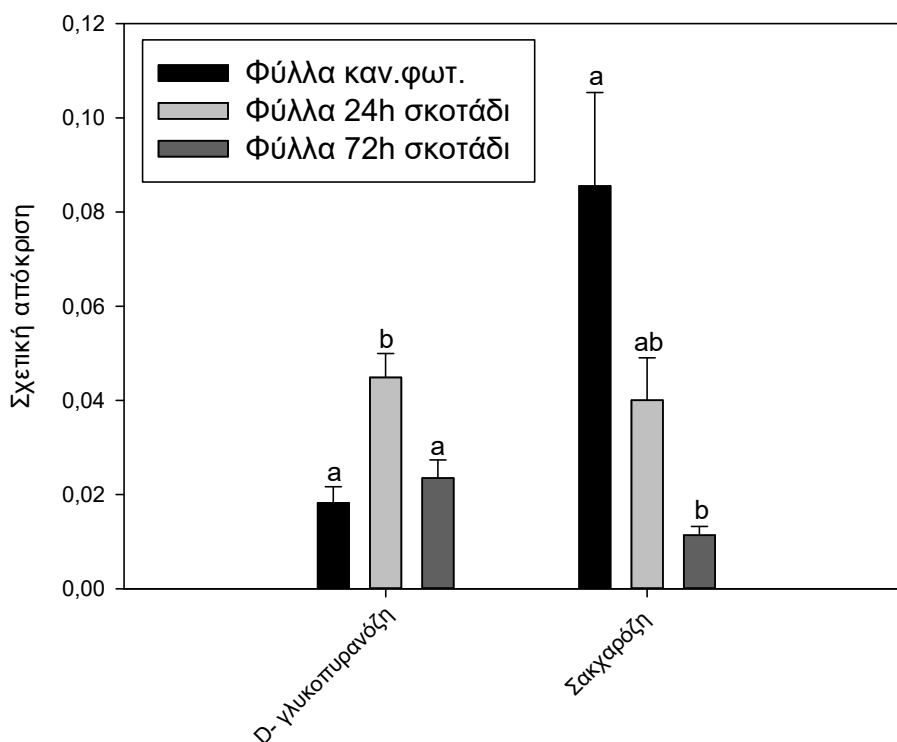
Η έκθεση των φυτών σε παρατεταμένο σκοτάδι επέφερε αλλαγές σε 13 από τους 18 σάκχαρα που εντοπίστηκαν. Μάλιστα η πλειοψηφία τους αντέδρασε διαφορετικά σε κάθε όργανο του φυτού. Στα φυμάτια η σακχαρόζη (**εικόνα 3.13**), η σοφορόζη και 6-φωσφορική μαννόζη ήταν οι μεταβολίτες που παρουσίασαν τη μεγαλύτερη μείωση στις συγκεντρώσεις τους μετά από παρατεταμένη παραμονή στο σκοτάδι. Η γαλακτόζη, η γλυκοπυρανόζη και η γλυκόζη (**εικόνα 3.13**) παρουσίασαν επίσης σημαντική μείωση, ειδικά μετά από 24 h στο σκοτάδι. Αντίθετα, η ξυλόζη και η α-λακτόζη παρουσίασαν σταδιακή αύξηση στο σκοτάδι. Η κυτταροτριόζη και η γεντοβιόζη παρουσίασαν επίσης αύξηση των συγκεντρώσεών τους στο σκοτάδι, κυρίως όμως στα φυτά της έπειτα από 24h στο σκοτάδι. Η λυξόζη και η ριβόζη παρουσίασαν ελαφριά αύξηση ύστερα από 24 h στο σκοτάδι, την οποία ακολούθησε όμως μείωση της συσσώρευσής τους ύστερα από 72 h σκοταδιού. Στις ρίζες, η καταπόνηση που επήλθε μετά από την παραμονή στο σκοτάδι άλλαξε ποικιλοτρόπως τις συγκεντρώσεις των περισσότερων σακχάρων που εντοπίστηκαν. Η σακχαρόζη και η κυτταροτριόζη παρουσίασαν μείωση των συγκεντρώσεών τους στο σκοτάδι. Αντιθέτως, η 1,6-άνυδρο-, β-γλυκόζη παρουσίασε σημαντική αύξηση στις ρίζες των φυτών της ομάδας II. Η φρουκτόζη και η σοφορόζη αυξήθηκαν σημαντικά μετά από 24 h έκθεσής τους στο σκοτάδι, αλλά μετά ακολούθησε μείωση της συσσώρευσης

τους. Όμοια με τα φυμάτια, η ξυλόζη παρουσίασε σταδιακή αύξηση της συσσώρευσής της στη ρίζα στο σκοτάδι. Στους βλαστούς παρατηρήθηκε γενικότερα μείωση των συγκεντρώσεων των σακχάρων ύστερα από παραμονή στο παρατεταμένο σκοτάδι, ιδίως μετά από 72h. Η φρουκτόζη, η γαλακτόζη, η γλυκόζη, η γεντοβιόζη, η σακχαρόζη και η ξυλοβιόζη έδειξαν μια σταδιακή μείωση των συγκεντρώσεών τους στο παρατεταμένο σκοτάδι. Η D-γλυκοπυρανόζη παρουσίασε τα υψηλότερα επίπεδα συγκέντρωσής της μετά από 24 h συνεχούς σκότους και σημαντική μείωση έπειτα από 72 h παρατεταμένου σκότους. Στα ακροβλαστίδια, τα περισσότερα σάκχαρα, όπως η αραβινόζη, η φρουκτόζη, η γαλακτόζη, η γλυκόζη, η λυξόζη μειώθηκαν σημαντικά έπειτα από το καταπύηση στο σκοτάδι, με τη φρουκτόζη και τη γαλακτόζη μάλιστα να παρουσιάζουν 24 και 16 φορές αντίστοιχα μικρότερες τιμές συσσώρευσης. Αντίθετα η D-γλυκοπυρανόζη αυξήθηκε στο σκοτάδι. Τέλος, τα περισσότερα σάκχαρα στα φύλλα παρουσίασαν σταδιακή μείωση στο σκοτάδι. Η συγκέντρωση της σακχαρόζης μειώθηκε 7,5 φορές έπειτα από έκθεση 72 h σε συνεχές σκότος (εικόνα 3.14). Από την άλλη, η D-γλυκοπυρανόζη αύξησε τη συσσώρευση της στο σκοτάδι, κυρίως τις πρώτες 24 h (εικόνα 3.14).



Εικόνα 3.13: Σχετική απόκριση των σακχάρων με την υψηλότερη συγκέντρωση σε συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου, τα οποία έδειξαν επίσης στατιστικά σημαντικές διαφορές στα φυμάτια,

έπειτα από παραμονή στο παρατεταμένο σκοτάδι. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των ανεξάρτητων βιολογικών επαναλήψεων (n=5) +/- SE. a, b, c δείχνουν τα επίπεδα των διαφορών που προέκυψαν με ANOVA και post-hoc Tukey HSD. Η στατιστική σημαντική διαφορά εκτιμήθηκε για $p \leq 0.05$.



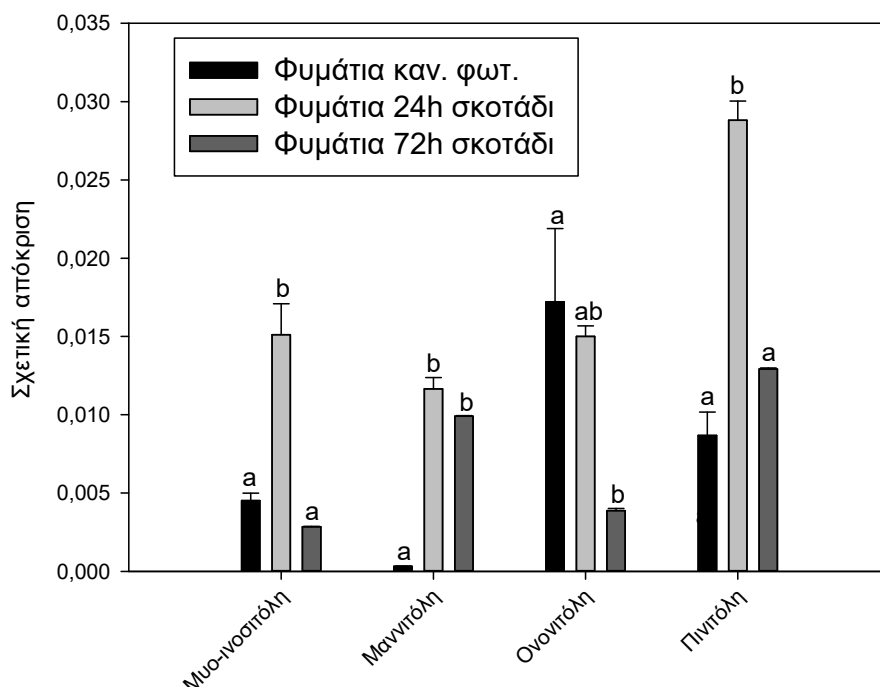
Εικόνα 3.14: Σχετική απόκριση των σακχάρων με την υψηλότερη συγκέντρωση σε συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου, τα οποία έδειξαν επίσης στατιστικά σημαντικές διαφορές στα φύλλα, έπειτα από παραμονή στο παρατεταμένο σκοτάδι. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των ανεξάρτητων βιολογικών επαναλήψεων (n=5) +/- SE. a, b, c δείχνουν τα επίπεδα των διαφορών που προέκυψαν με ANOVA και post-hoc Tukey HSD. Η στατιστική σημαντική διαφορά εκτιμήθηκε για $p \leq 0.05$.

3.9.2. Πολυόλες

Η μεταβολομική ανάλυση εντόπισε πέντε μεταβολίτες που ανήκουν στις πολυόλες στα διάφορα όργανα των φυτών των ομάδων I, II και III. Στα φυμάτια, όλες τους παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές υπό συνθήκες έλλειψης άνθρακα. Η καταπόνηση που προήλθε μετά από παραμονή στο σκοτάδι, αύξησε τις συγκεντρώσεις της πινιτόλης και της μαννιτόλης (37 φορές), ιδίως έπειτα από παραμονή 24 h στο σκοτάδι (**εικόνα 3.15**). Η μυο-ινοσιτόλη ήταν ο μόνος μεταβολίτης που έδειξε στατιστικά σημαντικές αλλαγές σε όλα τα εξεταζόμενα όργανα. Στα φυμάτια αυξήθηκε μετά από 24 h στο σκοτάδι, αλλά μετά μειώθηκε (**εικόνα 3.15**). Όσον αφορά την 1,2,4-τριόλη-βενζένιο, παρατηρήθηκε μια μικρή

αύξηση μετά από 24 h σκοταδιού, η οποία όμως ακολουθήθηκε από μια μικρή μείωση ύστερα από 72 h συνεχούς σκοταδιού. Από την άλλη, η συγκέντρωση της ονονιτόλης παρουσίασε σταδιακή μείωση από την καταπόνηση με την παραμονή στο σκοτάδι (εικόνα 3.15).

Στις ρίζες, μόνο η μυο-ινοσιτόλη παρουσίασε στατιστικά σημαντικές αλλαγές, παρουσιάζοντας αύξηση μετά από 24 h και μείωση έπειτα από 72 h συνεχούς σκότους. Στους βλαστούς, η μυο-ινοσιτόλη και η ονονιτόλη έμειναν σχεδόν σταθερές ως προς τις συγκεντρώσεις τους μετά από 24 h στο σκοτάδι, αλλά μειώθηκαν 8 και 3,5 φορές αντίστοιχα, έπειτα από 72 h συνεχούς σκότους. Στα ακροβλαστίδια η μυο-ινοσιτόλη παρουσίασε σταδιακή μείωση κατά την καταπόνηση σε παρατεταμένο σκοτάδι και έφτασε να υποδεκαπλασιαστεί στα φυτά που υπέστησαν 72 h συνεχές σκοτάδι. Η ονονιτόλη αυξήθηκε ελαφρά μετά από 24 h παραμονής στο σκοτάδι, αλλά μειώθηκε (5 φορές) στη συνέχεια. Στα φύλλα η μυο-ινοσιτόλη παρουσίασε μεγάλη μείωση (33 φορές) των συγκεντρώσεών της στο παρατεταμένο σκοτάδι. Η ονονιτόλη επίσης στα φύλλα αυξήθηκε ελαφρώς μετά από 24 h στο σκοτάδι, αλλά τελικά μειώθηκε 3 φορές μετά από παραμονή στο παρατεταμένο σκοτάδι των 72 h.

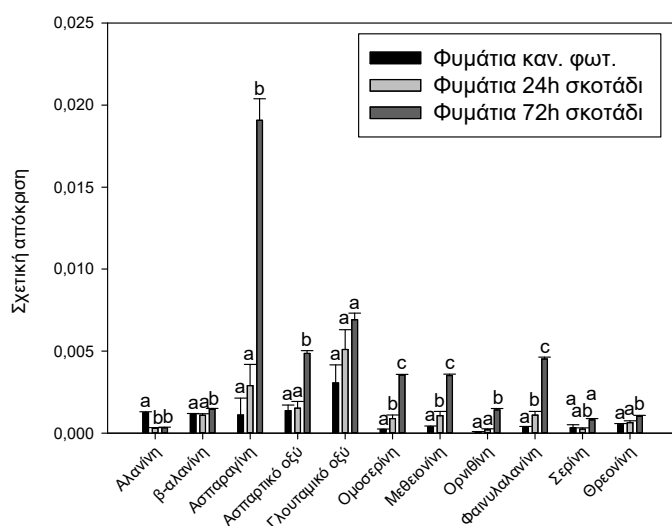


Εικόνα 3.15: Σχετική απόκριση της μυο-ινοσιτόλης σε όλα τα εξεταζόμενα όργανα υπό συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου και υπό 24 h και 72 h συνεχούς σκότους. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των ανεξάρτητων βιολογικών επαναλήψεων (n=5) +/- SE. a, b, c δείχνουν τα επίπεδα των

διαφορών που προέκυψαν με ANOVA και post-hoc Tukey HSD. Η στατιστική σημαντική διαφορά εκτιμήθηκε για $p \leq 0.05$.

3.9.3. Αμινοξέα

Σχεδόν όλα τα αμινοξέα που εντοπίστηκαν έδειξαν μια στατιστικά σημαντική αύξηση στα φυμάτια υπό συνθήκες έλλειψης φωτός, ειδικά μετά από 72 h συνεχούς σκότους (**εικόνα 3.16**). Η υψηλότερη αύξηση παρατηρήθηκε για την ασπαραγίνη και την ορνιθίνη των οποία τα επίπεδα συσσώρευσης αυξήθηκαν 17 και 22,5 φορές μετά από 72 h παρατεταμένου σκοταδιού. Η φαινυλαλανίνη, η ομοσερίνη, η μεθειονίνη και η ορνιθίνη έδειξαν επίσης υψηλά επίπεδα συσσώρευσης στα φυμάτια ύστερα από παρατεταμένο σκοτάδι. Ομοίως η β-αλανίνη, η θρεονίνη και η σερίνη έδειξαν επίσης σημαντικά στατιστική αύξηση έπειτα από 72 h συνεχούς σκότους. Γενικότερα τα αμινοξέα και ειδικά η ασπαραγίνη και η ορνιθίνη βρέθηκαν να έχουν υψηλά επίπεδα συσσώρευσης και στις ρίζες των φυτών μετά από 72 h σκοτάδι. Ενδιαφέρον παρουσίασε επίσης, ότι τα περισσότερα αμινοξέα μειώθηκαν στους βλαστούς και στα ακροβλαστίδια των φυτών της ομάδας II, εντούτοις στα φυτά του της ομάδας III αποκατέστησαν τις συγκεντρώσεις τους. Η αλανίνη και το γλουταμικό οξύ έδειξαν στατιστικά σημαντική αύξηση στα ακροβλαστίδια υπό συνθήκες έλλειψης άνθρακα. Τέλος στα φύλλα, το ασπαρτικό οξύ ήταν ο μόνος μεταβολίτης που έδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση στις συγκεντρώσεις του υπό συνθήκες παρατεταμένου σκοταδιού.



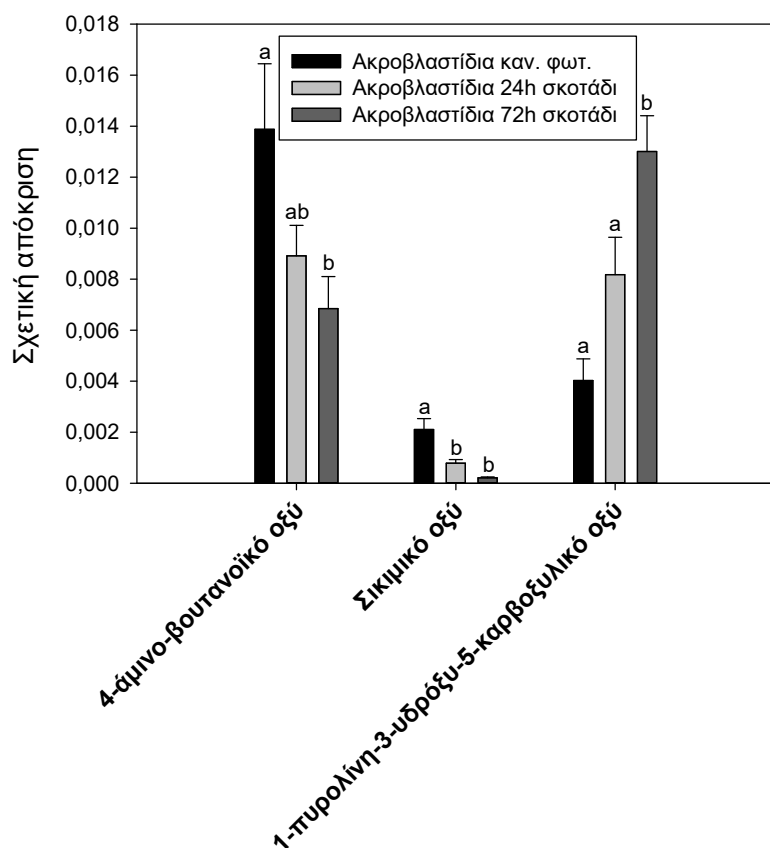
Εικόνα 3.16: Σχετική απόκριση αμινοξέων στα φυμάτια υπό συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου και υπό 24h και 72h συνεχούς σκότους. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των ανεξάρτητων

βιολογικών επαναλήψεων (n=5) +/- SE. a, b, c δείχνουν τα επίπεδα των διαφορών που προέκυψαν με ANOVA και post-hoc Tukey HSD. Η στατιστική σημαντική διαφορά εκτιμήθηκε για $p \leq 0.05$.

3.9.4. Οργανικά οξέα

Η GC-MS ανάλυση εντόπισε δώδεκα μεταβολίτες που ανήκουν στην κατηγορία των οργανικών οξέων στα εξεταζόμενα όργανα των φυτών των ομάδων I, II και III. Τα οξέα αυτά επηρεάστηκαν με διαφορετικό τρόπο μετά από παραμονή στο σκοτάδι. Στα φυμάτια 7 από αυτά παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές μετά από παραμονή στο παρατεταμένο σκοτάδι. Το γαλακτονικό οξύ το οποίο βρέθηκε να συσσωρεύεται σε μεγάλες ποσότητες στα φυμάτια, παρουσίασε σταδιακή μείωση υπό την καταπόνηση του σκοταδιού. Ίδια αντίδραση παρουσιάστηκε και για το 4-υδρόξυ-,cis-κινναμωμικό οξύ. Το βανιλικό οξύ μείωσε τη συσσώρευσή του στα φυμάτια τις πρώτες 24 h στο σκοτάδι. Αντίθετα, τα επίπεδα συγκέντρωσης του κιτρικού και του σακχαρικού οξέως παρουσίασαν σταδιακή αύξηση σε συνθήκες σκοταδιού. Ομοίως, τα υψηλότερα επίπεδα του λυξονικού οξέως εντοπίστηκαν στα φυμάτια των φυτών της ομάδας II. Το σικιμικό οξύ αυξήθηκε ελαφρά έπειτα από 24 h στο σκοτάδι, αλλά παρουσίασε μείωση της συγκέντρωσης του αργότερα. Στη ρίζα πέντε οργανικά οξέα παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές μετά από την καταπόνηση που προήλθε από την παραμονή στο σκοτάδι. Το γαλακτονικό οξύ αυξήθηκε σταδιακά, ενώ το κιτρικό, το φουμαρικό και το μηλικό οξύ παρουσίασαν τα υψηλότερα επίπεδα συγκεντρώσεών τους τις πρώτες 24 h στο σκοτάδι. Οι συγκεντρώσεις αυτές αργότερα μειώθηκαν. Το γαλακτικό οξύ βρέθηκε σε υψηλές συγκεντρώσεις έπειτα από 72h συνεχούς σκότους. Στους βλαστούς, 6 οργανικά οξέα έδειξαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές στο σκοτάδι. Το σικιμικό οξύ μειώθηκε σημαντικά (4 φορές) στο παρατεταμένο σκοτάδι, ενώ το φουμαρικό, το 4-υδρόξυ-,cis-κινναμωμικό και το μηλικό οξύ παρουσίασαν αυξημένες συγκεντρώσεις ύστερα από 24 h στο σκοτάδι, που στη συνέχεια όμως μειώθηκαν. Επιπλέον, το κιτρικό και το βανιλικό οξύ έδειξαν υψηλότερες συγκεντρώσεις έπειτα από το καταπόνηση στο σκοτάδι. Στα ακροβλαστίδια, τα οργανικά οξέα γενικότερα μείωσαν τις συγκεντρώσεις τους στο σκοτάδι. Παρ' όλα αυτά, μόνο τρεις μεταβολίτες παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές. Το 4-άμινο-βουτανοϊκό και σικιμικό οξύ μείωσαν 2 και 10 φορές αντίστοιχα τις συγκεντρώσεις τους στο παρατεταμένο σκοτάδι. Αντιθέτως το 1-πυρολίνη-3-υδρόξυ-5-καρβοξυλικό-οξύ αυξήθηκε 3 φορές στο παρατεταμένο σκοτάδι (εικόνα 3.17). Τέλος στα φύλλα τρία οργανικά οξέα παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές

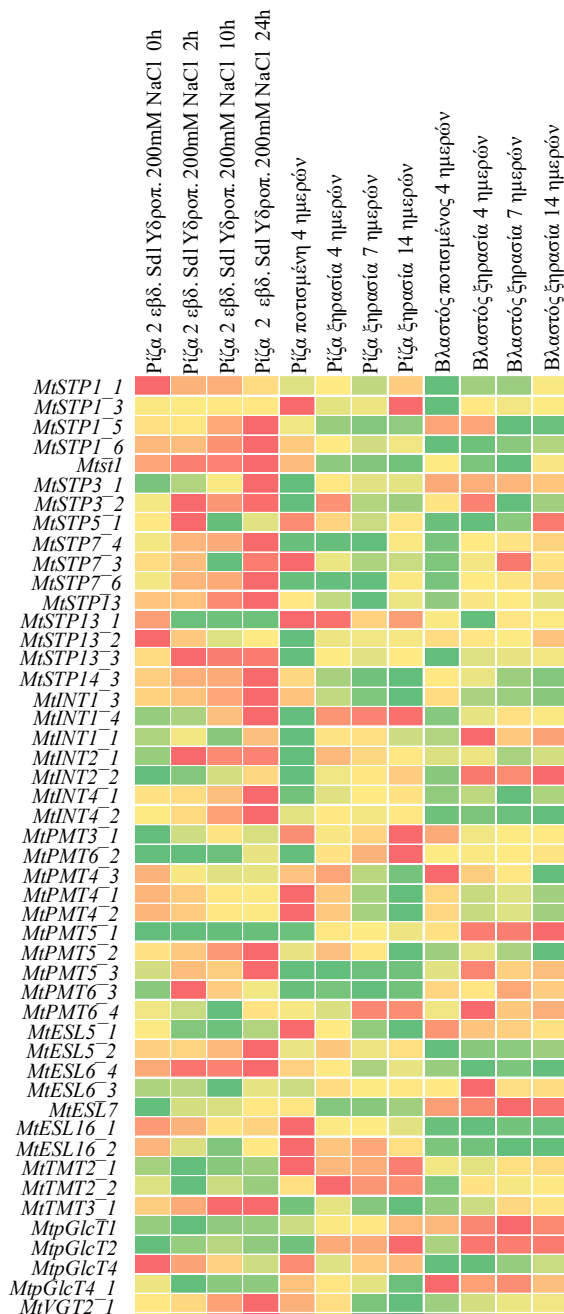
αλλαγές λόγω της καταπόνησης που προήλθε από την παραμονή στο σκοτάδι. Το μηλικό και το σικιμικό οξύ παρουσίασαν σταδιακή μείωση στο σκοτάδι, ενώ το 4-υδρόξυ-,cis-κινναμωμικό παρουσίασε αύξηση της συσσώρευσής του, ειδικά τις πρώτες 24 h στο σκοτάδι.



Εικόνα 3.17: Σχετική απόκριση των οργανικών οξέων που παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές μετά από την καταπόνηση στο σκοτάδι. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των ανεξάρτητων βιολογικών επαναλήψεων (n=5) +/- SE. a, b, c δείχνουν τα επίπεδα των διαφορών που προέκυψαν με ANOVA και post-hoc Tukey HSD. Η στατιστική σημαντική διαφορά εκτιμήθηκε για $p \leq 0.05$.

3.10. Ανάλυση αποτελεσμάτων φυτών του *M. truncatula* σε συνθήκες αλατότητας και ξηρασίας από τη βάση δεδομένων του MtGEA.

Πραγματοποιήθηκε μια μεγάλη *in silico* ανάλυση για *Medicago truncatula* στη βάση δεδομένων: Gene Expression Atlas (MtGEA) (<http://mtgea.noble.org/v2>) και κατασκευάστηκε θερμικός χάρτης (heat map) των μεταγραφημάτων των MST-γονιδίων του *M.truncatula* στις ρίζες υπό συνθήκες αλατότητας και ξηρασίας και στους βλαστούς υπό συνθήκες ξηρασίας (εικόνα 3.18).



Εικόνα 3.18: Οι εκφράσεις των MST-γονιδίων στη ρίζα και το βλαστό σε καταπόνηση αλατότητας και ξηρασίας, σύμφωνα με τη βάση δεδομένων της MiGEA.

Το *MiPMT4_3* μειώθηκε και στα δύο όργανα τόσο σε συνθήκες ξηρασίας όσο και σε συνθήκες αλατότητας. Παρόμοια αντίδραση παρατηρήθηκε γι' αυτό το γονίδιο και στα πειράματα της παρούσας μελέτης, αφού παρουσίασε στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα σχετικής έκφρασης έπειτα από την παραμονή στο παρατεταμένο σκοτάδι τόσο στα φυμάτια και τη ρίζα, όσο και στα ακροβλαστίδια και τα φύλλα. Το *MiESL16_2* (επάγεται στη ρίζα) που παρουσίασε σταδιακή πτώση των επιπέδων έκφρασής του έπειτα από την υποβολή των φυτών σε σκοτάδι και βρέθηκε να

αντιδρά παρόμοια έπειτα από συνθήκες ξηρασίας και αλατότητας, σύμφωνα με τα αποτελέσματα από τη βάση του MtGEA. Επίσης, τα *MtSTP7_4* και *MtESL6_3* τα οποία αυξήθηκαν σταδιακά και ανεξάρτητα από το φυτικό όργανο έπειτα από την υποβολή τους σε καταπόνηση στο σκοτάδι, βρέθηκε να έχουν την ίδια αντίδραση και έπειτα από συνθήκες ξηρασίας και αλατότητας, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του MtGEA. Αυτό ενισχύει την άποψη ότι σε αυτά τα γονίδια η ρύθμιση από την καταπόνηση υπερτερεί της οργανοειδικής ρύθμισης.

4. Αποτελέσματα-Μέρος 2ο

4.1. *In silico* αναγνώριση γονιδίων μεταφορέων σακχάρων του *M. truncatula* που επάγονται ή εκφράζονται αποκλειστικά στα φυμάτια.

Για την ταυτοποίηση των μεταφορέων μονοσακχαριτών (MSTs) του *M. truncatula*, πραγματοποιήθηκε εκτεταμένη *in silico* ανάλυση. Αξιοποιήθηκαν οι διεθνείς βάσεις δεδομένων από τον Άτλαντα Γονιδιακής Έκφρασης του *M. truncatula* (MtGEA, <http://mtgea.noble.org/v2>) που αφορά στα επίπεδα της μεταγραφής των γονιδίων του *M. truncatula* στα διαφορετικά φυτικά όργανα, και των NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) και IMGAG (<http://www.medicago.org/genome>), που αφορούν στο γονιδίωμα του φυτού, προκειμένου να εντοπιστούν γονίδια μεταφορέων σακχάρων του *M. truncatula* που επάγονται ή εκφράζονται αποκλειστικά στο φυμάτιο.

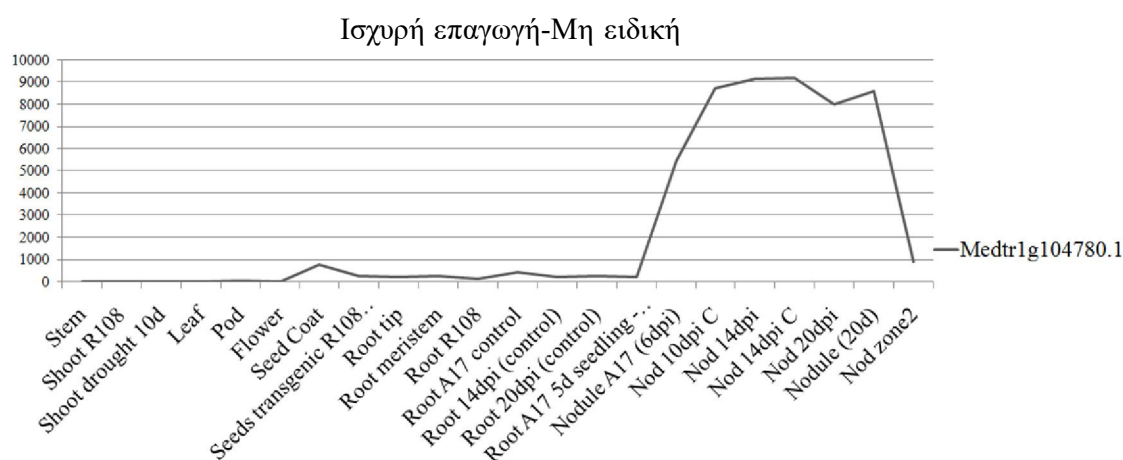
Από την παραπάνω *in silico* ανάλυση προέκυψαν δύο μεταφορείς σακχάρων που εκφράζονται αποκλειστικά στο φυμάτιο. Τα γονίδια που εντοπίστηκαν και οι πιθανές λειτουργίες των κωδικοποιούμενων πρωτεϊνών έχουν ως εξής:

Πίνακας 4.1: Αριθμός καταχώρησης, όνομα, θεωρητική λειτουργία και επίπεδα έκφρασης των γονιδίων: *MtSTP13* και *MtPMT3_1*.

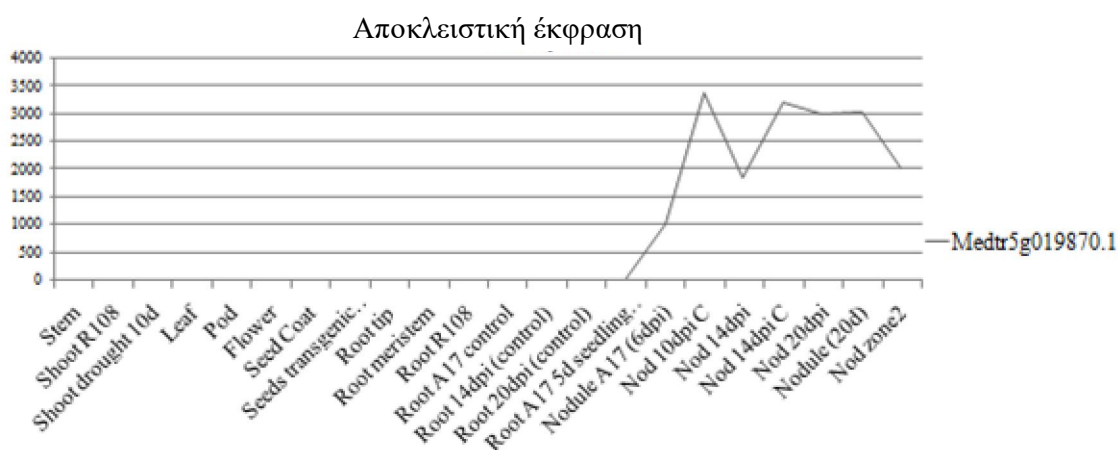
Αριθμός καταχώρησης	Όνομα Γονιδίου	Θεωρητική λειτουργία	Έκφραση στο φυμάτιο
Medtr1g104780	<i>MtSTP13</i>	Μεταφορέας εξοζών	Μη ειδική, ισχυρή επαγωγή
Medtr5g019870	<i>MtPMT3_1</i>	Άγνωστη πρωτεΐνη	Αποκλειστική έκφραση

Αναλυτικά η έκφραση των παραπάνω γονιδίων σύμφωνα με τα δεδομένα που ανακτήθηκαν από τον Άτλαντα Γονιδιακής Έκφρασης του *M. truncatula* (<http://mtgea.noble.org/v2>) στα μη συμβιωτικά όργανα του φυτού *M. truncatula*, σε

φυμάτια διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης, αλλά και κάτω από διαφορετικούς χειρισμούς φαίνεται στις εικόνες 4.1 και 4.2.



Εικόνα 4.1: Έκφραση του Medtr1g104780 (*MtSTP13*) σύμφωνα με τα δεδομένα που ανακτήθηκαν από τον Άτλαντα Γονιδιακής Έκφρασης του *M. truncatula* στα μη συμβιωτικά όργανα του φυτού *M. truncatula*, σε φυμάτια διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης, αλλά και κάτω από διαφορετικούς χειρισμούς.



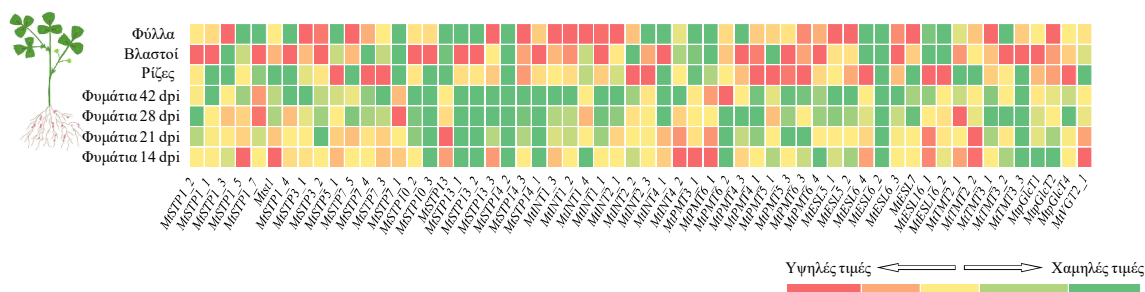
Εικόνα 4.2: Έκφραση του Medtr5g019870 (*MtPMT3_1*) σύμφωνα με τα δεδομένα που ανακτήθηκαν από τον Άτλαντα Γονιδιακής Έκφρασης του *M. truncatula* στα μη συμβιωτικά όργανα του φυτού *M. truncatula*, σε φυμάτια διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης, αλλά και κάτω από διαφορετικούς χειρισμούς.

4.2. Προσδιορισμός των επιπέδων της έκφρασης και εντοπισμός των mRNAs των προαναφερθέντων γονιδίων σε φυμάτια διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης, του *M. truncatula*.

Προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τον Άτλαντα Γονιδιακής Έκφρασης του *M. truncatula* και έδειξαν ότι τα γονίδια *MtSTP13* και *MtPMT3_1* επάγονται ή εκφράζονται αποκλειστικά στα φυμάτια

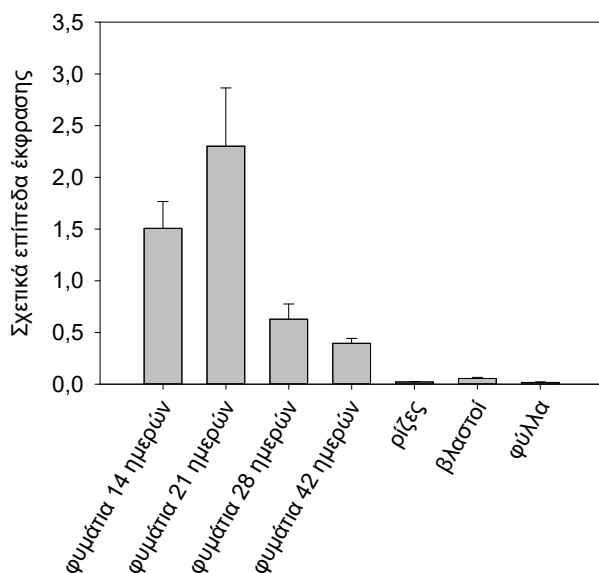
προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης τους σε φυμάτια διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης και σε διαφορετικά φυτικά όργανα.

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων της έκφρασης και τον ιστοειδικό εντοπισμό των mRNAs των γονιδίων, αρχέφυτρα του *M. truncatula* R108 εμβολιάστηκαν με ριζόβια *Sinorhizobium meliloti* 1021 και ακολούθησε συλλογή των παρακάτω φυτικών οργάνων: φυμάτια 14 ημερών μετά τον εμβολιασμό (dpi), 21 dpi, 28 dpi, 42 dpi, φύλλα, βλαστοί, ρίζες. Πραγματοποιήθηκαν 3 βιολογικές επαναλήψεις. Από τα παραπάνω όργανα απομονώθηκε ολικό RNA, ελέγχθηκε για την ύπαρξη DNA και μετά τον καθαρισμό του από DNA με τη βοήθεια DNAάσης, χρησιμοποιήθηκε σε αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής με χρήση εκκινητή oligo(dT) για παραγωγή cDNA. Στη συνέχεια με τη βοήθεια των ειδικών εκκινητών και της τεχνικής της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-qPCR) προσδιορίστηκε η έκφραση όλων των MSTs γονιδίων στα φυμάτια 14 ημερών, 21 ημερών, 28 ημερών και 42 ημερών (14 dpi, 21 dpi, 28 dpi, 42 dpi) μετά από τον εμβολιασμό τους με *S. meliloti* των υπό εξέταση γονιδίων. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο θερμικό χάρτη της **εικόνας 4.3**. Τα αποτελέσματα ήταν σε συμφωνία με την *in silico* έρευνα.



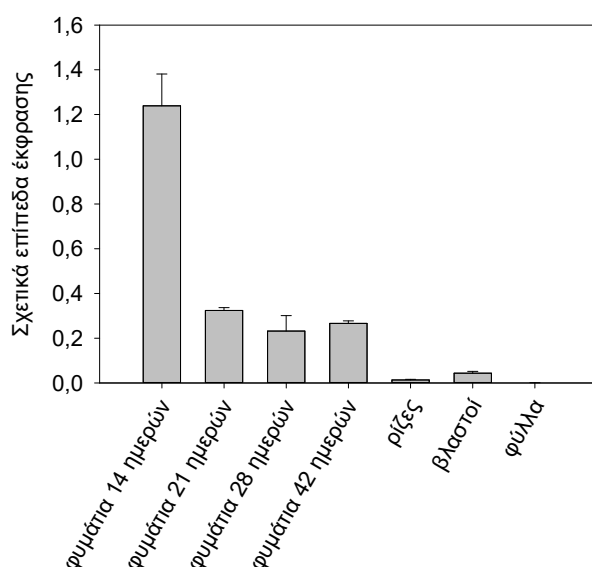
Εικόνα 4.3: Θερμικός χάρτης (heat map) των σχετικών επιπέδων έκφρασης των MSTs γονιδίων του *M.truncatula* στα φυμάτια (14 dpi, 21dpi, 28dpi, 42 dpi) στις ρίζες, στους βλαστούς και στα φύλλα. Τρεις βιολογικές επαναλήψεις χρησιμοποιήθηκαν για την τρανσκριπτομική ανάλυση του κάθε οργάνου του *M.truncatula*.

Πράγματι, προέκυψε ότι τα γονίδια *MtSTP13* και *MtPMT3_1* παρουσίασαν εξειδικευμένη ή ισχυρή επαγωγή στα φυμάτια. Το *MtSTP13* γονίδιο βρέθηκε να επάγεται ισχυρά και ειδικά στα φυμάτια 14 dpi, 21 dpi, 28 dpi, και 42 dpi με το μέγιστο της έκφρασης να εντοπίζεται στα φυμάτια 21 dpi. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με εκείνα του Άτλαντα Γονιδιακής Έκφρασης του *M. truncatula* για το συγκεκριμένο γονίδιο.



Εικόνα 4.4: Διάγραμμα με χρήση του προγράμματος SigmaPlot 12.0 που παρουσιάζει τα επίπεδα σχετικής έκφρασης του *MtSTP13* του *M. truncatula* στα φυμάτια των αγρίου τύπου R108 φυτών (14 ημερών, 21 ημερών, 28 ημερών και 42 ημερών μετά τον εμβολιασμό με *S. meliloti*), στις ρίζες, στους βλαστούς και στα φύλλα (42 ημέρες μετά τον εμβολιασμό με *S. meliloti*). Τρεις βιολογικές επαναλήψεις χρησιμοποιήθηκαν για την τρανσκριπτομική ανάλυση κάθε οργάνου του *M. truncatula*. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των των τριών βιολογικών επαναλήψεων +/- SE.

Το *MtPMT3_1* γονίδιο βρέθηκε να επάγεται ισχυρά και ειδικά στα φυμάτια 14 dpi, 21 dpi, 28 dpi, και 42 dpi με το μέγιστο της έκφρασης να εντοπίζεται στα φυμάτια 14 dpi. Παρόμοια μεταγραφήματα εντοπίστηκαν και στον Άτλαντα Γονιδιακής Έκφρασης του *M. truncatula* για το συγκεκριμένο γονίδιο.

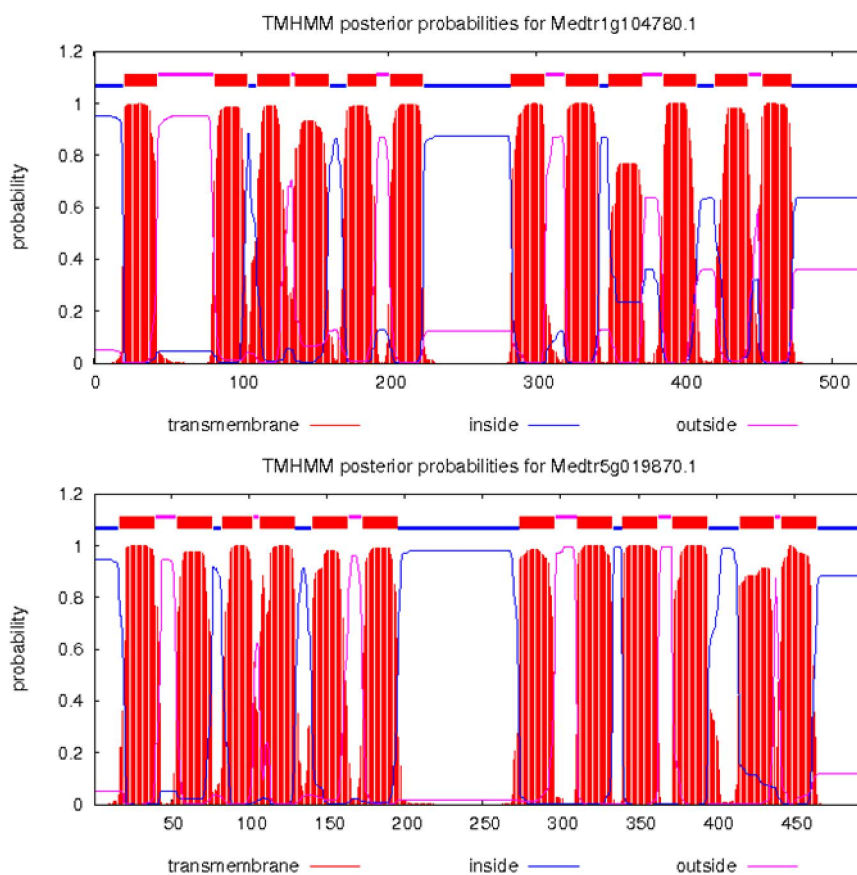


Εικόνα 4.5: Διάγραμμα με χρήση του προγράμματος SigmaPlot 12.0 που παρουσιάζει τα επίπεδα σχετικής έκφρασης του *MtPMT3_1* του *M. truncatula* στα φυμάτια των αγρίου τύπου R108 φυτών (14 ημερών, 21 ημερών, 28 ημερών και 42 ημερών μετά τον εμβολιασμό με *S. meliloti* 1021), στις ρίζες, στους βλαστούς και στα φύλλα (42 ημέρες μετά τον εμβολιασμό με *S. meliloti* 1021). Τρεις βιολογικές

επαναλήψεις χρησιμοποιήθηκαν για την τρανσκριπτομική ανάλυση κάθε οργάνου του *M.truncatula*. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των τριών βιολογικών επαναλήψεων +/- SE.

4.3. Πρόβλεψη διαμεμβρανικών περιοχών των *MtSTP13* και *MtPMT3_1*.

Με τη χρήση προγραμμάτων εύρεσης δομής με βάση την αμινοξική αλληλουχία, όπως το TMHMM 2.0 (Center for Biological Sequence Analysis (CBS) at the Technical University of Denmark (DTU)), προσδιορίστηκαν οι δομές των προϊόντων των παραπάνω γονιδίων (εικόνα 4.6).



Εικόνα 4.6: Διαμεμβρανικές έλικες των Medtr1g104780 (*MtSTP13*) και Medtr5g019870 (*MtPMT3_1*).

4.4. Μελέτη του χωροταξικού προτύπου έκφρασης με εφαρμογή της τεχνικής του *in situ* RNA-RNA υβριδισμού

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί ο εντοπισμός των mRNAs των γονιδίων-στόχων στο φυτό του *M. truncatula* έγιναν πειράματα *in situ* RNA-RNA υβριδισμού με χρήση των σημασμένων με διγοξιγενίνη ανιχνευτών (antisense RNA) και λεπτών τομών από ιστό φυματίου του *M. truncatula* που έχουν εγκλιστεί και μονιμοποιηθεί σε παραφίνη.

Από το cDNA που προέκυψε από τα φυμάτια του *M. truncatula*, αποκτήθηκαν με τη βοήθεια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) οι κωδικές αλληλουχίες των γονιδίων *MtSTP13* και *MtPMT3_1*. Οι κωδικές αλληλουχίες των γονιδίων που αποκτήθηκαν, κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pGEM[®]-T Easy (Promega Corporation, Fitchburg, Wisconsin, USA), που δίνει τη δυνατότητα μεταγραφής της κλωνοποιημένης αλληλουχίας μέσω των υποκινητών T7 και SP6 που διαθέτει εκατέρωθεν της περιοχής κλωνοποίησης. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε ανάγνωση των αλληλουχιών αυτών και προσδιορίστηκε με ποια φορά ήταν κλωνοποιημένες στον πλασμιδιακό φορέα pGEM[®]-T Easy, ώστε να αποφασιστεί ποια από τις δύο DNA-εξαρτώμενες RNA πολυμεράσες (T7 ή SP6) θα χρησιμοποιηθεί για την απόκτηση του συμπληρωματικού RNA, προκειμένου αυτό να χρησιμοποιηθεί ως ανιχνευτής στον *in situ* RNA-RNA υβριδισμό.

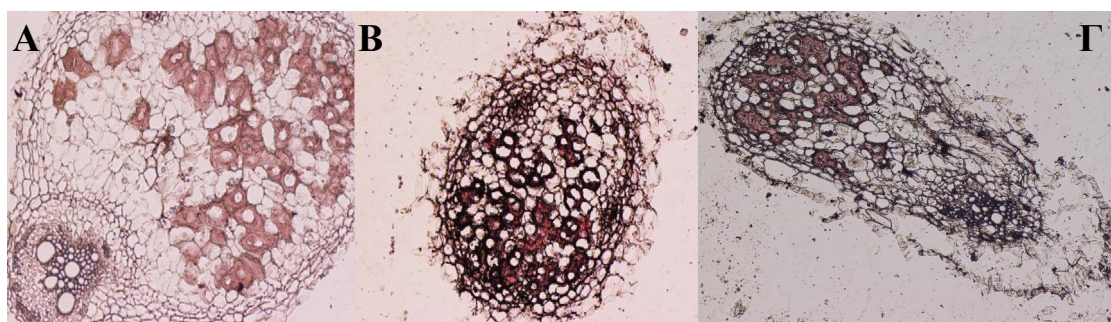
Παράλληλα, με κατάλληλους εκκινητές και με χρήση της τεχνικής PCR, κλωνοποιήθηκε από τον πλασμιδιακό φορέα pEGFP (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, California, USA) η νουκλεοτιδική αλληλουχία που αντιστοιχεί στην Green Fluorescent Protein (GFP), στον πλασμιδιο-φορέα pGEM[®]-T Easy. Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την GFP και έχει βρεθεί στη μέδουσα *Aequorea victoria*, δεν υπάρχει στο γονιδίωμα του *M. truncatula* και έτσι κρίθηκε κατάλληλο να χρησιμοποιηθεί τόσο το πληροφοριακό RNA (sense RNA) όσο και το αντι-πληροφοριακό RNA (antisense RNA) ως αρνητικοί μάρτυρες (control) στα πειράματα του *in situ* RNA-RNA υβριδισμού.

Έτσι, με χρήση των πλασμιδιακών φορέων pGEM[®]-T Easy στους οποίους είχαν κλωνοποιηθεί οι κωδικές αλληλουχίες των γονιδίων-στόχων, πραγματοποιήθηκε *in vitro* μεταγραφή με σκοπό την παραγωγή του αντι-πληροφοριακού RNA, ενώ με χρήση του πλασμιδιακού φορέα pGEM[®]-T Easy στον οποίο είχε κλωνοποιηθεί η κωδική αλληλουχία της GFP πραγματοποιήθηκε *in vitro* μεταγραφή με σκοπό την παραγωγή, σε ξεχωριστές αντιδράσεις, του πληροφοριακού RNA και του αντι-πληροφοριακού RNA (αρνητικοί μάρτυρες). Τα πειράματα της *in vitro* μεταγραφής πραγματοποιήθηκαν παρουσία σημασμένου με διγοξιγενίνη UTP (digoxigenin-UTP) ώστε το θετικό σήμα στα πειράματα του *in situ* RNA-RNA υβριδισμού να μπορεί να ανιχνευθεί με χρήση κατάλληλου αντισώματος έναντι της διγοξιγενίνης. Το αντίσωμα αυτό φέρει συζευγμένο το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση (anti-digoxigenin-alkaline phosphatase conjugated antibody) που επιτρέπει την ανάπτυξη χρώματος με τη χρήση κατάλληλου υποστρώματος.

Ποσότητες από τα RNAs που προέκυψαν από τις αντιδράσεις *in vitro* μεταγραφής υπέστησαν αλκαλική υδρόλυση προκειμένου να καταταμηθούν σε τμήματα μεγέθους περίπου 200 νουκλεοτιδικών βάσεων και να είναι κατάλληλα να λειτουργήσουν ως ανιχνευτές στα πειράματα του *in situ* RNA-RNA υβριδισμού.

Συνοπτικά, μετά τη συλλογή τους, τα φυμάτια μονιμοποιήθηκαν με τη χρήση παραφορμαλδεΐδης-γλουταραλδεΐδης, αφυδατώθηκαν με τη χρήση αιθανόλης, υπέστησαν διαφανοποίηση με τη χρήση ξυλενίου και στη συνέχεια εγκλίστηκαν σε παραφίνη. Από τα φυμάτια αυτά παραλήφθηκαν τομές ιστού πάχους 10 μm, με τη χρήση μικροτόμου. Οι τομές μεταφέρθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες Histobond⁺S (Paul Marienfeld GmbH&Co. KG, Lauda-Königshofen, Germany) που διαθέτουν επικολλητική και θετικά φορτισμένη επιφάνεια και ο ιστός ακινητοποιήθηκε με κατεργασία θέρμανσης. Ακολούθησε αποπαραφίνωση του ιστού με τη χρήση ξυλενίου, ενυδάτωση με διαλύματα αιθανόλης-νερού, διαδικασία προϋβριδισμού, υβριδισμός με τη χρήση του σημασμένου με διγοξιγενίνη ανιχνευτή (antisense RNA), χρήση του αντισώματος anti-DIG (Hoffmann-LaRoche, Basel, Switzerland) συζευγμένου με το ένζυμο της αλκαλικής φωσφατάσης για τον εντοπισμό του ανιχνευτή και του υποστρώματος NBT/BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitrobluetetrazolium) της αλκαλικής φωσφατάσης, που δίνει ένα σκούρο ιώδες χρώμα σε περίπτωση θετικής αντίδρασης.

Στην **εικόνα 4.7** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του *in situ* RNA-RNA υβριδισμού που αφορούν τον εντοπισμό των mRNAs των γονιδίων *MtSTP13* και *MtPMT3_1* στο φυμάτιο του *M. truncatula*. Όπως προκύπτει, η έκφραση των γονιδίων-στόχων εντοπίζεται τόσο στα μολυσμένα κύτταρα της αζωτοδεσμευτικής ζώνης του φυματίου του *M. truncatula* στα οποία πραγματοποιείται η συμβιωτική αζωτοδέσμευση όσο και στα γειτονικά τους μη μολυσμένα κύτταρα.



Εικόνα 4.7: *In situ* RNA-RNA υβριδισμός σε τομές φυματίων του *M. truncatula*. Για κάθε γονίδιο, Β) *MtSTP13*, Γ) *MtPMT3_1*, το σημασμένο με διγοξιγενίνη αντι-πληροφοριακό RNA χρησιμοποιήθηκε

σαν ανιχνευτής του αντίστοιχου mRNA. Το σημασμένο με διγοξιγενίνη αντι-πληροφοριακό RNA για την κωδική περιοχή του γονιδίου της GFP χρησιμοποιήθηκε σαν αρνητικός μάρτυρας, A) GFP (negative control) (είναι χαρακτηριστική η έλλειψη θετικού σήματος).

4.5. Υποκυτταρικός εντοπισμός των πιθανών μεταφορέων σακχάρων *MtSTP13* και *MtPMT3_1* στο σύστημα του *S. cerevisiae*.

Προκειμένου να εκφράσουμε τις κωδικές αλληλουχίες των γονιδίων *MtSTP13* και *MtPMT3_1* που εκφράζονται αποκλειστικά ή επάγονται ισχυρά στο φυμάτιο του *M. truncatula* και πιθανά κωδικοποιούν για μεταφορείς σακχάρων, έγινε προσπάθεια να βρεθεί κατάλληλος πλασμιδιακός φορέας που να επιτρέπει την έκφραση της κλωνοποιημένης πρωτεΐνης υπό τον ισχυρό υποκινητή ζύμης PMA1 στο σύστημα της ζύμης (*Saccharomyces cerevisiae*). Το συγκεκριμένο πείραμα πραγματοποιήθηκε ώστε να διαπιστώθει το κατά πόσον το *S. cerevisiae* είναι κατάλληλο για τη μελέτη του βιοχημικού χαρακτηρισμού των γονιδίων-στόχων. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκε και αποκτήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pDR196.

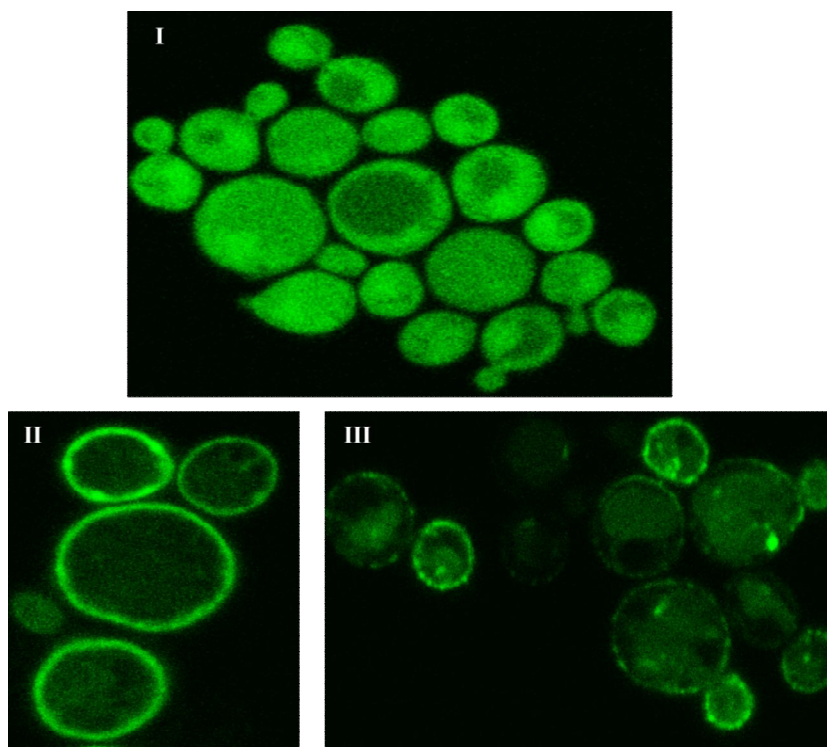
Με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών και της τεχνικής PCR, η φθορίζουσα πρωτεΐνη Yellow Fluorescent Protein (YFP) κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pDR196 και έγινε ο σχεδιασμός εκκινητών για την υποκλωνοποίηση (με χρήση της τεχνικής PCR) των κωδικών αλληλουχιών των γονιδίων *MtSTP13* και *MtPMT3_1* στην περιοχή που αντιστοιχεί στο αμινο-τελικό άκρο της φθορίζουσας πρωτεΐνης YFP και στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης με ταυτόχρονη εξάλειψη του κωδικονίου λήξης της κωδικής αλληλουχίας που κλωνοποιείται. Λήφθηκαν υπόψιν επίσης διαφορές ανάμεσα στο βέλτιστο kozak frame της ζύμης και του φυτού, ώστε οι αντίστοιχες πρωτεΐνες να εκφράζονται ισχυρά στη ζύμη.

Οι κωδικές αλληλουχίες των γονιδίων *MtSTP13* και *MtPMT3_1* κλωνοποιήθηκαν στο πλασμίδιο pDR196 + YFP (που προέκυψε από τον πλασμιδιακό φορέα pDR196 με κλωνοποίηση της κωδικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης YFP υπό τον έλεγχο του PMA1 υποκινητή) δημιουργώντας τα πλασμίδια pDR196 + *MtSTP13* + YFP και pDR196 + *MtPMT3_1* + YFP. Η κλωνοποίηση έγινε με τρόπο ώστε να εκφράζεται κάθε φορά η υβριδική πρωτεΐνη μεταφορέας -YFP (YFP στο καρβοξυτελικό άκρο).

Ακολούθησε μετασχηματισμός κυττάρων *S.cerevisiae* RS453 με τα πλασμίδια pDR196 + YFP (μάρτυρας), pDR196 + *MtSTP13* + YFP και pDR196 + *MtPMT3_1* + YFP, με χρήση οξικού λιθίου και πολυαιθυλενογλυκόλης και επιλογή των

μετασχηματισμένων κυττάρων ζύμης βάση της αυξοτροφίας σε ουρακίλη που προσφέρει ο πλασμιδιακός φορέας pDR196.

Οι μετασχηματισμένες ζύμες ελέγχθηκαν για την έκφραση και τον υποκυτταρικό εντοπισμό των υβριδικών πρωτεϊνών με χρήση συνεστιακού σαρωτικού μικροσκοπίου Laser.



Εικόνα 4.8: Υποκυτταρικός εντοπισμός των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *MtSTP13* και *MtPMT3_1* στο σύστημα του *S. cerevisiae* με χρήση συνεστιακού σαρωτικού μικροσκοπίου Laser. Κύτταρα ζύμης μετασχηματισμένα με pDR196+YFP (I), pDR196 + *MtSTP13* + YFP (II) και pDR196 + *MtPMT3_1*+ YFP (III).

Όπως φαίνεται στην **εικόνα 4.8**, η YFP εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα, ενώ οι υβριδικές πρωτεΐνες (μεταφορέας-YFP) εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη του μετασχηματισμένου κυττάρου της ζύμης. Αυτό σημαίνει πως οι μεταφορείς που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *MtSTP13* και *MtPMT3_1* εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη του *S. cerevisiae* και άρα το σύστημα αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το βιοχημικό χαρακτηρισμό τους.

Ο βιοχημικός προσδιορισμός των γονιδίων *MtSTP13* και *MtPMT3_1* πραγματοποιήθηκε από τη συνεργαζόμενη ομάδα του Καθηγητή κ. Ευστάθιου Φριλίγγου στο εργαστήριο Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Βρέθηκε ότι οι μεταφορείς που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *MtSTP13* και *MtPMT3_1* μπορούν να μεταφέρουν γλυκόζη, φρουκτόζη και σακχαρόζη. Ο μεταφορέας που κωδικοποιείται από το

γονίδιο *MtSTP13* φαίνεται να μπορεί να μεταφέρει πιο αποδοτικά τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη σε σχέση με εκείνον που κωδικοποιείται από το γονίδιο *MtPMT3_1* (Botou, Komaitis, Fletmetakis, and Frillingos, unpublished results).

4.6. Ανάλυση του φυσιολογικού ρόλου των *MtSTP13* και *MtPMT3_1*, στη διαδικασία της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης, με χρήση φυτών που φέρουν μεταλλάξεις στα συγκεκριμένα γονίδια.

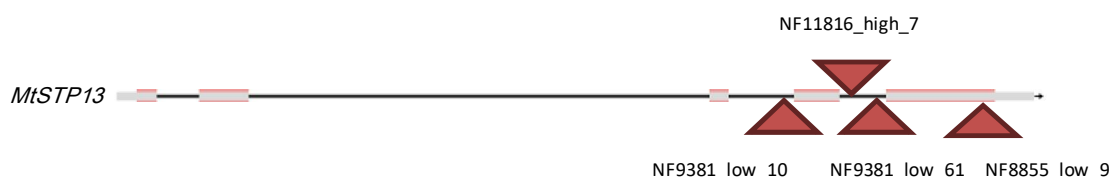
4.6.1. Ταυτοποίηση των μεταλλαγμένων *M. truncatula* με *Tnt1*-ένθεση για τα *MtSTP13* και *MtPMT3_1* που εκφράζονται αποκλειστικά ή επάγονται στην αζωτοδεσμευτική περιοχή του φυματίου που βρίσκεται σε συνθήκες υποξίας

Για τη μελέτη του φυσιολογικού ρόλου των μεταφορέων μονοσακχαριτών *MtSTP13* και *MtPMT3_1* οι οποίοι εκφράζονται αποκλειστικά ή επάγονται στην αζωτοδεσμευτική περιοχή του φυματίου έγινε ταυτοποίηση των μεταλλαγμένων φυτών του *M. truncatula* με *Tnt1*-ένθεση για τα γονίδια *MtSTP13* και *MtPMT3_1* από τη βάση Flanking Sequence Tags (FST database (<http://bioinfo4.noble.org/mutant>)) όπου και εντοπίστηκαν μεταλλαγμένες φυτικές σειρές για αυτά τα γονίδια – στόχους που παρουσιάζονται στον **πίνακα 4.2**.

Πίνακας 4.2: Μεταλλαγμένες σειρές φυτών του *M. truncatula* με *Tnt1*-ένθεση για τα γονίδια *MtSTP13* και *MtPMT3_1*.

Γονίδιο	Μεταλλαγμένες σειρές <i>M. truncatula</i>
<i>MtSTP13</i>	NF11816_high_7, NF9381_low_10, NF9381_low_61, NF8855_low_9
<i>MtPMT3_1</i>	NF4778_insertion_7, NF4652_insertion_8

Η γονιδιακή οργάνωση των *MtSTP13* (5 εξώνια/4 εσώνια) και *MtPMT3_1* (2 εξώνια/1 εσώνιο), καθώς και η θέση ένθεσης του μεταθετού στοιχείου *Tnt1* στις διαφορετικές μεταλλαγμένες σειρές παρουσιάζονται **εικόνες 4.9 και 4.10**.



Εικόνα 4.9: Γονιδιακή οργάνωση, θέσεις και αλληλουχίες των *Tnt1* ενθέσεων των μεταλλαγμένων σειρών (NF11816_high_7, NF9381_low_10, NF9381_low_61, NF8855_low_9) του *MtSTP13*.

MtPMT3_1



Εικόνα 4.10: Γονιδιακή οργάνωση, θέσεις ένθεσης και αλληλουχίες των μεταλλαγμένων σειρών (NF4652_insertion_8 και NF4778_insertion_7) του *MtPMT3_1*.

Παρελήφθησαν λοιπόν οι παραπάνω σειρές από το Plant Biology Division, Noble Foundation, Oklahoma, USA.

Σπόροι από τις παραπάνω μεταλλαγμένες σειρές *M. truncatula*, φυτεύτηκαν σε ειδικό θάλαμο με στόχο να εντοπιστούν ομοζυγωτά για τη μετάλλαξη φυτά. Απομονώθηκε γενωμικό DNA, επιλέχθηκαν κατάλληλοι εκκινητές με σκοπό να επιλεγούν τα ομοζυγωτά μεταλλαγμένα φυτά από τα ετεροζυγωτά και τα τυχόν μη-μεταλλαγμένα, ακολούθησε έλεγχος του γενωμικού DNA κάθε φυτού (PCR) με αυτούς τους εκκινητές και τέλος βρέθηκαν τα ομοζυγωτά μεταλλαγμένα φυτά. Τρία ζεύγη εκκινητών χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της ομοζυγωτίας. Το πρώτο ζεύγος περιλαμβάνει εκκινητές που υβριδίζουν πριν και μετά τη θέση της *Tnt1* ένθεσης στο γονίδιο, αντίστοιχα. Το δεύτερο ζεύγος περιλαμβάνει εκκινητές που υβριδίζουν πριν τη θέση της *Tnt1* ένθεσης στο γονίδιο και εντός του *Tnt1* μεταθετού στοιχείου, αντίστοιχα. Το τρίτο ζεύγος περιλαμβάνει εκκινητές που υβριδίζουν μετά τη θέση της *Tnt1* ένθεσης στο γονίδιο και εντός του *Tnt1* μεταθετού στοιχείου (ίδιος εκκινητής με το δεύτερο ζεύγος), αντίστοιχα. Κατά συνέπεια σε πηκτή αφαρόζης τα φυτά που εμφανίζουν ζώνη με το δεύτερο ή το τρίτο ζεύγος εκκινητών, αλλά όχι με το πρώτο είναι ομοζυγωτά.

Πίνακας 4.3: Οι ακολουθίες των forward και reverse primers που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της ομοζυγωτίας.

Γονίδια	Μεταλλαγμένες σειρές	Forward primer	Reverse primer
<i>MtSTP13</i>	NF11816	GGT TGA CTA TTT AGT GTT TTG TGA GCC A	AGC AAA AAC TAC TTA ACA CAA TGG GAA TG
	NF9381	1)AGA TTG CAC CTT CTA GAA TAC GTG GA 2) CAT TGG GGT TGG AGG ATA TCT CTG G	1)GCA GTG AAG AGG AAG TTG ACA CAA 2) GCA TCA AAA TGG TTA TTG TTG CAA GGG G
	NF8855	CAG CAA TTC ACT GGC ATC AAT GCG	GAC AAT TTA CCC ATG CTA AAA CTC GCC T
<i>MtPMT3_1</i>	NF4778	GCT GTT GGA ATT GAT GAA AAT TGC ACC C	GACITTTTCATCCGGAGGTAAGGGTTCGG
	NF4652	CTA GGG TGT TCG AGG CTT TAT GCT CAA ATG	TAG CTA GCA TTA TTC TCC ATC CAA GTC T

Πίνακας 4.4: Η ακολουθία του Tnt109 εκκινητή που υβριδίζει εντός του *Tnt1* μεταθετού στοιχείου και χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της ομοζυγωτίας.

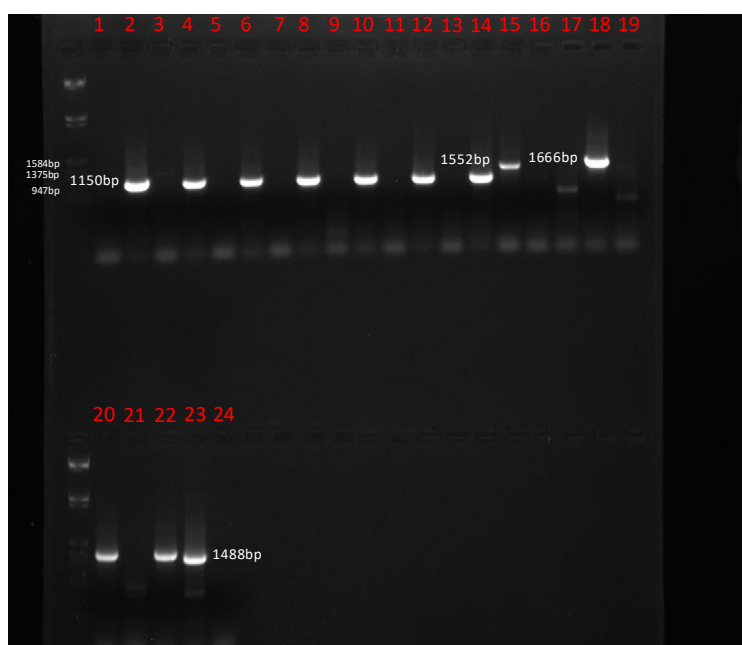
Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή (5'-3')
Tnt109	5'-GCATTCAAACTAGAAAGACGATGCTACC-3'

Σπόροι από τα ομοζυγωτά φυτά φυτεύτηκαν παράλληλα με μη-μεταλλαγμένα *M. truncatula* R108 και εμβολιάστηκαν με καλλιέργεια ριζοβίου *S. meliloti* 1021, προκειμένου να ελεγχθεί ο φαινότυπος των μεταλλαγμένων σειρών. Τα φυτά που προέκυψαν από τους σπόρους των ομοζυγωτών φυτών των μεταλλαγμένων σειρών NF9381_low_10, NF9381_low_61, NF8855_low_9, NF11816_high_7 που αντιστοιχούν στο γονίδιο *MtSTP13* αφέθηκαν να μεγαλώσουν και να δώσουν σπόρους επόμενης γενιάς, αφού τα πατρικά ομοζυγωτά φυτά έδωσαν μικρό αριθμό σπόρων.

Τα ομοζυγωτά φυτά των μεταλλαγμένων σειρών που αντιστοιχούν στο γονίδιο *MtSTP13* (NF9381_low_10, NF9381_low_61, NF8855_low_9, NF11816_high_7) και αφέθηκαν να μεγαλώσουν για να δώσουν σπόρους, είτε δεν έδωσαν καθόλου σπόρους είτε δεν έδωσαν ικανοποιητικό αριθμό σπόρων.

Τα ομοζυγωτά φυτά των μεταλλαγμένων σειρών που αντιστοιχούν στο γονίδιο *MtPMT3_1* (NF4778_insertion_7, NF4652_insertion_8) αναπτύχθηκαν, έδωσαν σπόρους και από τους σπόρους αυτούς προέκυψαν φυτά τα οποία ελέγχθηκαν για την ομοζυγωτία τους με τα τρία ζεύγη εκκινητών, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Ένας έλεγχος τέτοιων φυτών φαίνεται στην **εικόνα 4.11**.

1. 4652.8.1 FR
2. 4652.8.1 FT109
3. 4652.8.2 FR
4. 4652.8.2 FT109
5. 4652.8.3 FR
6. 4652.8.3 FT109
7. 4652.8.4 FR
8. 4652.8.4 FT109
9. 4652.8.5 FR
10. 4652.8.5 FT109
11. 4652.11.1 FR
12. 4652.11.1 FT109
13. 4652.11.2 FR
14. 4652.11.2 FT109
15. wild FR
16. wild FT109
17. 4778.9.1 FR
18. 4778.9.1 RT109
19. 4778.9.2 FR
20. 4778.9.2 RT109
21. 4778.9.3 FR
22. 4778.9.3 RT109
23. wild FR
24. wild RT109



Εικόνα 4.11: Έλεγχος με αντίδραση PCR, της ομοζυγωτίας ως προς την εισδοχή Tnt1 φυτών από που προέκυψαν από σπόρους ομοζυγωτών φυτών των μεταλλαγμένων σειρών NF4778_insertion_7 και

NF4652_insertion_8 για το γονίδιο *MtPMT3_1* με χρήση γενωμικού τους DNA και κατάλληλων εκκινητών. Η ομοζυγωτία βεβαιώνεται με την έλλειψη ζώνης, όταν χρησιμοποιείται το ζεύγος εκκινητών που υβριδίζουν με αλληλουχίες εκατέρωθεν της θέσης ένθεσης Tnt1 (FR) και ταυτόχρονα την ύπαρξη ζώνης, όταν χρησιμοποιείται το ζεύγος εκκινητών που υβριδίζουν με αλληλουχίες στο γονίδιο και στην Tnt1 ένθεση αντίστοιχα (FT109 ή RT109). Οι αριθμοί αντιπροσωπεύουν τα διαφορετικά φυτά των τριών γονοτύπων. Ακόμα: F: εκκινητής πριν την ένθεση, R: εκκινητής μετά την ένθεση, T109 εκκινητής ένθεσης. Οι αποστάσεις μεταξύ των F και R εκκινητών για τις μεταλλαγμένες σειρές NF4778_insertion_7 και NF4652_insertion_8 είναι 1552 bp και 1488 bp αντίστοιχα. Η απόσταση μεταξύ των F και T109 στη NF4652_insertion_8 είναι 1150 bp και μεταξύ των R και T109 στη NF4778_insertion_7 είναι: 1666 bp.

Για το γονίδιο *MtPMT3_1* αποκτήθηκαν ομοζυγωτά μεταλλαγμένα φυτά ως προς δύο διαφορετικές ενθέσεις *Tnt1*. Στα φυτά της μεταλλαγμένης σειράς NF4652_insertion_8 η ένθεση εντοπίζεται στο εσώνιο του γονιδίου *MtPMT3_1*, ενώ σε εκείνα της NF4778_insertion_7 η ένθεση εντοπίζεται μετά τη διαμεμβρανική περιοχή 10, προς το καρβοξυ-τελικό άκρο του μεταφορέα.

Προκειμένου να ελεγχθεί η σημασία του γονιδίου *MtPMT3_1* στην αζωτοδέσμευση, τα ομοζυγωτά φυτά των μεταλλαγμένων σειρών NF4652_insertion_8 και NF4778_insertion_7 εμβολιάστηκαν με το ριζόβιο *S. meliloti* 1021 προκειμένου να αποκτήσουν φυμάτια, μεγάλωσαν σε υλικό άμμο:περλίτη 1:1 για 30 μέρες στους 24°C, 16 h φως/8 h σκοτάδι και ποτίζονταν εναλλάξ με θρεπτικό B+D low N και dH₂O. Παράλληλα, και στις ίδιες συνθήκες αναπτύχθηκαν και φυτά *M. truncatula* αγρίου τύπου.

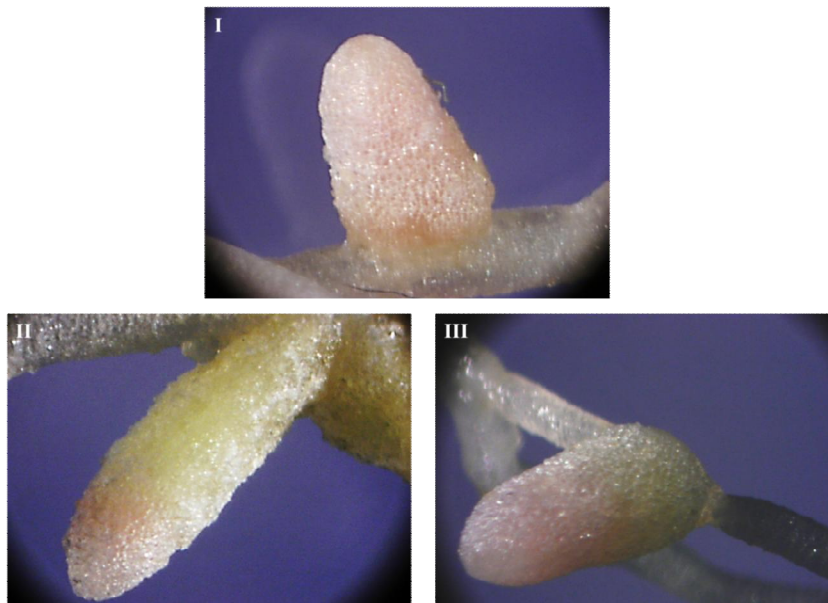
4.6.2. Φαινοτυπικές παρατηρήσεις μεταξύ των αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων φυτών του *M. truncatula*

Στην **εικόνα 4.12** φαίνονται άτομα των μεταλλαγμένων σειρών σε σύγκριση με αυτά του αγρίου τύπου. Τα ομοζυγωτά φυτά των μεταλλαγμένων σειρών NF4652_insertion_8 και NF4778_insertion_7 εμφανίζουν φαινότυπο που αντιστοιχεί σε μικρότερου μεγέθους φυτά με ελλιπή ανάπτυξη του ριζικού συστήματος, αλλά και του υπέργειου τμήματος του φυτού, ενώ παρατηρείται και μικρότερος αριθμός φυματίων. Επιπλέον, τα ομοζυγωτά φυτά της μεταλλαγμένης σειράς NF4778_insertion_7 εμφανίζουν ιώδες χρώμα στα φύλλα και το βλαστό που πιθανά υποδεικνύει σοβαρή έλλειψη αζώτου.



Εικόνα 4.13: Αντιπροσωπευτικά φυτά από *M. truncatula* R108 (wt) και από τη μεταλλαγμένη σειρά NF4652_insertion_8 (αριστερά) και NF4778_insertion_7 (δεξιά).

Η στερεοσκοπική παρατήρηση των φυματίων από αγρίου τύπου φυτά *M. truncatula* και ομοζυγωτά φυτά των μεταλλαγμένων σειρών NF4652_insertion_8 και NF4778_insertion_7 φαίνεται στην **εικόνα 4.14**.

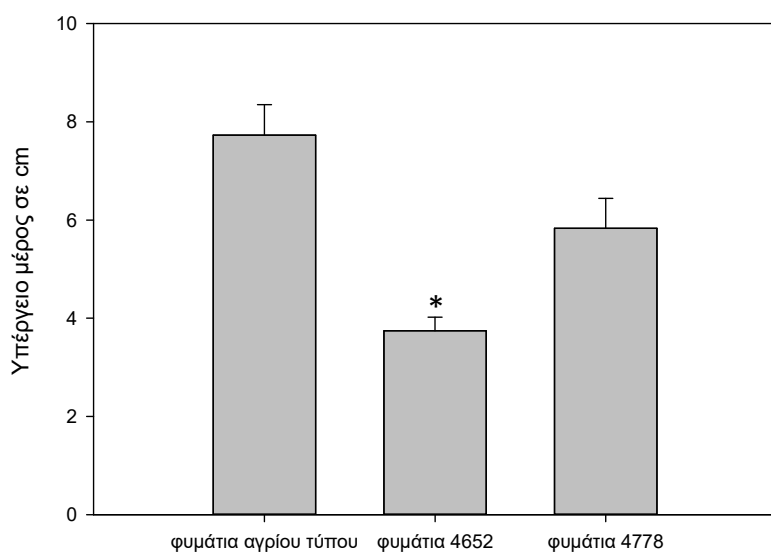


Εικόνα 4.13: Στερεοσκοπική παρατήρηση φυματίου από φυτό αγρίου τύπου *M. truncatula* R108 (I) και ομοζυγωτών φυτών από τις μεταλλαγμένες σειρές NF4778_insertion_7 (II) και NF4652_insertion_8 (III). Το κοκκινωπό χρώμα στο φυμάτιο οφείλεται στην παρουσία πρωτεϊνών της ομάδας των ψυχανθο-αιμοσφαιρινών που εξασφαλίζουν τις συνθήκες χαμηλού ελεύθερου οξυγόνου επιτρέποντας τη δράση της νιτρογενάσης και την αζωτοδέσμευση.

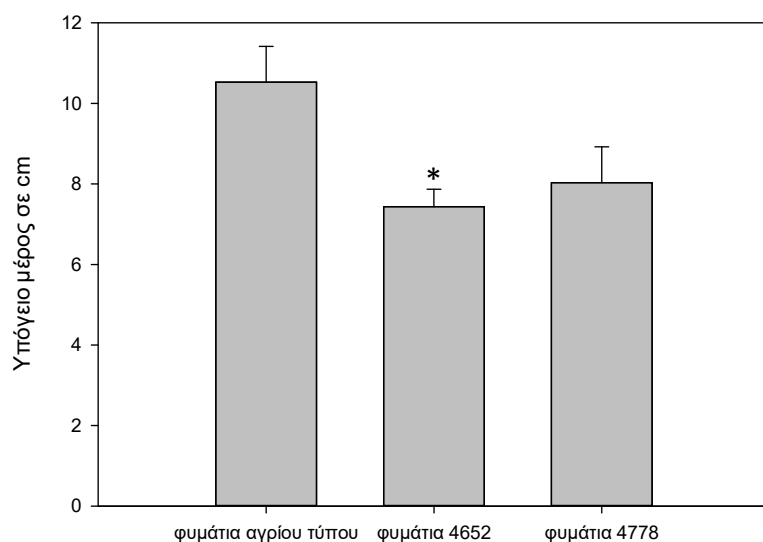
Από τη στερεοσκοπική παρατήρηση φαίνεται πως τα φυμάτια των ομοζυγωτών φυτών των μεταλλαγμένων σειρών NF4652_insertion_8 και NF4778_insertion_7 διαφέρουν από αυτά που σχηματίζονται στα φυτά *M. truncatula* αγρίου τύπου τόσο ως προς το σχήμα τους όσο και ως προς την παρουσία των

ψυχανθο-αιμοσφαιρινών. Τα φυμάτια των ομοζυγωτών φυτών των μεταλλαγμένων σειρών NF4652_insertion_8 και NF4778_insertion_7 εμφανίζονται να είναι πιο επιμήκη και με παρουσία ψυχανθο-αιμοσφαιρίνης εντοπισμένη στην κορυφή του φυματίου. Η εικόνα τους υποδηλώνει μειωμένη αποτελεσματικότητα στην αζωτοδέσμευση πράγμα που συμβαδίζει με το φαινότυπο των φυτών αυτών. Περισσότερο περιορισμένη είναι η παρουσία ψυχανθο-αιμοσφαιρίνης στο φυμάτιο των ομοζυγωτών φυτών της σειράς NF4778_insertion_7.

Από τις εικόνες 4.14 και 4.15 παρατηρείται το μικρότερο υπέργειο και υπόγειο μέρος των μετασηματισμένων φυτών των μεταλλαγμένων σειρών NF4652_insertion_8 και NF4778_insertion_7 του *M.truncatula* ως προς τα φυτά αγρίου τύπου R108. Μάλιστα τα μεταλλαγμένα φυτά της NF4652_insertion_8 ήταν και στατιστικά σημαντικά μικρότερα τόσο στο υπέργειο όσο και στο υπόγειο μέρος τους σε σχέση με τα αγρίου τύπου R108, όπως φάνηκε μετά από ANOVA και post-hoc Tukey ανάλυση.



Εικόνα 4.14: Ανάπτυξη υπέργειου τμήματος σε cm σε φυτά αγρίου τύπου R108 και σε μετασηματισμένα φυτά των μεταλλαγμένων σειρών NF4652_insertion_8 και NF4778_insertion_7 του *M.truncatula*. Τα (*) δείχνουν το επίπεδο σημαντικότητας με τη χρήση ANOVA και post-hoc Tukey. Τρεις βιολογικές επαναλήψεις χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση του υπέργειου μέρους των τριών αυτών γονοτύπων του *M.truncatula*. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των τριών βιολογικών επαναλήψεων +/- SE.

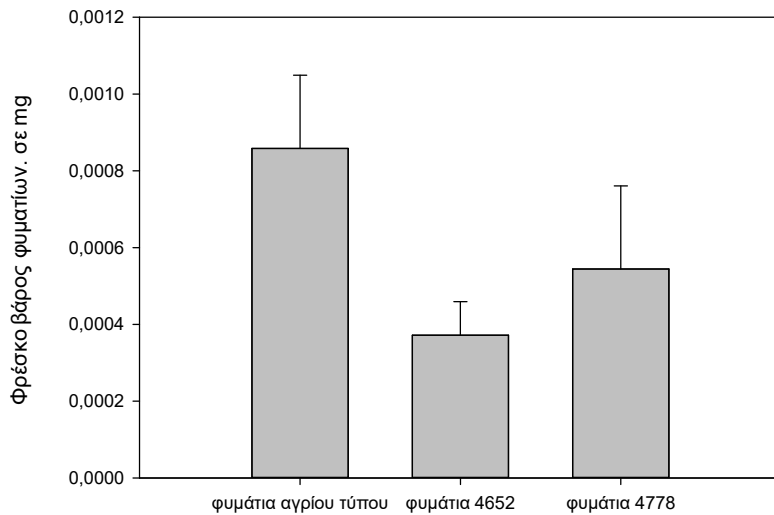


Εικόνα 4.15: Υπόγειο μέρος σε cm σε φυτά αγρίου τύπου R108 και σε μετασχηματισμένα φυτά των μεταλλαγμένων σειρών NF4652_insertion_8 και NF4778_insertion_7 του *M.truncatula*. Τα (*) δείχνουν το επίπεδο σημαντικότητας με τη χρήση ANOVA και post-hoc Tukey. Τρεις βιολογικές επαναλήψεις χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση του υπόγειου μέρους των τριών αυτών γονοτύπων του *M.truncatula*. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των τριών βιολογικών επαναλήψεων +/- SE.

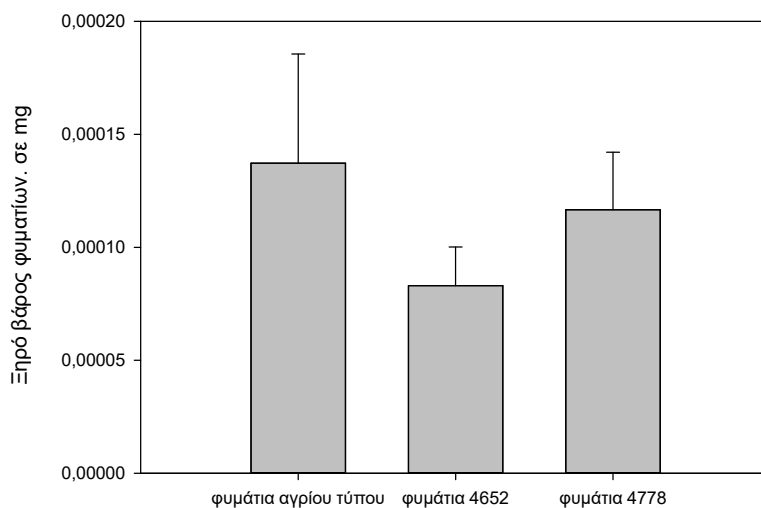
4.6.3. Προδιορισμός της δραστηριότητας της νιτρογενάσης και μέτρηση φαινοτυπικών χαρακτηριστικών στα αγρίου τύπου και στα μεταλλαγμένα φυτά του *M. truncatula*

Πραγματοποιήθηκε επίσης δοκιμή της δραστηριότητας της νιτρογενάσης στα φυμάτια των μετασχηματισμένων φυτών. Μετασχηματισμένα φυτά 42 ημερών των μεταλλαγμένων σειρών NF4652_insertion_8 και NF4778_insertion_7 του *M.truncatula*, καθώς και φυτά αγρίου τύπου R108 υποβλήθηκαν σε δοκιμή της δραστηριότητας της νιτρογενάσης. Συνοπτικά, η μέθοδος στηρίζεται στην ικανότητα της νιτρογενάσης των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων να ανάγει το ακετυλένιο σε αιθυλένιο. Η δραστηριότητα της νιτρογενάσης περιγράφεται από το ρυθμό παραγωγής του αιθυλενίου (ppm/h) και κανονικοποιείται ως προς το φρέσκο ή το ξηρό βάρος των φυματίων. Κάθε δοκιμή μελετήθηκε σε τρεις βιολογικές επαναλήψεις.

Από τις εικόνες 4.16 και 4.17 παρατηρείται το μικρότερο φρέσκο και βάρος των φυματίων των μετασχηματισμένων φυτών των μεταλλαγμένων σειρών NF4652_insertion_8 και NF4778_insertion_7 του *M.truncatula* ως προς τα φυμάτια των φυτών αγρίου τύπου R108. Τα φυμάτια των μεταλλαγμένων φυτών της NF4652_insertion_8 παρουσίασαν τις μικρότερες τιμές φρέσκου και ξηρού βάρους.



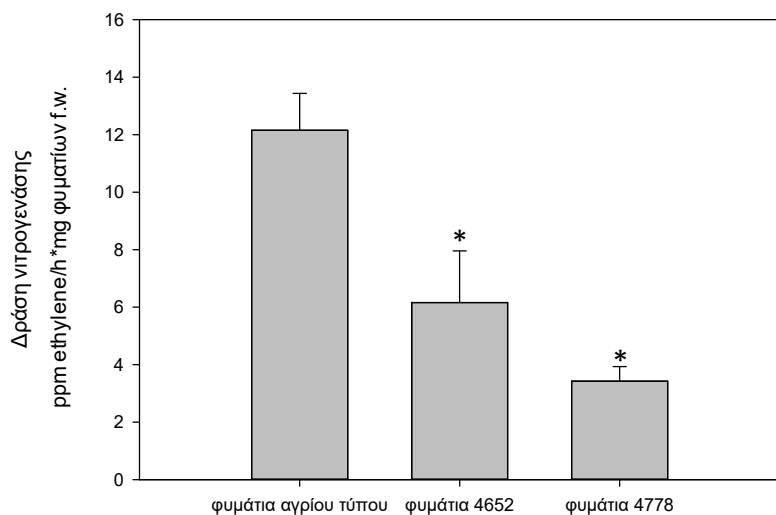
Εικόνα 4.16: Φρέσκο βάρος φυματίων σε mg σε φυτά αγρίου τύπου R108 και σε μετασχηματισμένα φυτά των μεταλλαγμένων σειρών NF4652_insertion_8 και NF4778_insertion_7 του *M.truncatula*. Τρεις βιολογικές επαναλήψεις χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση του φρέσκου βάρους των τριών αυτών γονοτύπων του *M.truncatula*. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των τριών βιολογικών επαναλήψεων +/- SE.



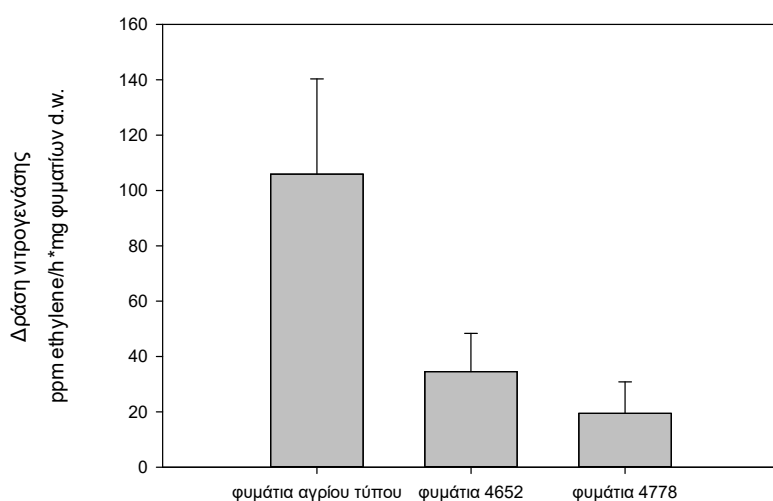
Εικόνα 4.17: Ξηρό βάρος φυματίων σε mg σε φυτά αγρίου τύπου R108 και σε μετασχηματισμένα φυτά των μεταλλαγμένων σειρών NF4652_insertion_8 και NF4778_insertion_7 του *M.truncatula*. Τρεις βιολογικές επαναλήψεις χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση του ξηρού βάρους των τριών αυτών γονοτύπων του *M.truncatula*. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των τριών βιολογικών επαναλήψεων +/- SE.

Σχετικά με τη δραστικότητα της νιτρογενάσης ως προς το φρέσκο βάρος των φυματίων παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση της στα μετασχηματισμένα φυτά των μεταλλαγμένων σειρών NF4652_insertion_8 και NF4778_insertion_7 του *M.truncatula* σε σχέση με τα φυμάτια των αγρίου τύπου R108. Μάλιστα τα μεταλλαγμένα φυτά της NF4778_insertion_7 παρουσίασαν τις μικρότερες τιμές της δραστικότητας της

νιτρογενάσης (**εικόνα 4.18**). Παρόμοια ήταν και η δραστικότητα της νιτρογενάσης ως προς το ξηρό βάρος των φυματίων (**εικόνα 4.19**).

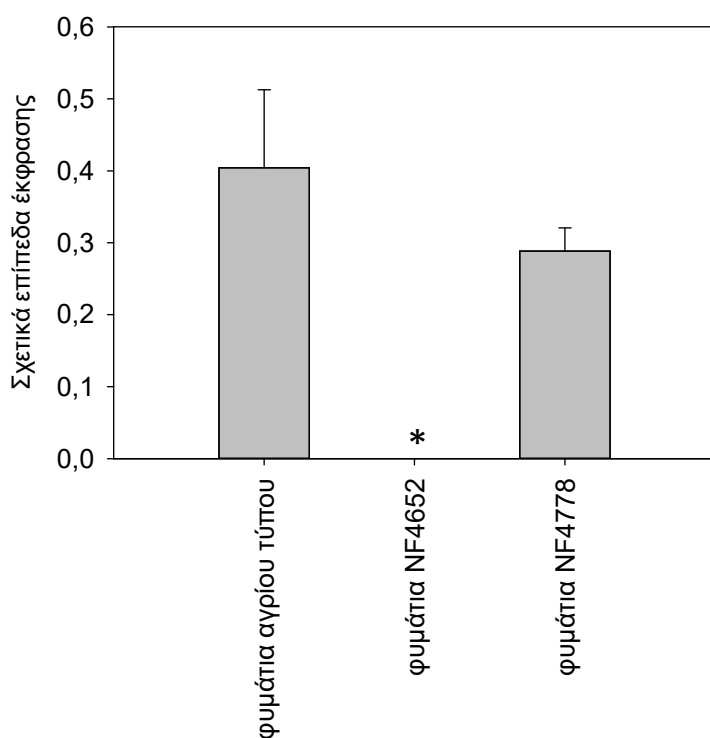


Εικόνα 4.18: Δραστικότητα νιτρογενάσης ως προς το φρέσκο βάρος (f.w.) των φυματίων σε φυτά αγρίου τύπου R108 και σε μετασχηματισμένα φυτά των μεταλλαγμένων σειρών NF4652_insertion_8 και NF4778_insertion_7 του *M.truncatula*. Τα (*) δείχνουν το επίπεδο σημαντικότητας με τη χρήση ANOVA και post-hoc Tukey. Τρεις βιολογικές επαναλήψεις χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση της δραστικότητας της νιτρογενάσης των τριών αυτών γονοτύπων του *M.truncatula*. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των τριών βιολογικών επαναλήψεων +/- SE.



Εικόνα 4.19: Δραστικότητα νιτρογενάσης ως προς το ξηρό βάρος (d.w.) των φυματίων σε φυτά αγρίου τύπου R108 και σε μετασχηματισμένα φυτά των μεταλλαγμένων σειρών NF4652_insertion_8 και NF4778_insertion_7 του *M.truncatula*. Τρεις βιολογικές επαναλήψεις χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση της δραστικότητας της νιτρογενάσης των τριών αυτών γονοτύπων του *M.truncatula*. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των τριών βιολογικών επαναλήψεων +/- SE.

Τέλος, όπως φαίνεται από την **εικόνα 4.20** παρατηρείται μείωση της σχετικής έκφρασης των φυματίων των μετασχηματισμένων φυτών των μεταλλαγμένων σειρών NF4652_insertion_8 και NF4778_insertion_7 του *M.truncatula* σε σχέση με τα φυμάτια των αγρίου τύπου φυτών R108. Τα μεταλλαγμένα φυτά της NF4652_insertion_8 παρουσίασαν και στατιστικά σημαντικά μικρότερα επίπεδα έκφρασης σε σχέση με τα αγρίου τύπου R108, όπως φάνηκε μετά από ANOVA και post-hoc Tukey ανάλυση.



Εικόνα 4.20: Διάγραμμα με χρήση του προγράμματος SigmaPlot 12.0 που παρουσιάζει τα επίπεδα σχετικής έκφρασης του *MiPMT3_1* του *M.truncatula* στα φυμάτια των αγρίου τύπου R108 φυτών και των μετασχηματισμένων φυτών των μεταλλαγμένων σειρών NF4652_insertion_8 και NF4778_insertion_7 του *M.truncatula* που έχουν υποστεί σίγηση στο συγκεκριμένο γονίδιο. Τρεις βιολογικές επαναλήψεις χρησιμοποιήθηκαν για τη μεταγραφομική ανάλυση των τριών αυτών γονοτύπων του *M.truncatula*. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των τριών βιολογικών επαναλήψεων +/- SE.

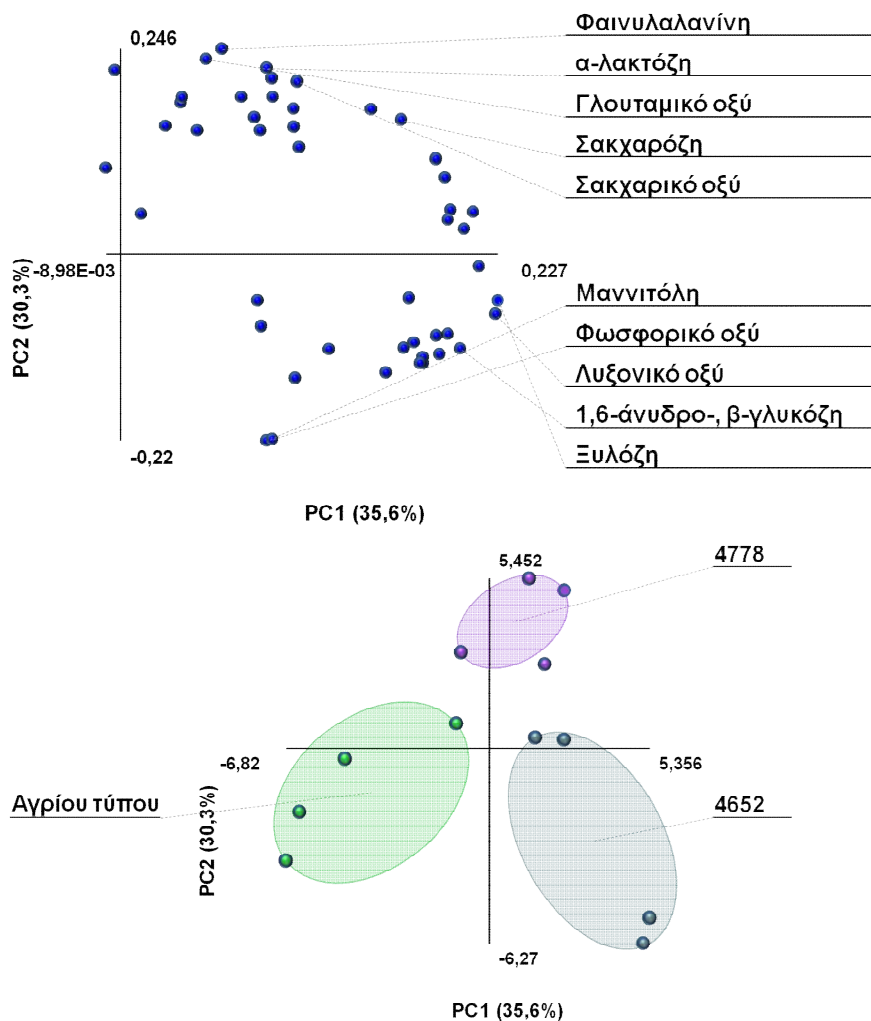
4.6.4. Μεταβολομική ανάλυση μεταξύ των αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων φυτών του *M. truncatula*

Ιστός από φυμάτια 42 ημερών φυτών *M. truncatula* αγρίου τύπου και ομοζυγωτών φυτών των μεταλλαγμένων σειρών NF4652_insertion_8 και NF4778_insertion_7 συλλέχθηκαν προκειμένου να γίνει ανάλυση μεταβολιτών. Συνοπτικά, τα φυμάτια λειοτριβήθηκαν με τη βοήθεια υγρού αζώτου και οι μεταβολίτες εκχυλίστηκαν σε μίγμα μεθανόλης/χλωροφόρμιου/dH₂O με θερμική κατεργασία. Στη συνέχεια έγινε εξάτμιση του διαλύτη των δειγμάτων και ακολούθησε η ανάλυση των μεταβολιτών με την τεχνική GC-MS (αέριος χρωματογραφία συνδυασμένη με χρωματογραφία μάζας). Εντοπίστηκαν 46 μεταβολίτες που ανήκουν σε διάφορες κατηγορίες: αμινοξέα, σάκχαρα, πολυόλες, οργανικά οξέα και ένα ανόργανο οξύ. Πραγματοποιήθηκε έπειτα ANOVA και post-hoc Tukey ανάλυση σε αυτούς τους μεταβολίτες και βρέθηκε ότι 24 από αυτούς έδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p \leq 0,05$) στα φυμάτια των φυτών των μεταλλαγμένων σε σχέση με αυτά των αγρίου τύπου φυτών. Στον παρακάτω **πίνακα 4.5** απεικονίζονται οι χημικές ενώσεις, οι τιμές σχετικής απόκρισης των φυματίων των αγρίου τύπου φυτών R108 και των ομοζυγωτών για ένθεση φυτών των μεταλλαγμένων σειρών NF4652_insertion_8 και NF4778_insertion_7, όπως και οι p-values που προέκυψαν μετά από ANOVA και post-hoc Tukey ανάλυση.

Από την PCA ανάλυση, η οποία επιτρέπει την ομαδοποίηση των δειγμάτων σε ομάδες παρατηρήθηκε ισχυρή διαφοροποίηση στο μεταβολομικό πρότυπο των φυματίων των τριών διαφορετικών γονοτύπων. Η πρώτη και η δεύτερη PCA συνιστώσα αντιπροσώπευσαν το 65,9 % της συνολικής παραλλακτικότητας που παρατηρήθηκε στο μεταβολομικό πρότυπο των τριών αυτών γονοτύπων και διαχώρισε ευκρινώς τα δείγματά τους, όπως φαίνεται από την **εικόνα 4.21**.

Πίνακας 4.5: Ανάλυση μεταβολιτών από τους τρεις διαφορετικούς γονότυπους. Στον πίνακα απεικονίζονται οι χημικές ενώσεις, η αναλογία μάζας προς φορτίο (m/z) των μεταβολιτών ο χρόνος έκλουσής τους (RT) και οι τιμές σχετικής απόκρισης των φυματίων αγρίου τύπου φυτών R108 και των ομοζυγωτών για ένθεση φυτών των μεταλλαγμένων σειρών NF4652_insertion_8 και NF4778_insertion_7. Πραγματοποιήθηκε ANOVA και post-hoc Tukey ανάλυση και με έντονη γραφή (bold) απεικονίζονται οι ενώσεις που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά.

Μεταβολίτης	m/z	RT	Αγρίου τύπου	4652	4778	p-value
Αμινοξέα						
Αλανίνη (3TMS)	188	17,884	0,00062	0,00072	0,00127	0,06524
β-αλανίνη (3TMS)	228	19,417	0,00086	0,00179	0,00123	0,07524
Ασπαραγίνη (3TMS)	116	24,475	0,00005	0,00014	0,00010	0,03711
Ασπαρτικό οξύ (3TMS)	231,6	21,531	0,00110	0,00145	0,00179	0,24351
Γλουταμικό οξύ (3TMS)	246,1	23,478	0,00059	0,00071	0,00223	0,00357
Ομοσερίνη (3TMS)	218,1	20,028	0,00006	0,00010	0,00011	0,14865
Μεθειονίνη (2TMS)	176	21,387	0,00007	0,00007	0,00009	0,66219
Ορνιθίνη (4TMS)	142	27,123	0,00002	0,00001	0,00003	0,32086
Φαινυλαλανίνη(2TMS)	217,6	23,524	0,00021	0,00024	0,00043	0,02992
Σερίνη (3TMS)	218,1	18,056	0,00003	0,00002	0,00005	0,19521
Θρεονίνη (3TMS)	219,1	18,682	0,00015	0,00019	0,00023	0,19363
Σάκχαρα						
Αραβινόζη (1ΜΕΟΧ) (4TMS) BP	103	24,867	0,00232	0,00341	0,00370	0,06234
D-κυτταροβιόζη (8TMS)	204,1	37,794	0,00009	0,00011	0,00012	0,75247
Κυτταροτριόζη (1ΜΕΟΧ) (11TMS)	361,1	40,835	0,00241	0,00425	0,00175	0,00190
Φρουκτόζη (1ΜΕΟΧ) (5TMS) MP	307,1	28,371	0,00907	0,01267	0,00752	0,01871
Γαλακτόζη (1ΜΕΟΧ) (5TMS) MP	319,1	28,823	0,02454	0,03154	0,02488	0,08734
Γεντοβιόζη (1ΜΕΟΧ) (8TMS) BP	361,1	41,181	0,00091	0,00237	0,00323	0,00012
Γλυκοπυρανόζη [-H2O] (4TMS)	217,1	26,394	0,00298	0,00669	0,00603	0,00054
D-γλυκοπυρανόζη (5TMS)	204	28,643	0,00184	0,00273	0,00162	0,37677
Γλυκόζη (1ΜΕΟΧ) (5TMS) MP	319,1	28,792	0,02454	0,03155	0,02489	0,08739
1,6-άνυδρο-, β-γλυκόζη (3TMS)	204	25,195	0,00063	0,00160	0,00101	0,00047
α-λακτόζη (1ΜΕΟΧ) (8TMS) BP	204,1	38,469	0,00146	0,00160	0,00244	0,00538
Λυξόζη (1ΜΕΟΧ) (4TMS) MP	103	24,877	0,00224	0,00336	0,00369	0,05357
6-φωσφορική μαννόζη (1ΜΕΟΧ) (6TMS) MP	387,1	35,342	0,00160	0,00128	0,00181	0,59395
Ριβόζη (1ΜΕΟΧ) (4TMS) MP	73	24,864	0,00373	0,00573	0,00586	0,04317
Σοφορόζη (1ΜΕΟΧ) (8TMS) MP	319,1	41,334	0,00004	0,00007	0,00004	0,00001
Σακχαρόζη (8TMS)	361,1	39,574	0,37460	0,78093	0,97328	0,00073
Ξυλόζη (1ΜΕΟΧ) (4TMS) BP	73	24,476	0,00085	0,00213	0,00142	0,00004
Πολυόλες						
1,2,4-τριόλη, βενζένιο(3TMS)	239,1	21,907	0,00062	0,00111	0,00154	0,05246
Μυο-ινοσιτόλη (6TMS)	305,1	31,791	0,00543	0,02371	0,02024	0,00000
Μαννιτόλη (6TMS)	319,1	29,31	0,00292	0,00448	0,00158	0,03641
Ονονιτόλη (5TMS)	216,6	29,656	0,00628	0,00656	0,00746	0,44039
D-πινιτόλη (5TMS)	260,1	27,651	0,00731	0,00602	0,01118	0,02392
Οργανικά οξέα						
4-άμινο-βουτανικό οξύ (3TMS)	173,6	21,6	0,00256	0,00418	0,00380	0,05372
4-υδρόξυ-, cis-κινναμωμικό οξύ (2TMS)	308,1	28,976	0,00007	0,00013	0,00008	0,33980
Κιτρικό οξύ (4TMS)	273,1	27,288	0,01360	0,06939	0,02229	0,00000
Φουμαρικό οξύ (2TMS)	245,1	17,566	0,00085	0,00133	0,00102	0,17977
Γαλακτονικό οξύ (6TMS)	73	30,408	0,03844	0,04743	0,06514	0,04514
Γαλακτικό οξύ (2TMS)	147	9,865	0,02329	0,03798	0,03208	0,16731
Λυξονικό οξύ (5TMS)	292,1	26,472	0,00054	0,00152	0,00105	0,00092
Μηλικό οξύ (3TMS)	147	20,897	0,01282	0,05214	0,01857	0,00000
Σακχαρικό οξύ (6TMS)	333,1	31,435	0,00090	0,00116	0,00217	0,00000
Σικιμικό οξύ (4TMS)	204	27,081	0,00029	0,00054	0,00071	0,00030
1-πυρολίνη-3-υδρόξυ-5-καρβοξυλικό οξύ_2TMS	156	21,426	0,00687	0,00842	0,01715	0,00023
Βανιλικό οξύ (2TMS)	296,7	26,072	0,00027	0,00043	0,00034	0,10045
Ανόργανα Οξέα						
Φωσφορικό οξύ (3TMS)	299	15,969	0,16633	0,31430	0,03897	0,03299

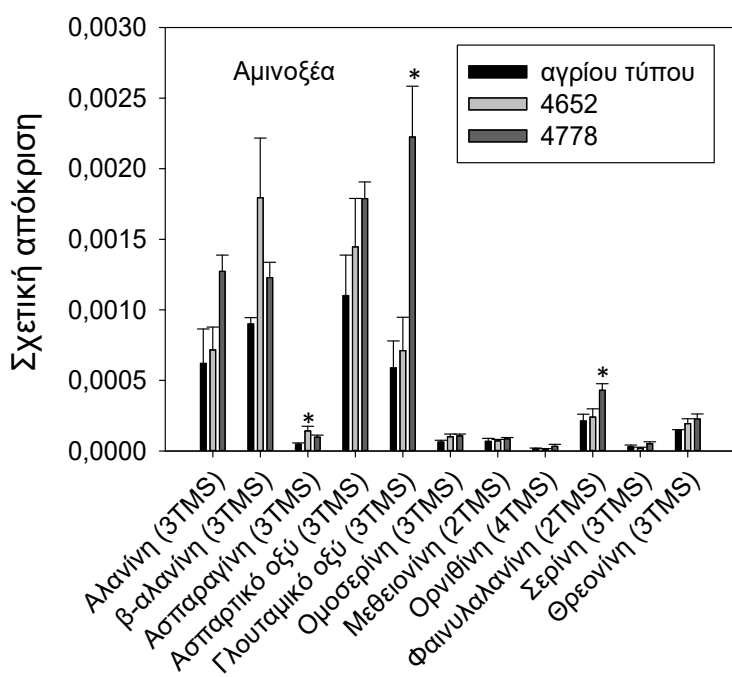


Εικόνα 4.21: PCA ανάλυση των μεταβολιτών που εντοπίστηκαν στα φυμάτια των φυτών αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων σειρών (NF4652_insertion_8, NF4778_insertion_7) του *M.truncatula*. I) Διάγραμμα των βαρών (loadings) των συνιστωσών που δείχνουν τη μεγαλύτερη διακύμανση στους τρεις διαφορετικούς αυτούς γονότυπους. II) Διάγραμμα των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών που αντιπροσωπεύουν το 65,9 % της συνολικής παραλλακτικότητας που παρατηρείται στο μεταβολομικό πρότυπο των τριών αυτών γονοτύπων. Για την ανάλυση κύριων συνιστωσών χρησιμοποιήθηκαν μετρήσεις από τέσσερις ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις για τα φυμάτια κάθε γονοτύπου.

Από τα αποτελέσματα προέκυψε μια γενικότερη αύξηση συσσώρευσης των μεταβολιτών στα φυμάτια των μετασηματισμένων φυτών των μεταλλαγμένων σειρών NF4652_insertion_8 και NF4778_insertion_7. Μάλιστα όλα τα οργανικά οξέα και σχεδόν όλα τα αμινοξέα παρουσίασαν μεγαλύτερες τιμές συσσώρευσης στα φυμάτια των μεταλλαγμένων σειρών NF4652_insertion_8 και NF4778_insertion_7 σε σχέση με τη συσσώρευση στα αγρίου τύπου φυτά.

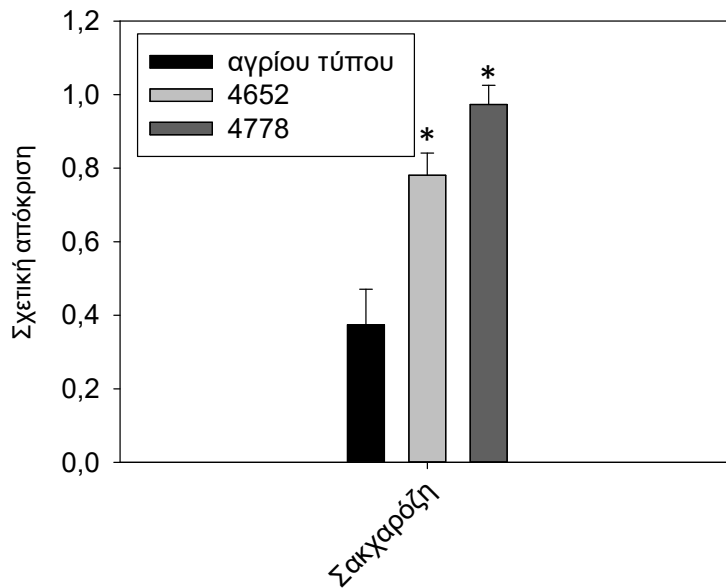
Το μεταβολομικό προφίλ των αμινοξέων των φυτών των τριών διαφορετικών γονοτύπων έδειξε μεγαλύτερες τιμές συσσώρευσής τους στα φυμάτια των μετασηματισμένων φυτών από ότι στα αγρίου τύπου (εικόνα 4.22). Από τους έντεκα

μεταβολίτες που εντοπίστηκαν οι τρεις έδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Το γλουταμινικό οξύ παρουσίασε τη μεγαλύτερη τιμή συσσώρευσης από όλα τα αμινοξέα στα φυμάτια της μεταλλαγμένης σειράς NF4778_insertion_7 και παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων του, όπως και η φαινυλαλανίνη. Η ασπαραγίνη παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση στα φυμάτια των μετασηματισμένων φυτών της μεταλλαγμένης σειράς NF4652_insertion_8.



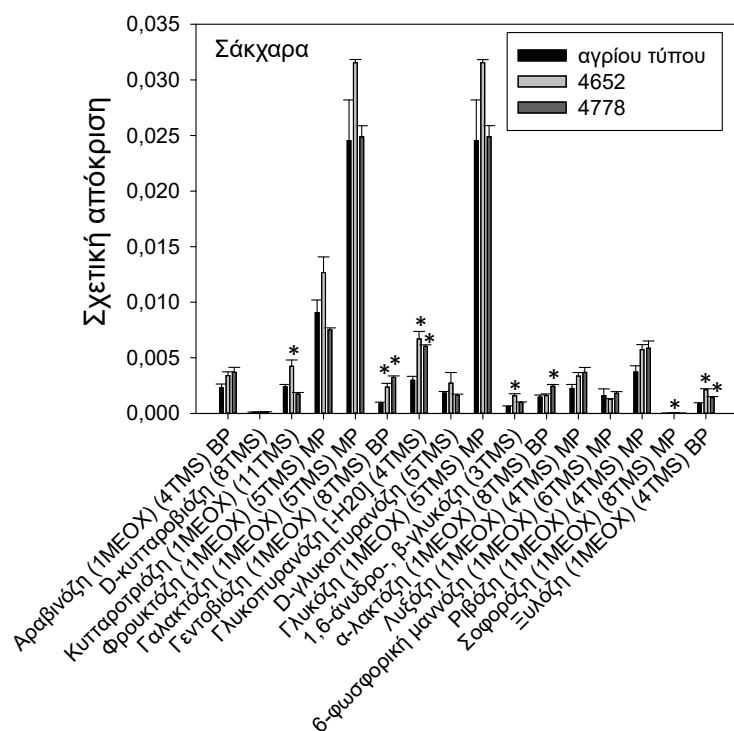
Εικόνα 4.22: Διάγραμμα με χρήση του προγράμματος SigmaPlot 12.0 που παρουσιάζει τα αμινοξέα που εντοπίστηκαν έπειτα από GC-MS ανάλυση στα φυμάτια των αγρίου τύπου R108 φυτών και των μεταλλαγμένων σειρών (NF4652_insertion_8, NF4778_insertion_7) του *M.truncatula*. Τα (*) δείχνουν το επίπεδο σημαντικότητας με τη χρήση ANOVA και post-hoc Tukey HSD. Η στατιστική σημαντικότητα μετρήθηκε για $p \leq 0.05$. Τέσσερις βιολογικές επαναλήψεις χρησιμοποιήθηκαν για τη μεταβολομική ανάλυση των τριών γονοτύπων του *M.truncatula*. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των τριών βιολογικών επαναλήψεων +/- SE.

Η σακχαρόζη παρουσίασε τις υψηλότερες τιμές συσσώρευσης από τα σάκχαρα που εντοπίστηκαν ύστερα από τη μεταβολομική ανάλυση και μάλιστα παρουσίασε στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη συγκέντρωση στα φυμάτια των φυτών και των δύο μεταλλαγμένων σειρών, με μεγαλύτερες τιμές συσσώρευσης για αυτά της μεταλλαγμένης σειράς NF4778_insertion_7 (εικόνα 4.23).



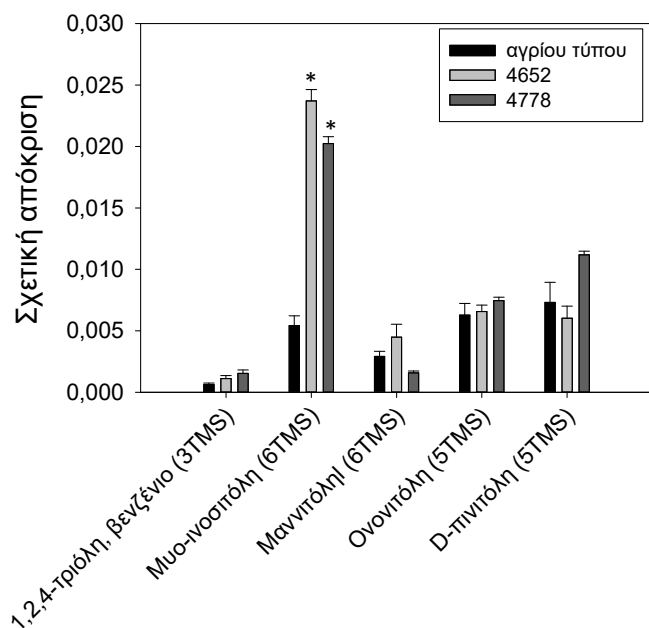
Εικόνα 4.23: Διάγραμμα με χρήση του προγράμματος SigmaPlot 12.0 που παρουσιάζει τη σακχαρόζη (πολύ υψηλή αφομοίωση) που ανιχνεύθηκε έπειτα από GC-MS ανάλυση στα φυμάτια των αγρίου τύπου R108 φυτών και των μεταλλαγμένων σειρών (NF4652_insertion_8, NF4778_insertion_7) του *M.truncatula*. Τα (*) δείχνουν το επίπεδο σημαντικότητας με τη χρήση ANOVA και post-hoc Tukey HSD. Η στατιστική σημαντικότητα μετρήθηκε για $p \leq 0.05$. Τέσσερις βιολογικές επαναλήψεις χρησιμοποιήθηκαν για τη μεταβολομική ανάλυση των τριών γονοτύπων του *M.truncatula*. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των τριών βιολογικών επαναλήψεων \pm SE.

Από τη μεταβολομική ανάλυση ανιχνεύθηκαν δεκαεπτά σάκχαρα (**εικόνα 4.24**) εκ των οποίων τα δέκα παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση σε κάποια ή και στις δύο μεταλλαγμένες σειρές. Η κυτταροτριόζη, η 1,6-άνυδρο-, β-γλυκόζη και η σοφορόζη παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση στα φυμάτια των φυτών της μεταλλαγμένης σειράς NF4652_insertion_8. Η α-λακτόζη παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση στα φυμάτια των φυτών της μεταλλαγμένης σειράς NF4778_insertion_7. Τέλος, η γεντοβιόζη, γλυκοπυρανόζη [-H₂O] και η ξυλόζη παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα φυμάτια και των δύο μεταλλαγμένων σειρών.



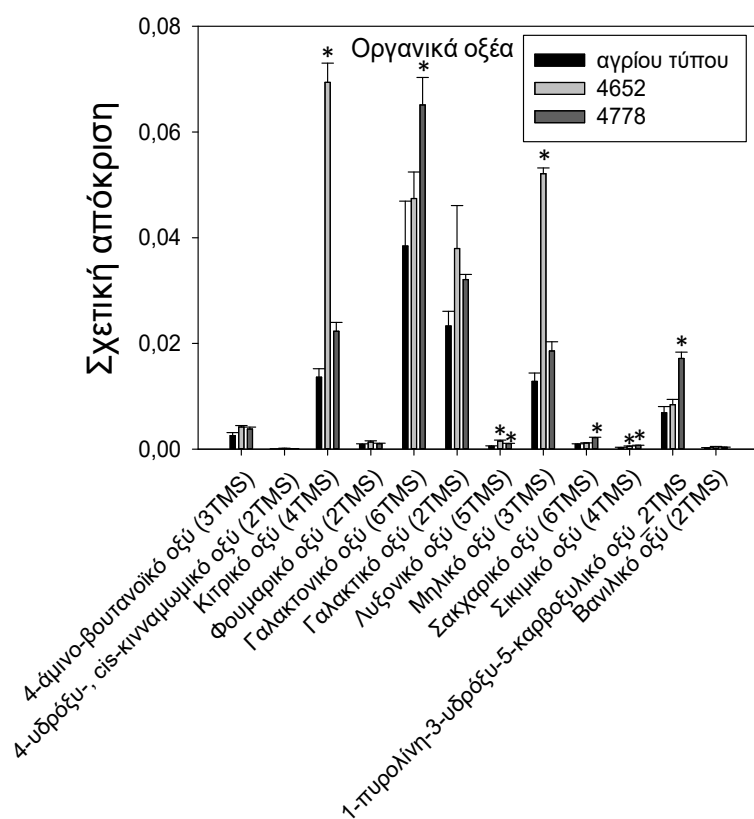
Εικόνα 4.24: Διάγραμμα με χρήση του προγράμματος SigmaPlot 12.0 που παρουσιάζει τα σάκχαρα, εκτός της σακχαρόζης που εντοπίστηκαν έπειτα από GC-MS ανάλυση στα φυμάτια των αγρίου τύπου R108 φυτών και των μεταλλαγμένων σειρών (NF4652_insertion_8, NF4778_insertion_7) του *M.truncatula*. Τα (*) δείχνουν το επίπεδο σημαντικότητας με τη χρήση ANOVA και post-hoc Tukey HSD. Η στατιστική σημαντικότητα μετρήθηκε για $p \leq 0.05$. Τέσσερις βιολογικές επαναλήψεις χρησιμοποιήθηκαν για τη μεταβολομική ανάλυση των τριών γονοτύπων του *M.truncatula*. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των τριών βιολογικών επαναλήψεων +/- SE.

Από τις πολυόλες που ανιχνεύθηκαν μόνο η μυο-ινοσιτόλη έδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση στα φυμάτια και των δύο μεταλλαγμένων σειρών, με μέγιστη τιμή για αυτά της μεταλλαγμένης σειράς NF4652_insertion_8 (εικόνα 4.25).



Εικόνα 4.25: Διάγραμμα με χρήση του προγράμματος SigmaPlot 12.0 που παρουσιάζει τις πολυόλες που εντοπίστηκαν έπειτα από GC-MS ανάλυση στα φυμάτια των αγρίου τύπου R108 φυτών και των μεταλλαγμένων σειρών (NF4652_insertion_8, NF4778_insertion_7) του *M.truncatula*. Τα (*) δείχνουν το επίπεδο σημαντικότητας με τη χρήση ANOVA και post-hoc Tukey HSD. Η στατιστική σημαντικότητα μετρήθηκε για $p \leq 0.05$. Τέσσερις βιολογικές επαναλήψεις χρησιμοποιήθηκαν για τη μεταβολομική ανάλυση των τριών γονοτύπων του *M.truncatula*. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των τριών βιολογικών επαναλήψεων +/- SE.

Όπως ειπώθηκε και προηγουμένως και τα δώδεκα οργανικά οξέα παρουσίασαν μεγαλύτερες συσσωρεύσεις στα φυμάτια των μετασηματισμένων φυτών (εικόνα 4.26) και μάλιστα επτά από αυτά παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση σε κάποια ή και στις δύο μεταλλαγμένες σειρές. Πιο συγκεκριμένα, το κιτρικό οξύ και το μηλικό παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση των τιμών συσσώρευσής τους στα φυμάτια των φυτών της μεταλλαγμένης σειράς NF4652_insertion_8. Το γαλακτονικό οξύ, το σακχαρικό οξύ και το 1-πυρολίνη-3-υδρόξυ-5-καρβοξυλικό οξύ παρουσίασαν στατιστική αύξηση της συσσώρευσής τους στα φυμάτια των φυτών της μεταλλαγμένης σειράς NF4778_insertion_7.

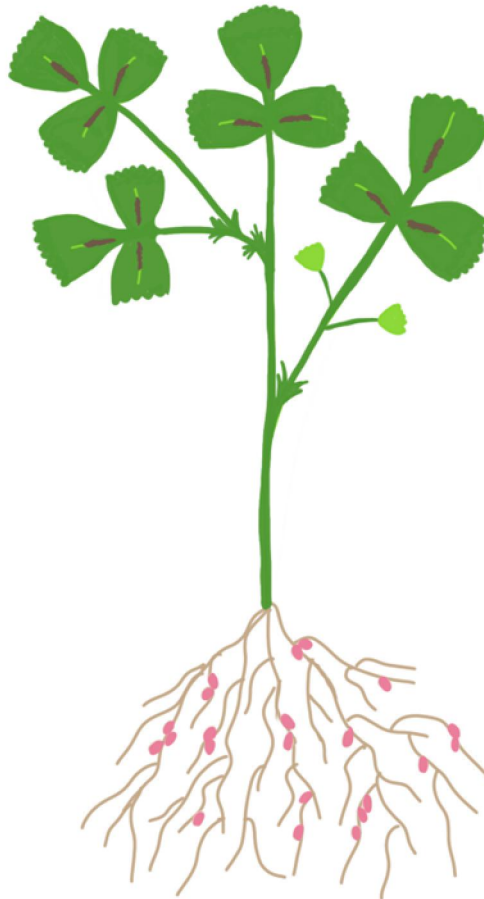


Εικόνα 4.26: Διάγραμμα με χρήση του προγράμματος SigmaPlot 12.0 που παρουσιάζει τα οργανικά οξέα που εντοπίστηκαν έπειτα από GC-MS ανάλυση στα φυμάτια των αγρίου τύπου R108 φυτών και

των μεταλλαγμένων σειρών (NF4652_insertion_8, NF4778_insertion_7) του *M.truncatula*. Τα (*) δείχνουν το επίπεδο σημαντικότητας με τη χρήση ANOVA και post-hoc Tukey HSD. Η στατιστική σημαντικότητα μετρήθηκε για $p \leq 0.05$. Τέσσερις βιολογικές επαναλήψεις χρησιμοποιήθηκαν για τη μεταβολομική ανάλυση των τριών γονοτύπων του *M.truncatula*. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των τριών βιολογικών επαναλήψεων +/- SE.

Συζήτηση

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5



5. Συζήτηση

5.1. Φυλογενετική ταξινόμηση και οργάνωση γονιδίων

Οι MST μεταφορείς εμπλέκονται στην εισαγωγή και εξαγωγή των μονοσακχαριτών των φυτών μέσω της πλασματικής μεμβράνης και μεταξύ των οργανιδίων μέσα στο κύτταρο. Πρόσφατες μελέτες έχουν εντοπίσει ένα μεγάλο αριθμό πιθανών MST-γονιδίων, εκ των οποίων 53 MST-γονίδια στο *Arabidopsis thaliana* (Büttner 2007), 59 στο αμπέλι (*Vitis vinifera*) (Afoufa-Bastien et al. 2007) και 65 στο ρύζι (*Oryza sativa*) (Johnson and Thomas 2007). Στην παρούσα μελέτη εντοπίστηκαν 71 MSTs στο *M.truncatula* (εικόνα 3.1). Στο *M.truncatula* και στο *O.sativa* η υποοικογένεια των STPs ήταν αυτή που παρουσίασε τα περισσότερα μέλη με 30 και 29 αντίστοιχα, ενώ η υποοικογένεια των ESLs περιελάμβανε τα περισσότερα μέλη στο *A.thaliana* και το *V.vinifera*. Μάλιστα στο *M.truncatula*, δέκα μόνο μέλη εντοπίστηκαν στην υποοικογένεια των ESLs. Η υποοικογένεια των INTs στο *M.truncatula* παρουσίασε πολλά περισσότερα MST-γονίδια από αυτά που βρέθηκαν για τα τρία άλλα φυτά. Από την άλλη τα *MtPMTs* στο *M.truncatula* ήταν λιγότερα από αυτά στο ρύζι, παρ' όλ' αυτά ήταν περισσότερα από αυτά στο αμπέλι και την αραβίδοψη. Τα TMT- and pGlcT-γονίδια δεν παρουσίασαν μεγάλες διακυμάνσεις στον αριθμό των μελών τους στα τέσσερα αυτά φυτά. Τέλος η υποοικογένεια των VGTs παρουσίασε τα λιγότερα μέλη και στα τέσσερα αυτά φυτά.

Πίνακας 5.1: Συγκριτική ανάλυση των υποοικογενειών των MST-γονιδίων στα φυτά: *A. thaliana*, *O.sativa*, *V.vinifera* και *M.truncatula*.

Υποοικογένεια	Αριθμός γονιδίων			
	<i>A.thaliana</i>	<i>O.sativa</i>	<i>V.vinifera</i>	<i>M.truncatula</i>
STPs	14	29	20	30
ESLs	19	6	22	10
INTs	4	3	3	9
PMTs	6	15	5	11
TMTs	3	6	3	5
pGlcTs	4	4	4	5
VGTs	3	2	2	1
Total	53	65	59	71

Η *in silico* ανάλυση δομής των MST-γονιδίων φανέρωσε ορισμένες αλλαγές στο μέγεθος και την οργάνωση των γονιδίων (αριθμός και μέγεθος εξωνίων/εσωνίων) μεταξύ των μελών των διαφόρων υποοικογενειών. Πράγματι τα *MtTMTs* με δομή 5 ή 6 εξωνίων/4 ή 5 εσωνίων (**εικόνα 3.3**) παρουσίασαν σχεδόν την ίδια γονιδιακή οργάνωση με αυτή των αντίστοιχων MSTs στο *V.vinifera* (5 εξώνια/4 εσώνια) (Afoufa-Bastien et al. 2007), στο *A. thaliana* (5 εξώνια/4 εσώνια) (Wormit et al. 2006) και στο *O. sativa* (6 εξώνια/5 εσώνια) (Cho et al. 2010), ενώ η υποοικογένεια των STPs στο *M.truncatula* παρουσίασε ποικιλότητα στη γονιδιακή διάταξη των μελών της (1-6 εξώνια/ 0-5 εσώνια) (**εικόνα 3.3**), σε αντίθεση με τη γονιδιακή δομή των *VnSTPs* (4 εξώνια/3 εσώνια η πιο κοινή δομή) (Afoufa-Bastien et al. 2007) και των *AtSTPs* (3 ή 4 εξώνια/2 ή 3 εσώνια) (Sauer et al. 1990, Truernit et al. 1996, Truernit et al. 1999, Büttner et al. 2000, Nørholm et al. 2006, Poschet et al. 2010, Scholz-Starke et al. 2003, Schneidereit et al. 2005, Rottman et al. 2018). Τα *MtPMTs* παρουσίασαν παρόμοια γονιδιακή δομή με αυτή των αντίστοιχων MSTs στο *A. thaliana* (2-4 εξώνια/1-3 εσώνια) (Klepek et al. 2005, Klepek et al. 2010). Επιπλέον, τα *MtTMTs* παρουσίασαν τις μεγαλύτερες αμινοξικές αλληλουχίες (716-744 aa) (**πίνακας 3.2**), σχεδόν δηλαδή στο ίδιο εύρος με αυτό στα *AtTMTs* (729-739 aa) (Wormit et al. 2006) και *OsTMTs* (740-749 aa) (Cho et al. 2010). Τέλος, τα *MtINTs* παρουσίασαν μια ποικίλη γονιδιακή δομή (2-9 exons/1-8 introns) (**εικόνα 3.3**) και πρωτεϊνική αλληλουχία (496-582 aa) (**πίνακας 3.2**), όπως έχει εντοπιστεί δηλαδή και στα *AtINTs* (2-6 εξώνια/1-5 εσώνια και 496-582aa, αντίστοιχα).

Οι MSTs έχουν ένα κοινό πρότυπο δομικής οργάνωσης με 12 διαμεμβρανικές περιοχές α-έλικας οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με υδρόφιλα συνδετικά τμήματα (βρόχους) (Henderson 1990, Saier 1994, Büttner and Sauer 2000, Law et al. 2008). Το ίδιο φαίνεται να ισχύει και για τους MSTs του *M. truncatula* (**πίνακας 3.2**). Ο εκτεταμένος υδρόφιλος βρόχος μεταξύ των διαμεμβρανικών ελίκων 6 και 7 των TMT-μελών, σε συνάρτηση με την δομική ομολογία μεταξύ των έξι αμινοτελικών και έξι καρβοξυτελικών περιοχών των MFS μεταφορέων, υποδεικνύει ότι οι μεταφορείς TMT πιθανόν να έχουν προέλθει από γονιδιακό διπλασιασμό ενός προγονικού γονιδίου που κωδικοποιούσε για ένα μεταφορέα με έξι διαμεμβρανικές περιοχές (Büttner and Sauer 2000, Cho et al. 2010).

5.2. Παρουσία συντηρημένων μοτίβων

Η στοίχιση των αλληλουχιών αμινοξέων (alignment) (ClustalW) των μελών των MSTs των μελών της κάθε υποοικογένειας φανέρωσε την παρουσία πολλών συντηρημένων μοτίβων. Κάποια από αυτά έχουν ήδη περιγραφεί σε προηγούμενες μελέτες. Πράγματι το μοτίβο RXGRR (Pao et al. 1998), το οποίο είναι κοινό σε πολλά μέλη των MFS (Major Facilitator Superfamily) και εντοπίζεται μεταξύ των TM2 και TM3, εντοπίστηκε και στην παρούσα μελέτη σε πολλά μέλη της υποοικογένειας των STPs. Ειδικά το GR(R/K) παρουσίασε υψηλή συντήρηση σε όλα τα MSTs του *M. truncatula*, εκτός των *MtpGlcTs*. Το μοτίβο YYX(T/P) που είναι γνωστό ότι ελέγχει τη δράση και την εξειδίκευση των μεταφορέων σακχάρων και το οποίο εντοπίζεται στο εσωτερικό της διαμεμβρανικής έλικας 7 (Wang et al. 2016) εντοπίστηκε και στα μέλη της υποοικογένειας των INTs του *M. truncatula*. Το μοτίβο WXXHXXW που έχει βρεθεί στο καρβοξυτελικό άκρο των *AtSTPs* (Yamada et al. 2017) βρέθηκε επίσης και στην πλειοψηφία των STPs του *M. truncatula*. Επιπλέον, το μοτίβο (D/E)XXXL(L/I) (Bonifacino and Traub 2003) που εντοπίζεται ως EVEKLL στο καρβοξυτελικό άκρο του *AtINT4* (Wolfenstetter, Wirsching et al. 2012) εντοπίστηκε μετά την TM12 στα *MtINT4_1* και *MtINT4_2*. Ακόμα, το καρβοξυτελικό μοτίβο WKERA το οποίο έχει βρεθεί σχεδόν απaráλλαχτο στις INT1-τύπου πρωτεΐνες (Wolfenstetter et al. 2012) εντοπίστηκε και στους *MtINT1_1*, *MtINT1_2*, *MtINT1_3* και *MtINT1_4*, μετά την TM12. Τέλος, το συντηρημένο μοτίβο PESP το οποίο έχει βρεθεί στο μεταφορέα σακχάρων-A [transporter-A, (Past-A)], που σχετίζεται με τη μεταφορά πρωτονίου και εντοπίζεται μετά τη διαμεμβρανική περιοχή 6, και ο οποίος επάγεται στο μυαλό μετά την υπερκαπνία και ρυθμίζει την πρόσληψη της γλυκόζης μαζί με την τιμή του pH (Shimokawa et al. 2002) βρέθηκε στην πλειοψηφία των MSTs του *M. truncatula*, εκτός των STPs.

Εκτός των μοτίβων που αναφέρθηκαν παραπάνω, αρκετά κοινά συντηρημένα μοτίβα μεταξύ των μελών της κάθε υποοικογένειας των MSTs του *M. truncatula* και του *Arabidopsis*. Τα συντηρημένα μοτίβα που βρέθηκαν να είναι κοινά για τους STPs των δύο αυτών φυτών ήταν τα: (S/T)GGV και FY(A/S)P. Στην υποοικογένεια των INTs δύο μοτίβα βρέθηκαν όμοια και στα δύο φυτά, τα VPWXXNSE(I/V)YP και VPET(K/Q)G. Τα μοτίβα που εντοπίστηκαν όμοια στην υποοικογένεια των PLTs των δύο αυτών φυτών ήταν τα: VM(S/A)GA και WRXML. Όσον αφορά τους *MtESLs*, ένα μόνο μοτίβο, το VPET(K/R) (όπως και στην υποοικογένεια των INTs) υπάρχει και στο *Arabidopsis*. Τα συντηρημένα μοτίβα: TIAG, GING, IGGGW, PSWRXML,

TIP(I/V)LI και EIFPT(S/R)VRG(I/L)CI εντοπίστηκαν στα μέλη της υποοικογένειας των TMTs τόσο της μηδικής όσο και του *Arabidopsis*. Ακόμα, το μοτίβο: FV(Y/F)LKVPETKGMPL (όπως και στις υποοικογένειες των INTs και ESLs) εντοπίστηκε και στο *Arabidopsis*.

Οι *MtpGlcTs* παρά το ότι αντιπροσωπεύονται από λίγα μέλη στο γονιδίωμα του *M. truncatula* παρουσίασαν κι αυτοί δύο κοινά συντηρημένα μοτίβα με τους αντίστοιχους μεταφορείς στο *A. thaliana*, τα: FGYH(L/I)G(V/I)(V/M)N και GAGPV. Όμοια συντηρημένα μοτίβα ανιχνεύθηκαν και για τους VGTs του *M. truncatula* και τους αντίστοιχους μεταφορείς του *Arabidopsis*. Αυτά ήταν τα SGSLYGAL, SLKE(F/L) και GLVLFQQITGQPSVLYYA.

Κλείνοντας, τα συντηρημένα μοτίβα που εντοπίστηκαν μεταξύ των μελών των MST-υποοικογενειών και ιδιαίτερα αυτών των STPs, INTs, PLTs και TMTs στο *M. truncatula* και στο *A. thaliana*, ίσως παίζουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργία και τη δομή τους και μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως αποτυπώματα για την αναγνώριση νέων μελών αυτών των υποοικογενειών σε άλλα είδη φυτών. Ακόμα, ο μικρός αριθμός γονιδίων των pGlcTs (5) και VGTs (1) δείχνει ίσως ότι η συντήρηση των αλληλουχιών συνδέεται κυρίως με κάποιο σχετικά πρόσφατο γεγονός γονιδιακού διπλασιασμού, παρά με την αναγκαιότητα συντήρησης λόγω λειτουργικών αναγκών. Από την άλλη το γεγονός ότι οι MtESLs έχουν μόλις ένα κοινό μοτίβο με τους αντίστοιχους ESLs στο *Arabidopsis*, ίσως οφείλεται στην αρκετά πρόσφατη εξάπλωση της υποοικογένειας των ERD6-like, όπως αναφέρεται και από τους Afoufa Bastien et al. 2000.

Ανεξάρτητα από τη διδακτορική μελέτη, μία πρόσφατη εκτενής βιοπληροφορική ανάλυση μοτίβων για όλους τους φυτικούς μεταφορείς MST που στηρίχθηκε στο πρόγραμμα MEME (Komaitis et al., 2020) αποκάλυψε 15 συντηρημένα κοινά μοτίβα αλληλουχιών, πολλά από τα οποία περιλαμβάνουν και τα μοτίβα που εντοπίστηκαν στην παρούσα διατριβή, όπως τα συντηρημένα SP μοτίβα PETK (μεταξύ της TM12 και του IC5) και PDTP (μεταξύ της TM6 και του IC1) της δομικής περιοχής ICH (ICH domain) (Deng et al., 2014; Paulsen et al., 2019), όπως επίσης και το χαρακτηριστικό μοτίβο διπλασιασμού RXGRR (στους βρόχους 2-3 και 8-9) (Pao et al., 1998), το οποίο είναι κοινό στην υπερ-οικογένεια των MFS. Το μοτίβο 13 επίσης (TAYCKFDNQMLQLFTSSLYL) σύμφωνα με τους Komaitis et al. 2020, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα μοτίβα τα οποία εμφανίζονται σχεδόν σταθερά στα μέλη της οικογένειας των MSTs, εμφανίζεται μόνο στο 1/3 των μεταφορέων

μονοσακχαριτών και κυρίως σε αυτούς της υποοικογένειας των STPs, κάτι που φανερώνει ότι η δομική περιοχή Lid (Lid domain) έχει έναν ειδικό και διακριτό ρόλο στους *MtSTPs* από άλλους μεταφορείς μονοσακχαριτών. Όλα τα σημαντικά αμινοξέα του ενεργού κέντρου των MST, όπως προκύπτουν με βάση την πρόσφατη κρυσταλλογραφική ανάλυση του AtSTP10 περιλαμβάνονται στις αλληλουχίες των παραπάνω μοτίβων (Q295, Q296 και N301 στο μοτίβο 3, N433 και T437 στο μοτίβο 12, G406 και W410 στο μοτίβο 1, Q177 και I184 στο μοτίβο 11, D42 στο μοτίβο 8, R142 στο μοτίβο 7, F39 και L43 στο μοτίβο 8), με μόνη εξαίρεση (N332, έλικα 8) (Paulsen et al., 2019, Komaitis et al. 2020).

5.3. Μεταγραφομικό και μεταβολομικό προφίλ των MSTs του *M. truncatula*

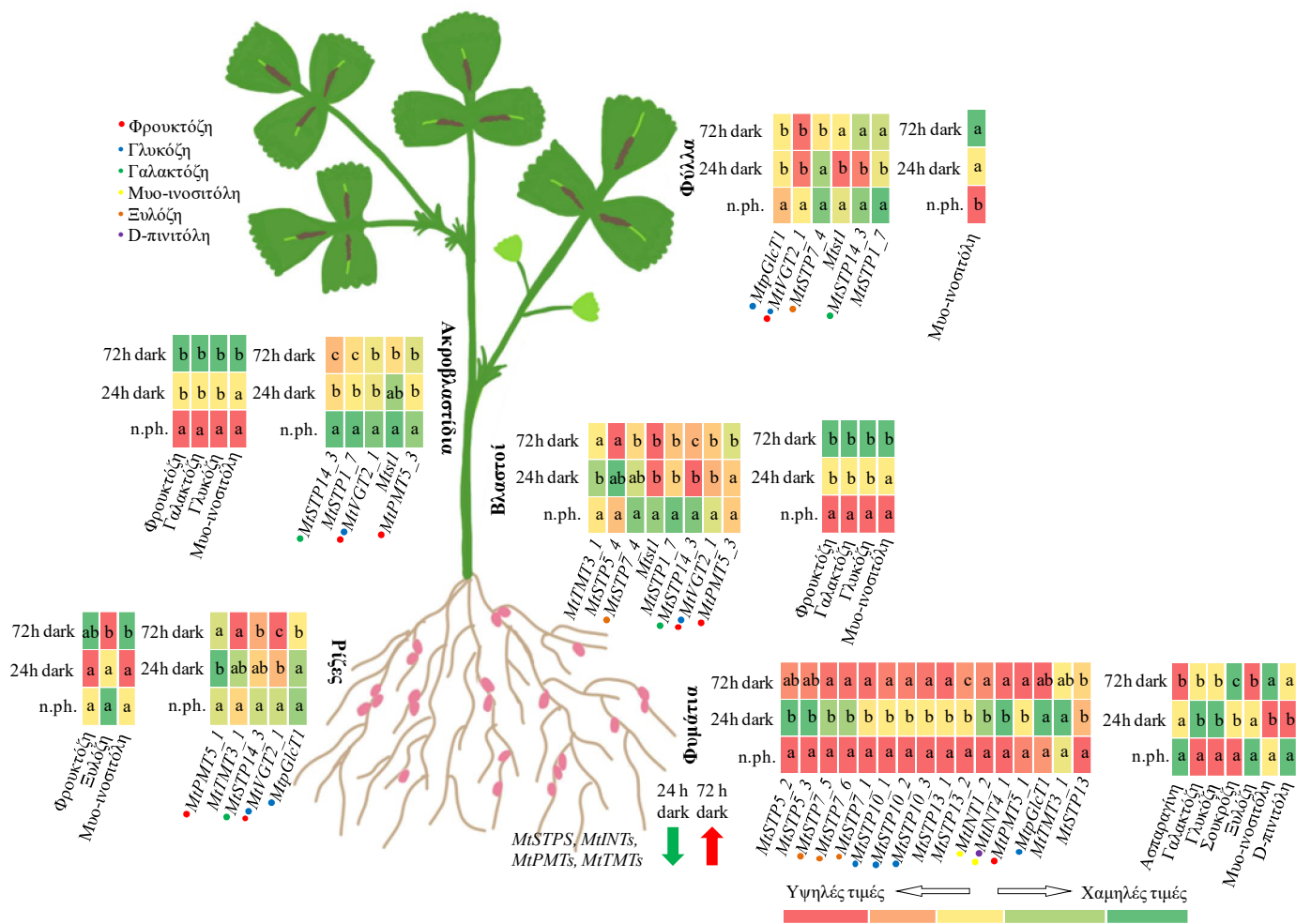
Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι οι *MtMSTs* ρυθμίζονται διαφορετικά μεταξύ των φωτοσυνθετικών και των οργάνων-καταβροθρών του *M. truncatula* και υπό συνθήκες μειωμένης φωτοσύνθεσης, υποδεικνύοντας έτσι τον κεντρικό τους ρόλο στη ρύθμιση της κατανομής και διαχωρισμού του άνθρακα μέσα στο φυτό. Επιπροσθέτως τα αποτελέσματα της γονιδιακής έκφρασης συνδυάστηκαν με αυτά της μεταβολομικής ανάλυσης, έτσι ώστε να εμβαθύνουμε περισσότερο στο ρόλο των MSTs στη ρύθμιση της ανθρακικής ομοιοστάσης σε όλο το φυτό (**Εικόνα 5.1**).

Όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα των μεταγραφημάτων των MST-γονιδίων του *M. truncatula* υπό συνθήκες παρατεταμένου σκοταδιού στα διάφορα όργανα του φυτού (**εικόνα 3.11**), τα γονίδια αυτά ακολουθούν την αντίδραση στα επίπεδα έκφρασής τους μίας εκ των παρακάτω διακριτών ομάδων: γονίδια των οποίων η έκφραση μειώθηκε τις πρώτες 24 h στο σκοτάδι, αλλά αυξήθηκε αργότερα (Ομάδα 1), γονίδια των οποίων η έκφραση έδειξε τελειώς διαφορετική αντίδραση κατά την παραμονή τους στο σκοτάδι από τα παραπάνω (Ομάδα 2), γονίδια των οποίων τα μεταγραφήματα παρουσίασαν σταδιακή μείωση (Ομάδα 3) ή αύξηση (Ομάδα 4) και τέλος, γονίδια των οποίων η έκφραση γενικότερα επηρεάστηκε ασθενώς από την παραμονή στο σκοτάδι (Ομάδα 5).

Παρόλ' αυτά κάθε MST ομόλογο που κατανεμήθηκε σε κάποια από τις παραπάνω διακριτές ομάδες που προέκυψαν από την αντίδραση στην καταπόνηση, εξαρτιόταν από το όργανο του φυτού, φανερώνοντας έτσι μια διαφορετική αλλά συνολικά μια σύνθετη φυσιολογική λειτουργία κάθε ομόλογου στην κατανομή και το διαχωρισμό του άνθρακα στα διάφορα όργανα του φυτού. Έγινε φανερό ότι τα περισσότερα MST γονίδια ακολουθούν κάποια από τις παραπάνω αντιδράσεις στην

καταπόνηση που προήλθε από την παρατεταμένη παραμονή στο σκοτάδι, λόγω κάποιου συγκεκριμένου όργανου και λίγα MST γονίδια ακολουθούν μία μόνο συγκεκριμένη αντίδραση στην καταπόνηση ανεξάρτητα από το όργανο του φυτού.

Στο *A. thaliana*, οι STPs μεταφέρουν διάφορες εξόζες και πεντόζες (Rottmann et al., 2018; Paulsen et al., 2019), παρ' αυτά τα ομόλογα του *M. truncatula* δεν έχουν ακόμα χαρακτηριστεί λειτουργικά μέχρι σήμερα. Η μεταγραφομική μας ανάλυση έδειξε αρκετές ομοιότητες στα επίπεδα έκφρασης μεταξύ των μεταξύ *MtSTP* and *AtSTP*. Οι *MtSTPs* όμοια με τους *AtSTPs* εκφράζονται κυρίως στα μη φωτοσυνθετικά όργανα, με εξαίρεση τα *MtSTP5_4*, *MtSTP14_1* (βλαστός), *MtSTP7_2* και *MtSTP7_4* (ακροβλαστίδια) του *M. truncatula* (εικόνα 3.5) και τα *AtSTP3*, *AtSTP4* και *AtSTP8* του *A. thaliana* που εκφράζονται στα φύλλα. Δύο άλλα *AtMSTs* έχουν αναφερθεί να επάγονται στο παρατεταμένο σκότος, τα: *AtSTP1* (Boorer et al. 1994) και *AtSTP14* (Poschet et al. 2010). Η ίδια αντίδραση στο συνεχές σκοτάδι εντοπίστηκε στα *MtSTP1_7* και *Mtst1* στο βλαστό, το ακροβλαστίδιο και τα φύλλα. Τα δύο αυτά γονίδια έχουν υψηλή συγγένεια με το *AtSTP1*, το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη υψηλής εξειδίκευσης μεταφοράς γλυκόζης και διαφόρων εξοζών και πεντοζών (Boorer et al., 1994, Sherson et al., 2000). Επιπροσθέτως το *Mtst1* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη υψηλής εξειδίκευσης μεταφοράς γλυκόζης και φρουκτόζης και εμπλέκεται σε μυκοριζικές αντιδράσεις του φυτού. (Harrison 1996, Büttner and Sauer 2000). Το *MtSTP14_3* επίσης, το οποίο σύμφωνα με το φυλογενετικό δέντρο έχει υψηλή συγγένεια με το *AtSTP14* παρουσίασε αυξημένα επίπεδα έκφρασης στη ρίζα, το βλαστό, το ακροβλαστίδιο και τα φύλλα, ύστερα από συνεχές σκοτάδι. Μάλιστα λόγω της υψηλής του συγγένειας με το *AtSTP14*, το οποίο είναι εξειδικευμένο MST-γονίδιο για γαλακτόζη, ίσως εμπλέκεται κι αυτό στη μεταφορά της, κάτι στο οποίο οδηγούν και τα αποτελέσματα από τη μεταβολομική ανάλυση που έδειξαν μειωμένα επίπεδα γαλακτόζης στα φυμάτια, στους βλαστούς και στα ακροβλαστίδια. Επιπροσθέτως, η εξειδικευμένη έκφραση *MtSTP13* στα φυμάτια του *M. truncatula* έχει εντοπιστεί κι από τους Kryvoruchko et al. 2016.



Εικόνα 5.1: Θερμικοί χάρτες (heat maps) των μεταγραφομικών και των μεταβολομικών αλλαγών σημαντικών MSTs γονιδίων του *M.truncatula* υπό συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου, 24h στο σκοτάδι και 72h στο σκοτάδι. Τα a,b,c δείχνουν το επίπεδο σημαντικότητας με τη χρήση ANOVA και post-hoc Tukey HSD. Η στατιστική σημαντικότητα μετρήθηκε για $p \leq 0.05$. Τρεις βιολογικές επαναλήψεις χρησιμοποιήθηκαν για τη μεταγραφομική ανάλυση και πέντε για τη μεταβολομική ανάλυση κάθε οργάνου του *M.truncatula* υπό συνθήκες κανονικής φωτοπεριόδου, 24h στο σκοτάδι και 72h στο σκοτάδι. Για κάθε γονίδιο, ο χρωματισμός του θερμικού χάρτη των μεταγραφομικών αλλαγών έγινε με βάση την τιμή των επιπέδων mRNA του συγκεκριμένου γονιδίου σε όλα τα όργανα του φυτού και σε όλες τις πειραματικές συνθήκες. Για κάθε μεταβολίτη, ο χρωματισμός του θερμικού χάρτη των μεταγραφομικών αλλαγών έγινε με βάση την τιμή συσσώρευσής του στο συγκεκριμένο όργανο του φυτού και σε όλες τις πειραματικές συνθήκες. Οι διαφορετικού χρωματισμού κουκκίδες αντικατοπτρίζουν τους διαφορετικούς μεταβολίτες στη μεταφορά των οποίων μπορεί να εμπλέκονται οι αντίστοιχοι μεταφορείς μονοσακχαριτών.

Από τα αποτελέσματα της μεταβολομικής φάνηκε μια αύξηση της αφομοίωσης της ξυλόζης τόσο στις ρίζες όσο και στα φυμάτια μετά από παραμονή στο παρατεταμένο σκοτάδι, ενώ η γλυκόζη και η αραβινόζη μειώθηκαν στα φυμάτια

μετά από την καταπόνηση. Επιπροσθέτως τα *MtSTP10_1*, *MtSTP10_2*, *MtSTP10_3*, τα οποία έχουν υψηλή συγγένεια με τον εξειδικευμένο για D-γλυκόζη *AtSTP9* (Schneidereit et al. 2003), όπως και τα *MtSTP7_1*, *MtSTP7_5*, *MtSTP7_6*, με υψηλή συγγένεια για τον εξειδικευμένο για D-ξυλόζη και L-αραβινόζη *AtSTP7* (Rottmann et al. 2018) παρουσίασαν αυξημένα σχετικά επίπεδα έκφρασης στα φυμάτια μετά από 72 h παραμονής στο σκοτάδι, μετά από μία μείωση στις 24 h (εικόνα 3.11). Αυτό ίσως υποδεικνύει ότι αυτά τα MST-γονίδια παίζουν πιθανά κάποιο αντίστοιχο ρόλο με αυτά των συγγενών *AtMSTs* στη μεταφορά των αντίστοιχων σακχάρων στο *M. truncatula*. Το *MtSTP7_4* που έχει κι αυτό υψηλή συγγένεια με τον εξειδικευμένο για ξυλόζη *AtSTP7* και εμπλέκεται στην επανακινητοποίηση των σακχάρων του κυτταρικού τοιχώματος από τη δράση των γλυκοσυλ-υδρολασών και την επακόλουθη μεταφορά τους εντός του κυττάρου για περαιτέρω μεταβολισμό (Lee et al., 2007; Poschet et al., 2010).

Οι *AtSTPs*, όπως έχει φανεί από τα *AtSTP1*, *AtSTP2*, *AtSTP4*, *AtSTP6*, *AtSTP8*, *AtSTP10*, *AtSTP11*, *AtSTP12* και *AtSTP13* μεταφέρουν διάφορες εξόζες και πεντόζες (Sauer et al. 1990, Boorer et al. 1994; Truernit et al. 1996; Scholz-Starke et al. 2003, Schneidereit et al. 2005, Rottmann et al. 2016, Rottmann et al. 2018). Πιθανόν λοιπόν και οι *MtSTPs* να συνεισφέρουν στη μεταφορά διαφόρων εξοζών και πεντοζών.

Από τα δεδομένα, βρέθηκε ότι η σακχαρόζη και η γλυκόζη στο *M. truncatula*, όπως και στα φυμάτια του *L. japonicus* (Tsikou et al. 2013) παρουσίασαν αξιόλογη μείωση των συγκεντρώσεών τους στο παρατεταμένο σκοτάδι. Η σακχαρόζη ίσως εξάγεται στον αποπλάστη, διασπάται σε μονοσακχαρίτες και επανεισάγεται μέσω των STPs, συνεισφέροντας έτσι σε μια γρήγορη μείωση της συγκέντρωσης της σακχαρόζης στην περιοχή μετάδοσης. Η χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης στον αποπλάστη της περιοχής μετάδοσης θα μπορούσε να είναι ένδειξη έλλειψης, όπως είναι το παρατεταμένο σκοτάδι στο πείραμά μας και θα μπορούσε να οδηγήσει τους STPs να περισυλλέξουν όσο περισσότερο μπορούν. Αυτό θα αύξανε τη βαθμίδα συγκέντρωσης μεταξύ ιστών πηγών και ιστών καταβοθρών, προωθώντας έτσι την μεγάλης απόστασης μεταφορά της σακχαρόζης από τα φύλλα στην περιοχή μετάδοσης. Ο συνδυασμός αυτός συμπλαστικής και αποπλαστικής μεταφοράς σακχάρων θα μπορούσε να προσφέρει θρεπτικά συστατικά σε γρήγορα αναπτυσσόμενους ιστούς. (Rottmann et al. 2016). Αυτή η λειτουργία επανάκτησης των STPs εντοπίστηκε, από τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, στα φυμάτια

του *M. truncatula* όπου η πλειοψηφία των *MtSTPs* σχεδόν αποκατέστησαν τα επίπεδα έκφρασής τους έπειτα από 72 h υπό συνεχόμενο σκοτάδι (εικόνα 3.11). Αντίθετα, η λυξόζη στο *Lotus* μειώθηκε στο παρατεταμένο σκοτάδι, ενώ στο *M. truncatula* τα αποτελέσματα έδειξαν μια μικρή αύξηση πριν μειωθεί έπειτα από 72h παρατεταμένου σκοταδιού.

Οι TMTs εντοπίζονται στη μεμβράνη του χυμοτοπίου και δρουν ως μεταφορείς αισθητήρες (sensors). Επομένως οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις τους στα φύλλα κατά τη διάρκεια παραμονής στο σκοτάδι είναι επακόλουθο των συνθηκών έλλειψης σακχάρων. Σύμφωνα με τη μεταγραφομική μας μελέτη οι *MtTMTs* γενικά βρέθηκαν στις Ομάδες 1 και 3 και παρουσίασαν μια γενικότερη μειωμένη έκφραση τουλάχιστον 24 h από την έναρξη της καταπόνησης στο σκοτάδι, κάτι που είναι αντίθετο με τα επίπεδα έκφρασης των *AtTMT1* και *AtTMT2* τα οποία επάγονται στο σκοτάδι (Neuhaus 2007). Το *MtTMT3_1* (Ομάδα1) ήταν το μόνο γονίδιο από την TMT-υποοικογένεια το οποίο βρέθηκε να ρυθμίζεται από την καταπόνηση, ενώ για όλα τα υπόλοιπα *MtTMTs* κυριαρχεί η οργανο-ειδική ρύθμιση. Οι *MtTMTs* παρουσίασαν όπως και οι *AtTMTs* σημαντικές αλλαγές όταν υπόκεινται σε αβιοτική καταπόνηση, επομένως φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στις οσμωτικές αντιδράσεις καταπόνησης (Neuhaus 2007), όπως επίσης ίσως να χρησιμοποιούνται και για επανάκτηση των σακχάρων κατά τη μετακίνηση αυτών, όπως έχει παρατηρηθεί για τους *OsTMTs* (Cho et al. 2010). Επιπλέον, οι *MtTMTs* πιθανόν να είναι αντιμεταφορείς πρωτονίων, όπως οι *AtTMT1* και *AtTMT2*, οι οποίοι έχουν την ικανότητα να διοχετεύουν γλυκόζη και σακχαρόζη στο χυμοτόπιο (Schulz et al. 2011).

Οι PMTs, οι οποίοι εντοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη δε μεταφέρουν μόνο πολυόλες αλλά και διάφορους άλλους μονοσακχαρίτες. Τα *AtPMT1*, *AtPMT2* και *AtPMT5* έχει αναφερθεί ότι παίζουν ρόλο στον εφοδιασμό των κυττάρων με φρουκτόζη, ως αποτέλεσμα της δράσης της ιμπερτάσης (Klepek et al 2005, Klepek et al. 2010) κι επομένως τα *MtPMT5_1*, *MtPMT5_2* και *MtPMT5_3*, που είναι τα τρία MST-γονίδια με την υψηλότερη συγγένεια σε αυτά, ίσως έχουν αυτήν την ικανότητα. Το *LjPLT4* επίσης έχει αναφερθεί ως συμμεταφορέας ξυλιτόλης της πλασματικής μεμβράνης στο *Lotus japonicus* (Kalliamprakou et al., 2011). Υπό τις πειραματικές μας συνθήκες η αφομοίωση της φρουκτόζης στις ρίζες αυξήθηκε έπειτα από 24 h στο σκοτάδι και μειώθηκε μετά από 72h σκότους, ενώ μειώθηκε βαθμιαία στο σκοτάδι τόσο στους βλαστούς όσο και στα ακροβλαστίδια. Το *MtPMT5_1* έδειξε χαμηλότερα

επίπεδα έκφρασης στους ιστούς καταβόθρες μετά από 24 h στο σκοτάδι, τα οποία αποκαταστάθηκαν μετά από 72 h στο σκοτάδι. Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του *MtPMT5_3* αυξήθηκαν μετά από 24 h στο σκοτάδι και μειώθηκαν μετά από 72h σκότους στους βλαστούς και στα ακροβλαστίδια (**εικόνα 3.11**), υποδεικνύοντας σύνθετους και συμπληρωματικούς μηχανισμούς ρύθμισης, οι οποίοι πιθανώς να καταννοηθούν καλύτερα μετά από βιοχημικό χαρακτηρισμό. Επιπλέον, ίσως να παίζουν ρόλο στην επανακινητοποίηση των χαμένων μορίων από διάφορα κύτταρα από παθητική διάχυση (Klerpek et al. 2010), αφού τα περισσότερα αποκατέστησαν σχεδόν τα επίπεδα έκφρασής τους στα φυμάτια.

Οι φυτικοί INTs εντοπίζονται τόσο στην πλασματική μεμβράνη όσο και στις μεμβράνες του χυμοτοπίου και εμπλέκονται στη μεταφορά της μυο-ινοσιτόλης (Schneider et al., 2008). Η μυο-ινοσιτόλη ήταν η μόνη πολυόλη που παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές σε όλα τα εξεταζόμενα όργανα του φυτού της μελέτης μας. Στα όργανα καταβόθρες, αύξησε τις συγκεντρώσεις της μετά από 24 h στο σκοτάδι, αλλά μειώθηκε δραματικά έπειτα από 72 h παραμονής στο σκοτάδι, ενώ στα υπέργεια όργανα μειώθηκε σταδιακά στο σκοτάδι (**εικόνα 3.11**). Όσον αφορά τα *MtINTs*, μόνο το *MtINT4_1* βρέθηκε να ρυθμίζεται από την καταπόνηση. Τα *MtINT4_1* και *MtINT1_2* των οποίων η έκφραση μειώθηκε στα φυμάτια μετά από την παραμονή στο σκοτάδι, έχουν υψηλή συγγένεια με το *AtINT1* και το οποίο έχει αναφερθεί ως εξαγωγέας από το χυμοτόπιο που εμπλέκεται στο γενικό μεταβολισμό της μυο-ινοσιτόλης (Schneider et al. 2006, Schneider et al. 2007), φαίνεται να έχουν την ίδια λειτουργία. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με άλλες μελέτες που επισημαίνουν τη σημασία της μεταφοράς της μυο-ινοσιτόλης και του μεταβολισμού υπό συνθήκες έλλειψης άνθρακα (Czedik-Eysenberg et al., 2016, Durgud et al., 2018).

Το *MtESL6_3*, το οποίο παρουσίασε αύξηση της έκφρασής του ανεξάρτητα από το φυτικό όργανο υπό συνθήκες έλλειψης άνθρακα στα πειράματά μας, παρουσίασε ίδια αντίδραση και στην ξηρασία και στην αλατότητα, όπως εντοπίστηκε από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων από τη βάση MtGEA (**εικόνα 3.18**). Επίσης όπως φαίνεται από τη φυλογενετική ανάλυση έχει υψηλή συγγένεια με το *AtERD6* (**εικόνα 3.1**) το οποίο επίσης επάγεται στο παρατεταμένο σκοτάδι (Poschet et al. 2011) και με το *AtESL1*, το οποίο επίσης επάγεται σε αβιοτική καταπόνηση, όπως το κρύο και η ξηρασία (Yamada et al. 2010). Τα δύο αυτά γονίδια εντοπίζονται στον τονοπλάστη και μεσολαβούν στη μεταφορά γλυκόζης από το χυμοτόπιο,

ρυθμίζοντας έτσι την κυτταρική ομοιόσταση ως αντίδραση σε διάφορα ερεθίσματα (Poschet et al. 2011). Τα *MtESL7* και *MtESL5_1* είναι επίσης δύο MST-γονίδια τα οποία φαίνεται να ρυθμίζονται από την καταπόνηση. Το προφίλ έκφρασης των ESLs σε αρκετά είδη φυτών υποδεικνύει ότι διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην επανακινητοποίηση των αποθηκευμένων σακχάρων σε διάφορα περιβαλλοντικά ερεθίσματα (Kiyosue et al. 1998, Yamada et al. 2010, Poschet et al. 2011). Στη συγκεκριμένη μελέτη αυτό εντοπίστηκε για τα *MtESL6_4* και *MtESL16_1* στα φυμάτια. Επιπλέον, τα *MtESLs* ίσως παίζουν ρόλο, όπως τα *AtESL1* και *AtERD6* στην εξαγωγή γλυκόζης (Yamada et al. 2010, Poschet et al. 2011) και σε συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης, πιθανόν σε συνδυασμό με την ιμβερτάση του χυμοτοπίου, να λειτουργούν με τέτοιο τρόπο ώστε να ρυθμίζουν την οσμωτική πίεση επηρεάζοντας τη συσσώρευση των σακχάρων στα φυτικά κύτταρα (Yamada et al. 2010).

Το *MtVGT2_1*, το οποίο εντοπίζεται στη μεμβράνη του χυμοτοπίου (Aluri and Büttner 2007), βρέθηκε να επάγεται στα φύλλα και η έκφρασή του ρυθμίζεται από αυτά (οργανο-ειδική). Τα σχετικά επίπεδα έκφρασής τους αυξήθηκαν σταδιακά στις ρίζες, στα ακροβλαστίδια και στα φύλλα μετά από την παραμονή τους στο σκοτάδι, ενώ στους βλαστούς αυξήθηκαν κυρίως έπειτα από 24 h στο σκοτάδι (εικόνα 3.11). Επιπλέον, το *MtVGT2_1*, ίσως εμπλέκεται όπως το κοντινό του ομόλογο *AtVGT1* στην ενεργή μεταφορά της γλυκόζης και της φρουκτόζης, όπως φάνηκε από τα δεδομένα της μεταβολομικής ανάλυσης και τα οποία έδειξαν μειωμένα επίπεδα των δύο αυτών σακχάρων στους βλαστούς και στα ακροβλαστίδια έπειτα από παραμονή σε παρατεταμένο σκοτάδι.

Η μεταγραφομική μας ανάλυση εμφάνισε μια πολύπλοκη μεταγραφομική συσσώρευση των *MtpGlcTs* υπό συνθήκες παρατεταμένου σκοταδιού. Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του *MtpGlcT1* αυξήθηκαν στις ρίζες από την έναρξη του παρατεταμένου σκοταδιού και στα φυμάτια μετά από 72 h παραμονής στο σκοτάδι, αλλά μειώθηκε στα φύλλα (εικόνα 3.11). Όπως λοιπόν είναι γνωστή η λειτουργία των *pGlcTs* στην εξαγωγή γλυκόζης, το κύριο προϊόν της αμυλολυτικής διάσπασης του μεταφερόμενου αμύλου (Weber et al. 2000), τα αποτελέσματά μας προτείνουν ότι το *MtpGlcT1* ίσως συνδέεται με τον επαναπρογραμματισμό του παραγόμενου αμύλου και την κατανομή και το διαχωρισμό της γλυκόζης υπό συνθήκες περιορισμού προϊόντων φωτοσύνθεσης και την επακόλουθη αποδόμηση του αμύλου στα φυμάτια. Σε συμφωνία με τον παραπάνω ρόλο των *pGlcTs*, παρουσιάστηκε πρόσφατα ότι η προερχόμενη από την αποδόμηση του αμύλου στους χλωροπλάστες γλυκόζη πιθανώς

να εξάγεται στο κυτταρόπλασμα από τους pGlcTs, προκαλώντας δυναμικές αλλαγές στην ενδοκυτταρική ροή των σακχάρων υπό χαμηλές συνθήκες θερμοκρασίας (Yamada et al., 2017).

5.4. Οι MSTs παίζουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της κατανομής και του διαχωρισμού του C στα αζωτοδευσμετικά φυμάτια

Αυξανόμενο ενδιαφέρον παρουσιάζεται για τις βιοχημικές και φυσιολογικές λειτουργίες των *MSTs* του *M. truncatula* που προκύπτει από σημαντικά παράγωγα της διαδικασίας της φωτοσύνθεσης για να καλυφθούν οι ανάγκες σε άνθρακα και ενέργεια για αποτελεσματική συμβιωτική αζωτοδέσμευση. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι για κάποια *MtMST* ομόλογα, συμπεριλαμβανομένων των *MtSTP13*, *MtSTP13_1* και *MtSTP13_2*, *MtSTP5_1*, *MtSTP5_2* και *MtSTP5_3* και *MtINT4_1*, *MtINT4_2* που κατατάσσονται στην ίδια ομάδα των χρωμοσωμάτων 1, 3 και 2 (εικόνα 3.2) αντίστοιχα και επάγονται ισχυρά στα φυμάτια, ίσως είναι μια ένδειξη ότι μοιράζονται στοιχεία μεταγραφομικής ρύθμισης (enhancers). Παρ' όλα αυτά αντιδρούν διαφορετικά στο παρατεταμένο σκοτάδι ακόμα και στο ίδιο όργανο, δείχνοντας έτσι ότι έχουν έναν πιο περίπλοκο μηχανισμό μεταγραφομικής ρύθμισης.

Τα μεταβολομικά μας αποτελέσματα έδειξαν ότι τόσο η σακχαρόζη όσο και η γλυκόζη, μειώθηκαν σημαντικά έπειτα συνθήκες παρατεταμένου σκότους στα φυμάτια (εικόνα 3.13), κάτι που έχει διαπιστωθεί παλαιότερα και για το φυτό μοντέλο *L. japonicus* (Tsikou et al., 2013). Σύμφωνα με την εργασία των Tsikou et al., 2013 η έλλειψη του φωτοσυνθετικού άνθρακα που προήλθε από την παραμονή στο παρατεταμένο σκοτάδι επηρέασε πολλές μεταβολικές διαδικασίες τόσο της έκφρασης γονιδίων όσο και του μεταβολομικού περιεχομένου, καθιστώντας το φυμάτιο ως όργανο-πηγή C και N υπό αυτές τις συνθήκες. Παρ' όλα αυτά μια λεπτομερής μελέτη των αντίστοιχων μελών της *MST*-οικογένειας έλειπε από αυτήν τη μελέτη.

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι τα σχετικά επίπεδα έκφρασης αρκετών *MSTs* (*MtSTPs*, *MtPMTs*, *MtINTs* και *MtTMTs*) αυξήθηκαν μετά από 72h σε παρατεταμένο σκοτάδι, μετά από μια αρχική μείωση που παρατηρήθηκε μετά από 24 h σκότους, πιθανώς να δείχνουν ότι λειτουργούν ως μέρος του προτεινόμενου μηχανισμού επανακινητοποίησης του άνθρακα στα φυμάτια. Τα πιο άφθονα *MSTs* στα φυμάτια στο τέλος της περιόδου φωτός (εξαιρώντας τα *MtSTP13* και *MtPMT6_1*)

παρουσίασαν επίσης αύξηση των μεταγραφημάτων τους μετά από 72 h στο σκοτάδι πριν από μια αρχική μείωση μετά από 24 h σκοταδιού, ενώ τα ίδια γονίδια σε μη συμβιωτικά όργανα παρουσίασαν διαφορετικά μεταγραφομικά προφίλ (εικόνα 3.11). Η αρχική μείωση των MSTs στα φυμάτια μετά από 24 h στο σκοτάδι σχετίζεται με τη γρήγορη απώλεια της δραστικότητας της νιτρογενάσης που συμβάνει νωρίς στα προϊόντα της φωτοσύνθεσης υπό συνθήκες καταπόνησης (Tsikou et al., 2013), υπογραμμίζοντας τον καθοριστικό ρόλο της μεταφοράς του C, ώστε να επιτευχθεί αποτελεσματική συμβιωτική αζωτοδέσμευση. Επιπλέον, όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, η χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης στον αποπλάστη της μεταδιδόμενης περιοχής θα μπορούσε να λειτουργήσει ως ένδειξη έλλειψης και να οδηγήσει τους STPs να περισυλλέξουν όσο περισσότερους μονοσακχαρίτες μπορούν από τον αποπλάστη. Αυτό θα αύξανε τη βαθμίδα συγκέντρωσης μεταξύ των οργάνων πηγών και οργάνων-καταβόθρων και έτσι θα προωθείτο η μεταφορά της σακχαρόζης σε μεγάλη απόσταση (Rottmann et al., 2016). Συνεπώς η αυξημένη έκφραση συγκεκριμένων μελών της οικογένειας των MSTs πιθανώς να είναι μια προσπάθεια των φυματίων να χρησιμοποιήσουν ακόμα και τις μικρότερες διαθέσιμες ποσότητες σακχάρων υπό αυτές τις συνθήκες.

Επιπλέον όλα σχεδόν τα αμινοξέα που εντοπίστηκαν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση των συγκεντρώσεών τους στα φυμάτια υπό συνθήκες έλλειψης άνθρακα, ειδικά μετά από 72 h συνεχούς σκοταδιού (εικόνα 3.16). Στο *L. japonicus* αυτό ήταν σαν αποτέλεσμα της *in situ* αποδόμησης των πρωτεϊνών (Tsikou et al., 2013). Γενικότερα λειτουργούν ως εναλλακτική πηγή άνθρακα σε όλα σχεδόν τα φυτά υπό συνθήκες καταπόνησης (Taylor et al. 2004, Sanchez et al. 2008). Πιο συγκεκριμένα, η ασπαραγίνη στο *M. truncatula* παρουσίασε υψηλή συσσώρευση έπειτα από παραμονή των φυτών στο σκοτάδι σε όλα σχεδόν τα εξεταζόμενα φυτικά όργανα, κάτι που είναι σε συμφωνία με το γεγονός ότι στο καλαμπόκι, το σιτάρι και το *Lotus*, τα γονίδια που συμμετέχουν στη σύνθεση της ασπαραγίνης αυξάνουν την έκφρασή τους υπό συνθήκες καταπόνησης αλατότητας και έλλειψης άνθρακα (Brousquisse et al. 1998, Wang et al. 2005, Tsikou et al. 2013). Τέλος, η πινιτόλη ένας πλούσιος σε άνθρακα μεταβολίτης του *M. truncatula*, όπως και στο *L. japonicus* βρέθηκε σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα φυμάτια. Παρόλ' αυτά σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων η πινιτόλη αύξησε τις συγκεντρώσεις της σε συνθήκες παρατεταμένου σκότους, κυρίως μετά από 24h συνεχούς σκότους (εικόνα 3.15), ενώ στο *L. japonicus* μείωσε τις συγκεντρώσεις της στην αντίστοιχη

καταπόνηση. Επομένως η πινιτόλη στη μηδική, ίσως παίζει σημαντικό ρόλο στον ανθρακικό και ενεργειακό μεταβολισμό. Οι Schneider et al. 2006 ανέφεραν ότι το *AtINT4* μεταφέρει σε χαμηλές τιμές πινιτόλη, οπότε ο υψηλής συγγένειας με αυτόν *MtINT4_1* (Ομάδα 1) ο οποίος ρυθμίζεται από την καταπόνηση ίσως συνδέεται με τη μεταφορά αυτής.

Η σταδιακή μείωση του γαλακτονικού οξέος στα φυμάτια του *M. truncatula*, στα οποία είχε και υψηλές συγκεντρώσεις, του 4-υδρόξυ, του *cis*-κινναμωμικού οξέος στα φυμάτια, του σικιμικού οξέος στο βλαστό, τα ακροβλαστίδια και τα φύλλα, του αμινο-βουτανοϊκού οξέος στα ακροβλαστίδια και του μηλικού οξέος στα φύλλα είναι σε συμφωνία με τα ευρήματα των Sanchez et al. 2008. Πιθανή ερμηνεία της μείωσης των οργανικών οξέων είναι η ισορροπία των ανομοιόμορφων ιοντικών φορτίων που μπαίνουν στο φυτό.

Συνοψίζοντας, το παρατεταμένο σκοτάδι χρησιμοποιήθηκε ως εργαλείο για τη μελέτη των μεταγραφομικών και μεταβολομικών προφίλ των *MtMSTs* στα εξεταζόμενα όργανα υπό συνθήκες έλλειψης άνθρακα. Παραδόξως, μεγάλες διαφορές εντοπίστηκαν μεταξύ όλων των εξεταζόμενων οργάνων ακόμα και σε όργανα με ίδια χαρακτηριστικά, όπως τα φυμάτια και οι ρίζες (μη-φωτοσυνθετικά όργανα) και οι βλαστοί, τα ακροβλαστίδια και τα φύλλα (φωτοσυνθετικά όργανα). Στα φυμάτια εντοπίστηκε μεγαλύτερη αποκατάσταση της έκφρασης των MST-γονιδίων υπό συνθήκες παρατεταμένου σκότους. Αυτό πιθανώς οφείλεται στην επανακινητοποίηση των αποθηκευμένων σακχάρων στα φωτοσυνθετικά όργανα και/ή ως μια προσπάθεια των φυματίων να εντοπίσουν ακόμα και μικρές διαθέσιμες ποσότητες σακχάρων, ώστε να επιβιώσουν. Από τα αποτελέσματα τέλος φάνηκε ότι η οργανο-ειδική ρύθμιση του φυτού μοντέλου *M. truncatula* κυριαρχεί αυτής από την καταπόνηση. Παρόλ' αυτά σε αρκετά γονίδια, δηλαδή τα *MtSTP1_1*, *MtSTP3_2*, *MtSTP7_1*, *MtSTP7_4*, *MtSTP10_1*, *MtSTP10_2*, *MtSTP13_1*, *MtESL6_3*, *MtESL7*, *MtINT4_1*, *MtPMT5_1* και *MtTMT3_1* φάνηκε ότι η ρύθμιση από την καταπόνηση κυριαρχεί της οργανοειδικής ρύθμισης.

5.5. Ο πιθανός φυσιολογικός ρόλος του μεταφορέα *MtPMT3_1* κατά τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση

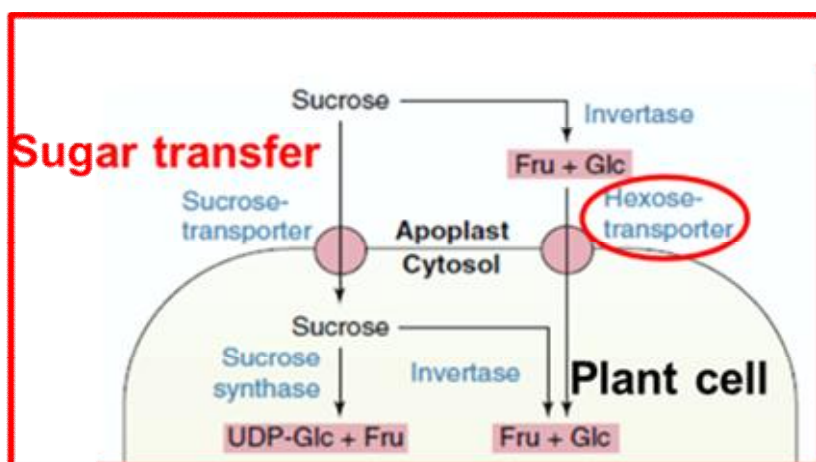
Σε φαινοτυπικό επίπεδο παρατηρήθηκε ότι τα φυτά που ήταν ομοζυγωτά για την ένθεση των μεταλλαγμένων *NF4652_insertion_8* και *NF4778_insertion_7* για το γονίδιο *MtPMT3_1*, είχαν μικρότερη ανάπτυξη παρουσιάζοντας μικρότερο υπέργειο

και υπόγειο μέρος (**εικόνες 4.14 και 4.15**), κάτι που υποδηλώνει την άμεση σύνδεση του μεταφορέα με την αφομοίωση θρεπτικών συστατικών, αλλά και την εμπλοκή στην λειτουργία των φυματίων, αφού τα φυμάτιά τους ήταν πιο επιμήκη και η παρουσία των ψυχανθο-αιμοσφαιρινών ήταν εντοπισμένη στην κορυφή του φυματίου. Στα παραπάνω συμπεράσματα οδήγησαν και τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασής τους (**εικόνα 4.20**), όπως και η χαμηλότερη δράση της νιτρογενάσης (**εικόνα 4.18**). Επίσης, φάνηκε μια γενικότερη αύξηση συσσώρευσης των μεταβολιτών τόσο των σακχάρων (**εικόνα 4.23 και 4.24**) όσο και των πολυολών (**εικόνα 4.25**), αλλά και σχεδόν όλων των κατηγοριών των μεταβολιτών που ανιχνεύθηκαν στα φυμάτια των μετασηματισμένων φυτών, των μεταλλαγμένων σειρών NF4652_insertion_8 και NF4778_insertion_7 για το γονίδιο *MtPMT3_1*, γεγονός που πιθανά μπορεί να αποδοθεί στα μειωμένα επίπεδα αζωτοδέσμευσης και μεταβολικής λειτουργίας των φυματίων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του βιοχημικού προσδιορισμού που πραγματοποιήθηκε από τη συνεργαζόμενη ομάδα του Καθηγητή κ. Ευστάθιου Φριλίγγου στο εργαστήριο Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, οι μεταφορείς *MtSTP13* και *MtPMT3_1* που βρίσκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη έχουν την ικανότητα να μεταφέρουν γλυκόζη, φρουκτόζη και σακχαρόζη και πιθανώς έχουν καθοριστικό ρόλο στη λειτουργία του φυματίου και στην αζωτοδέσμευση (Botou, Komaitis, Flemetakis, and Frillingos, unpublished results). Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με τους αντίστοιχους μεταφορείς των δύο αυτών υποοικογενειών στο *Arabidopsis*, οι οποίοι παρουσιάζουν ευρεία εξειδίκευση και για εξόζες (Klepek et al. 2005, Klepek et al. 2010, Rottman et al. 2018).

Η σακχαρόζη που παράγεται από τη φωτοσύνθεση φτάνει μέσω του φλοιώματος στον αποπλάστη των φυτικών κυττάρων και εκεί είτε εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα με ειδικούς μεταφορείς είτε υδρολύεται σε φρουκτόζη και γλυκόζη (**εικόνα 5.2**). Τα σάκχαρα αυτά (μονοσακχαρίτες) μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα του φυτικού κυττάρου με τη βοήθεια μεταφορέων μονοσακχαριτών (Pego and Smeekens 2000). Σε αυτούς τους μεταφορείς μονοσακχαριτών ανήκουν και τα προϊόντα των γονιδίων *MtSTP13* και *MtPMT3_1* που βρέθηκαν να εκφράζονται ισχυρά και σχεδόν αποκλειστικά στο φυμάτιο του *M. truncatula*. Οι μεταφορείς που κωδικοποιούνται από τα παραπάνω γονίδια καταλύουν αντιδράσεις μεταφοράς που

είναι απαραίτητες για την εισαγωγή της σακχαρόζης, καθώς και της φρουκτόζης και της γλυκόζης που προέρχονται από αυτήν, στο μονοπάτι της γλυκόλυσης.



Εικόνα 5.2: Μεταφορά σακχάρων από τον αποπλάστη, στο κυτταρόπλασμα του φυτικού κυττάρου.

5.6. Γενικά Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματά μας προτείνουν ότι συγκεκριμένα MST ομόλογα παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποτελεσματική κατανομή και χρήση των σακχάρων και πιθανώς στους μηχανισμούς επανακινητοποίησης του C στα φυμάτια υπό συνθήκες περιορισμού των προϊόντων φωτοσύνθεσης. Αυτοί οι μηχανισμοί φαίνεται να εισάγουν συστημικές αλλαγές, οι οποίες προκαλούνται από το παρατεταμένο σκοτάδι και τον περιορισμό των προϊόντων φωτοσύνθεσης, αφού τα φυμάτια αναγκάζονται να αποκτήσουν ένα νέο ρόλο ως πηγή C και N. Η μελλοντική έρευνα πρέπει να εστιάσει στην εξειδίκευση των υποστρωμάτων και τον κινητικό χαρακτηρισμό συγκεκριμένων MtMSTs, την εξακρίβωση του βιοχημικού και φυσιολογικού τους ρόλου στην κατανομή και το διαχωρισμό του C κατά τα διάφορα στάδια δημιουργίας και λειτουργίας της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης, χρησιμοποιώντας τόσο κλασσική όσο και αντίστροφη γενετική. Επιπλέον μελέτες σχετικές με τη ρύθμιση των γονιδίων που εμπλέκονται στη σύνθεση και την αποδόμηση των μεταβολιτών του άνθρακα θα βοηθήσουν στη διευκρίνιση της σημασίας της μεταφοράς έναντι της de-novo σύνθεσης και της αποδόμησης για τα επίπεδα των μεταβολιτών υπό συνθήκες έλλειψης C.

Στη διδακτορική λοιπόν αυτή διατριβή, έγινε ανάλυση του φυσιολογικού ρόλου των *MtST13* και *MtPMT3_1*. Φάνηκε ότι και οι δύο αυτοί μεταφορείς μονοσακχαριτών είναι εξειδικευμένοι στα φυμάτια και βρίσκονται στην

κυτταροπλασματική μεμβράνη. Επίσης φαίνεται να εμπλέκονται στη μεταφορά της σακχαρόζης, της γλυκόζης και της φρουκτόζης. Τέλος για τον *MtPMT3_1* μετά από ανάλυση με αγρίου τύπου φυτών και μεταλλαγμένων του σειρών διαπιστώθηκε ότι στα φυτά των μεταλλαγμένων σειρών παρατηρήθηκε μικρότερη ανάπτυξη υπέργειου και υπόγειου μέρους και τα φυμάτια τους ήταν πιο επιμήκη με παρουσία ψυχανθοαιμοσφαιρινών μόνο στην κορυφή του φυματίου. Επίσης παρουσίασαν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης, καθώς και χαμηλότερη δραστικότητα της νιτρογενάσης. Η μεταβολομική ανάλυση που διεξήχθη σε φυτά αγριού τύπου και φυτά μεταλλαγμένων φυτών έδειξε αύξηση της συσσώρευσης των μεταβολιτών σακχάρων και πολυολών στα φυμάτια των μετασηματισμένων φυτών, κάτι που φαίνεται να οφείλεται στα μειωμένα επίπεδα αζωτοδέσμευσης και μεταβολικής λειτουργίας των φυματίων.

Παράρτημα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6



6. Παράρτημα

Πίνακας Π1: Σύσταση B&D (Broughton & Dilworth) low nitrogen:

Μητρικά Διαλύματα	Συγκεντρώσεις Μητρικών		C _{τελ}	V για 1 lt
CaCl ₂ 2H ₂ O (147.014)	0.1 M	2.94 gr at 200ml	1 mM	10 ml
KH ₂ PO ₄ (136.086)	1 M	6.8 gr at 50ml	0.5 mM	500 µl
MgSO ₄ 7H ₂ O (246.469)	1 M	24.65 gr at 100ml	0.25 mM	250 µl
K ₂ SO ₄ (174.177)	0.1 M	1.74 gr at 100ml	0.25 mM	2.5 ml
Ferric citrate (244.94)	10 mM	0.123 gr at 50 ml	10 µM	1 ml
Μικροστοιχεία				
H ₃ BO ₃ (61.83)	2 mM	61.83 mgr at 500ml	2 µM	1 ml
MnSO ₄ H ₂ O (169.02)	1mM	84.51 mgr at 500ml	1 µM	
ZnSO ₄ 7H ₂ O (287.54)	0.5 mM	71.89 mgr at 500ml	0.5 µM	
CuSO ₄ 5H ₂ O (249.70)	0.2 mM	24.97 mgr at 500ml	0.2 µM	
CoSO ₄ 7H ₂ O (281.103)	0.1 mM	14.06 mgr at 500ml	0.1 µM	
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O (241.95)	0.1 mM	12.1 mgr at 500ml	0.1 µM	
Χαμηλό Άζωτο				
KNO ₃ (101.103)	1 M	10.11 gr at 100 ml	0.5 mM	500 µl

Σύσταση διαλυμάτων:

- Fixation buffer 10x (pH 7): Ανά 100 ml:30.5 ml Na₂HPO₄ 0.2M, 19.5 ml NaH₂PO₄ 0.2M, 5.844 gr NaCl, ddH₂O (RNase-free)
- Διάλυμα μονιμοποίησης: 4% παραφορμαλδεΰδη, 0.25% γλουταραλδεΰδη σε 1x Fixation buffer
- Protease K buffer: 100 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 7.5
- TBS 10x (pH 7.5) πυκνό: 0.5 M Tris-HCl (pH 7.5), 1.5 M NaCl, pH 7.5 (with HCl)
- TE 10x: 100mM Tris-HCl, 10mM EDTA pH 7.5
- Denhardt's 50x: 1% Ficoll, 1% πολυβινυλοπυρρολιδόνη (PVP), 1% BSA RNase-free
- SSC 20x: 3M NaCl, 0.3M κιτρικό νάτριο (Na₃C₆H₅O₇), PH 7.0 (ρύθμιση με HCl)

- Buffer προ-υβριδισμού: 50% απιονισμένο φορμαμίδιο, 300mM NaCl, 10mM Tris/HCl pH 7.5, 1x Denhardt's, 2.25 µg/ml tRNA
- RNase buffer: 10 mM Tris/HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 500 mM NaCl

YMB (Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης *S. meliloti*): Για την παρασκευή 1 L θρεπτικού διαλύματος YMB:

- Σε 1 L απιονισμένου νερού προστίθενται 10gr μαννιτόλη, 0.5gr K₂HPO₄, 0.2gr MgSO₄·7H₂O, 0.1grNaCl και 0.5gr Yeast extract.
- Ακολουθεί αποστείρωση.

MtSTP5_1	-----	0
MtSTP7_5	MESLHKFKFCVMAICLVFQSGYGFYLPGSYPHNYAIGDELSVKVNSITSIDTEMPFSYYS	60
MtSTP7_4	-----	0
MtSTP7_3	-----	0
MtSTP7_1	-----	0
MtSTP14_2	-----	0
MtSTP14_1	-----	0
MtSTP14_3	-----	0
MtSTP13_1	-----	0
MtSTP13_2	-----	0
MtSTP13	-----	0
MtSTP13_3	-----	0
MtSTP3_1	-----	0
MtSTP3_2	-----	0
MtSTP10_2	-----	0
MtSTP10_3	-----	0
MtSTP1_5	-----	0
MtSTP1_7	-----	0
Mtst1	-----	0
MtSTP1_3	-----	0
MtSTP1_4	-----	0
MtSTP1_2	-----	0
MtSTP1_1	-----	0
MtSTP5_1	-----	0
MtSTP7_5	LPFCKPQGGVKDSAENLGEELMGDRIENSYPYRFKMFNESEVFLCQVDKLSDDQFKILKK	120
MtSTP7_4	-----	0
MtSTP7_3	-----	0
MtSTP7_1	-----	0
MtSTP14_2	-----	0
MtSTP14_1	-----	0
MtSTP14_3	-----	0
MtSTP13_1	-----	0
MtSTP13_2	-----	0
MtSTP13	-----	0
MtSTP13_3	-----	0
MtSTP3_1	-----	0
MtSTP3_2	-----	0
MtSTP10_2	-----	0
MtSTP10_3	-----	0
MtSTP1_5	-----	0
MtSTP1_7	-----	0
Mtst1	-----	0
MtSTP1_3	-----	0
MtSTP1_4	-----	0
MtSTP1_2	-----	0
MtSTP1_1	-----	0
MtSTP5_1	-----	0
MtSTP7_5	RIDEMYQVNLILDNLPAIRFTKKDEYFLRWGTGYPVGIKIQDVYYLFNHHLRFNVLVHKYEE	180
MtSTP7_4	-----	0
MtSTP7_3	-----	0

MtSTP7_1 ----- 0
 MtSTP14_2 ----- 0
 MtSTP14_1 ----- 0
 MtSTP14_3 ----- 0
 MtSTP13_1 ----- 0
 MtSTP13_2 ----- 0
 MtSTP13 ----- 0
 MtSTP13_3 ----- 0
 MtSTP3_1 ----- 0
 MtSTP3_2 ----- 0
 MtSTP10_2 ----- 0
 MtSTP10_3 ----- 0
 MtSTP1_5 ----- 0
 MtSTP1_7 ----- 0
 Mtst1 ----- 0
 MtSTP1_3 -----MSL-----G----- 4
 MtSTP1_4 ----- 0
 MtSTP1_2 ----- 0
 MtSTP1_1 ----- 0

TM1

MtSTP5_1 -----MAGGVLPVD-STPVAVTAINIGGKLTLSIIITCIVAASGGLLYG 43
 MtSTP7_5 TNVARVMGTAFNCNIKEMEDGSSPTGGGTVDKGRAEQYKGRVTVHVI IACIVAATGGSLFG 240
 MtSTP7_4 -----MEDGR--GGGTVDKNGRAEQYKGRVTVHVI IACIVAATGGSLFG 42
 MtSTP7_3 -----MEDGVAKVRADQYNGRVTVHVI IACIVAATGGSLFG 36
 MtSTP7_1 -----MAGG--TFTTSNVDNERAELYKGRVTPYVII IACIVAATGGSLFG 42
 MtSTP14_2 -----MAGGAF--DGSTLKRALYEHKITGYLIFSCI IAGLGGALFG 41
 MtSTP14_1 -----MAGGAF--DGSTLKRALYEHKITGYLIFSCI IAGLGGALFG 41
 MtSTP14_3 -----MAGGGLT---NGGPGKRALYEHKFTAYFAFTCVV GALGGSLFG 41
 MtSTP13_1 -----MAGGGFTTG-----SSDVI FEAKITPAVIVSC IMAAFGGMLFG 38
 MtSTP13_2 -----MAGGGFTTG-----SSDVVFEARITAAVVI SC IMAATGGLMFG 38
 MtSTP13 -----MTGGGFSGG-----NDREFEAKITP **IIIIISCI MAATGGLMFG** 37
 MtSTP13_3 -----MAGGGFATS-----GGGEFEAKITPIVI I SC IMAATGGLMFG 37
 MtSTP3_1 -----MAVVEVP I P-----SNGRGYNGKMTPIV I LSCMVAATGG I IFG 38
 MtSTP3_2 -----MAVGLA I TR-----PSEQKNNGRITLYVVL SCMMAAMGGV I FG 38
 MtSTP10_2 -----MGAGAFVET-----SGIKHYEGRVTPYVLMTCFVAAMGGLLFG 38
 MtSTP10_3 -----MGAGVLVSS-----TNGRQYEGKVT PPFVVTCLVAAMGGLLFG 38
 MtSTP1_5 -----MAKE--GIM-----DVATQYPGKLTFRV I ITCVMAASGGLIYG 36
 MtSTP1_7 -----MPAVGIPTG-----GGNKEYPGNLT PPFVVT CIVAAMGGLIFG 38
 Mtst1 -----MAGGGIPIG-----GGNKEYPGNLT PPFVITIC IVAAMGGLIFG 38
 MtSTP1_3 ---HDIIFNSGSLRRNSDDII INSG-----SLRKNYSKGLTFRV I TCFATFGGLIFG 55
 MtSTP1_4 -----MAGGTIGTN-----GSGKEYPGKLT PPRVVFVCV I AAFGGGLIFG 38
 MtSTP1_2 -----MAGGYI-AH-----GSEKEYPGKLTFRV I IACMIAAFEGLIFG 37
 MtSTP1_1 -----MAGGYI-AQ-----GSGKEYPGKFT I RVFI ICMTAACGGGLIFG 37
 ..* . . * . : * : : *



MtSTP5_1 YDLGV-----SGGVTTMVPFLQKFFPDILRCAA---SAEVN 76
 MtSTP7_5 YDVG I-----SGGVASMDDFLQNFPPAVYKHKL---EAHEN 273
 MtSTP7_4 YDVG I-----SGGVASMDDFLQNFPPAVYKHKL---RAHEN 75
 MtSTP7_3 YDVG I-----SGGVTSMDDFLLKFFPSVYKQKM---HAHEN 69
 MtSTP7_1 YDVG I-----SGGVTSMDDFLKEFFPAVYIQKQ---HAHEN 75
 MtSTP14_2 YDLGV-----SGGVTSMDDFLVEFFPHVYARKH---EKLQET 75
 MtSTP14_1 YDLGV-----SGGVTSMDDFLVEFFPHVYARKH---EKLQET 75
 MtSTP14_3 YDLGVSENFSKFFPYRILVASHLNLGLSGGVTSMDDFLEKFFPDVYRKKH---AHLKET 99
 MtSTP13_1 YDIGI-----SGGVTSMP SFLKEFFPQIYEWIQ-AP-KNES 72
 MtSTP13_2 YDVG I-----SGGVTSMP SFLQKFFPDVYKRTQ-EHTVLES 73
 MtSTP13 **YDVG V**-----**S**GGVASMP PFLKFFPPTVLRQTT-ESDGS 72
 MtSTP13_3 YDVG V-----SGGVTSMP H PFLKFFP PAVYRKT V-LEAGLDS 72
 MtSTP3_1 YDIGI-----SGGVTSMP PFLKFFPDVYTKMKQD---NKIS 72
 MtSTP3_2 YDIGI-----TGGVTSME PFLNKFFHNI YLKMKS D---DKVS 72
 MtSTP10_2 YDLGI-----TGGVTSME DFLIKFFPRVYKMK-DETHNTS 73
 MtSTP10_3 YDLGI-----TGGVTSME PFLVKFFPSVYKMK-DESRHDS 73
 MtSTP1_5 YDHGV-----SGGVTSMD SFLKQFFPSVYEQQI-NTKASSN 71
 MtSTP1_7 YDIGI-----SGGVTSMD PFLKFFPLVYRKK---NLGTSSN 72
 Mtst1 YDIGI-----SGGVTSMD PFLKFFP PAVYRKK---NKDKSTN 72
 MtSTP1_3 YDIGI-----SGGVI SMNPFLKFFPHVYEQNVTTIKPSTN 91
 MtSTP1_4 YDLGI-----SGGVTSMD PFLQKFFPSVYEKEA-NIRPSDN 73
 MtSTP1_2 YDLGI-----SGGVTA-----KEL-NIKPTDN 58
 MtSTP1_1 YDLGI-----SGGV TAMDPFLMKFFPDVYAKQL-NIKPADN 72
 ** * : :*** :



MtSTP5_1 MYCVYDSQILTLFTSSLYLAGLVSSIAASKVTAAYGRRNVII IGGALFIAGGAINGGSEN 136
 MtSTP7_5 NYCKYNNQGISAF TSTLYI SGLVASIIAAPI TRRYGRRTSII IGGINFLIGSALNAAVD 333

MtSTP7_4 NYCKYNNQGISAFSTSTLYISGFIASIVAAPITRRYGRRTSIIIGGINFLVGSALNAAAVD 135
 MtSTP7_3 NYCKYNNQVLAFAFTSVLYISGLVASLVASTITRKYGRKISIIVGGISFLIGSILNAAAA 129
 MtSTP7_1 NYCKYDNQGLAAFTSSLYIAGLVASLFASTITRTRYGRRASIIIGGISFLIGSVAVASAIN 135
 MtSTP14_2 DYCKYDDQILTLFTSSLYFAALVSTFGASSLTKNKGRRASILVGSVSFFCGAIINAAAKN 135
 MtSTP14_1 DYCKYDDQILTLFTSSLYFAALVSTFGASSLTKNKGRRASILVGSVSFFCGAIINAAAKN 135
 MtSTP14_3 DYCKYDNQVLTTLFTSSLYFSALVMTFFASYLTRNKGRKATIIVGALSFLIGAILNAAAQN 159
 MtSTP13_1 NYCKYDNQMLQLFTSSLYIAALVASMIA SPVTRKLGKRLTMLLAGIFFIAGTALSALAGT 132
 MtSTP13_2 NYCKYDNQKLQLFTSSLYLAALVASMIA SPVTRKLGKRLTMLLAGILFIVGTVLSASAGK 133
 MtSTP13 NYCKYDNQGLQLFTSSLYLAGLTVTFFASYTTRVLRRLTMLLIAGFFFIAGVSLNAAAQN 132
 MtSTP13_3 NYCKYDNQGLQLFTSSLYLAALTSTFFASYTTRTMGRRLTMLIAGFFFIAGVAFNAAAQN 132
 MtSTP3_1 NYCKFDSQLLTTFTSSLYIAGLLASFFASITRAFGRKPSILVGGAAFLIAGALGGAALN 132
 MtSTP3_2 NYCMFDSQLLTSFTSSLYVAGFVTSFFASYVTRVFRKPSIVAGGAAFLAGTALGGAAFN 132
 MtSTP10_2 QYCKFDDEILTLFTSSLYLAALIASFFASAITRMMGRKTSMFLGGLFFLIAGILNGLAAN 133
 MtSTP10_3 NYCKFDNQLLTLFTSSLYIAALIASFFASITTRVFRKISMFAGGLFFLVGALLNGLAVN 133
 MtSTP1_5 QYCKFDSQTLTFTSSLYISALISSLGASSLTRMMGRATMLGGLFFVSGALLNSFAQN 131
 MtSTP1_7 KYCQYDSQTLTMTFTSSLYLAALLSIVASSVTRRFRKLSMFFGGLLFLIGALVNGFAQH 132
 Mtst1 QYCYDSQTLTMTFTSSLYLAALLSIVASTITRFRKLSMFLGGLFFLVGALINGFANH 132
 MtSTP1_3 QYCKFDSQTLTTLFTSSLYLAALVASLGASTVTRSFGRRLTMSGGVFLFLAGAALNGFAQE 151
 MtSTP1_4 QYCKFDSQTLTTLFTSSLYLAALVASLGASTVTRIFGRRLTMSGGVFLFLAGAAMNGFAQE 133
 MtSTP1_2 QYCKFDSQTLTTLFTSSLYLAALVASLGASTVTRIFGRRLTMSGGVFLFLAGAAMNGFAEK 118
 MtSTP1_1 QYCKFDSQTLTTLFTSSLYLAALVASLGASTVTRIFGRRLTMSGGVFLFLAGAAMNGFAEK 132
 * * : : : * * * : * : : : : * : * * * : . . . * . * . . . :



MtSTP5_1 IPMLILGRVLLGFGVGFNTQAAPLYLSETAPPKWRGTFTNTGFQFFLIGIVVAAGCINYAT 196
 MtSTP7_5 LEMLIIGRVLQGVGIGFGNQAIPLYLSEMAPTHFRGGLNMMFQVATTFGIPTANMINYGT 393
 MtSTP7_4 LEMLIIGRVLQGVGIGFGNQAIPLYLSEMAPTHFRGALNMMFQVATTFGIPTANMINYGT 195
 MtSTP7_3 LGMLIIGRILLGVGIGFGDQAIPLYLSEMAPTHLRGGLNMMFQVATTLGIPTANMINYGT 189
 MtSTP7_1 LSLMIFGRIMLGIGIGFGNQAIPLYLSEMAPTHLRGGLNMMFQVATTFGIPTANMINYGT 195
 MtSTP14_2 IAMLIIIGRILLGIGIGFGNQAVPLYLSEMAPAKIRGAVNQFLQTLTCLGILIANLVNYGT 195
 MtSTP14_1 IAMLIIIGRILLGIGIGFGNQAVPLYLSEMAPAKIRGAVNQFLQTLTCLGILIANLVNYGT 195
 MtSTP14_3 IPTLLIIGRVLGGGIGFGNQAVPLYLSEMAPASSRGAVNQFLQFTTCAGILIANLVNYFT 219
 MtSTP13_1 LSLIILGRILLGCGVGFANQAVPVFLSEIAPTRIRGALNIMFQNLNITIGIFIANLVNWF 192
 MtSTP13_2 LILLIFGRILLGCGVGFANQAVPVFLSEIAPTRIRGALNIMFQNLNITIGIFIANLVNWF 193
 MtSTP13 LLMILVGRVLLGCGIGFANQAVPVFLSEIAPSRIRGALNIFLQDLITLGLIFANLVNYA 192
 MtSTP13_3 LAMLIIVGRILLGCGVGFANQAVPVFLSEIAPSRIRGALNIFLQNLVITIGILFANLVNYGT 192
 MtSTP3_1 IYMLILGRVLLGFGVGFANQAVPLYLSEMAPRYRGAINIGFQLCVGVLSANLVNINFT 192
 MtSTP3_2 VYMLIVGRILLGFGVGFANQAVPLYLSEMAPRFRGAINNGFQLSIGIGALSANLVNINFT 192
 MtSTP10_2 VEMLIIGRILLGFGVGFANQAVPVFLSEIAPTRIRGALNIGFQMMITIGILANLVNINFT 193
 MtSTP10_3 VGMLIIGRILLGFGVGFANQAVPVFLSEIAPTRIRGALNIGFQMMITIGILANLVNINFT 193
 MtSTP1_5 IAMLIIIGRILLGFGVGFANQAVPVFLSEIAPSRIRGALNIMFQNLNITIGIFIANLVN 191
 MtSTP1_7 VVMLIVGRILLGFGVGFANQAVPVFLSEIAPSRIRGALNIMFQNLNITIGIFIANLVN 192
 Mtst1 VVMLIVGRILLGFGVGFANQAVPVFLSEIAPSRIRGALNIMFQNLNITIGIFIANLVN 192
 MtSTP1_3 VVMLILGRMLLGFVGFANQAVPVFLSEIAPSRIRGALNIMFQNLNITIGIFIANLVN 211
 MtSTP1_4 VVMLIVGRMLLGFVGFANQAVPVFLSEIAPSRIRGALNIMFQNLNITIGIFIANLVN 193
 MtSTP1_2 VVMLIVGRMLLGFVGFANQAVPVFLSEIAPSRIRGALNIMFQNLNITIGIFIANLVN 178
 MtSTP1_1 VVMLIVGRMLLGFVGFANQAVPVFLSEIAPSRIRGALNIMFQNLNITIGIFIANLVN 192
 : : . * * : : * * : * * : * : : * * * * * * * * * * * * * * * * * * :



MtSTP5_1 AKH--TWGWRLSLGLAVVPAVMTIGSFLITDTPNGLVERG-KIEQAKQALRKIRGSSVD 253
 MtSTP7_5 QQIQ-PWGWRLALGLAAIPTLLMTIGGIFIPETPNLSIERG-SKEQGRKLEKIRGT-NE 450
 MtSTP7_4 QQIQ-PWGWRLALGLASIPTLLMTVGGIFIPETPNLSIERG-SKEQGRKLEKIRGT-DE 252
 MtSTP7_3 RNIK-PWGWRLSLGLAAIPAVLMTVGGILIPETPNLSIERG-SKEQGRKLEKIRGT-KD 246
 MtSTP7_1 QRIK-PWGWRLSLGLAAIPALLMTIGGIFLDPDTPNSLIQRG-SQEKGRKLEKIRGT-SD 252
 MtSTP14_2 EKIH-PWGWRLSLGLATVPAIFMFIGGIFCPETPNLSVEQG-RMDEGRVLEKIRGT-RN 252
 MtSTP14_1 EKIH-PWGWRLSLGLATVPAIFMFIGGIFCPETPNLSVEQG-RMDEGRVLEKIRGT-RN 252
 MtSTP14_3 DKIH-PHWRLSLGLAGIPAVLMLLGGIFCAETPNLSVEQG-RLDEARKVLEKVRGT-KN 276
 MtSTP13_1 SKMEGGYWRISLAGAIIIPAVMLTVGSLIVDDTPNSLIERG-FEEKGKAVLRKIRGV-EN 250
 MtSTP13_2 SKIKGGYWRVSLAGAIIPAVMLTMGSLIVDDTPNSLIERG-FEEKGKAVLRKIRGV-EN 251
 MtSTP13 NKIKGHWGWRISLGLGIPALLTLTGAYLVVDTPNLSIERG-HLDKGAVALRIRGT-DN 250
 MtSTP13_3 NKISGGWWRISLGLAGIPALLTLTGAVIVVDTPNLSIERG-RLEEGKAVLKKIRGT-DN 250
 MtSTP3_1 EKIKDGGWRISLAMAAPVATILTLGAFLLPETPNLSIIQNSKNHQKAKMLQSIQIRGT-HD 251
 MtSTP3_2 EKIEGGWWRVSLAMAAPVATILTLGALFLPETPNLSIIQNTQDHQAKRILQIRGT-ED 251
 MtSTP10_2 SKHKN--GWRVSLGLGAVPAIILLCLGSLFLGETPNLSIERG-NHEKAKAMLRKIRGT-EN 249
 MtSTP10_3 SKLEN--GWRVSLGLGAVPAVMLCVGSFFLGDTPNSLIERG-QTEGAKEMLQKIRGT-DN 249
 MtSTP1_5 AKLWNGEGWRISLGLGAVPAVIFVVGTLFLPDSPLSVSRG-RHEAARKELAKIRGT-DD 249
 MtSTP1_7 SKLKGGLGWRISLGGAMVPALIIITIGSIVLPDTPNSMIERG-DRDGAKVHLKIRGT-ED 250
 Mtst1 AKIKGGWWRISLGGAMVPALIIITIGSIVLPDTPNSMIERG-DRDGAKVHLKIRGT-ED 250
 MtSTP1_3 AKMKNNEGWRYSLSFASIPGMFTLGAMFLPDSPLSIERG-QNDKAKQELINMRGT-TD 269
 MtSTP1_4 SKMKNNEGWRYSLGLAAVPAIMIITIGAIIFLDPDTPNSLIERG-QNDKAKKELISIRGT-TD 251
 MtSTP1_2 ANMKNNEGWRYSLGFVAVPAIMIITIGAIIFLDPDTPNSLIERG-QDDKAKKELIKIRGT-SD 236
 MtSTP1_1 AKMKNNEGWRYSLGCAGVPAIMIITIGAIIFLDPDTPNSLIERG-LDDKAKKELIKIRGT-SD 250
 . * * * : * . . : * . . : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * :



MtSTP5_1 IEPELEELIKWTEIAKSVQQEPPFKTILKREYRPHLVM-AFAIPFFQQLTGINIVAFYSPN 312
MtSTP7_5 VDAEFQDMLDAGELA-NSIKHPYYNILKRRYRPELVM-AICMPAFQILTGINSILFYAPM 508
MtSTP7_4 VDAEFQDMLDAGELA-NSIKHPYYNILKRRYRPELVM-AICMPAFQILTGINSILFYAPM 310
MtSTP7_3 VDAEFQDMVEASELA-NSIKHPFRNILEKRYRPELVM-AICMPAFQILTGINSILFYAPV 304
MtSTP7_1 VDAELEDMVEASELA-NSIKHPFRNILEKRYRPELVM-AIVMPTSQILTGINAILFYAPV 310
MtSTP14_2 VDAEFDDLIEASREA-KSIKNPFQNLRLKRNRPQFIIGAICIPAFQQLTGNNNSILFYAPV 311
MtSTP14_1 VDAEFDDLIEASREA-KSIKNPFQNLRLKRNRPQFIIGAICIPAFQQLTGNNNSILFYAPV 311
MtSTP14_3 VDAEFEDLDKASELA-QAVKSPFKVLLKRRYRQPLIIGALGIPAFQQLTGNNNSILFYAPV 335
MtSTP13_1 IEPEFEDILRASKVA-NEVKSPFKDLVKSHNLPPLII-AICMQVFQQFTGINAIMFYAPV 308
MtSTP13_2 IEPEFEDILRASKVA-NEVKSPFKDLVKSHNRPPLII-AICMQVFQQFTGINAIMFYAPV 309
MtSTP13 IEPEFLELVEASRVA-KEVKHPFRNLLKRNRPQLVI-SIALMIFQQFTGINAIMFYAPV 308
MtSTP13_3 IEPEFLELVEASRVA-KEVKHPFRNLLKRNRPQLII-SIALQIFQQFTGINAIMFYAPV 308
MtSTP3_1 VQEFEDLIEASIMS-NSIKHPFNILQRRYRQPLVM-AIAIPFFQQTGINVIFSYAPV 309
MtSTP3_2 VAEELDDLTKASSTSKTSSQQPFKIIIMKRRYRQPLVM-AIAIPFFQQTGINVIFSYAPV 310
MtSTP10_2 VDEEYQDLVDASEEA-SRVEHPWKNITQPEYRQPLTF-VSFIPIFFQQLTGINVIMFYAPV 307
MtSTP10_3 VDEEFQDLIDASEEA-KKVEHPWKNITQTRYPQPLTF-CSLIPIFFQQLTGINVIMFYAPV 307
MtSTP1_5 VDAEFNDIVAASEAS-DQVKNPWKTLNKRKRNPVMVF-AIPIPFQQTGINVITFYAPI 307
MtSTP1_7 VDEEFNDLVAASEAC-MQVKNPWRNLLQRRYRQPLSM-AIPIPFQQTGINVIMFYAPV 308
Mtst1 VDEEFNDLVAASEAS-MQVENPWRNLLQRRYRQPLTM-AVLIPIFFQQTGINVIMFYAPV 308
MtSTP1_3 VDEEFQDLVVASDVS-KTVKHPWVSLKRYRPHLTM-AIAIPFFQQLTGMNVTFYAPV 327
MtSTP1_4 VDEEFQDLVAASDIS-KTVEHPWASLLTRYPYRPHLTM-AIAIPFFQQLTGMNVTFYAPV 309
MtSTP1_2 VDDEFNDLLAASQAS-KAIKYPWACLTRQYRQPLTM-AIAIPLFQQLTGMNVTFYAPV 294
MtSTP1_1 VDDEFNDLLAASQAS-KAIKHPWSILLTRQYRQPLTM-AIAIPFFQQLTGMNVTFYAPV 308
 :: * :: : . : * : : : * * * : * * * :



MtSTP5_1 LFHSGVFGHDGALLSAIILGSVSLLSNLI SAGIVDRIGRRFLFISGGIMMLVCLIAVSIV 372
MtSTP7_5 LFQSMGFGQRQASLYSSALTGVLGAGSTFISIAIVDRLGRRPLLISSGGIQMIVCQVSAII 568
MtSTP7_4 LFQSMGFGQRQASLYSSALTGVLGAGSTFISIAIVDRLGRRPLLISSGGIQMIICQVWKTHD 370
MtSTP7_3 LFQSMGFGKQDASLYSSALTGVLGAGSTFISIAIVDRLGRRPLLISSGGIQMIICQVIVAVI 364
MtSTP7_1 LFQSMGFGGDASLYSSALTGVLGAGSTFISIAIVDRLGRRPLLISSGGIQMIICQVIVAVI 370
MtSTP14_2 IFQTI GFGSGASLYSSVIT SVALVLATLISMALVDKFGRRAFFLEAGTEMIICMVATAIV 371
MtSTP14_1 IFQTI GFGSGASLYSSVIT SVALVLATLISMALVDKFGRRAFFLEAGTEMIICMVATAIV 371
MtSTP14_3 IFQSLGFGSNAALFSSFITNGALLVATVISMFLVDKFGRRKFFLEAGFEMICCMITAVV 395
MtSTP13_1 LFNTLGFHNDASLYSSVITGGVNVLTCLVSVYFVDKVGRRVLLLEACVQMFVSVQVIVGV 368
MtSTP13_2 LFNTLGFHNDASLYSSVITGGVNVLTCLVSVYFVDKAGRRVLLLEACVQMFVSVQVIVGV 369
MtSTP13 LFNTLGFHNDASLYSAVITGAVNVLTSTIVSIYFVDKLGRRMLLLEAGVQMFVLSQVIVAVI 368
MtSTP13_3 LFNTVGFHNDASLYSAVITGAVNVLTSTIVSIYFVDKLGRRMLLLEAGVQMFVLSQVIVAVI 368
MtSTP3_1 LFLTIGLGEASLLSVMVIGVTSTFISMLIVDKLGRRVLFISGGIQMFFSQILIGSI 369
MtSTP3_2 LFRITIGLGEASLLSSVMTGIVGTSTFISMFIVDKLGRRTLFIVGGIQMFFVSVQVIVGV 370
MtSTP10_2 LFKILGFGDDASLMSAVITGGVNVVATLVSVFTVDKFGRRFLFLEGGQMFICQVIVGIL 367
MtSTP10_3 LFKTLGFGNDASLISAVISGGVNVVATLISYIVTVDKFGRRFLFLEGGIQMFICQVIVGSM 367
MtSTP1_5 LFRITIGFGQASLMSAAIIGGFKPLATLVSVIVLVDKFGRRFLFLEGGQMLVLCQILMAIA 367
MtSTP1_7 LFSSVGFEDDAALMSSVITGVVNAFGTIIISIFGVDRLGRRALFLEGGQMLICQIVGVAAS 368
Mtst1 LFNSIGFKDDASLMSAVITGGVNVVATCVSIVYGVDKWGRRALFLEGGQMLICQVAVAAA 368
MtSTP1_3 LFKTIGFSNTASLVSALIGGCNALATLVSIATVDKFGRRFLFIEGGIQMFICQVIVAVIA 387
MtSTP1_4 LFKTIGFSNASLMSALITGGCNALATFVSIATVDKFGRRFLFIEGGIQMFICQVIVAVIA 369
MtSTP1_2 LFKTIGFAT-----LVSIVTVDKFGRRFLFLEGGQMFICQIVAVAA 336
MtSTP1_1 LFKTIGFGANASLMSAMITGGCNALATFASIVTVDKFGRRFLFLEGGQMFICQIVAVAA 368
 :* :*: : * **: *** :: . * : .



MtSTP5_1 LAVVTGVDGT-KDISKGNIAIVVLLVLCFYSAGFGWSWGPLTWLIPSEIFPVKIRTTGQSI 431
MtSTP7_5 LG---IKFGENQELSKSYSISVVIILSLFVLAFGWSWGPLGWTVPSEIFPLEIRSAGQSI 625
MtSTP7_4 LVQIPIMLRTVT-----F----- 384
MtSTP7_3 LG---IKFGDNQELSKGYSLSVVVAICFLVLAFGWSWGPLGWTVPSEIFPLEIRSAGQSI 421
MtSTP7_1 LG---VKFGDNQELSKGYSILVVVVVCLFVVAFGWSWGPLGWTVPSEIFPLEIRSAGQSI 427
MtSTP14_2 LA---TCFGDGKQLSFGVAIFLVLVIFLFLVLAAGRWSWGPLGWLVPSELFPLEIRSSAQSV 428
MtSTP14_1 LA---TCFGDGKQLSFGVAIFLVLVIFLFLVLAAGRWSWGPLGWLVPSELFPLEIRSSAQSV 428
MtSTP14_3 LA---VEFGHGKELSKGISAFVLVIVIFLFLVLAAGRWSWGPLGWLVPSELFPLEIRSSAQSI 452
MtSTP13_1 LGMKVT--DHSDSLKSGYAMLVVVMVCTFVASFVSWWGPLGWLIPSETFPLETRSAGQSV 426
MtSTP13_2 LGAKLQ--DHSDSLKSGYAMLVVVMVCTFVASFVSWWGPLGWLIPSETFPLETRSAGQSV 427
MtSTP13 LGIKVT--DHSEELSKGYAALVVVMVCTFVASFVSWWGPLAWLIPSEIFPLETR SAGQSV 426
MtSTP13_3 LGIKVT--DHSDDLKSGYALFVVLVCTFVASFVSWWGPLGWLIPSETFPLETRSAGQSV 426
MtSTP3_1 MAALQG---DHGEISKKYAYLILVLICIVYVAGFAWSWGPLGWLVPSEIFPLEIRSSAQSI 426
MtSTP3_2 MAVHLK---DHGGLSKGYAYMVLIMICIYVAGFAWSWGPLGWLVPSEIFPLEIRSSAQSI 427
MtSTP10_2 IALKFGVTGQ-GSFTKGEADLLFFICAYVAFAWSWGPLGWLVPSEVCALEVRPAGQAI 426
MtSTP10_3 IAIKLGVSGE-GSFTKTEADLLVFCILYVAFAWSWGALGWLVPSEICSLVRSAGQAI 426
MtSTP1_5 IGVTFGTSGNPGQLPQWFAITIVGVICIVYVSGFAWSWGPLAWLVPSEIFPLEIRSSAQSI 427

MtSTP1_7 IGAKFGIDGNPGELPKWYAIVVVLFICAYVAAFSWSWGPLGWLVTSEIFPLEIRSAQSV 428
 Mtst1 IGAKFGTSGNPNLPEWYAIVVVLFICIYVAGFAWSWGPLGWLVPSEIFPLEIRSAQSV 428
 MtSTP1_3 IACKFGVDGDDPDTLSKWYAIVVVMCI CVYVVGFAWSWGPLSWLVPSEIFPLEIRSAQSI 447
 MtSTP1_4 IALKFGVSGDPGVLPKWYAIVVVMCI CVYVAGFAWSWGPLGWLVPSEIFPLEVRSAAQSI 429
 MtSTP1_2 VQSKFGVDGNPGELPKWYALLVIGICVYVMGFAWSWGPLGWLVPSEIFPLEVRSAAQSV 396
 MtSTP1_1 IASKFGVDGNPGELPKWYALLVIGICVYVMGFAWSWGPLGWLVPSEIFPLEVRSAAQSV 428



MtSTP5_1 AVAVQFIIIFVLSQTFLTMLCHMKFGAFVYAFWVIVMTLFFVIFFLPETKGIPIESM-YT 490
 MtSTP7_5 TVAVNLLFTFIIAQAFLSLLCFFKYGIFLFFAGWTALMTLFFVFLFLPETKGIPIEEM-SI 684
 MtSTP7_4 ----- 384
 MtSTP7_3 TVAVNLLFTFIIAQTFLSLCFSKFKGIFLFFAGWITIMTIFVVLFLPETKGIPIEEM-AI 480
 MtSTP7_1 TVFVNLFFTFIIAQVFLALCFSKFKGIFLFFAGWITLMTIFVILFLPETKGIPIEEM-TF 486
 MtSTP14_2 VVCVNMIFTAIVAQFFLVSLCHLKYGIFLFFGGLIVLMSCFVYFLLPETKQVPIEEI-YL 487
 MtSTP14_1 VVCVNMIFTAIVAQFFLVSLCHLKYGIFLFFGGLIVLMSCFVYFLLPETKQVPIEEI-YL 487
 MtSTP14_3 VVCVNMIFTAIVAQFFLVSLCHLKYGIFLFFGGLIVVMSVVFVFLPETKQVPIEEI-YL 511
 MtSTP13_1 TVFTNMLFTFLIAQAFLSMLCHLKFYGFIFLFFSAWVFMGVFTVFFIPIETKNIPIEDMAEK 486
 MtSTP13_2 TVFTNMLFTFLIAQAFLSMLCFLKFGIFLFFSAWVFMGVFTVFFIPIETKNIPIEDMAET 487
 MtSTP13_3 TVCVNMLFTFVIAQAFLSMLCHFKFGIFLFFSGWVLMISIFVFLFLVPIETKNIPIEEMTQR 486
 MtSTP3_1 TVAVNLFLETFIVAQTFLSMLCHFKYGTFFFFGGWVVMIMTVFVYFLLPETKNVPIEQM-DR 485
 MtSTP3_2 TVAVSFLFTFIVAQTFLSMLCHFKSGIFLFFGGWVVMIMTVFVYFLLPETKNVPLEQM-EK 486
 MtSTP10_2 NVAVNMFFTFMIAQVFLTMLCHLKFGLFFFAAGFVAIMTIFIAVLLPETKNVPIEEM-NR 485
 MtSTP10_3 NVAVNMLFTFIIAQVFLTMLCHLKFGLFFFAAGFVLMISIFVALFLPETNNVPIEEM-NK 485
 MtSTP1_5 TVAVNMTSIFIIAQFFTEMLCHFKFGLFLFFSGFVIIMTLFIYKFLPETKGVPLEDM-QM 486
 MtSTP1_7 NVSVNMFVTFVAVQVFLTLMLCHMKFGLFIFFAFFVVMVMTFFVYFMLPETKGIPIEEM-SK 487
 Mtst1 NVSVNMLFTFLVAQVFLIMLCHMKFGLFLFFAFFVLMVSIYVFFLLPETKGIPIEEM-DR 487
 MtSTP1_3 NVSVNMICTFVIAQIFTTMLCYMKFGLFIFFAFFLFLMTAFIYKFLPETKEVPIEEM-SI 506
 MtSTP1_4 NVSVNMICTFIIAQIFTTMLCHMKFGLFIFFAFFVVMVMTGFIYKFLPETKGVPIEEM-ST 488
 MtSTP1_2 NVSVNMIFTFIAIAQVFTTMLCHMKFGLFIFFALLVVMVMSLFIYKFLQETKGVPIEEM-FV 455
 MtSTP1_1 NVSVNMIFTFIAIAQVFTAMLCHMKFGLFIFFAFFVVMVMSLFIYKFLPETKGVPIEEM-SK 487

MtSTP5_1 IWGRHWFWSRYVKQEVLENLP----- 512
 MtSTP7_5 LLRKHWFWMVLPDDAV----- 701
 MtSTP7_4 ----- 384
 MtSTP7_3 MWKHHWFWRILP----- 493
 MtSTP7_1 MWRKHWFWKLILPENTSQ----- 504
 MtSTP14_2 LFENHWFWKNIVKDENKGETQA----- 510
 MtSTP14_1 LFENHWFWKNIVKDENKGETQA----- 510
 MtSTP14_3 LFENHWFWKNIVREGTDQEQGKPNKPIAP----- 541
 MtSTP13_1 VWKQHWFWRKRFMH----- 499
 MtSTP13_2 VWKQHWFWRRRGFIELQKLLSVFLPCATPIIMSTKPMRETNVNSRPISNLPSVTFLLQQ 547
 MtSTP13_3 VWKQHWFWRKRFVENDYIEDE---KVTGGNSPS-----RNDLVSQI----- 523
 MtSTP13_3 VWKQHWFWRKRFMEDDNEK-----VSNADYPK-----IKNNPNSQL----- 521
 MtSTP3_1 VWREHFFWKRIVGDKIEGKQTVVP----- 509
 MtSTP3_2 VWQEHWFWKKIVGKISDDRGGKGEV----- 510
 MtSTP10_2 VWKSHWFWTKYVSDHVVGGGNNKQVDP----- 512
 MtSTP10_3 VWKSHWFWKKFVSNVVIDHGQKAI----- 510
 MtSTP1_5 VWKHKHPWKGYLEKESKKTVKQDT----- 511
 MtSTP1_7 VWKGHYPYWSRFVDHDKGDKGLEMGRSN----- 514
 Mtst1 VWKSHPFWSRFVEHGDHNGVEMGKAPKNV----- 518
 MtSTP1_3 VWEHPYWGKFAVLLIPT----- 525
 MtSTP1_4 VWEKHPYWSDFVKAKPKPNDQELGQR----- 514
 MtSTP1_2 VWINHSYWRKFKVPAEHEGGGQA----- 478
 MtSTP1_1 VWQNHSYWKKFKVPTDDHNSGGGQA----- 512

MtSTP5_1 ----- 512
 MtSTP7_5 ----- 701
 MtSTP7_4 ----- 384
 MtSTP7_3 ----- 493
 MtSTP7_1 ----- 504
 MtSTP14_2 ----- 510
 MtSTP14_1 ----- 510
 MtSTP14_3 ----- 541
 MtSTP13_1 ----- 499
 MtSTP13_2 FFRSNAIMSYII 560
 MtSTP13_3 ----- 523
 MtSTP13_3 ----- 521
 MtSTP3_1 ----- 509
 MtSTP3_2 ----- 510
 MtSTP10_2 ----- 512
 MtSTP10_3 ----- 510
 MtSTP1_5 ----- 511
 MtSTP1_7 ----- 514
 Mtst1 ----- 518
 MtSTP1_3 ----- 525

MtSTP1_4 ----- 514
 MtSTP1_2 ----- 478
 MtSTP1_1 ----- 512

MtINT1_4 -----MPYATPGSSD 10
 MtINT1_3 MSGAESADSDADNDKHKHVLYCNIVLAIYWDLTQLIIQSNLCYDEMVTVTSIRIPGSSG 60
 MtINT1_2 -----MTNNTSSTMVQSTPGSSG 17
 MtINT1_1 -----MTVPFIAMQSTPGSSG 15
 MtINT4_1 -----MAEGGHP 7
 MtINT4_2 -----MAEGGHQ 7
 MtINT2_3 -----MEGEVH 6
 MtINT2_1 -----MEGGVP 6
 MtINT2_2 -----MEGGVP 6



MtINT1_4 Y--LELYPERKISYFKNPYILGVTAAAGIGLLFGYDTGVISGALLYIKDDFDDVRNSSF 68
 MtINT1_3 Y--LDIHPERKVSFKNPYILCLTSVASIGLLFGYDTGVISGALLYIKDDFQAVRYSHF 118
 MtINT1_2 Y--LDLYPERKMSFFKNPYILGLAAVAGIGLLFGYDTGVISGALLYIKDDFESVRESNI 75
 MtINT1_1 Y--LDMHPDRKMSFFKNPYILGLAAVAGIGLLFGYDTGVISGALLYIKDDFPQVRNSNF 73
 MtINT4_1 LADKTEFTECWRRTAESPYLMRLALS--GLLFGYDTGVISGALLYIRDEFEQVDKPKW 64
 MtINT4_2 LADKTEFTECWRRTESPYLMRLALSAGIGLLFGYDTGVISGALLYIRDEFDQVDKKTW 67
 MtINT2_3 KPDISAFRECLSLSWKNPYVLRALFASAGIGLLFGYDTGVISGALLYIRDDFKAVDTKVV 66
 MtINT2_1 EADMSAFRECLSLSWKNPYVLRALFASAGIGLLFGYDTGVISGALLYIRDEFFAVEKKTW 66
 MtINT2_2 EADVSARECLSLSWKNPYVLRALFASAGIGLLFGYDTGVISGALLYIRDDFKAVDRQTW 66



MtINT1_4 LQETIVSMALVGAIIGAATGGWINDAFGRKKATLSADVFTLGSVVMASAPDAYVLIIGR 128
 MtINT1_3 LQETIVSMVAGAIVGAAGVGMNDRYGRKKATIIADVIFILGAIVMAAAPDPYIILIGR 178
 MtINT1_2 LQETIVSMAIAGAIVGAAGWINDAYGRKKATLIADVIFIIIGAIWMAAAPDPYIILIGR 135
 MtINT1_1 LQETIVSMAIAGAIVGAAGWLNDAVGRKKATLLADVIFILGAILMAAAPDPYVLIAGR 133
 MtINT4_1 LQETIVSMASAGAIIGAAGVGMNDKMRKKTILMADVVFVAGALVMAAAPAPWVIIIGR 124
 MtINT4_2 LQETIVSMVAGAIVGAAGVGMNDKMRKKTILMADVVFVAGALVMAAAPAPWVIIIGR 127
 MtINT2_3 LQSAIVSTLLAGAVIIGAAGWINDRFGRKRSIMIIADTLFFIGSALMAAATSPAILIVGR 126
 MtINT2_1 LQEAIVSTAIAGAIIGAAGWINDRFGRKRSIIIVADTLFLLGSIIILAAANPNPATLIVGR 126
 MtINT2_2 LQEAIVSTALAGAIIGAAGWINDRFGRKKAIIADALFFIGSVIMAAANPAAILIVGR 126



MtINT1_4 LLVGLGVASVTAPVYIAESSPSEIRGSLVS----- 160
 MtINT1_3 VLVGLGVGIASVTAPVYIAELSPSEIRGGLVA----- 210
 MtINT1_2 LLVGLGVGIASVTAPVYIAEASPSSEIRGSLVS----- 167
 MtINT1_1 LLVGLGVGIASVTAPVYIAEVAPSEIRGSLVS----- 165
 MtINT4_1 LLVGLGVGAASMTEHWF-----AVC----- 144
 MtINT4_2 VLVGLGVGASMTAPLYISEASPAKIRGALVC----- 159
 MtINT2_3 VLVGLGVGMASMASPLYISEASPAKIRGALVSLCLVWLLQSQNFWSISKAILQYLTCV 186
 MtINT2_1 VLVGLGVGMASMASPLYISEASPTRVRGALVS----- 158
 MtINT2_2 VLVGLGVGMASMASPLYISEASPTRVRGALVS----- 158



MtINT1_4 -----TNVLMITGGQFLSYLVNLAFTKSPNEILIKQVPGTWRWMLGVA 204
 MtINT1_3 -----TNVLMITGGQFISYLVNLSFT-----QVPGTWRWMLGVS 244
 MtINT1_2 -----TNSLMITSGQLLSYIVNLAFT-----RVPGTWRWMLGVS 201
 MtINT1_1 -----TNVLMITGGQFVSYLVNLSFT-----QVPGTWRWMLGVS 199
 MtINT4_1 -----TNGLLITGGQFLSYLINLAFT-----KAPGTWRWMLGVA 178
 MtINT4_2 -----TNGLLITGGQFLSYLINLAFT-----KAPGTWRWMLGVA 193
 MtINT2_3 WLFKIVFILQTKHTSLNGFLITGGQFLSYLINLAFT-----KAPGTWRWMLGVA 236
 MtINT2_1 -----LNSFLITGGQFLSYLINLAFT-----KAPGTWRWMLGVA 192
 MtINT2_2 -----LNGFLITGGQFLSYVINLAFT-----NAPGTWRWMLGVA 192



MtINT1_4 GLPAVIQFCVLMFLPESPRWFLKRNKDEAIVLSNIIYNERLEDEVNYLTAVSEQEMQK 264
 MtINT1_3 GVPAVIQFFLMLFLPESPRWLYINNRENEAIVLGLKIYDFDRLEDEVALLTAQSEQD--- 301
 MtINT1_2 AVPALVQFII LMLFLPESPRWLFMKNRKNKNEAVDVISNIYDLARLEDEVDFLTAQEQDRQK 261
 MtINT1_1 GVPALIQFICMLFLPESPRWFLKRNKNEAVDVISKIYDLARLEDEIDFLTAQSEQERQR 259
 MtINT4_1 AIPAIIQFVLMFLSLPESPRWLYRQSKKEEAKQILSKIYRPGVEVEEMKAMHESIEAEKAE 238
 MtINT4_2 AIPAIQFVLMFLSLPESPRWLYRQSKKEEAKIILTKIYRPGVEVADEMAMHESIEAEKAE 253

MtINT2_3 ALPAILQLLLMFWLPESPRWLFRKGKEEGKAILRKIYPAEVDE----- 281
 MtINT2_1 AAPAVIQIVLMLSLPESPRWLFRKGKEEGKAVLKKIYEVEDYDNEIQALKESVEMELKE 252
 MtINT2_2 AVPAITQIVLMLMLPESPRWLFRKGKEEGKAILRKIYPPQDVEDEIIALKESVEMESKD 252
 . ** : * : * : ***** : : : : * : : * * :



MtINT1_4 RK-----NIRYMDVFRSTEIRNAFFVVGAGLQAFQFTGISIVMYYSPITIIQMAGFNSNQ 318
 MtINT1_3 -----QIRLAFLAGAGLQAFQFTGINTVMYYSPITIVQMAGFHSNE 342
 MtINT1_2 NM-----NVKFKDVFSKKEIRLAFMVGAGLMVFQFTGINTVMYYSPITIVQMAGFQSKE 315
 MtINT1_1 RS-----TIKFWHVFRSKETRLAFLVGGGLLAFQFTGINTVMYYSPITIVQMAGFPHANQ 313
 MtINT4_1 DGLIGHSLAQKLGAWNSNDVVRRLYAGITVQVQQIVGINTIMYYSPITIVQFAGIASNS 298
 MtINT4_2 EGLIGHSLAQKLGAWNSNDVVRRLYAGITVQVQQIVGINTVMYYSPITIVQFAGIASNS 313
 MtINT2_3 AESSEKI---SMITLLKTTSVRRGLYAGMLQIFQQFVGINVMYFSPTIVQLAGFASNQ 338
 MtINT2_1 T---EKI---SIMQLVKTTSVRRGLYAGVGLAFFQFTGINTVMYYSPISIVQLAGFASKR 306
 MtINT2_2 DSSSNKV---SIKLLKTKVRRGLYAGVGLQIFQQFVGINVMYSPITIVQLAGFASNK 309
 * . : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *



MtINT1_4 LALLLSLIVAGMNAAGTVLGIYLDHAGRRKLALSSLSGATVALAIIISAGSYLQSSDP-- 376
 MtINT1_3 LALQLSLIVAGLNAAGTVLGIYLDHAGRRKLALYSLGGVIASLIILSVSFFNQSSST-- 400
 MtINT1_2 LALQISLIVFVAAMNAVGTVLGIYLDHAGRRKLALALCSLGGVFTSLVLLSVAFSNQTSAA-- 373
 MtINT1_1 LALLLSLIVAGMNAVGTILGIYLDNTGRKKLALSSLAGVIASLIMLSVAFYKQSSS--- 370
 MtINT4_1 TAFALSLVTSGLNAVGTIVSMVLIDRFGRKKLMLISLIGIFVSLVTSVTFNQAAHHAPS 358
 MtINT4_2 TALALSLVTSGLNAVGTILSMILIDRFGRKKLMLISLIGICVSLVMSVTFNIASHHAPA 373
 MtINT2_3 TAMLLSLITAGLNAFGLSISYFIDKTGRKKLALISLFGVVLVSLV----- 383
 MtINT2_1 TALLLSLITAGLNAFGLSISYFIDKTGRKKLALISLFGVVLVSLV----- 366
 MtINT2_2 TALLLSLVTAGLNAFGLSISYFIDKTGRKKLALISLFGVVLVSLV----- 369
 * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

MtINT1_4 ----- 376
 MtINT1_3 ----- 400
 MtINT1_2 ----- 373
 MtINT1_1 ----- 370
 MtINT4_1 LSIQDLSLFGGNSTCKAYTAP-NHLSWNCMQCLH--EDCAFCAANSQNEFLPGACLAEEK 415
 MtINT4_2 ISKHDSL SFGGNSTCNAYATAP-NFSSWNCMKCLH--EDCAFCAANTQSEFQPGACLAAGK 430
 MtINT2_3 --EIEYHF--NNTCPAFTP---SRGGWDCTRVLY-----MQLLPGACLI SND 424
 MtINT2_1 VSLVESHY--NNTCEPKTAATNHNWNCMKCIRAESTCGFCAAPGDMTKPGACLISNK 424
 MtINT2_2 VSEIESSKF--NNTCPDYRTAL-DAQWDCMKCLKASPECGFCASAGNKLLPGACLI SND 426



MtINT1_4 -----TNRTYGLWLAIIGLALYIIFFAPGMGPVWPVNSEIYPEEFRG 418
 MtINT1_3 -----TTNQNDLYGLWLAIVVGLALYIAFFSPGMGPVWAVNSEVYPQEYRG 445
 MtINT1_2 -----ASNATGWLAVLGLILYIAFFSPGMGPVWAMNSEIYPKERYG 415
 MtINT1_1 -----TNEVYGWLAIVIGLGLYIGFFSPGMGPVWPVNSEIYPEEFRG 412
 MtINT4_1 NIRGMCCAQ--NCVWFSQGCPSRIGILAVVILGLYIISYAPGIGTVPVWVNSEIYPLRFRG 474
 MtINT4_2 NIRGMCAQ--KRVWFSQGCPSRIGILAVVILGLYIISYAPGIGTVPVWVNSEIYPLRFRG 489
 MtINT2_3 MTKNQCQKG--HRSWYTQGCPSKLGWLAIIGLALYIILFFSPGMGTVPVWVNSEIYPLRFRG 483
 MtINT2_1 NTEDICGVD--HRAWYTKGCPNFGWIAILALALYIIFFSPGMGTVPVWVNSEIYPLRFRG 483
 MtINT2_2 TTEDQCQKEQSRQWYTRGCPNKGWLAIIGLALYIILFFSPGMGTVPVWVNSEIYPLRFRG 486
 * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *



MtINT1_4 VCGGMSATVNWICSVIMSESFSLISDSVGLGGSFVILGVICVVAFFVLLFVPETKGLTF 478
 MtINT1_3 MCGGMSATVNWISNLIVAQSFLSIAEAAAGTGPTFLLLAIIAVIAFLVVFVLPETKGLTF 505
 MtINT1_2 ICGGMSATVCWVSNLIVSQTFLSVAEALGTGPTFLILAVITVLAFLVLLVFPETKGLTF 475
 MtINT1_1 ICGGMAATVCWISNLIVSESFSLIADAIGIASTFLIIAVIAVVAFLVLLVFPETQGLTF 472
 MtINT4_1 IGGGIAAVFNWCANVIMSESFSLMIKLTGTGTFTFAGFSLIGFVAIYLLVFPETKGLQF 534
 MtINT4_2 IGGGIAAVFNWCANLIVSESFSLMIKALGTGTFTFAGFSLIGLVAIYLLVFPETKGLQF 549
 MtINT2_3 VCGGMASTSVWISNLIVSQSFLSLTQAIGVAWTFMLFGVAVIASSFVLLVFPETKGVPI 543
 MtINT2_1 ICGGIASTTVWVSNLVVSQSFLSLTVAIGPAWTFMIFAIIVVAIFVVIIFVPETKGVPM 543
 MtINT2_2 ICGGIASTSNWISNLIVAQSFLSLTDAIGTSYTFMIFIVTVAAIVFVIVFPETKGLPI 546
 : * : : * : : : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : :

MtINT1_4 EEVALIWKKRARGKDYDS-----QNLLEGRSQF- 506
 MtINT1_3 DEVELLWRRERAWGKNPRTKT-----LLERNQSY 534
 MtINT1_2 DEVELIWKERAWGGTINNNNSDSRNLGTDNDQ- 508
 MtINT1_1 DEVELIWKERAWGKNPNTQN-----LLEQGSQS- 500
 MtINT4_1 EEVEKLLQKGFRRPFPFNKKKDDDKGKEEVKHI- 567
 MtINT4_2 EEVEKLLQKGFRRPFPFNKKKDDDKGKEKQVEMA- 582
 MtINT2_3 EEVEKMLQQRTLQFKFWNKRIASQKG----- 569
 MtINT2_1 EEVESMLEKRFVQIKFWKKRDSPEKK----- 570

Mt INT2_2 EVENMLERRTLNFKFWQRNSGSDQALTQKNVSF 580
 : ** : ..

Mt PMT4_3 MGLVDVQENGNNGDVIEIPLGAKNKYIRMT---SEEEEEEE-----GFATRKHDS 49
 Mt PMT4_1 ---MMFQENGNEMGLSGIPLGTKNKYKRMN---SHLVDDND--VLHQ-QQLEDKRNS 51
 Mt PMT6_3 -----MQENNSA-MDELNKQQNYSYSHPLPCSDSNVDQINNEHNI SAEEDCHKNKVYHL 54
 Mt PMT6_4 -----MDSNGKEENTSIRI 14
 Mt PMT3_1 -----MESTCGDVNHL 11
 Mt PMT6_1 -----MIDTQGD-IENQVTKV 15
 Mt PMT6_2 -----MIINQGD-KEDQNTF 15
 Mt PMT5_1 -----MAEEKTPVQLKSLEDFDSQKPKES 24
 Mt PMT5_3 -----MAEGEATVLKSLEDFGPGQKLLKR 23



Mt PMT4_3 KKYIFACAVFASLNSVLLGYDVGVMGSAIIFIQGDLKITEVQQEVLVIGLSIISLLGSLA 109
 Mt PMT4_1 RKYVIACAI FASLNNVLLGYDVGVMGSAVIFIKEDLKITEVQVEFLIGLSIVSLLGSLG 111
 Mt PMT6_3 NKYALAGAILASTNSILLGYDIGVM SGAVIYIRKDLKIS SVQVEILVGC LNVCSLIGSLV 114
 Mt PMT6_4 NRYTL LCALLSSTNSILLGYDIGVM SGASMLIKENLKISRIQQEILVGS LNLCSLIGSLA 74
 Mt PMT3_1 NKHACACVLAATIIISAI FGYVTTVMAGALLFIKEELEISDMQVQLLAGILNACALPACMI 71
 Mt PMT6_1 NKYAFACAI VASMVSIVSGYDTGVMGAMFIQEDLGISDTQQEVLGAILNL CALVGS LT 75
 Mt PMT6_2 NKYAFACAI VASMVSIVSGYDTGVMGAMLFIKEDLGISDTQQEVLGAILNL CALVGS LT 75
 Mt PMT5_1 NKFAFACAI LASMTSILLGYDIGVMGSAVIYIKRDLKLSNVQIEILVGINLFLSLIGSCL 84
 Mt PMT5_3 NKFAFACAI LASMTSILLGYDIGVMGSAIYIKRDLKVTDVQIEILLGINLYSPIGSIYI 83
 : : : . : * * * : * * : * : * : : * : * * : . : . :



Mt PMT4_3 GGKTSDWIGRKTIGLAALIFQTGGAIMTLAPSFVKVLMIGRLIAGVIGFGVMIAPVYIA 169
 Mt PMT4_1 GGRTSDIIGRKWTMALAAVVFQMGGITMTLAPSYQVLMIGRLLAGIGIGFGVMISPIYIA 171
 Mt PMT6_3 SGKISDMIGRRYT IMIAALTF LIGALLMGLAPSFTF LMFGRVIAGIGVGFSLMISPVYVA 174
 Mt PMT6_4 SGKTSDTIGRRYTI VLAATFLIGAI FMSLAPSFLFILTGRMIAGIGVGYALMISPLYTA 134
 Mt PMT3_1 AGRLSDYIGRRYTIMLSSIFFFLGSLIMGYGSSFPILMIGRCIAGFGVGFALIIIVSVYSA 131
 Mt PMT6_1 AGRCSDYIGRRYTI FLASVLF IIGAILMGYGNPNTI LMIGRCICGIGVGFALMVAPVYSA 135
 Mt PMT6_2 AGRTSDYIGRRYTI FLASILF ILGAGLMGYGNPNTI LMVGRVCVCGVGFALMIAPVYSA 135
 Mt PMT5_1 AGRTSDWIGRRYTI VLAGSIF FAGALLMGFSNFAFLMFARFIAGIGIGYALMIAPVYTA 144
 Mt PMT5_3 AGRLSDWIGRRYTI VLAGLIF FVGVAVLMLGSPNYAFLMFGREFAGVIGF AFLIAPVYTS 143
 * : * * * * : * : : . : . * * * * * * . : : . * * * : * : * : : * : :



Mt PMT4_3 EISPAIARGSLTSFPEIFINFGILLGYISNYAFSK-LPAHLNWRIMLGVGLIPSVVIAVA 228
 Mt PMT4_1 EISPNLTRGSLTTFPEIFINVGIMLGYVSNYAFSG-LSVHISWRVMLAVGILPSVFIGFA 230
 Mt PMT6_3 ELSPDLTR GFLTSLPEVFISFGILLGYVSNYALSS-LPIGILNWRIML GIAALPAILVALG 233
 Mt PMT6_4 ELSPDTRGFLTSLPEVFITLIGILGYVINYALTD-LPINLGWRIMLAISALPAILAFG 193
 Mt PMT3_1 EISSPSYRGFLTSLPDL SINIGFLLGYLSNYFLGK-LSLRLGWRIMLAIPSPISIGLVIL 190
 Mt PMT6_1 EISSAHSRGLLASLPELCIGIGIFLGYLSNYFLGKLSLKLGWRLMLAIAAIPSFALAYG 195
 Mt PMT3_2 EISSASSRGLTSLPELCIGIGILLGYISNYVLGKLSLKLGWRLMLGIAALPSFVVAFC 195
 Mt PMT5_1 EVSPASSRGLTSLPEVFINGGILLGYISNYGFSK-LSLRLGWRVMLGIGAI PSVIILAVG 203
 Mt PMT5_3 EVSPTSSRGLTSLPEVFLNGGILVGYISNYGFSK-LPLRYGWRVMLGIGAI PPSIILAMA 202
 * : * * * * : * : : : * : * * : * * : * * * * : * * : : * : :



Mt PMT4_3 LFIIIPESPRWL VVQNRIEEAKLVLSKISESEKDAEKLQEI QKAAGSG-----N 277
 Mt PMT4_1 LFIIIPESPRWL VMQNRIEEARSVLLKTNEDEKEVEERLAEIQQAAGFA-----N 279
 Mt PMT6_3 VLAM PESPRWL VMKGLKEEAKQVLI RTSSNKGEAEFRLSEISQAATNS-----S 282
 Mt PMT6_4 VIFMPESPHWL VFKGRVSEAKRVLLSLSTPPEAE LRLQEI VKNKNDL-----AHG 244
 Mt PMT3_1 MLQLVESPRWL VMQGR LGDAK KVVLLI SNSKQEA EQRMKEI KNAVGI DENC TQNIVHVSK 250
 Mt PMT6_1 ILTMPESPRWL VMQGLGKAKKVL FQVSN TQEAELRFNDIKLAAGLDENCNDEIVKLPQ 255
 Mt PLM3_2 ILTMPESPRWL VMQGLGKAKKVL MQVSN TQEAELRLKDIKIAAGLDENCNDEIVKLPQ 255
 Mt PMT5_1 VLAMPESPRWL VMKGR LGDAI IVLNKTSNSEQEAQLRLSEIKAAAGI PENCTDDVVSVKK 263
 Mt PMT5_3 VLAMPESPRWL VAKGR LGDAI IVLNKTSNSEQEAQLRLSEIKAAAGI PENCTDDVVSVKK 262
 : : : * * : * * : : : . * * * . . : : : : * :



Mt PMT4_3 ADKYETKAVWKEIL-YPSPPVRRMLITGCGIQCFQQTIGIDTTVYYSPTIFKNAGITGNS 336
 Mt PMT4_1 SGKYEDKPVWRELL-SPPPALRRMLITGLGICFCFQQISGIDATVYYSPEILMAAGIEDKS 338
 Mt PMT6_3 TSSRHGGQVWKELLITPTRPVLRI LIAAVGINFFMQASGNDAVIYYSPEV FREAGVKGEK 342
 Mt PMT6_4 PGNWIGQGVWKELLFRPSKPIKRMLISAIGINFFMQASGNDAVIYYSPEV FKAAGIHGKK 304
 Mt PMT3_1 K-TRSGGALKEMFYKPSPHVYRILIAAIGVHIFQNICGVEGIFLYSPRIFGRMGITDKG 309
 Mt PMT6_1 K-SHQQEGVWKEILIRPTPAVRWMLIASVGIHFFEHATGIEAVMLYSHKIFKAGIKSKE 314
 Mt PMT3_2 K-SHQQEGVWKEILIRPTPSVRWMLIAAVGIHFFEHATGIEAVMLYSPRIFR KAGITSKE 314

MtPMT5_1 TNREGNTVWKELFIYPTPAVRHIVIAALGIHFFQASGIDAVVLYSPTIFRKAGLESDT 323
 MtPMT5_3 V---QKGGVWKELFLHPTPAVRHIFIASLGIHFFAQATGIDAVVLYSPRIFEKAGIKSDT 319
 . : * : : * : : * : * : * : * : . * * : : * : . .



MtPMT4_3 ELLAATVAVGFTKTVFILIAILLIDKLGKRPALLYVSTIGMTISLFLSFLAFSLHAK-- 394
 MtPMT4_1 KLLAATVAVGITKTVFILVAIVLIDKVGKRPLLITSTIGMTACLFCMGVTLTLSEKGP-- 396
 MtPMT6_3 Q^LLFGVTI^IIMGLIAKT^CFVLF^SALV^LDRFGRRP^MLLLGSSGMAV^SLFGLGMGCT^LLHNSD-- 400
 MtPMT6_4 KLFGVNVIMGLSKSFVFLSAIYLDKFGRRP^LLLIGSFGMAV^SLFGLGFGSKILEG-S-- 361
 MtPMT3_1 TLLLATVIGIGISQTLFLLSCFLLDKIGRRILLVSSGGVIFSMGLGCVC^SAIVENSKLG 369
 MtPMT6_1 NLLLATIGVGLTKIIFLVLALFLIDKVGRRRLLQVSTAGMIIGLTALGFS^LTMVEHAN-- 372
 MtPMT3_2 KLLLATIGVGLTKIIFLVIALFLLDKIGRRRLLQISTGGMIIGLT^LLGLSLTVVDKSN-- 372
 MtPMT5_1 EQLLATVAVGLAKTVFILVATFLLDKVGRRP^LLLSVGGMVISL^LLAVSLTVVDHSR-- 381
 MtPMT5_3 NKLLATVAVGFVKTMFVLVATFLLDKVGRRVLL^LTSVGG^LLIISL^LLTAISLTIIDNSS-- 377
 : . . : * : : * . . : * : * : * : * : . * : : : . .



MtPMT4_3 ----IGIALAILAVCGNVASFVGLGPICVWLSSEIFPLRLRAQASALGAVGSRVSSGAI 450
 MtPMT4_1 ----LVIALGILFVCGNVAFVSVGLGPVCWVLTSEIFPLRVRAQASALGAVANRVCGLV 452
 MtPMT6_3 EKPM^WAIALCVVAVCAAVS^FSIGL^GETT^WVYSSEIFPMRLRAQGT^SL^AISVNR^LISGV^V 460
 MtPMT6_4 GKPVWAVVVCIVAVCADVSFFSIGLGPITWVYSSEIFPMRLRAQGS^SIAISVNR^LISGV^V 421
 MtPMT3_1 EEPLWAIIFTIIVIIYIMAGFNAIGIGAVTWVYSTEIFPLRLRAQGLGVCVIMNRITNVAV 429
 MtPMT6_1 EEVLWAL^TLSIATYFYVAFNIGLAPVTWLYGSEIFPLK^LRAQGV^SIGVAVNRSMNAAV 432
 MtPMT3_2 GNVLWALILSIVATYAYVAFNIGLGPITWVYSSEIFPLK^LRAQGV^SIGVAVNR^TMNAV 432
 MtPMT5_1 VRQMWAVGLSIAVLSYVATFSIGAGPITWVYSSEIFPLRLRAQGV^SAGV^VVNRVTSGII 441
 MtPMT5_3 ATLTWALSLSIAAVLSYAATFSIGSGPITWVYSSEIFPLRLRAQGV^SIGAVNRVTSGVI 437
 : . : . . : * . * : : * * : : * * . . * . .



MtPMT4_3 SMSFLSVTKAITVAGTFFVFGVISCSAVAFVHYCVPETK^GKSLE^EIEVLFQNVGESQ^ESE 510
 MtPMT4_1 AMSFLSVSDAISFGGTF^LLSAISALAI^VFVFTLVPETK^GKSLE^QIEMMFENEHGSQ^GKE 512
 MtPMT6_3 ^SMSFLS^ISE^EIT^FFGGM^FVLAGV^MVLAT^LFF^YYFLPETK^GKSLE^EIEALFEEELS----- 515
 MtPMT6_4 SMTFLSISKKITFGGMFFVLAGIMVAATGFYVSM^PETK^GKTLEEMETL^FVEDDDDDNNNN 481
 MtPMT3_1 VTSFIS^IYKTIITLGGTF^LLVFGT^NVLGW^FYYSFLPETK^GRSLE^DMETIFGKNSN^SEVQ^M 489
 MtPMT6_1 SMSFIS^IYKALTIGGAFFMFAAISVIAWVFF^FYFLVPETK^GKTLEEMETL^FTKKNK^SGK^SV 492
 MtPMT3_2 SMTFIS^IYKAITIGGSFFM^FAGISVLA^WLFYF^FFLPETK^GKALEMEM^VFTK^KS-SGKNV 491
 MtPMT5_1 SMTFLSLS^DKISIGGAFFLFGGIAACGWI^FFFYTL^LPETQ^GKTLEEMEG^TFGK^FGGK^SNNK 501
 MtPMT5_3 SMTFLSLSNAITIGGAFFL^FAGIAI^VAWIFHYT^MLPE^TQ^GKTLE^EIEG^SFGN^FWRK^PKAS 497
 : * : * : . : . . * * : . * . : * * : : * * : * : *

MtPMT4_3 VEMGDVEHLMQ---KS----- 523
 MtPMT4_1 MELGDVEQLVQ---NKTGLTN-- 530
 MtPMT6_3 ----- 515
 MtPMT6_4 NNEKQGS^HDKG---VDKGVV--- 498
 MtPMT3_1 KYGSNNA----- 496
 MtPMT6_1 AMETYPTQ----- 500
 MtPMT3_2 AIEMDPIQKV----- 501
 MtPMT5_1 G-ANNNGEIQFAN----- 514
 MtPMT5_3 ATAEGANGKIQ^LSTNDKTY^TTMD 520

MtESL6_2 -----MPMGKDYDDFRKPFVNNNNFFLKDINNNN-----N-----NA 32
 MtESL6_4 MS-----LIREDYEDGNLKKPFLNTGSWYRMGSKQTN-----ILNSS^TQYVM 43
 MtESL6_3 ----- 0
 MtESL5_1 -----MKNKFKD-----FSRL^LSSIREEA 19
 MtESL5_2 --MDSKRIE^SSSSSS----SSPLFRGNAESQSQQYDSSDDVASNDEQH^KQKITSSSSS 54
 MtESL7 MKMDIKEDVEGGKQKQ---IREPLIGE^QNN-----QLVH-----ANK 34
 MtESL16_1 MTIEQH^KDIENGETNGFQY^LQEP^FIQQG^KD----ACK-----EVGSDK^SM 41
 MtESL16_2 MTIEQH^KDVESGHENTHRDLQEP^FIQH^GKD----ATVD-----YHDIESN^KRA 44



MtESL6_2 GS-GSFYIVLCV^LLIVALGPIQFG^FTCGYSSPTEADMIQDLNLTISQ^FSLFGSLANIGAMV 91
 MtESL6_4 RD-SSVSVLLCVL^LLIVALGPIQFG^FTCGYTSPTQESIISDLNLSLSEFSLFGSLSNVGMV 102

MtESL6_3 -----MV 2
 MtESL5_1 SSVPTSILILTTLAAVSGSYVFGSAVGYSSPAQSGITDDLNLGVAEYSLFGSILTI GAMI 79
 MtESL5_2 SSI PPTL **FTTTLVAVFGSYVFGTAIGYSSFT**QARIMIDLNL**TVAQFSIFGSI**LTIGAMI 114
 MtESL7 DHHHPWMVYFTTFAVCGSYEFAGACAGYSSPTQEAIRKDLSSLAEYSLFGSILTFGAMI 94
 MtESL16_1 ENGSIGMVLSTFVAVCGSFSFGTCVGYSAPTQAAIRADLNLSLAEFSMFGLVITIGAML 101
 MtESL16_2 ENGSIGMVLSTFVAVCGSFSFGTCVGYSSPTQAAIRADLNLSEFSMFGLVITIGAML 104



MtESL6_2 GATVSGQIAGYFGRKGSILVAAVFNIFGWLAISIAKDSSLLYMGRLLEGFGVGIISYVVP 151
 MtESL6_4 GAIASGQMAEYIGRKGSLIIAAIPNIIGWLAISFAQDSSFLFMGRFLEGFGVGIISYVVP 162
 MtESL6_3 GAIASGQIAEYVGRKGSMLIASIPNIIGWLAISFAKDSSFLFMGRLLLEGFGVGIISYVVP 62
 MtESL5_1 GAIVSGSLADYAGRRAMGFSELCILGWLAIAVSKVAVWLVYVGRLLLGCGMGILSYVVP 139
 MtESL5_2 **GAI VSGTIADYAGRRLAMGFSQLFCISGWLAITIA**KDAW**LYIGRLLVGCIGI**LSYVVP 174
 MtESL7 GAITSGPIADYVGRKGMRVSSAFACIAGWLVVYFSEGPVPLDIGRLATGYGMGVFVFPV 154
 MtESL16_1 GAITSGRVTDIIGRKGAMRISTGFCIIGWLVVFFSKSSYTLDLGRFFTGYGIGVISYVVP 161
 MtESL16_2 GAITSGRITDFIGRKGAMRLSTGFCITGWLVVFFSKDPYSLDIGRFFFTGYGIGVISYVVP 164



MtESL6_2 VYIAEISPRTMRGSLGSVNQLSVTIGIMLAYLLGMFFKWRTLISILGILPCAILIPGLYFI 211
 MtESL6_4 VYIAEVSPQNMRTLGSVNQLSVTIGILLAYLLGLFVNWRILAVLGIPLCTILIPGLFFFI 222
 MtESL6_3 VYIAEIPENMRGSLGSVNQLSVTIGIMLAYLLGLFANWRVLAAILGILPCTVLIPLGLFFFI 122
 MtESL5_1 IYIAEITPKDLRGGFTAVHQLMICFGVSLTYLIGAFLNWRLLAIGTIPCLAQLLSLSFI 199
 MtESL5_2 **VYIAEITPKNLRGFTAVHQLMICCGMSLTYLIGAF**VNWR**ILAIIGIVPCLVQLLSV**PF 234
 MtESL7 VFVAEIPAKELRGALTTLNQFMIVTAVSVSFIIGTVLSWRALAIIGLIPAVLLGLFFFI 214
 MtESL16_1 VYIAEIPAKNLRGGGLATTNQLMIVIGSSMSFLIGSIINWRQLALAGLVPCICLLVGLCFI 221
 MtESL16_2 VYIAEIPAKNLRGGGLATTNQLMIVIGASVSFLGSLVSWRKLALAGLLPCLSLLLIGLCFI 224

MtESL6_2 PESRWLAEMGMDKFESSLQSLRGPVDINIEAQEIQGSLASNNTTDTVRIADLKKRKY 271
 MtESL6_4 PESRWLAKMRMTEEFETSLQVLRGFDTDISLEVHEIKKSVESMGKGVTIQFADLKMKKY 282
 MtESL6_3 PESRWLAKMGMEEFETSLQVLRGFDTDISLEVHEIKKAVASNGKRATIRFADLQRRKY 182
 MtESL5_1 PESRWLAKVGRLESESTLQHLRGNVDISEEATEIREFTEASQQQTEANIIFGLFQLQY 259
 MtESL5_2 PDSRWLAKMGRLEKESDSSLQRLRGNADVYKEANEIRDYTEALQQQTEANIIFGLFQLQY 294
 MtESL7 PESRWLAKRGHAKDFVAALQILRCKDADISEEAGEIQDYITSLQQLAKPKVLDLFPQRY 274
 MtESL16_1 PESRWLAKVGREKEFQLALRKLKRGKIDIDISDEANEILDNIETLQSLPKTKFLDLFQSKY 281
 MtESL16_2 PESRWLAKVGREKEFQVALRRLRGNVDISEEATEILDYIETLQNLPKVKLLDLFQNKH 284



MtESL6_2 WFPLMVGGLLVLLVQLSGINGVFFYASKIFSSAGISSSNAATFGLGAIQVVMGTGVAWLV 331
 MtESL6_4 WFPLMVGIGLLVLLVQLSGTNGVLFYSSTIFLNAGVSSSNAATVGLGIIQI----- 332
 MtESL6_3 WFPLSVGIGLLVLLVQLSGINGVLFYSTSIFANAGISSSNAATVGLGAIQVIATGVAWLV 242
 MtESL5_1 LKSLTVGVGLIILQQFQGVNAIAFYASSIFVSAFGRS-IGTIAMVVVQIPMTALGVILM 318
 MtESL5_2 LKSL**TVGLGLMILQQFQGGINGIVFYANS**IFISA**GLSES-IGTIAMVAVKIPMTTLGV**FLM 353
 MtESL7 LRSITIGVGLMVCQQLGGINGVCFYTSIFDLAGFPSA-TGSIIYAILQIVITGVGAALI 333
 MtESL16_1 VRSVIIGVGLMAFQQSVGINGIGFYTAETFVAAGLSSAKAGTIAYACIQVPFTLLGAILM 341
 MtESL16_2 ARSVIIGVGLMVCQSVGINGIGFYTSETFVAAGLSSGKIGTIAYACMQVPFTLLGAILM 344



MtESL6_2 DRSGRRVLLIVSSSVMTVSLLLVATAFYLQGVVTSGSDLYRMMGMLSVVGLVALVIGFAL 391
 MtESL6_4 -----SSSMTGSLFLVSIIFYFEGVTEKDSPLYSFLGILSVVGLVAMVIGYSL 381
 MtESL6_3 DKSGRRVLLIISLMTASLLVVSIAFYLEGVVEKDSQYFSILGIIISVGLVVMVIGFSL 302
 MtESL5_1 DKSGRRPLLLISASGTCCLGCLVLSLFFYLQDLH---K--EFSPILALVGLVLYTGSFSL 372
 MtESL5_2 DKSGRR**PLLLLSAVGTCLGCLLAALSFFL**QDIH---KWKEVSP**ILALVGLVLYVGSYSI** 409
 MtESL7 DRAGRKPLLLVSGSGLVAGCIFTAVAFYLVKVD---VAVGAVPALAVTGILVYIGSFSI 389
 MtESL16_1 DKSGRKPLITVSASGTFGLGCFITGVAFFKNQS---LWLEWVPTLAVAGVLIYIAAFSI 397
 MtESL16_2 DKSGRRPLITASASGTFGLGCFMTGIAFFLKDQN---LLELVPIAVAGILYIYVAAFSI 400



MtESL6_2 GIGPIPWLIMSEILPVPNIKLAGSAAATFLNWFTASLITMTAHFLDWSNAGTFTIYAIIFS 451
 MtESL6_4 GLGPIPWLIMSEILPVPNIKLAGSIATLTLNWLTSWIITMTANLLLTWSSGGTFLIYTVMA 441
 MtESL6_3 GLGPIPWLIMSEILPVPNIKLAGSSTATMANWLVAWIITMTANLLLTWSSGGTFLIYTVVA 362
 MtESL5_1 GGGIPWVIMSEIFPINVKGSAGSFVTFVHWLCSWIVSYAFNFLMSWNSAGTFFIFSTIC 432
 MtESL5_2 **GMGAIPWVIMSEIFPINVKGSAGSLVTLNWLCSWIIISYAFNFL**MTWSST**GTFFGFAAIC** 469
 MtESL7 GMGAIPWVIMSEIFPVPNIKQAGSIATLVNWFAGAWLCSYTFNFLMSWSSYGTFFLYAAIN 449
 MtESL16_1 GLGSPVWMMSEVFPINVKGTAGSLVVLVAWLGAWIVSYTFNFLMSWSSPGTMFFYAGCS 457

MtpGlcT1 FVVGLFFLELVEKFGVAPVYASFGAVSLAAAFAHYFLVETKGCSLLEEIERLSNSKA 535
MtpGlcT2 FFVGLFLRLLEKLGALQLLYSMFATFCIMAVIFVKRNVEVKGKSLQEIEIALLPQE 490
MtpGlcT4 FVIGLYFLSVVKNKIGISSVYLGFSSTVCLLAVLYIAANVVEVKGRSLEEIERALTPPT 506
*.:** ** :.:*: * :* *.:.:*: . : :***** **:*** :*

Εικόνα Π1: Στοίχιση (alignment) και διαμεμβρανικές περιοχές των *MtSTPs*, *MtINTs*, *MtPMTs*, *MtESLs* και *MtpGlcTs* του *M. truncatula*.

Πίνακας Π2: Οι τιμές των σχετικών εκφράσεων (mean ratio) όλων των *MtMSTs* των φυτών των τριών διαφορετικών ομάδων φυτών στα φυμάτια, καθώς και τα αντίστοιχα τυπικά σφάλματα και οι αντίστοιχες p-values τους. Με έντονη γραφή απεικονίζονται οι *MtMSTs* που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές, έπειτα από ANOVA και post-hoc Tukey HSD ανάλυση.

Όνομα γονιδίου	Φυμάτια								
	κav. φov.		24h σκoτάδι		72h σκoτάδι		p-value		
	Mean Ratio	Standard Error	Mean Ratio	Standard Error	Mean Ratio	Standard Error	κ.φ.-24h σκoτάδι	κ.φ.-72h σκoτάδι	24h σκoτ-72h σκoτ
MtSTP1_1	0.821	0.162	0.027	0.018	0.777	0.100	0.005	0.957	0.007
MtSTP1_2	0.726	0.026	0.009	0.003	0.517	0.041	0.000	0.005	0.000
MtSTP1_3	0.479	0.061	0.007	0.001	0.428	0.091	0.005	0.844	0.008
MtSTP1_4	0.801	0.035	0.023	0.011	0.721	0.052	0.000	0.338	0.000
MtSTP1_5	0.611	0.070	0.061	0.022	0.606	0.048	0.001	0.997	0.001
MtSTP1_6	1.2204	0.2567	1.3593	0.2282	0.9599	0.3176	0.9305	0.7821	0.5780
MtSTP1_7	0.781	0.036	0.056	0.007	0.785	0.090	0.000	0.998	0.000
Mtst1	1.039	0.098	0.982	0.056	1.076	0.349	0.981	0.992	0.948
MtSTP3_1	0.597	0.084	0.024	0.002	0.534	0.046	0.001	0.708	0.001
MtSTP3_2	0.956	0.037	0.022	0.005	0.952	0.111	0.000	0.999	0.000
MtSTP5_1	0.681	0.148	0.277	0.146	0.496	0.018	0.121	0.559	0.452
MtSTP5_2	1.1344	0.3138	0.0000	0.0000	0.8040	0.1935	0.0217	0.5495	0.0821
MtSTP5_3	1.6016	0.3822	0.0000	0.0000	1.2318	0.4085	0.0295	0.7112	0.0795
MtSTP5_4	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	x	x	x
MtSTP7_1	0.104	0.021	0.004	0.001	0.098	0.009	0.004	0.937	0.006
MtSTP7_2	1.5153	0.3737	0.6740	0.1439	0.8712	0.4731	0.1920	0.4898	0.7206
MtSTP7_3	0.808	0.180	0.041	0.003	1.077	0.644	0.396	0.877	0.219
MtSTP7_4	0.002	0.001	0.017	0.017	0.004	0.002	0.581	0.946	0.761
MtSTP7_5	0.676	0.039	0.139	0.026	0.638	0.039	0.000	0.729	0.000
MtSTP7_6	0.6763	0.0385	0.1391	0.0261	0.6378	0.0388	0.0001	0.7289	0.0001
MtSTP10_1	0.7475	0.1015	0.0114	0.0044	0.6203	0.0872	0.0013	0.5144	0.0034
MtSTP10_2	0.748	0.102	0.011	0.004	0.620	0.087	0.001	0.514	0.003
MtSTP10_3	0.533	0.045	0.007	0.003	0.480	0.045	0.000	0.599	0.000
MtSTP13	1.424	0.275	0.558	0.041	0.239	0.020	0.021	0.005	0.397
MtSTP13_1	0.473	0.033	0.011	0.002	0.460	0.026	0.000	0.929	0.000
MtSTP13_2	0.677	0.076	0.017	0.002	0.453	0.018	0.000	0.030	0.001
MtSTP13_3	0.872	0.508	0.119	0.001	0.438	0.025	0.243	0.578	0.734
MtSTP14_1	0.033	0.006	0.021	0.003	2.134	0.770	1.000	0.036	0.035
MtSTP14_2	0.264	0.091	0.005	0.002	0.191	0.008	0.030	0.614	0.102
MtSTP14_3	0.614	0.090	0.652	0.176	0.815	0.086	0.975	0.524	0.643
MtINT1_1	0.652	0.189	0.317	0.130	0.558	0.053	0.265	0.878	0.468
MtINT1_2	0.770	0.112	0.048	0.026	0.589	0.031	0.001	0.230	0.003
MtINT1_3	0.635	0.026	0.200	0.077	0.844	0.060	0.004	0.099	0.001
MtINT1_4	0.961	0.135	1.018	0.276	0.601	0.028	0.972	0.385	0.295
MtINT2_1	0.349	0.020	0.136	0.062	0.389	0.046	0.039	0.818	0.019
MtINT2_2	0.750	0.061	0.019	0.010	0.670	0.070	0.000	0.578	0.000
MtINT2_3	0.904	0.090	0.088	0.007	0.543	0.031	0.000	0.009	0.003
MtINT4_1	0.543	0.035	0.012	0.005	0.522	0.014	0.000	0.785	0.000
MtINT4_2	0.192	0.060	0.115	0.051	0.220	0.011	0.504	0.903	0.310
MtTMT2_1	0.184	0.044	0.127	0.046	0.172	0.013	0.553	0.970	0.685
MtTMT2_2	1.659	0.709	0.874	0.358	1.370	0.813	0.691	0.948	0.858
MtTMT3_1	1.353	0.378	0.440	0.155	1.479	0.053	0.078	0.927	0.049
MtTMT3_2	0.630	0.067	0.016	0.005	0.564	0.007	0.000	0.487	0.000
MtTMT3_3	0.189	0.022	0.005	0.001	0.202	0.021	0.001	0.867	0.001
MtPMT3_1	0.230	0.089	0.102	0.005	0.014	0.005	0.262	0.058	0.498
MtPMT4_1	0.473	0.103	0.185	0.055	0.332	0.027	0.059	0.381	0.355
MtPMT4_2	0.4728	0.1028	0.1853	0.0551	0.3321	0.0272	0.0586	0.3811	0.3551
MtPMT4_3	0.361	0.027	0.018	0.002	0.345	0.040	0.000	0.922	0.000
MtPMT5_1	0.779	0.188	0.015	0.008	0.986	0.092	0.011	0.696	0.005
MtPMT5_2	0.2145	0.0389	0.7258	0.2176	0.6431	0.2874	0.2711	0.3777	0.9582
MtPMT5_3	1.159	0.266	0.072	0.032	1.251	0.924	0.406	0.993	0.355
MtPMT6_1	1.326	0.074	0.788	0.183	0.769	0.057	0.042	0.037	0.993
MtPMT6_2	0.656	0.031	0.022	0.018	0.597	0.035	0.000	0.346	0.000
MtPMT6_3	0.794	0.280	0.030	0.006	0.499	0.078	0.041	0.473	0.197
MtPMT6_4	0.213	0.012	0.025	0.014	0.246	0.022	0.000	0.383	0.000
MtESL5_1	0.497	0.061	1.352	0.232	0.445	0.024	0.011	0.963	0.009
MtESL5_2	0.938	0.052	0.847	0.259	1.186	0.107	0.919	0.566	0.372
MtESL6_1	2.5878	0.5425	6.6000	1.2839	4.0641	0.7049	0.0368	0.4862	0.1697
MtESL6_2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	x	x	x
MtESL6_3	0.643	0.058	1.009	0.215	1.048	0.142	0.281	0.224	0.982
MtESL6_4	0.188	0.032	0.045	0.009	0.117	0.010	0.006	0.099	0.100
MtESL7	0.649	0.048	0.658	0.387	0.183	0.019	1.000	0.372	0.361
MtESL7_1	1.3963	0.2082	0.0000	0.0000	1.4563	0.3225	0.0102	0.9801	0.0084
MtESL16_1	0.162	0.009	0.007	0.001	0.207	0.015	0.000	0.049	0.000
MtESL16_2	0.043	0.030	0.015	0.010	0.024	0.009	0.473	0.753	0.870
MtpGlcT1	0.443	0.123	0.085	0.018	0.606	0.059	0.076	0.625	0.024
MtpGlcT2	0.710	0.159	0.304	0.105	0.512	0.049	0.098	0.480	0.445
MtpGlcT3	2.9046	0.7207	0.9921	0.2326	1.3947	0.6767	0.1307	0.2414	0.8806
MtpGlcT4	0.071	0.029	0.115	0.037	0.057	0.006	0.532	0.931	0.358
MtpGlcT4_1	2.1990	0.3125	5.1506	0.8760	2.1619	0.7029	0.0480	0.9992	0.0458
MtVGT2_1	0.113	0.043	0.844	0.297	0.351	0.254	0.135	0.749	0.341

Πίνακας Π3: Οι τιμές των σχετικών εκφράσεων (mean ratio) όλων των *MtMSTs* των φυτών των τριών διαφορετικών ομάδων φυτών στις ρίζες, καθώς και τα αντίστοιχα τυπικά σφάλματα και οι αντίστοιχες p-values. Με έντονη γραφή απεικονίζονται οι *MtMSTs* που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές, έπειτα από ANOVA και post-hoc Tukey HSD ανάλυση.

Όνομα γονιδίου	Ρίζες								
	καν. φωτ.		24h σκοτάδι		72h σκοτάδι		p-value		
	Mean Ratio	Standard Error	Mean Ratio	Standard Error	Mean Ratio	Standard Error	κ.φ.-24h σκοτάδι	κ.φ.-72h σκοτάδι	24h σκοτ-72h σκοτ
<i>MtSTP1_1</i>	0,008	0,000	0,000	0,000	0,027	0,008	0,704	0,042	0,016
<i>MtSTP1_2</i>	0,002	0,002	0,005	0,001	0,010	0,004	1,000	0,000	0,000
<i>MtSTP1_3</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,033	0,006	x	x	x
<i>MtSTP1_4</i>	0,008	0,000	0,000	0,000	0,011	0,001	0,305	0,027	0,204
<i>MtSTP1_5</i>	0,025	0,002	0,034	0,006	0,065	0,013	0,702	0,029	0,080
<i>MtSTP1_6</i>	0,5592	0,2627	0,8641	0,3039	1,1733	0,5238	0,8425	0,5272	0,8386
<i>MtSTP1_7</i>	0,021	0,008	0,114	0,012	0,226	0,069	x	x	x
<i>Mst1</i>	1,471	0,226	1,806	0,405	2,677	0,266	0,734	0,073	0,194
<i>MtSTP3_1</i>	0,005	0,000	0,010	0,001	0,026	0,007	0,717	0,277	0,654
<i>MtSTP3_2</i>	0,034	0,010	0,060	0,016	0,070	0,006	0,573	0,872	0,851
<i>MtSTP5_1</i>	0,277	0,011	0,229	0,037	0,148	0,009	0,352	0,016	0,098
<i>MtSTP5_2</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	x	x	x
<i>MtSTP5_3</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2836	0,2836	1,0000
<i>MtSTP5_4</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	x	x	x
<i>MtSTP7_1</i>	0,000	0,000	0,001	0,000	0,002	0,000	0,648	0,165	0,494
<i>MtSTP7_2</i>	0,5602	0,3347	0,6656	0,1243	0,3529	0,0909	0,9353	0,7783	0,5816
<i>MtSTP7_3</i>	0,073	0,015	0,053	0,014	0,018	0,004	0,486	0,040	0,184
<i>MtSTP7_4</i>	0,012	0,003	0,019	0,001	0,040	0,015	0,851	0,145	0,289
<i>MtSTP7_5</i>	0,214	0,034	0,143	0,020	0,097	0,010	0,163	0,029	0,404
<i>MtSTP7_6</i>	0,2142	0,0343	0,1432	0,0199	0,0969	0,0097	0,1631	0,0290	0,4043
<i>MtSTP10_1</i>	0,0069	0,0000	0,0022	0,0000	0,0090	0,0026	1,0000	0,0133	0,0133
<i>MtSTP10_2</i>	0,007	0,000	0,002	0,000	0,009	0,003	1,000	0,013	0,013
<i>MtSTP10_3</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,021	0,007	0,668	0,380	0,847
<i>MtSTP13</i>	0,060	0,014	0,032	0,008	0,010	0,001	0,307	0,030	0,224
<i>MtSTP13_1</i>	0,005	0,000	0,003	0,000	0,014	0,003	0,536	0,033	0,009
<i>MtSTP13_2</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005	0,000	x	x	x
<i>MtSTP13_3</i>	0,841	0,148	0,307	0,078	0,396	0,089	0,031	0,063	0,838
<i>MtSTP14_1</i>	0,009	0,002	0,003	0,000	0,000	0,000	0,496	0,800	0,234
<i>MtSTP14_2</i>	0,001	0,000	0,000	0,000	0,004	0,002	x	x	x
<i>MtSTP14_3</i>	0,652	0,055	1,486	0,427	2,418	0,221	0,167	0,010	0,122
<i>MtINT1_1</i>	0,293	0,030	0,333	0,033	0,587	0,007	0,555	0,001	0,001
<i>MtINT1_2</i>	0,025	0,007	0,127	0,017	0,314	0,045	0,094	0,001	0,008
<i>MtINT1_3</i>	0,128	0,009	0,628	0,204	1,648	0,146	0,110	0,001	0,006
<i>MtINT1_4</i>	0,483	0,084	0,793	0,069	0,968	0,073	0,062	0,010	0,303
<i>MtINT2_1</i>	0,536	0,015	0,169	0,049	0,108	0,010	0,000	0,000	0,384
<i>MtINT2_2</i>	0,039	0,006	0,016	0,007	0,013	0,007	0,099	0,071	0,962
<i>MtINT2_3</i>	0,104	0,016	0,078	0,008	0,076	0,012	0,358	0,314	0,993
<i>MtINT4_1</i>	0,016	0,006	0,012	0,005	0,025	0,004	0,829	0,508	0,258
<i>MtINT4_2</i>	0,013	0,004	0,066	0,036	0,132	0,010	0,261	0,018	0,153
<i>MtTMT2_1</i>	0,176	0,021	0,199	0,023	0,115	0,014	0,708	0,159	0,057
<i>MtTMT2_2</i>	0,497	0,057	0,435	0,044	0,346	0,033	0,631	0,127	0,408
<i>MtTMT3_1</i>	1,698	0,122	0,997	0,345	2,824	0,526	0,427	0,159	0,030
<i>MtTMT3_2</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,526	0,775	0,898
<i>MtTMT3_3</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	0,005	1,000	0,483	0,483
<i>MtPMT3_1</i>	0,008	0,000	0,005	0,003	0,009	0,008	x	x	x
<i>MtPMT4_1</i>	0,460	0,011	0,385	0,069	0,243	0,029	0,489	0,029	0,132
<i>MtPMT4_2</i>	0,4599	0,0113	0,3850	0,0689	0,2433	0,0288	0,4889	0,0294	0,1323
<i>MtPMT4_3</i>	0,123	0,006	0,056	0,025	0,026	0,005	0,042	0,009	0,405
<i>MtPMT5_1</i>	0,012	0,001	0,003	0,000	0,012	0,004	0,025	0,933	0,039
<i>MtPMT5_2</i>	0,8211	0,4290	0,5782	0,1446	0,8737	0,3218	0,8573	0,9926	0,7984
<i>MtPMT5_3</i>	0,448	0,028	0,340	0,014	0,545	0,087	0,381	0,458	0,078
<i>MtPMT6_1</i>	0,167	0,003	0,156	0,053	0,008	0,003	0,965	0,024	0,033
<i>MtPMT6_2</i>	0,005	0,001	0,009	0,006	0,019	0,006	0,982	0,101	0,127
<i>MtPMT6_3</i>	0,958	0,078	0,145	0,015	0,314	0,017	0,000	0,000	0,094
<i>MtPMT6_4</i>	0,009	0,003	0,007	0,001	0,007	0,001	0,905	0,732	0,938
<i>MtESL5_1</i>	1,665	0,067	1,013	0,067	1,335	0,140	0,008	0,118	0,127
<i>MtESL5_2</i>	1,322	0,113	0,799	0,031	1,543	0,060	0,007	0,179	0,001
<i>MtESL6_1</i>	1,9835	1,4145	14,7505	1,6309	20,6087	0,5466	0,0056	0,0010	0,1915
<i>MtESL6_2</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	1,000	0,109	0,109
<i>MtESL6_3</i>	0,991	0,040	1,673	0,201	4,017	0,304	0,136	0,000	0,001
<i>MtESL6_4</i>	0,177	0,018	0,100	0,012	0,035	0,010	0,020	0,001	0,041
<i>MtESL7</i>	0,756	0,098	0,403	0,045	0,358	0,026	x	x	x
<i>MtESL7_1</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	x	x	x
<i>MtESL16_1</i>	0,124	0,027	0,133	0,045	0,466	0,041	0,987	0,002	0,002
<i>MtESL16_2</i>	0,516	0,068	0,308	0,045	0,017	0,003	0,047	0,001	0,001
<i>MtpGlcT1</i>	0,107	0,008	0,113	0,004	0,150	0,007	0,997	0,048	0,044
<i>MtpGlcT2</i>	0,545	0,067	0,558	0,080	0,290	0,042	0,988	0,072	0,060
<i>MtpGlcT3</i>	1,6459	0,0000	0,9117	0,3423	0,3266	0,1754	0,3078	0,1927	0,9248
<i>MtpGlcT4</i>	0,267	0,035	0,195	0,049	0,349	0,065	0,606	0,527	0,163
<i>MtpGlcT4_1</i>	2,7891	0,5171	6,0914	1,2748	2,5803	0,5142	0,8369	0,5308	0,2768
<i>MtVGT2_1</i>	0,421	0,060	0,797	0,044	1,169	0,112	0,032	0,001	0,034

Πίνακας Π4: Οι τιμές των σχετικών εκφράσεων (mean ratio) όλων των *MtMSTs* των φυτών των τριών διαφορετικών ομάδων φυτών στα φύλλα, καθώς και τα αντίστοιχα τυπικά σφάλματα και οι αντίστοιχες p-values. Με έντονη γραφή απεικονίζονται οι *MtMSTs* που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές, έπειτα από ANOVA και post-hoc Tukey HSD ανάλυση.

Όνομα γονιδίου	Φύλλα								
	καν. φωστ.		24h σκοτάδι		72h σκοτάδι		p-value		
	Mean Ratio	Standard Error	Mean Ratio	Standard Error	Mean Ratio	Standard Error	κ.φ.-24h σκοτάδι	κ.φ.-72h σκοτάδι	24h σκοτ-72h σκοτ
<i>MtSTP1_1</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	x	x	x
<i>MtSTP1_2</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,456	0,456	1,000
<i>MtSTP1_3</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	x	x	x
<i>MtSTP1_4</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	x	x	x
<i>MtSTP1_5</i>	0,008	0,003	0,011	0,002	0,005	0,002	0,697	0,642	0,258
<i>MtSTP1_6</i>	0,1310	0,0555	0,2624	0,1290	0,1665	0,0308	0,9127	0,9419	0,9966
<i>MtSTP1_7</i>	0,016	0,002	0,094	0,031	0,076	0,005	0,051	0,808	0,024
<i>Mst1</i>	1,204	0,228	2,754	0,203	1,353	0,179	0,004	0,866	0,007
<i>MtSTP3_1</i>	0,102	0,023	0,178	0,043	0,032	0,009	0,219	0,269	0,025
<i>MtSTP3_2</i>	0,561	0,028	0,116	0,023	0,156	0,022	0,000	0,000	0,507
<i>MtSTP5_1</i>	0,002	0,000	0,000	0,000	0,005	0,000	x	x	x
<i>MtSTP5_2</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	x	x	x
<i>MtSTP5_3</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	x	x	x
<i>MtSTP5_4</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	x	x	x
<i>MtSTP7_1</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	x	x	x
<i>MtSTP7_2</i>	0,4626	0,1912	2,9220	0,9412	2,0385	0,3243	0,0564	0,2177	0,5661
<i>MtSTP7_3</i>	0,126	0,008	0,081	0,030	0,013	0,002	0,260	0,011	0,084
<i>MtSTP7_4</i>	0,004	0,001	0,006	0,002	0,013	0,001	0,401	0,005	0,021
<i>MtSTP7_5</i>	0,208	0,023	0,193	0,021	0,180	0,027	0,908	0,704	0,917
<i>MtSTP7_6</i>	0,2075	0,0227	0,1934	0,0211	0,1800	0,0265	0,9078	0,7039	0,9166
<i>MtSTP10_1</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	x	x	x
<i>MtSTP10_2</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	x	x	x
<i>MtSTP10_3</i>	0,000	0,000	0,004	0,000	0,004	0,000	x	x	x
<i>MtSTP13</i>	0,003	0,002	0,000	0,000	0,001	0,000	0,238	0,238	1,000
<i>MtSTP13_1</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	x	x	x
<i>MtSTP13_2</i>	0,004	0,000	0,008	0,000	0,000	0,000	x	x	x
<i>MtSTP13_3</i>	0,384	0,128	0,625	0,158	0,126	0,027	0,380	0,339	0,056
<i>MtSTP14_1</i>	0,042	0,006	0,009	0,005	0,000	0,000	0,005	0,002	0,417
<i>MtSTP14_2</i>	0,001	0,000	0,002	0,001	0,001	0,000	0,546	0,558	0,152
<i>MtSTP14_3</i>	0,438	0,048	3,507	0,400	0,594	0,059	0,000	0,889	0,000
<i>MtINT1_1</i>	0,716	0,018	0,420	0,073	1,697	0,101	0,064	0,000	0,000
<i>MtINT1_2</i>	0,081	0,016	0,066	0,027	0,462	0,034	0,922	0,000	0,000
<i>MtINT1_3</i>	0,827	0,278	2,806	0,039	3,393	0,446	0,006	0,002	0,441
<i>MtINT1_4</i>	0,493	0,090	0,322	0,169	1,093	0,100	0,271	0,023	0,004
<i>MtINT2_1</i>	0,123	0,013	0,385	0,040	0,215	0,023	0,001	0,123	0,011
<i>MtINT2_2</i>	0,076	0,018	0,023	0,006	0,072	0,007	0,044	0,966	0,060
<i>MtINT2_3</i>	0,054	0,012	0,023	0,006	0,013	0,000	0,042	0,010	0,460
<i>MtINT4_1</i>	0,020	0,004	0,018	0,003	0,032	0,001	0,860	0,055	0,029
<i>MtINT4_2</i>	0,001	0,000	0,011	0,005	0,004	0,002	x	x	x
<i>MtTMT2_1</i>	0,136	0,017	0,125	0,004	0,039	0,007	0,877	0,010	0,018
<i>MtTMT2_2</i>	0,399	0,033	0,218	0,009	0,187	0,020	0,003	0,001	0,630
<i>MtTMT3_1</i>	1,949	0,218	1,254	0,153	1,211	0,218	0,105	0,086	0,987
<i>MtTMT3_2</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	x	x	x
<i>MtTMT3_3</i>	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,112	1,000	0,112
<i>MtPMT3_1</i>	0,007	0,002	0,000	0,000	0,002	0,001	x	x	x
<i>MtPMT4_1</i>	0,266	0,017	0,347	0,052	0,186	0,025	0,298	0,303	0,038
<i>MtPMT4_2</i>	0,2664	0,0169	0,3472	0,0521	0,1863	0,0245	0,2984	0,3030	0,0385
<i>MtPMT4_3</i>	0,010	0,003	0,003	0,001	0,000	0,000	0,070	0,018	0,538
<i>MtPMT5_1</i>	0,007	0,000	0,011	0,000	0,013	0,002	0,469	0,698	0,173
<i>MtPMT5_2</i>	1,9351	0,2456	1,0784	0,2157	0,0889	0,0068	0,0421	0,0011	0,0234
<i>MtPMT5_3</i>	4,179	0,297	2,298	0,307	1,128	0,034	0,004	0,000	0,036
<i>MtPMT6_1</i>	0,000	0,000	0,021	0,000	0,000	0,000	x	x	x
<i>MtPMT6_2</i>	0,001	0,000	0,013	0,008	0,024	0,009	0,691	0,111	0,320
<i>MtPMT6_3</i>	0,445	0,019	0,146	0,057	0,055	0,007	0,002	0,001	0,238
<i>MtPMT6_4</i>	0,008	0,001	0,012	0,001	0,014	0,003	0,363	0,125	0,682
<i>MtESL5_1</i>	4,963	0,306	10,732	1,459	5,264	0,364	0,009	0,969	0,011
<i>MtESL5_2</i>	1,058	0,101	3,759	0,449	4,055	0,700	0,018	0,011	0,904
<i>MtESL6_1</i>	0,1326	0,0678	5,3037	1,3229	19,3019	1,5701	0,0491	0,0001	0,0004
<i>MtESL6_2</i>	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,483	0,483	1,000
<i>MtESL6_3</i>	1,668	0,026	6,448	1,281	6,939	0,626	0,015	0,009	0,908
<i>MtESL6_4</i>	0,000	0,000	0,013	0,000	0,000	0,000	x	x	x
<i>MtESL7</i>	2,392	0,053	4,190	0,289	2,597	0,135	0,001	0,000	0,000
<i>MtESL7_1</i>	0,1124	0,0202	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,1254	0,1254	1,0000
<i>MtESL16_1</i>	0,000	0,000	0,206	0,012	0,013	0,001	x	x	x
<i>MtESL16_2</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	0,000	x	x	x
<i>MtpGlcT1</i>	0,308	0,025	0,154	0,037	0,146	0,019	0,017	0,020	0,990
<i>MtpGlcT2</i>	0,858	0,059	0,604	0,078	0,809	0,090	0,128	0,896	0,226
<i>MtpGlcT3</i>	2,0326	0,7331	0,4529	0,0343	0,2381	0,1218	0,0898	0,0576	0,9341
<i>MtpGlcT4</i>	0,085	0,011	0,044	0,019	0,063	0,009	0,165	0,535	0,604
<i>MtpGlcT4_1</i>	9,4941	1,5512	6,9807	0,9117	7,4429	0,4820	0,2469	0,3675	0,9418
<i>MtVGT2_1</i>	0,554	0,040	1,088	0,107	1,123	0,021	0,003	0,002	0,930

Πίνακας Π5: Οι τιμές των σχετικών εκφράσεων (mean ratio) όλων των *MtMSTs* των φυτών των τριών διαφορετικών ομάδων φυτών στους βλαστούς, καθώς και τα αντίστοιχα τυπικά σφάλματα και οι αντίστοιχες p-values. Με έντονη γραφή απεικονίζονται οι *MtMSTs* που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές, έπειτα από ANOVA και post-hoc Tukey HSD ανάλυση.

Όνομα γονιδίου	Βλαστοί								
	καν. φωτ.		24h σκοτάδι		72h σκοτάδι		p-value		
	Mean Ratio	Standard Error	Mean Ratio	Standard Error	Mean Ratio	Standard Error	κ.φ.-24h σκοτάδι	κ.φ.-72h σκοτάδι	24h σκοτ-72h σκοτ
<i>MtSTP1_1</i>	0,009	0,003	0,007	0,007	0,007	0,004	0,978	0,988	0,936
<i>MtSTP1_2</i>	0,018	0,011	0,000	0,000	0,016	0,007	0,252	0,972	0,332
<i>MtSTP1_3</i>	0,007	0,004	0,013	0,000	0,014	0,005	0,417	0,924	0,266
<i>MtSTP1_4</i>	0,028	0,022	0,009	0,000	0,015	0,005	0,399	0,957	0,539
<i>MtSTP1_5</i>	0,013	0,005	0,044	0,014	0,032	0,002	0,103	0,339	0,632
<i>MtSTP1_6</i>	0,2572	0,0889	0,3190	0,1275	0,7205	0,0320	0,8844	0,0272	0,0481
<i>MtSTP1_7</i>	0,024	0,010	0,233	0,046	0,311	0,024	0,007	0,001	0,242
<i>Mtst1</i>	0,743	0,108	2,748	0,236	2,851	0,120	0,000	0,000	0,900
<i>MtSTP3_1</i>	0,054	0,028	0,210	0,023	0,103	0,019	0,008	0,365	0,041
<i>MtSTP3_2</i>	0,363	0,248	0,114	0,042	0,135	0,005	0,488	0,540	0,995
<i>MtSTP5_1</i>	0,015	0,007	0,001	0,000	0,013	0,002	0,238	0,860	0,122
<i>MtSTP5_2</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	x	x	x
<i>MtSTP5_3</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	x	x	x
<i>MtSTP5_4</i>	0,0623	0,0548	0,0000	0,0000	0,1832	0,0764	0,6742	0,0556	0,0197
<i>MtSTP7_1</i>	0,001	0,000	0,001	0,000	0,002	0,000	0,105	0,444	0,021
<i>MtSTP7_2</i>	0,2958	0,0788	0,8516	0,2410	0,7786	0,2229	0,1891	0,2632	0,9623
<i>MtSTP7_3</i>	0,194	0,030	0,202	0,030	0,301	0,038	0,985	0,136	0,167
<i>MtSTP7_4</i>	0,005	0,001	0,009	0,003	0,016	0,003	0,427	0,030	0,161
<i>MtSTP7_5</i>	0,242	0,021	0,206	0,020	0,146	0,006	0,371	0,018	0,103
<i>MtSTP7_6</i>	0,2416	0,0214	0,2061	0,0196	0,1458	0,0061	0,3712	0,0176	0,1028
<i>MtSTP10_1</i>	0,0327	0,0256	0,0092	0,0029	0,0096	0,0030	0,4701	0,5551	0,9856
<i>MtSTP10_2</i>	0,033	0,026	0,009	0,003	0,010	0,003	0,470	0,555	0,986
<i>MtSTP10_3</i>	0,017	0,011	0,008	0,000	0,006	0,003	0,326	0,575	0,863
<i>MtSTP13</i>	0,011	0,001	0,000	0,000	0,012	0,006	0,158	0,984	0,127
<i>MtSTP13_1</i>	0,006	0,001	0,007	0,001	0,016	0,005	0,990	0,107	0,127
<i>MtSTP13_2</i>	0,002	0,000	0,019	0,010	0,003	0,001	0,345	0,995	0,385
<i>MtSTP13_3</i>	0,111	0,018	1,229	0,147	0,558	0,013	0,000	0,024	0,004
<i>MtSTP14_1</i>	0,080	0,018	0,080	0,018	0,058	0,017	1,000	0,649	0,651
<i>MtSTP14_2</i>	0,001	0,001	0,002	0,000	0,002	0,000	0,998	0,941	0,919
<i>MtSTP14_3</i>	0,388	0,045	4,115	0,596	2,216	0,250	0,001	0,031	0,027
<i>MtINT1_1</i>	0,609	0,049	0,503	0,031	1,245	0,166	0,752	0,010	0,005
<i>MtINT1_2</i>	0,078	0,012	0,055	0,019	0,227	0,053	0,880	0,053	0,029
<i>MtINT1_3</i>	0,275	0,055	1,172	0,423	2,322	0,160	0,114	0,004	0,049
<i>MtINT1_4</i>	0,521	0,032	0,287	0,028	0,969	0,058	0,017	0,001	0,000
<i>MtINT2_1</i>	0,153	0,005	0,280	0,065	0,115	0,012	0,121	0,765	0,049
<i>MtINT2_2</i>	0,131	0,006	0,024	0,009	0,022	0,006	0,000	0,000	0,820
<i>MtINT2_3</i>	0,140	0,028	0,026	0,011	0,044	0,008	0,007	0,021	0,581
<i>MtINT4_1</i>	0,029	0,003	0,032	0,004	0,052	0,014	0,959	0,225	0,316
<i>MtINT4_2</i>	0,011	0,003	0,033	0,015	0,041	0,003	0,263	0,127	0,836
<i>MtTMT2_1</i>	0,095	0,017	0,133	0,006	0,098	0,006	0,103	0,988	0,125
<i>MtTMT2_2</i>	0,403	0,102	0,104	0,024	0,200	0,032	0,036	0,136	0,568
<i>MtTMT3_1</i>	1,538	0,086	0,904	0,086	1,485	0,129	0,011	0,932	0,016
<i>MtTMT3_2</i>	0,006	0,000	0,000	0,000	0,015	0,006	0,923	0,116	0,071
<i>MtTMT3_3</i>	0,003	0,001	0,001	0,000	0,004	0,001	0,047	0,259	0,007
<i>MtPMT3_1</i>	0,017	0,004	0,032	0,000	0,036	0,006	0,610	0,538	0,169
<i>MtPMT4_1</i>	0,423	0,023	0,293	0,025	0,240	0,040	0,051	0,012	0,481
<i>MtPMT4_2</i>	0,4231	0,0225	0,2927	0,0247	0,2402	0,0404	0,0513	0,0124	0,4813
<i>MtPMT4_3</i>	0,125	0,051	0,040	0,012	0,015	0,003	0,196	0,091	0,824
<i>MtPMT5_1</i>	0,016	0,004	0,035	0,003	0,016	0,002	0,819	0,864	0,530
<i>MtPMT5_2</i>	0,9788	0,3370	1,4205	0,2934	0,5517	0,1603	0,5270	0,5473	0,1420
<i>MtPMT5_3</i>	1,776	0,280	1,820	0,056	0,784	0,211	0,987	0,033	0,027
<i>MtPMT6_1</i>	0,009	0,000	0,019	0,000	0,011	0,003	0,028	0,900	0,017
<i>MtPMT6_2</i>	0,068	0,015	0,040	0,005	0,167	0,024	0,518	0,013	0,004
<i>MtPMT6_3</i>	0,427	0,016	0,076	0,021	0,194	0,029	0,000	0,001	0,023
<i>MtPMT6_4</i>	0,012	0,003	0,013	0,003	0,021	0,004	0,971	0,233	0,310
<i>MtESL5_1</i>	3,321	0,167	4,876	0,810	1,341	0,088	0,133	0,060	0,005
<i>MtESL5_2</i>	0,592	0,058	2,840	0,477	1,331	0,130	0,004	0,242	0,023
<i>MtESL6_1</i>	1,6583	0,7884	3,8090	0,8449	27,8087	1,1905	0,1698	0,0000	0,0000
<i>MtESL6_2</i>	0,001	0,001	0,000	0,000	0,005	0,001	0,873	0,017	0,010
<i>MtESL6_3</i>	2,085	0,184	4,659	0,783	10,854	0,817	0,074	0,000	0,001
<i>MtESL6_4</i>	0,083	0,033	0,028	0,012	0,013	0,003	0,214	0,112	0,869
<i>MtESL7</i>	1,115	0,078	1,497	0,310	0,765	0,047	0,873	0,017	0,010
<i>MtESL7_1</i>	0,2165	0,0583	0,0000	0,0000	0,3534	0,2118	0,4305	0,9925	0,3774
<i>MtESL16_1</i>	0,002	0,001	0,026	0,004	0,028	0,002	0,003	0,002	0,942
<i>MtESL16_2</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,011	0,002	x	x	x
<i>MtpGlcT1</i>	0,315	0,059	0,135	0,027	0,152	0,011	0,030	0,055	0,876
<i>MtpGlcT2</i>	1,047	0,033	0,545	0,006	0,429	0,037	0,000	0,000	0,064
<i>MtpGlcT3</i>	3,6317	1,1624	0,9560	0,5411	1,0688	0,0868	0,0958	0,1098	0,9937
<i>MtpGlcT4</i>	0,125	0,008	0,069	0,026	0,089	0,008	0,114	0,335	0,683
<i>MtpGlcT4_1</i>	8,4958	1,2823	5,1226	0,5835	7,1983	0,6641	0,0714	0,5646	0,2760
<i>MtVGT2_1</i>	0,457	0,051	0,822	0,029	0,715	0,078	0,009	0,041	0,426

Πίνακας Π6: Οι τιμές των σχετικών εκφράσεων (mean ratio) όλων των *MtMSTs* των φυτών των τριών διαφορετικών ομάδων φυτών στα ακροβλαστίδια, καθώς και τα αντίστοιχα τυπικά σφάλματα και οι αντίστοιχες p-values. Με έντονη γραφή απεικονίζονται οι *MtMSTs* που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές, έπειτα από ANOVA και post-hoc Tukey HSD ανάλυση.

Όνομα γονιδίου	Ακροβλαστίδια								
	καν. φωτ.		24h σκοτάδι		72h σκοτάδι		p-value		
	Mean Ratio	Standard Error	Mean Ratio	Standard Error	Mean Ratio	Standard Error	κ.φ.-24h σκοτάδι	κ.φ.-72h σκοτάδι	24h σκοτ-72h σκοτ
<i>MtSTP1_1</i>	0,024	0,005	0,011	0,002	0,014	0,004	0,660	0,996	0,708
<i>MtSTP1_2</i>	0,149	0,036	0,002	0,002	0,038	0,018	0,009	0,032	0,544
<i>MtSTP1_3</i>	0,022	0,004	0,000	0,000	0,022	0,009	0,085	1,000	0,087
<i>MtSTP1_4</i>	0,000	0,000	0,036	0,036	0,014	0,002	0,495	0,888	0,755
<i>MtSTP1_5</i>	0,025	0,020	0,024	0,004	0,037	0,002	0,998	0,757	0,724
<i>MtSTP1_6</i>	1,6678	1,3392	0,1569	0,0558	0,3399	0,1158	0,1222	0,1568	0,9793
<i>MtSTP1_7</i>	0,016	0,011	0,104	0,024	0,179	0,014	0,017	0,001	0,045
<i>Mtstl</i>	0,420	0,029	0,790	0,331	1,522	0,163	0,482	0,025	0,112
<i>MtSTP3_1</i>	0,013	0,004	0,124	0,070	0,122	0,073	0,399	0,412	1,000
<i>MtSTP3_2</i>	0,071	0,022	0,086	0,044	0,119	0,014	0,931	0,518	0,720
<i>MtSTP5_1</i>	0,014	0,000	0,030	0,017	0,007	0,000	x	x	x
<i>MtSTP5_2</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	x	x	x
<i>MtSTP5_3</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	x	x	x
<i>MtSTP5_4</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	x	x	x
<i>MtSTP7_1</i>	0,004	0,002	0,002	0,002	0,001	0,001	0,286	0,258	0,996
<i>MtSTP7_2</i>	1,6264	0,7811	0,2266	0,0625	0,7614	0,0369	0,4209	0,8700	0,6925
<i>MtSTP7_3</i>	0,112	0,039	0,506	0,108	0,220	0,030	0,016	0,540	0,058
<i>MtSTP7_4</i>	0,021	0,000	0,009	0,006	0,029	0,010	0,628	0,053	0,179
<i>MtSTP7_5</i>	0,126	0,013	0,310	0,057	0,129	0,032	0,036	0,998	0,038
<i>MtSTP7_6</i>	0,1263	0,0130	0,3095	0,0574	0,1294	0,0323	0,0358	0,9983	0,0383
<i>MtSTP10_1</i>	0,0804	0,0575	0,0196	0,0109	0,0337	0,0011	0,6345	0,8487	0,9200
<i>MtSTP10_2</i>	0,080	0,058	0,020	0,011	0,034	0,001	0,635	0,849	0,920
<i>MtSTP10_3</i>	0,015	0,000	0,001	0,000	0,006	0,001	x	x	x
<i>MtSTP13</i>	0,021	0,008	0,002	0,001	0,006	0,001	0,048	0,079	0,921
<i>MtSTP13_1</i>	0,019	0,005	0,000	0,000	0,014	0,005	0,048	0,079	0,921
<i>MtSTP13_2</i>	0,010	0,000	0,007	0,000	0,006	0,001	x	x	x
<i>MtSTP13_3</i>	0,243	0,076	0,247	0,081	0,247	0,062	0,999	0,999	0,999
<i>MtSTP14_1</i>	0,071	0,065	0,019	0,008	0,013	0,002	0,741	0,647	0,985
<i>MtSTP14_2</i>	0,007	0,002	0,002	0,001	0,004	0,002	0,124	0,507	0,512
<i>MtSTP14_3</i>	0,284	0,109	1,232	0,093	2,064	0,242	0,014	0,001	0,026
<i>MtINT1_1</i>	0,254	0,049	0,651	0,079	0,482	0,099	0,027	0,178	0,343
<i>MtINT1_2</i>	0,046	0,012	0,028	0,007	0,184	0,011	0,489	0,000	0,000
<i>MtINT1_3</i>	0,228	0,129	0,800	0,036	1,271	0,406	0,302	0,055	0,421
<i>MtINT1_4</i>	0,752	0,062	0,677	0,032	1,211	0,397	0,972	0,401	0,308
<i>MtINT2_1</i>	0,109	0,040	0,170	0,039	0,085	0,009	0,429	0,863	0,231
<i>MtINT2_2</i>	0,043	0,009	0,011	0,003	0,012	0,002	0,017	0,020	0,992
<i>MtINT2_3</i>	0,093	0,041	0,027	0,013	0,042	0,013	0,465	0,841	0,777
<i>MtINT4_1</i>	0,054	0,031	0,013	0,003	0,052	0,021	1,000	0,999	0,999
<i>MtINT4_2</i>	0,010	0,002	0,009	0,003	0,021	0,007	0,959	0,190	0,268
<i>MtTMT2_1</i>	0,056	0,016	0,098	0,043	0,073	0,024	0,643	0,962	0,793
<i>MtTMT2_2</i>	0,263	0,044	0,199	0,074	0,231	0,039	0,703	0,910	0,914
<i>MtTMT3_1</i>	1,234	0,192	2,241	0,324	2,208	0,397	0,140	0,154	0,997
<i>MtTMT3_2</i>	0,013	0,000	0,000	0,000	0,008	0,001	0,581	0,978	0,473
<i>MtTMT3_3</i>	0,018	0,003	0,006	0,003	0,005	0,002	0,015	0,018	0,976
<i>MtPMT3_1</i>	0,041	0,007	0,008	0,000	0,000	0,000	x	x	x
<i>MtPMT4_1</i>	0,251	0,049	0,336	0,070	0,252	0,021	0,507	1,000	0,509
<i>MtPMT4_2</i>	0,2512	0,0491	0,3361	0,0704	0,2515	0,0206	0,5071	1,0000	0,5088
<i>MtPMT4_3</i>	0,100	0,029	0,027	0,014	0,016	0,008	0,080	0,049	0,920
<i>MtPMT5_1</i>	0,019	0,000	0,053	0,038	0,012	0,004	x	x	x
<i>MtPMT5_2</i>	1,7405	1,0455	0,2740	0,0782	0,2367	0,0760	0,2771	0,2628	0,9990
<i>MtPMT5_3</i>	0,373	0,062	0,985	0,046	0,796	0,150	0,010	0,050	0,413
<i>MtPMT6_1</i>	0,049	0,025	0,035	0,020	0,013	0,004	0,583	0,312	0,839
<i>MtPMT6_2</i>	0,037	0,009	0,064	0,009	0,020	0,009	0,184	0,432	0,035
<i>MtPMT6_3</i>	0,286	0,012	0,216	0,049	0,181	0,019	0,315	0,117	0,720
<i>MtPMT6_4</i>	0,036	0,006	0,012	0,003	0,026	0,008	0,072	0,497	0,326
<i>MtESL5_1</i>	2,231	0,454	2,825	0,289	1,275	0,113	0,431	0,164	0,031
<i>MtESL5_2</i>	0,504	0,076	1,100	0,028	0,994	0,183	0,025	0,054	0,799
<i>MtESL6_1</i>	1,5263	0,4564	0,5307	0,1362	8,0396	1,3555	0,6891	0,0035	0,0017
<i>MtESL6_2</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	x	x	x
<i>MtESL6_3</i>	1,332	0,224	5,372	0,128	10,626	1,286	0,022	0,000	0,006
<i>MtESL6_4</i>	0,088	0,014	0,034	0,008	0,015	0,007	0,631	0,295	0,769
<i>MtESL7</i>	1,015	0,403	1,443	0,115	1,179	0,245	0,559	0,911	0,790
<i>MtESL7_1</i>	0,0000	0,0000	0,1521	0,0955	0,1508	0,0174	0,0668	0,2339	0,6095
<i>MtESL16_1</i>	0,032	0,008	0,022	0,002	0,023	0,001	0,996	0,991	0,999
<i>MtESL16_2</i>	0,006	0,000	0,000	0,000	0,014	0,005	x	x	x
<i>MtpGlcT1</i>	0,109	0,038	0,121	0,013	0,131	0,016	0,978	0,960	0,887
<i>MtpGlcT2</i>	0,631	0,069	0,805	0,045	0,462	0,053	0,155	0,167	0,012
<i>MtpGlcT3</i>	3,3117	0,0026	1,0643	0,3988	0,6307	0,0446	0,0002	0,0001	0,2300
<i>MtpGlcT4</i>	0,152	0,076	0,091	0,025	0,037	0,009	0,647	0,261	0,698
<i>MtpGlcT4_1</i>	7,2619	1,5355	10,1808	0,9298	4,8662	0,6210	0,0933	0,9134	0,0558
<i>MtVGT2_1</i>	0,194	0,042	0,510	0,082	0,514	0,013	0,014	0,013	0,999

Πίνακας Π7: Ανάλυση μεταβολιτών από τις τρεις διαφορετικές ομάδες φυτών. Στον πίνακα απεικονίζονται οι μεταβολίτες που εντοπίστηκαν, η αναλογία μάζας προς φορτίο (m/z) των μεταβολιτών, ο χρόνος έκλουσής τους (RT) και οι τιμές σχετικής απόκρισης (mean ratio) τους στα φυμάτια των τριών διαφορετικών ομάδων φυτών. Πραγματοποιήθηκε ANOVA και post-hoc Tukey ανάλυση. Με έντονη γραφή (bold) απεικονίζονται οι ενώσεις που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά.

Μεταβολίτες	m/z	RT	Φυμάτια						
			καν. φορτ. mean ratio	SE	24h σκοτάδι mean ration	SE	72h σκοτάδι mean ratio	SE	p-value
Αμινοξέα									
Αλανίνη (3TMS)	188	17,884	0,00124	0,00006	0,00029	0,00005	0,00033	0,00003	0,00000
β-αλανίνη (3TMS)	228	19,417	0,00113	0,00007	0,00109	0,00009	0,00145	0,00006	0,01869
Ασπαραγίνη (3TMS)	116	24,475	0,00111	0,00103	0,00289	0,00129	0,01907	0,00131	0,00000
Ασπαρτικό οξύ (3TMS)	231,6	21,531	0,00136	0,00035	0,00152	0,00041	0,00486	0,00017	0,00004
Γλουταμικό οξύ (3TMS)	246,1	23,478	0,00306	0,00110	0,00510	0,00121	0,00691	0,00040	0,07460
Ομοσερίνη (3TMS)	218,1	20,028	0,00022	0,00003	0,00088	0,00022	0,00354	0,00004	0,00000
Μεθειονίνη (2TMS)	176	21,387	0,00038	0,00006	0,00107	0,00026	0,00351	0,00009	0,00000
Ορνιθίνη (4TMS)	142	27,123	0,00006	0,00003	0,00020	0,00006	0,00041	0,00008	0,00000
Φαινυλαλανίνη(2TMS)	217,6	23,524	0,00033	0,00008	0,00109	0,00023	0,00452	0,00012	0,00000
Σερίνη (3TMS)	218,1	18,056	0,00033	0,00018	0,00025	0,00008	0,00081	0,00008	0,02879
Θρεονίνη (3TMS)	219,1	18,682	0,00051	0,00007	0,00064	0,00011	0,00103	0,00005	0,00468
Σάκχαρα									
Αραβινόζη (1ΜΕΟΧ) (4TMS) BP	103	24,867	0,00276	0,00047	0,00291	0,00028	0,00131	0,00007	0,01724
D-κυτταροβίωση (8TMS)	204,1	37,794	0,00011	0,00001	0,00010	0,00001	0,00010	0,00002	0,82646
Κυτταροτριόζη (1ΜΕΟΧ) (11TMS)	361,1	40,835	0,00171	0,00020	0,00428	0,00037	0,00209	0,00005	0,00004
Φρουκτόζη (1ΜΕΟΧ) (5TMS) MP	307,1	28,371	0,00269	0,00050	0,01113	0,00934	0,00049	0,00003	0,42382
Γαλακτόζη (1ΜΕΟΧ) (5TMS) MP	319,1	28,823	0,32340	0,04350	0,05878	0,02152	0,06461	0,00053	0,00007
Γεντοβίωση (1ΜΕΟΧ) (8TMS) BP	361,1	41,181	0,00050	0,00005	0,00109	0,00012	0,00052	0,00001	0,00043
Γλυκοπυρανόζη [-H2O] (4TMS)	217,1	26,394	0,05944	0,01488	0,00771	0,00045	0,01761	0,00010	0,00448
D-γλυκοπυρανόζη (5TMS)	204	28,643	0,00241	0,00139	0,00162	0,00041	0,00133	0,00003	0,69535
Γλυκόζη (1ΜΕΟΧ) (5TMS) MP	319,1	28,792	0,32438	0,04280	0,05879	0,02153	0,06459	0,00052	0,00006
1,6-άνυδρο-, β-γλυκόζη (3TMS)	204	25,195	0,00217	0,00061	0,00129	0,00032	0,00209	0,00004	0,31352
α-λακτόζη (1ΜΕΟΧ) (8TMS) BP	204,1	38,469	0,00144	0,00009	0,00156	0,00010	0,00249	0,00005	0,00001
Λυόζη (1ΜΕΟΧ) (4TMS) MP	103	24,877	0,00275	0,00046	0,00283	0,00028	0,00129	0,00007	0,01760
6-φωσφορική μαννόζη (1ΜΕΟΧ) (6TMS) MP	387,1	35,342	0,00215	0,00026	0,00077	0,00017	0,00040	0,00001	0,00011
Ριβόζη (1ΜΕΟΧ) (4TMS) MP	73	24,864	0,00463	0,00076	0,00477	0,00049	0,00202	0,00012	0,01163
Σοφορόζη (1ΜΕΟΧ) (8TMS) MP	319,1	41,334	0,00104	0,00021	0,00010	0,00006	0,00005	0,00000	0,00037
Σακχαρόζη (8TMS)	361,1	39,574	0,74045	0,04657	0,44132	0,03056	0,03363	0,00019	0,00000
D-ξυλοβίωση (1ΜΕΟΧ) (6TMS) BP2	259,1	39,883	0,00001	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,12139
Ξυλόζη (1ΜΕΟΧ) (4TMS) BP	73	24,476	0,00219	0,00156	0,00496	0,00216	0,03002	0,00193	0,00000
Πολυόλες									
1,2,4-τριόλη, Βενζένιο(3TMS)	239,1	21,907	0,00049	0,00007	0,00031	0,00005	0,00086	0,00003	0,00012
Μυο-ινοσιτόλη (6TMS)	305,1	31,791	0,00452	0,00047	0,01511	0,00198	0,00285	0,00002	0,00005
Μαννιτόλη (6TMS)	319,1	29,31	0,00032	0,00002	0,01165	0,00072	0,00990	0,00004	0,00000
Ονονιτόλη (5TMS)	216,6	29,656	0,01722	0,00467	0,01500	0,00068	0,00388	0,00014	0,02283
D-πινιτόλη (5TMS)	260,1	27,651	0,00868	0,00150	0,02881	0,00122	0,01292	0,00006	0,00000
Οργανικά οξέα									
4-άμινο-βουτανικό οξύ (3TMS)	173,6	21,6	0,00583	0,00047	0,00642	0,00113	0,00583	0,00033	0,82387
4-υδρόξυ-, cis-κινναμωμικό οξύ (2TMS)	308,1	28,976	0,00055	0,00007	0,00011	0,00003	0,00011	0,00001	0,00003
Κιτρικό οξύ (4TMS)	273,1	27,288	0,01274	0,00188	0,03253	0,00504	0,03399	0,00025	0,00135
Φουμαρικό οξύ (2TMS)	245,1	17,566	0,00144	0,00028	0,00276	0,00108	0,00073	0,00001	0,16158
Γαλακτονικό οξύ (6TMS)	73	30,408	0,11488	0,02592	0,08749	0,00390	0,03425	0,00050	0,01839
Γαλακτικό οξύ (2TMS)	147	9,865	0,02610	0,00251	0,02377	0,00400	0,02654	0,00153	0,78871
Λυξονικό οξύ (5TMS)	292,1	26,472	0,00046	0,00008	0,00201	0,00028	0,00192	0,00001	0,00010
Μηλικό οξύ (3TMS)	147	20,897	0,01715	0,00403	0,01916	0,00512	0,00685	0,00005	0,13390
Σακχαρικό οξύ (6TMS)	333,1	31,435	0,00093	0,00024	0,00216	0,00016	0,00255	0,00004	0,00016
Σικιμικό οξύ (4TMS)	204	27,081	0,00099	0,00016	0,00126	0,00021	0,00053	0,00003	0,03646
1-πυρολίνη-3-υδρόξυ-5-καρβοξυλικό οξύ_2TMS	156	21,426	0,01452	0,00288	0,01612	0,00625	0,01483	0,00033	0,95990
Βανιλικό οξύ (2TMS)	296,7	26,072	0,00065	0,00011	0,00036	0,00004	0,00050	0,00001	0,04601
Ανόργανο οξύ									
Φωσφορικό οξύ (3TMS)	299	15,969	0,05138	0,00566	0,23651	0,22071	0,01884	0,00035	0,50134

Πίνακας Π8: Ανάλυση μεταβολιτών από τις τρεις διαφορετικές ομάδες φυτών. Στον πίνακα απεικονίζονται οι μεταβολίτες που εντοπίστηκαν, η αναλογία μάζας προς φορτίο (m/z) των μεταβολιτών, ο χρόνος έκλουσής τους (RT) και οι τιμές σχετικής απόκρισης (mean ratio) τους στις ρίζες των τριών διαφορετικών ομάδων φυτών. Πραγματοποιήθηκε ANOVA και post-hoc Tukey ανάλυση. Με έντονη γραφή (bold) απεικονίζονται οι ενώσεις που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά.

Μεταβολίτες	m/z	RT	Ρίζες						
			καν. φωτ. mean ratio	SE	24h σκοτάδι mean ratio	SE	72h σκοτάδι mean ratio	SE	p-value
Αμινοξέα									
Αλανίνη (3TMS)	188	17,884	0,00024	0,00002	0,00021	0,00003	0,00033	0,00003	0,01805
β-αλανίνη (3TMS)	228	19,417	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,24042
Ασπαράγινη (3TMS)	116	24,475	nd	nd	nd	nd	0,00101	0,00026	0,00084
Ασπαρτικό οξύ (3TMS)	231,6	21,531	0,00070	0,00021	0,00085	0,00010	0,00119	0,00022	0,18898
Γλουταμικό οξύ (3TMS)	246,1	23,478	0,00035	0,00013	0,00034	0,00004	0,00055	0,00008	0,25060
Ομοσερίνη (3TMS)	218,1	20,028	0,00052	0,00015	0,00071	0,00017	0,00074	0,00010	0,50761
Μεθειονίνη (2TMS)	176	21,387	0,00017	0,00004	0,00020	0,00002	0,00026	0,00004	0,17202
Ορνιθίνη (4TMS)	142	27,123	0,00002	0,00001	0,00002	0,00000	0,00021	0,00005	0,00177
Φανυλαλανίνη(2TMS)	217,6	23,524	0,00014	0,00004	0,00014	0,00001	0,00051	0,00006	0,00004
Σερίνη (3TMS)	218,1	18,056	0,00014	0,00006	0,00002	0,00000	0,00029	0,00015	0,15831
Θρεονίνη (3TMS)	219,1	18,682	0,00014	0,00003	0,00014	0,00002	0,00016	0,00004	0,79261
Σάκχαρα									
Αραβινόζη (1ΜΕΟΧ) (4TMS) BP	103	24,867	0,00106	0,00018	0,00126	0,00009	0,00087	0,00019	0,25708
D-κυτταροβιόζη (8TMS)	204,1	37,794	0,00003	0,00001	0,00005	0,00002	0,00003	0,00001	0,47350
Κυτταροτριόζη (1ΜΕΟΧ) (11TMS)	361,1	40,835	0,00140	0,00032	0,00057	0,00008	0,00058	0,00007	0,01645
Φρουκτόζη (1ΜΕΟΧ) (5TMS) MP	307,1	28,371	0,00584	0,00197	0,01244	0,00347	0,00135	0,00024	0,01686
Γαλακτόζη (1ΜΕΟΧ) (5TMS) MP	319,1	28,823	0,03898	0,00742	0,06118	0,00519	0,04578	0,00691	0,08831
Γεντοβιόζη (1ΜΕΟΧ) (8TMS) BP	361,1	41,181	0,00023	0,00003	0,00023	0,00002	0,00022	0,00003	0,87316
Γλυκοπυρανόζη [-H2O] (4TMS)	217,1	26,394	0,00158	0,00018	0,00225	0,00014	0,00177	0,00022	0,05942
D-γλυκοπυρανόζη (5TMS)	204	28,643	0,00453	0,00356	0,00306	0,00113	0,00205	0,00133	0,74775
Γλυκόζη (1ΜΕΟΧ) (5TMS) MP	319,1	28,792	0,03992	0,00712	0,06119	0,00519	0,04783	0,00596	0,08436
1,6-άνυδρο-, β-γλυκόζη (3TMS)	204	25,195	0,00030	0,00002	0,00073	0,00016	0,00035	0,00007	0,02191
α-λακτόζη (1ΜΕΟΧ) (8TMS) BP	204,1	38,469	0,00014	0,00002	0,00017	0,00001	0,00020	0,00002	0,08950
Λυξόζη (1ΜΕΟΧ) (4TMS) MP	103	24,877	0,00112	0,00016	0,00126	0,00009	0,00092	0,00014	0,25101
6-φωσφορική μαννόζη (1ΜΕΟΧ) (6TMS) MP	387,1	35,342	0,00009	0,00002	0,00005	0,00001	0,00008	0,00001	0,18265
Ριβόζη (1ΜΕΟΧ) (4TMS) MP	73	24,864	0,00169	0,00028	0,00203	0,00015	0,00133	0,00033	0,22255
Σοφορόζη (1ΜΕΟΧ) (8TMS) MP	319,1	41,334	0,00004	0,00001	0,00006	0,00001	0,00003	0,00001	0,00306
Σακχαρόζη (8TMS)	361,1	39,574	0,12635	0,01552	0,09415	0,01188	0,05139	0,00964	0,00421
D-ξυλοβιόζη (1ΜΕΟΧ) (6TMS) BP2	259,1	39,883	0,00002	0,00001	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,12869
Ξυλόζη (1ΜΕΟΧ) (4TMS) BP	73	24,476	0,00066	0,00018	0,00154	0,00018	0,00380	0,00075	0,00114
Πολυόλες									
1,2,4-τριόλη, βενζένιο(3TMS)	239,1	21,907	0,00014	0,00002	0,00032	0,00006	0,00045	0,00013	0,05828
Μυο-ινωσιτόλη (6TMS)	305,1	31,791	0,00479	0,00080	0,00603	0,00061	0,00181	0,00035	0,00125
Μαννιτόλη (6TMS)	319,1	29,31	0,01510	0,00566	0,00586	0,00092	0,01227	0,00364	0,27114
Ονονιτόλη (5TMS)	216,6	29,656	0,00347	0,00044	0,00329	0,00017	0,00389	0,00057	0,59873
D-πιριτόλη (5TMS)	260,1	27,651	0,01499	0,00353	0,01146	0,00079	0,01611	0,00220	0,39999
Οργανικά οξέα									
4-άμινο-βουτανικό οξύ (3TMS)	173,6	21,6	0,00465	0,00079	0,00287	0,00029	0,00411	0,00050	0,11387
4-υδρόξυ-, cis-κινναμωμικό οξύ (2TMS)	308,1	28,976	0,00006	0,00001	0,00010	0,00001	0,00008	0,00001	0,09064
Κιτρικό οξύ (4TMS)	273,1	27,288	0,00536	0,00128	0,01525	0,00161	0,00440	0,00112	0,00016
Φουμαρικό οξύ (2TMS)	245,1	17,566	0,00014	0,00003	0,00027	0,00004	0,00014	0,00004	0,04194
Γαλακτονικό οξύ (6TMS)	73	30,408	0,00236	0,00029	0,00317	0,00023	0,00475	0,00046	0,00116
Γαλακτικό οξύ (2TMS)	147	9,865	nd	nd	nd	nd	0,01717	0,00146	0,00719
Λυξονικό οξύ (5TMS)	292,1	26,472	0,00033	0,00009	0,00040	0,00004	0,00030	0,00005	0,50728
Μηλικό οξύ (3TMS)	147	20,897	0,00465	0,00138	0,00760	0,00051	0,00220	0,00055	0,00434
Σακχαρικό οξύ (6TMS)	333,1	31,435	0,00030	0,00010	0,00028	0,00005	0,00032	0,00008	0,93621
Σκιμικό οξύ (4TMS)	204	27,081	0,00025	0,00008	0,00014	0,00002	0,00006	0,00001	0,05128
1-πυρολίνη-3-υδρόξυ-5-καρβοξυλικό οξύ_2TMS	156	21,426	0,00226	0,00063	0,00249	0,00034	0,00295	0,00078	0,72474
Βανιλικό οξύ (2TMS)	296,7	26,072	0,00031	0,00008	0,00052	0,00006	0,00050	0,00010	0,15256
Ανόργανο οξύ									
Φωσφορικό οξύ (3TMS)	299	15,969	0,00916	0,00408	0,00838	0,00289	0,01516	0,00414	0,40302

Πίνακας Π9: Ανάλυση μεταβολιτών από τις τρεις διαφορετικές ομάδες φυτών. Στον πίνακα απεικονίζονται οι μεταβολίτες που εντοπίστηκαν, η αναλογία μάζας προς φορτίο (m/z) των μεταβολιτών, ο χρόνος έκλουσής τους (RT) και οι τιμές σχετικής απόκρισης (mean ratio) τους στα φύλλα των τριών διαφορετικών ομάδων φυτών. Πραγματοποιήθηκε ANOVA και post-hoc Tukey ανάλυση. Με έντονη γραφή (bold) απεικονίζονται οι ενώσεις που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά.

Μεταβολίτες	m/z	RT	Φύλλα						
			καν. φοτ. mean ratio	SE	24h σκοτάδι mean ratio	SE	72h σκοτάδι mean ratio	SE	p-value
Αμινοξέα									
Αλανίνη (3TMS)	188	17,884	0,00212	0,00144	0,00060	0,00008	0,00029	0,00006	0,28804
β-αλανίνη (3TMS)	228	19,417	0,00613	0,00555	0,00048	0,00008	0,00049	0,00005	0,38654
Ασπαραγίνη (3TMS)	116	24,475	0,00223	0,00174	0,00007	0,00001	0,00215	0,00067	0,31076
Ασπαρτικό οξύ (3TMS)	231,6	21,531	0,00202	0,00065	0,00669	0,00103	0,00615	0,00031	0,00117
Γλουταμικό οξύ (3TMS)	246,1	23,478	0,00482	0,00177	0,00340	0,00071	0,00733	0,00103	0,12132
Ομοσερίνη (3TMS)	218,1	20,028	0,00075	0,00032	0,00010	0,00001	0,00029	0,00008	0,07971
Μεθειονίνη (2TMS)	176	21,387	0,00152	0,00132	0,00007	0,00002	0,00024	0,00005	0,37366
Ορνιθίνη (4TMS)	142	27,123	0,00252	0,00245	0,00001	0,00000	0,00020	0,00005	0,40328
Φανυλαλανίνη(2TMS)	217,6	23,524	0,00172	0,00131	0,00023	0,00006	0,00259	0,00038	0,14366
Σερίνη (3TMS)	218,1	18,056	0,00098	0,00049	0,00017	0,00011	0,00024	0,00011	0,13735
Θρεονίνη (3TMS)	219,1	18,682	0,00305	0,00263	0,00015	0,00008	0,00022	0,00006	0,33967
Σάκχαρα									
Αραβινόζη (1ΜΕΟΧ) (4TMS) BP	103	24,867	0,00308	0,00100	0,00187	0,00029	0,00127	0,00014	0,14186
D-κυτταροβιόζη (8TMS)	204,1	37,794	0,00624	0,00081	0,00680	0,00041	0,00484	0,00087	0,18475
Κυτταροτριόζη (1ΜΕΟΧ) (11TMS)	361,1	40,835	0,00172	0,00079	0,00110	0,00051	0,00010	0,00004	0,14640
Φρουκτόζη (1ΜΕΟΧ) (5TMS) MP	307,1	28,371	0,00206	0,00083	0,00212	0,00063	0,00069	0,00011	0,20501
Γαλακτόζη (1ΜΕΟΧ) (5TMS) MP	319,1	28,823	0,00641	0,00273	0,00461	0,00151	0,00239	0,00048	0,32866
Γεντοβιόζη (1ΜΕΟΧ) (8TMS) BP	361,1	41,181	0,00178	0,00079	0,00097	0,00020	0,00057	0,00009	0,22100
Γλυκοπυρανόζη [-H2O] (4TMS)	217,1	26,394	0,01023	0,00573	0,00658	0,00050	0,00395	0,00052	0,43382
D-γλυκοπυρανόζη (4TMS) MP	204	28,643	0,01825	0,00340	0,04484	0,00511	0,02349	0,00387	0,00174
Γλυκόζη (1ΜΕΟΧ) (5TMS) MP	319,1	28,792	0,00638	0,00274	0,00469	0,00147	0,00239	0,00049	0,32874
1,6-άνυδρο-, β-γλυκόζη (3TMS)	204	25,195	0,06058	0,05931	0,00126	0,00007	0,00101	0,00008	0,39495
α-λακτόζη (1ΜΕΟΧ) (8TMS) BP	204,1	38,469	0,00715	0,00361	0,00365	0,00022	0,00271	0,00036	0,32356
Λυξόζη (1ΜΕΟΧ) (4TMS) MP	103	24,877	0,00447	0,00232	0,00195	0,00025	0,00126	0,00014	0,24934
6-φωσφορική μαννόζη (1ΜΕΟΧ) (6TMS) MP	387,1	35,342	0,00014	0,00008	0,00009	0,00003	0,00010	0,00002	0,79203
Ριβόζη (1ΜΕΟΧ) (4TMS) MP	73	24,864	0,01712	0,01284	0,00371	0,00059	0,00264	0,00027	0,34022
Σοφορόζη (1ΜΕΟΧ) (8TMS) MP	319,1	41,334	0,00247	0,00246	0,00002	0,00000	0,00002	0,00000	0,39714
Σακχαρόζη (8TMS)	361,1	39,574	0,08552	0,01988	0,04003	0,00901	0,01136	0,00185	0,00454
D-ξυλοβιόζη (1ΜΕΟΧ) (6TMS) BP2	259,1	39,883	0,00188	0,00062	0,00308	0,00021	0,00183	0,00032	0,09728
Ξυλόζη (1ΜΕΟΧ) (4TMS) BP	73	24,476	0,02048	0,01508	0,00232	0,00079	0,00528	0,00141	0,32414
Πολυόλες									
1,2,4-τριόλη, βενζένιο(3TMS)	239,1	21,907	0,00331	0,00315	0,00025	0,00007	0,00020	0,00004	0,41111
Μυο-ινοσιτόλη (6TMS)	305,1	31,791	0,02305	0,00711	0,02218	0,00136	0,00070	0,00014	0,00381
Μαννιτόλη (6TMS)	319,1	29,31	0,02144	0,00621	0,02768	0,00538	0,02158	0,00635	0,70900
Ονονιτόλη (5TMS)	216,6	29,656	0,01127	0,00159	0,01276	0,00182	0,00357	0,00106	0,00232
D-πινιτόλη (5TMS)	260,1	27,651	0,20317	0,01111	0,28710	0,03496	0,19330	0,02682	0,05080
Οργανικά οξέα									
4-άμινο-βουτανικό οξύ (3TMS)	173,6	21,6	0,00537	0,00044	0,00518	0,00080	0,00473	0,00045	0,73893
4-υδρόξυ-, cis-κινναμωμικό οξύ (2TMS)	308,1	28,976	0,00031	0,00010	0,00062	0,00005	0,00039	0,00006	0,03261
Κιτρικό οξύ (4TMS)	273,1	27,288	0,03353	0,01780	0,05532	0,01085	0,05170	0,00961	0,48186
Φουμαρικό οξύ (2TMS)	245,1	17,566	0,00131	0,00072	0,00043	0,00008	0,00027	0,00002	0,20713
Γαλακτονικό οξύ (6TMS)	73	30,408	0,01759	0,01451	0,00701	0,00136	0,00273	0,00021	0,46102
Γαλακτικό οξύ (2TMS)	147	9,865	0,01787	0,00236	0,00984	0,00182	0,01229	0,00207	0,05105
Λυξονικό οξύ (5TMS)	292,1	26,472	0,01190	0,00315	0,00671	0,00113	0,00897	0,00151	0,26007
Μηλικό οξύ (3TMS)	147	20,897	0,04096	0,01266	0,01860	0,00417	0,00624	0,00076	0,02342
Σακχαρικό οξύ (6TMS)	333,1	31,435	0,00287	0,00076	0,00307	0,00053	0,00335	0,00038	0,84014
Σικιμικό οξύ (4TMS)	204	27,081	0,00068	0,00017	0,00032	0,00007	0,00018	0,00002	0,01712
1-πυρολίνη-3-υδρόξυ-5-καρβοξυλικό οξύ 2TMS	156	21,426	0,01162	0,00195	0,01428	0,00346	0,01678	0,00305	0,47371
Βανιλικό οξύ (2TMS)	296,7	26,072	0,00003	0,00001	0,00004	0,00000	0,00003	0,00000	0,52288
Ανόργανο οξύ									
Φωσφορικό οξύ (3TMS)	299	15,969	0,01244	0,00331	0,01363	0,00438	0,01526	0,00172	0,83680

Πίνακας Π10: Ανάλυση μεταβολιτών από τις τρεις διαφορετικές ομάδες φυτών. Στον πίνακα απεικονίζονται οι μεταβολίτες που εντοπίστηκαν, η αναλογία μάζας προς φορτίο (m/z) των μεταβολιτών, ο χρόνος έκλουσής τους (RT) και οι τιμές σχετικής απόκρισης (mean ratio) τους στους βλαστούς των τριών διαφορετικών ομάδων φυτών. Πραγματοποιήθηκε ANOVA και post-hoc Tukey ανάλυση. Με έντονη γραφή (bold) απεικονίζονται οι ενώσεις που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά.

Μεταβολίτες	m/z	RT	Βλαστοί						
			καν. φωτ. mean ratio	SE	24h σκοτάδι mean ratio	SE	72h σκοτάδι mean ratio	SE	p-value
Αμινοξέα									
Αλανίνη (3TMS)	188	17,884	0,00033	0,00001	0,00026	0,00011	0,00107	0,00013	0,00013
β-αλανίνη (3TMS)	228	19,417	0,00047	0,00007	0,00065	0,00007	0,00062	0,00009	0,22184
Ασπαραγίνη (3TMS)	116	24,475	0,00023	0,00011	0,00006	0,00002	0,00338	0,00298	0,34133
Ασπαρτικό οξύ (3TMS)	231,6	21,531	0,00302	0,00043	0,00336	0,00067	0,00515	0,00156	0,31162
Γλουταμικό οξύ (3TMS)	246,1	23,478	0,00243	0,00043	0,00221	0,00065	0,00182	0,00088	0,81013
Ομοσερίνη (3TMS)	218,1	20,028	0,00075	0,00010	0,00012	0,00003	0,00031	0,00014	0,00220
Μεθειονίνη (2TMS)	176	21,387	0,00025	0,00004	0,00008	0,00002	0,00043	0,00017	0,08585
Ορνιθίνη (4TMS)	142	27,123	0,00004	0,00001	0,00002	0,00001	0,00012	0,00007	0,18977
Φαινυλαλανίνη(2TMS)	217,6	23,524	0,00029	0,00002	0,00012	0,00003	0,00181	0,00054	0,00433
Σερίνη (3TMS)	218,1	18,056	0,00017	0,00007	0,00025	0,00008	0,00036	0,00016	0,46932
Θρεονίνη (3TMS)	219,1	18,682	0,00043	0,00008	0,00035	0,00007	0,00033	0,00010	0,70441
Σάκχαρα									
Αραβινόζη (1ΜΕΟΧ) (4TMS) BP	103	24,867	0,00151	0,00006	0,00114	0,00012	0,00115	0,00034	0,40674
D-κυτταροβιόζη (8TMS)	204,1	37,794	0,00035	0,00003	0,00043	0,00005	0,00035	0,00006	0,40763
Κυτταροτριόζη (1ΜΕΟΧ) (11TMS)	361,1	40,835	0,00031	0,00005	0,00035	0,00007	0,00028	0,00015	0,89762
Φρουκτόζη (1ΜΕΟΧ) (5TMS) MP	307,1	28,371	0,00462	0,00040	0,00205	0,00024	0,00093	0,00026	0,00001
Γαλακτόζη (1ΜΕΟΧ) (5TMS) MP	319,1	28,823	0,01102	0,00105	0,00653	0,00133	0,00331	0,00081	0,00107
Γεντοβιόζη (1ΜΕΟΧ) (8TMS) BP	361,1	41,181	0,00031	0,00002	0,00030	0,00002	0,00015	0,00003	0,00045
Γλυκοπυρανόζη [-H ₂ O] (4TMS)	217,1	26,394	0,00307	0,00017	0,00478	0,00013	0,00272	0,00055	0,00238
D-γλυκοκυρανόζη (5TMS)	204	28,643	0,22460	0,01649	0,35445	0,03141	0,13754	0,06251	0,01003
Γλυκόζη (1ΜΕΟΧ) (5TMS) MP	319,1	28,792	0,01102	0,00105	0,00647	0,00137	0,00331	0,00081	0,00120
1,6-άνυδρο-, β-γλυκόζη (3TMS)	204	25,195	0,00059	0,00002	0,00094	0,00013	0,00057	0,00013	0,04854
α-λακτόζη (1ΜΕΟΧ) (8TMS) BP	204,1	38,469	0,00114	0,00006	0,00117	0,00002	0,00113	0,00012	0,92633
Λυξόζη (1ΜΕΟΧ) (4TMS) MP	103	24,877	0,00152	0,00005	0,00120	0,00009	0,00116	0,00037	0,48306
6-φωσφορική μαννόζη (1ΜΕΟΧ) (6TMS) MP	387,1	35,342	0,00011	0,00002	0,00009	0,00002	0,00006	0,00002	0,39903
Ριβόζη (1ΜΕΟΧ) (4TMS) MP	73	24,864	0,00270	0,00009	0,00223	0,00020	0,00268	0,00131	0,88837
Σοφορόζη (1ΜΕΟΧ) (8TMS) MP	319,1	41,334	0,00001	0,00000	0,00002	0,00000	0,00001	0,00000	0,03684
Σακχαρόζη (8TMS)	361,1	39,574	0,08057	0,00916	0,04656	0,00517	0,01772	0,00314	0,00006
D-ξυλοβιόζη (1ΜΕΟΧ) (6TMS) BP2	259,1	39,883	0,00058	0,00003	0,00053	0,00005	0,00037	0,00003	0,00669
Ευλόζη (1ΜΕΟΧ) (4TMS) BP	73	24,476	0,00172	0,00032	0,00359	0,00029	0,02040	0,01270	0,18269
Πολυόλες									
1,2,4-τριόλη, βενζένιο(3TMS)	239,1	21,907	0,00014	0,00001	0,00021	0,00005	0,00016	0,00004	0,45840
Μυο-ιννοσιτόλη (6TMS)	305,1	31,791	0,00449	0,00039	0,00442	0,00037	0,00054	0,00003	0,00000
Μαννιτόλη (6TMS)	319,1	29,31	0,00651	0,00072	0,01441	0,00607	0,00605	0,00117	0,22210
Ονονιτόλη (5TMS)	216,6	29,656	0,00808	0,00091	0,00801	0,00065	0,00229	0,00086	0,00035
D-πνιτόλη (5TMS)	260,1	27,651	0,19607	0,00614	0,22418	0,01376	0,17564	0,04203	0,43461
Οργανικά οξέα									
4-άμινο-βουτανικό οξύ (3TMS)	173,6	21,6	0,00568	0,00047	0,00460	0,00079	0,00461	0,00110	0,58821
4-υδρόξυ-, cis-κινναμωμικό οξύ (2TMS)	308,1	28,976	0,00006	0,00001	0,00008	0,00001	0,00005	0,00000	0,03328
Κιτρικό οξύ (4TMS)	273,1	27,288	0,00419	0,00074	0,01226	0,00201	0,01675	0,00339	0,00750
Φουμαρικό οξύ (2TMS)	245,1	17,566	0,00034	0,00003	0,00048	0,00006	0,00019	0,00005	0,00397
Γαλακτονικό οξύ (6TMS)	73	30,408	0,00284	0,00008	0,00484	0,00070	0,00433	0,00134	0,27954
Γαλακτικό οξύ (2TMS)	147	9,865	0,01171	0,00082	0,01356	0,00123	0,01075	0,00292	0,57934
Λυξονικό οξύ (5TMS)	292,1	26,472	0,00201	0,00020	0,00188	0,00026	0,00346	0,00234	0,67046
Μηλικό οξύ (3TMS)	147	20,897	0,02276	0,00365	0,02810	0,00527	0,00548	0,00177	0,00337
Σακχαρικό οξύ (6TMS)	333,1	31,435	0,00128	0,00010	0,00148	0,00007	0,00142	0,00018	0,51961
Σικιμικό οξύ (4TMS)	204	27,081	0,00050	0,00003	0,00033	0,00004	0,00011	0,00006	0,00016
1-πυρολίνη-3-υδρόξυ-5-καρβοξυλικό οξύ_2TMS	156	21,426	0,00669	0,00094	0,00605	0,00020	0,00917	0,00203	0,23964
Βανιλικό οξύ (2TMS)	296,7	26,072	0,00003	0,00000	0,00005	0,00000	0,00004	0,00001	0,01285
Ανόργανο οξύ									
Φωσφορικό οξύ (3TMS)	299	15,969	0,04718	0,01187	0,05429	0,01349	0,06766	0,02197	0,67725

Πίνακας Π11: Ανάλυση μεταβολιτών από τις τρεις διαφορετικές ομάδες φυτών. Στον πίνακα απεικονίζονται οι μεταβολίτες που εντοπίστηκαν, η αναλογία μάζας προς φορτίο (m/z) των μεταβολιτών, ο χρόνος έκλουσής τους (RT) και οι τιμές σχετικής απόκρισης (mean ratio) τους στα ακροβλαστίδια των τριών διαφορετικών ομάδων φυτών. Πραγματοποιήθηκε ANOVA και post-hoc Tukey ανάλυση. Με έντονη γραφή (bold) απεικονίζονται οι ενώσεις που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά.

Μεταβολίτες	m/z	RT	Ακροβλαστίδια						p-value
			καν. φωτ. mean ratio	SE	24h σκοτάδι mean ratio	SE	72h σκοτάδι mean ratio	SE	
Αμινοξέα									
Αλανίνη (3TMS)	188	17,884	0,00049	0,00013	0,00094	0,00006	0,00080	0,00013	0,04016
β-αλανίνη (3TMS)	228	19,417	0,00089	0,00019	0,00077	0,00002	0,00092	0,00005	0,60704
Ασπαράγιν (3TMS)	116	24,475	0,00216	0,00042	0,00034	0,00013	0,00644	0,00313	0,09126
Ασπαρτικό οξύ (3TMS)	231,6	21,531	0,00816	0,00133	0,00907	0,00186	0,00875	0,00112	0,90704
Γλουταμικό οξύ (3TMS)	246,1	23,478	0,00145	0,00022	0,00227	0,00068	0,00473	0,00129	0,04533
Ομοσερίνη (3TMS)	218,1	20,028	0,00131	0,00020	0,00040	0,00007	0,00060	0,00009	0,00108
Μεθειονίνη (2TMS)	176	21,387	0,00051	0,00008	0,00019	0,00004	0,00051	0,00012	0,03449
Ορνιθίνη (4TMS)	142	27,123	0,00012	0,00003	0,00004	0,00001	0,00039	0,00010	0,00404
Φαινυλαλανίνη(2TMS)	217,6	23,524	0,00035	0,00005	0,00024	0,00006	0,00199	0,00017	0,00000
Σερίνη (3TMS)	218,1	18,056	0,00048	0,00005	0,00027	0,00007	0,00039	0,00009	0,13994
Θρεονίνη (3TMS)	219,1	18,682	0,00091	0,00014	0,00072	0,00012	0,00050	0,00011	0,09039
Σάκχαρα									
Αραβινόζη (1ΜΕΟΧ) (4TMS) BP	103	24,867	0,00464	0,00097	0,00189	0,00034	0,00129	0,00013	0,00424
D-κνιταροβιόζη (8TMS)	204,1	37,794	0,00038	0,00009	0,00029	0,00006	0,00028	0,00005	0,57013
Κνιταροτριώζη (1ΜΕΟΧ) (11TMS)	361,1	40,835	0,00052	0,00017	0,00023	0,00002	0,00021	0,00007	0,12993
Φρουκτόζη (1ΜΕΟΧ) (5TMS) MP	307,1	28,371	0,02317	0,00510	0,00358	0,00025	0,00096	0,00019	0,00032
Γαλακτόζη (1ΜΕΟΧ) (5TMS) MP	319,1	28,823	0,05665	0,01235	0,01323	0,00153	0,00352	0,00054	0,00048
Γεντοβιόζη (1ΜΕΟΧ) (8TMS) BP	361,1	41,181	0,00028	0,00008	0,00017	0,00002	0,00010	0,00004	0,09548
Γλυκοπυρανόζη [-H2O] (4TMS)	217,1	26,394	0,00333	0,00074	0,00381	0,00026	0,00215	0,00012	0,06448
D-γλυκοπυρανόζη (5TMS)	204	28,643	0,01406	0,00341	0,02992	0,00264	0,01496	0,00132	0,00151
Γλυκόζη (1ΜΕΟΧ) (5TMS) MP	319,1	28,792	0,05665	0,01235	0,01312	0,00154	0,00351	0,00054	0,00047
1,6-άνυδρο-, β-γλυκόζη (3TMS)	204	25,195	0,00064	0,00011	0,00070	0,00009	0,00053	0,00003	0,36282
α-λακτόζη (1ΜΕΟΧ) (8TMS) BP	204,1	38,469	0,00132	0,00034	0,00131	0,00011	0,00093	0,00014	0,38815
Λυξόζη (1ΜΕΟΧ) (4TMS) MP	103	24,877	0,00464	0,00097	0,00195	0,00031	0,00121	0,00012	0,00367
6-φωσφορική μαννόζη (1ΜΕΟΧ) (6TMS) MP	387,1	35,342	0,00019	0,00005	0,00017	0,00002	0,00011	0,00005	0,35520
Ριβόζη (1ΜΕΟΧ) (4TMS) MP	73	24,864	0,00776	0,00165	0,00302	0,00061	0,00170	0,00023	0,00314
Σοφορόζη (1ΜΕΟΧ) (8TMS) MP	319,1	41,334	0,00001	0,00000	0,00001	0,00000	0,00001	0,00000	0,05886
Σαχαρόζη (8TMS)	361,1	39,574	0,03906	0,01058	0,06124	0,00937	0,01523	0,00498	0,00934
D-ξυλοβιόζη (1ΜΕΟΧ) (6TMS) BP2	259,1	39,883	0,00074	0,00018	0,00055	0,00011	0,00028	0,00006	0,07007
Ξυλόζη (1ΜΕΟΧ) (4TMS) BP	73	24,476	0,00545	0,00085	0,00272	0,00022	0,01229	0,00471	0,07816
Πολυόλες									
1,2,4-τριόλη, βενζένιο(3TMS)	239,1	21,907	0,00009	0,00003	0,00021	0,00005	0,00028	0,00006	0,05043
Μυο-ινσοιτόλη (6TMS)	305,1	31,791	0,00660	0,00156	0,00487	0,00022	0,00065	0,00012	0,00178
Μαννιτόλη (6TMS)	319,1	29,31	0,01160	0,00424	0,01078	0,00019	0,00521	0,00064	0,18121
Ονονιτόλη (5TMS)	216,6	29,656	0,01577	0,00381	0,01641	0,00178	0,00307	0,00034	0,00333
D-πνιτιόλη (5TMS)	260,1	27,651	0,33166	0,08073	0,29942	0,00917	0,28185	0,03425	0,78556
Οργανικά οξέα									
4-άμινο-βουτανικό οξύ (3TMS)	173,6	21,6	0,01388	0,00257	0,00892	0,00120	0,00685	0,00126	0,04501
4-υδρόξυ-, cis-κινναμωμικό οξύ (2TMS)	308,1	28,976	0,00018	0,00007	0,00018	0,00006	0,00003	0,00001	0,13093
Κιτρικό οξύ (4TMS)	273,1	27,288	0,04267	0,01205	0,03323	0,00505	0,03898	0,00691	0,73859
Φουμαρικό οξύ (2TMS)	245,1	17,566	0,00115	0,00035	0,00056	0,00010	0,00045	0,00006	0,07901
Γαλακτονικό οξύ (6TMS)	73	30,408	0,00758	0,00197	0,00775	0,00022	0,00830	0,00141	0,93025
Γαλακτικό οξύ (2TMS)	147	9,865	0,01511	0,00384	0,00918	0,00031	0,01388	0,00258	0,29192
Λυξονικό οξύ (5TMS)	292,1	26,472	0,00307	0,00109	0,00158	0,00026	0,00143	0,00014	0,18836
Μηλικό οξύ (3TMS)	147	20,897	0,04770	0,00983	0,04353	0,00963	0,02057	0,00137	0,06988
Σαχαρικό οξύ (6TMS)	333,1	31,435	0,00408	0,00111	0,00251	0,00029	0,00261	0,00042	0,25015
Σικιμικό οξύ (4TMS)	204	27,081	0,00210	0,00043	0,00079	0,00014	0,00021	0,00004	0,00079
1-πυρολίνη-3-υδρόξυ-5-καρβοξυλικό οξύ_2TMS	156	21,426	0,00402	0,00085	0,00818	0,00146	0,01301	0,00140	0,00115
Βανιλικό οξύ (2TMS)	296,7	26,072	0,00010	0,00003	0,00009	0,00001	0,00009	0,00001	0,82695
Ανόργανο οξύ									
Φωσφορικό οξύ (3TMS)	299	15,969	0,06787	0,02269	0,08575	0,01880	0,08161	0,01156	0,77345

Κωδική περιοχή (cds) και αμινοξική αλληλουχία των *MtSTP13* και *MtPMT3_1*.

MtSTP13

CDS αλληλουχία:

```
ATAAAT AAGCCACCACCTACACCATCTCCATAACCAATTAAGAAAATATCACTCTCAATCTAGTCACTCTTCTTC
ATCTATCTATTCTGTTATCACAGAATTCACTGTGCGAGTGTGGATCACCTAAGCATTGTTGAAGACAGAAATAAC
TAACCATGACGGGAGGAGGCTTCAGCGCGGCAACGACAGAGAATTTGAGGCAAAGATAACTCCTATCATTTATCAT
TTCATGCATAAATGGCTGCCACCGGAGGTCTTATGTTTGGTTACGATGTTGGAGTTCAGGTGGCGTGGCCTCGATG
CCACCCTTCTTGAAGAAGTCTTTCCAAACAGTCTTGAGACAGACAACGGAATCAGATGGGTGGAAAGTAACTACT
GCAAAATACGATAATCAAGGGCTGCAGCTATCACTTCCATCATTTGATTTTGGCGGGTTTAAACAGTAACTTCTTCGC
GTCTTATACAACCTCGAGTACTAGGGAGAAGGCTCACAATGTTGATTGCTGGCTTTTTCTTCATAGCTGGAGTTAGT
CTTAATGCATCTGCTCAAAACCTTCTCATGCTCATCGTTGGTAGGGTCTTACTTGGCTGTGGAATTTGGTTTTGCAA
ACCGCCGTGCCAGTTTCTCTTTCAGAGATTGCACCTTCTAGAATACGTGGAGCATTGAATATACTGTTTCAGCT
TGATATCACTCTTGGCATTCTCTTTGCTAACCTTGTCAATTATGCCACCAACAAAATCAAAGGTCATTGGGGTTGG
AGGATATCTCTGGGATTGGGAGGTATCCAGCATTACTCCTCACTTTAGGGGCTTACTTGGTAGTGGACACCCCAA
ATAGTCTCATTGAACGTGGTCACTTGGACAAAGGAAAAGCTGTTCTGAGAAAAGATTCTGGCACCGGACAACATTGA
ACCCGAGTCTTAGAGTTAGTAGAAGCAAGTCGTGTTGCTAAAGAGGTGAAAATCCATTCAGAAAATCTCCTCAAG
CGCAATAACCGACCTCAACTTGTCAATTTCCATTGCTCTAATGATTTTTAGCAATTCACCTGGCATCAATGCGATAA
TGTTCATGCTCCAGTTCTGTTCAACACCTTAGGATTTAAGAAATGATGCTGCACCTTACTCTGCTGTGATTACTGG
TGCAATCAATGTCATCTCAACTATAGTTTCAATATATTCAGTGGATAAACTTGGTCTGCGAAAAGCTATTACTGGAA
GCTGGTGTTCAAATGTTGTTGTCACAAATGGTGATAGCAATGTAAGTGAAGGATCATTCTGAGG
AACTCTCAAAAGGGTATGCAGCTCTTGTAGTTGTTATGGTTTGTATTTTTGTGTCAGCATTTCATGGTCAATGGG
TCCACTTGGCTTGGCTTATCCAAAGTGAATATTTCCACTAGAGACTCGTCTGCAGGACAAAGTGAACAGTTTGT
GTCAACTTCTCTTCACTGCTGTCATTCGACAAGCTTTCCCTTTCAATGCTTTGCTATTTCAAGTTTGGTATCTTCT
TTTTCTTCTCTGGTTGGATCTTGTTCATGTCAACTTTGCTTTTTCTTGTCCCTGAGACAAAGAATGTCCCTAT
TGAAGAGATGACACAAAAGAGTGTGGAAGCAGCATTGGTTTTGGAAGAGGTTTGTGAAAAATGATATATTTGAAGAT
GAGAAAGTAACTGGTGGAAATTTCCCTAGCAGAAATGATCTTGTCTCAGTTGTAAATTAAGGAATTTCTAGTA
CTAAGTTGTTTTGTCAAATAAA
```

Εικόνα Π2: Η κωδική περιοχή (cds) του γονιδίου *MtSTP13_1* (σε κίτρινο πλαίσιο), ο στοιχειώδης υποκινητής και το πιθανό σημείο έναρξης μεταγραφής.

Πρωτεϊνική αλληλουχία:

```
MTGGGFSGGNDREFEAKITPIIIISCI MAATGGLMFGYDVGVS GGVA S MP PFLK KFFPTVLRQT TES DGSES NYCK
YDNQGLQLFTSSLYLAGLTVTFFASYTRVLGRRLTMLIAGFFFIAGVSLNAsaQNLMLIVGRVLLGCGIGFANQ
AVPVFLSEIAPSRIRGALNILFQLDITLGI L FANLVNYATNKIKGHWGWRISLGLGGIPALLLTLGAYLVVDT PNS
LIERGHLDK GKAVLRKIRGTDNIEPEFLELVEASRVAKV KHPFRNLLKRNNRPQLVISIALMI FQQFTGINAIMF
YAPVLFNTLGFKNDAALYSAVITGAINVISTIVSIYSVDKLGRRKLLLEAGVQMLLSQMVIAIVLGIKVKD HSEEL
SKGYAALVVMVCIFVSAFAWSWGPLAWLIPSEIFPLETRSAGQSVTVCVNLF LTA VIA IQAFLSMLCYFKFGIFFF
FSGWILFMSTFVFFLVPETKNVPIEEMTQRVWKQHWFWKRFVENDYIEDEKVTGGNSPSRNDLVS QL
```

Εικόνα Π3: Η αμινοξική αλληλουχία του γονιδίου *MtSTP13_1*.

MtPMT3_1

CDS αλληλουχία:

```
TATAAAATCATATACAAGTTGGGTTAAAAGAAATGTTGTCTAGTGGAAAAGAAAACAAATGGGCACAGCCAAGTATCA
TCCATGGAAAAGCAGTGTGGGATGTAAACCATCTCAACAGCATGCTTGTGCTTGTGTGTTAGCTGCCACTATTA
TCTCTGCCATATTTGGTTATGTTACAACAGTGATGGCTGGAGCACTCTTATTCATAAAGGAAGAACTTGAAATCAG
TGACATGCAAGTGCAGCTTCTAGCAGGAATCTTAAATGCATGTGCATTACCAGCATGCATGATTGCAGGAAGATTA
TCCGATTACATAGGTCGACGCTACACAATCATGCTATCGTCGATATTTCTTCTTAGGCTCAATTTTAAATGGGGT
ATGGTTCACTTTTCCAATCTTAATGATTTGGAAGATGCATTGCAGGATTTGGTGTGGTTTTGCACCTTATCATAGT
ATCTGTTTACAGTGCAGAAATTTCACTCTCCTTCTTATAGAGGTTTTCTAACTTCTCTACCAGATCTTTCCATTAAC
TAGGTTTCTTACTTGGTTATCTCTCAAAATTAATTTCTTGGAAAATTAATCTTAAAGACTTGGATGGAGAAATAATGC
ATAGTATCTCTCAATACCTTCAATTGGTTTGGTAATATAAATGTTGCAATTGGTAGAGTACCAAGATGGTTAGT
AATGCAAGGAAGATTAGGTGATGCTAAGAAAAGTCTTTTATTAATCTCTAATTCAAAACAAGAAGCTGAACAAAAG
ATGAAGGAAAATAAAAAATGCTGTTGGAATGATGAAAATGCACCCAAAACATTTGTTCAATGTTCAAAGAAAATC
GTAGTGGTGGAGGAGCTTTAAAAGAAATGTTTTATAAACCTTACCACATGTATATAGGATCTTATTGCAGCTAT
TGGTGTTCATATATTTCAAATAATTTGTGGAGTTGAGGGTATTTTTTATATAGTCCAAGAATTTTTGGAAGAAATG
GGAATCACTGATAAGGGTACACTTCTTTAGCTACAGTTGGTATTGGGATAAGCCAACTTTATTCACATTAATCTAT
CATGTTTTTTGTTGGATAAAAATGGGAGAAGGATTTCTATATTGGTCAAGTTCAGGAGGTGATTTTTTCTATGTT
AGGGTTATGTTGTTGTTGCTCAGCTATAGTGGAGAATTTCTAAATTAGGAGAAGAACCATTATGGCCATAAATTTACT
ATTATTTGTTATATACATTAATGGCAGGTTTTAATGCTATTGGAATTTGGGGCTGTGACATGGGTTTATAGCACAGAGA
```

TATTTCCACTAAGGTTGAGAGCACAAGGACTTGGGGTTTGTGTGATTATGAATAGAATTACTAATGTGGCAGTGGT
TACTAGTTTTATTTCAATTTATAAACTATAACATTGGGTGGAACCTTCTTTTTGTTTGTGGTACAAATGTTTTG
GGTTGGTGGTTTTACTATTCTTTCTTGCCTGAAACTAAAGGAAGATCATTAGAAGATATGGAACTATCTTTGGGA
AAAATCCAACCTCTGAGGTACAAATGAAGTATGGAAGCAACAATGCATAGTTTGGATAATCACACTTTTTCTCT
TAAAATAAA

Εικόνα Π4: Η κωδική περιοχή (cds) του γονιδίου *MtPMT3_1* (σε κίτρινο πλαίσιο) ο στοιχειώδης υποκινητής και το πιθανό σημείο έναρξης μεταγραφής.

Προτεινική αλληλουχία:

MESTCGDVENHLNKHACACVLAATIISAIFGYVTTVMAGALLFIKEELEISDMQVQLLAGIILNACALPACMIAGRLS
DYIGRRYTIMLSSIFFFLGSLMVGYSFFILMIGRCIAGFGVGFALIIIVSVYSAEISSPSYRGFLTSLPDL SINI
GFLLYLSNYFLGKLSLRIGWRIMLAIPSIPIGLVILMLQLVESPRWLVMQGRIGDAAKVVLLIISNSKQEAEQRM
KEIKNAVIGIDENCTQNIIVHVSKKTRSGGGALKEMFYKPSPHVYRILIAAIGVHIFQNICGVEGIFLYSPRIFGRMG
ITDKGTLTLLATVIGIGISQTLFTLLSCFLLDKIGRRILLVSSGGVIFSMGLCVCSAIVENSKLGEELWAIIFTI
IVIIYIMAGFNAIGAVTWVYSTEIFPLRLRAQGLGVCVIMNRITNAVAVVTSFISIIYKTIITLGGTFFLFGTENVLG
WWFYYSFLPETKGRSLEDMETIFGKNSNSEVQMKYGSNNA

Εικόνα Π5: Η αμινοξική αλληλουχία του γονιδίου *MtSTP13_1*.

Μεταλλαγμένες σειρές των *MtSTP13* και *MtPMT3_1*

CCTTACAAATATATGTTTTCCAAGGTTTAGATGCTTTTGTCAAGGTTTTGACCCTGGCAAATACCA
AATTTCTTGACATACATTGATATTTTCATCGTTATTGTTATTGTTTTTTGAGAAATGTTAACTTGTG
TCTTAAGACACAAGTTAATGAGTCAAAAATAAAAATACTTTGTTGTAATTAATGTATTTCAATTTAATT
TTTCTACTTTTAATTAATTGAACGCATAAAAATTTAAAATAAAGTTCCACATATTTGGTTGCTTAACAT
AAAGTGTCATATGGGCACAAGTTAGTATGACCCTGTTTTTTATATTTATCTAAAAAAACTTAAGTT
TAACTAAAATAATATAACTTTTTATTTAATGTTAAAACATTTCTTAAATATTCATTTTCAGGGGTTCCATA
AGTTTAAATCTGAACTCTTTAAACAAAAAATGTTTAAATTTGAACATGATATATCAAATAATAAACTT
AAACACTAATTTATGTCATCTATTTTCATATATATTGTCAAAGTTTAAATTTTCATACGTTACATACATTTA
TTTCATGTTTTTTTTAATAAATTTATTTTCATATGTTTGAATATTTTCATATTTAAAAAATTAATGAAAT
TACTGCACAAGGCACAAAACACTAGTTACTAGTAGATGATTGAAATTCATTCCTACTGCATTGACTATC
GATAAATCCAAAAATAATGGCAAATAAATAAGCCACCACTCTACACCATCTCCATAACCAATTAAGA
AAATATCACTCTCAATCTAGTCACTCTTCTTCATCTATCTATTCTGTTATCACAAGAATTCAGTGTGCGA
GTGTGGATCACCTAAGCATTGTTGAAGACAGAAATAACTAACCATGACGGGAGGAGGCTTCAGCGG
CGGCAACGACAGAGAATTTGAGGCAAAGATAACTCCTATCATTATCATTTCATGCATAATGGCTGCC
ACCGGAGGTCTTATGTTTGGTTACGATGTTGGAGTTTCAGGTACCTAATTAATTTTAACTTTTTACATG
CAATAGGCTTAAGCTTAAAATTCGCTTCAAACCTCAATATGTGTTTGGCCGGTCTTCAAAAATATAA
TTCTAATTAATTCAAATATCATATTATGATAAAATTTAAAATTTATAGTACTATTTTCTTATGAAAAG
CGGAGTACTCCAATTTTCGCTAGTGTAAAGAGTAGTATAAAAATTTGAGCATTGCTAACAAAACATATCT
TATAATGGATGATTTTGGTTGGTTAATTGTTTTAAGGTGGCGTGGCCTCGATGCCACCCTTCTTGAA
GAAGTTCTTTCCAACAGTCTTGAGACAGACAACGGAATCAGATGGGTGCGAAAGTAACTACTGCAAA
TACGATAATCAAGGGCTGCAGCTATTCATTCATCATTGTATTTGGCGGGTTAACAGTAACTTCTTC
GCGTCTTATACAACCTCGAGTACTAGGGAGAAGGCTCACAATGTTGATTGCTGGCTTTTTCTTCATAGC

TGGAGTTAGTCTTAATGCATCTGCTCAAAACCTTCTCATGCTCATCGTTGGTAGGGTCTTACTTGGCT
GTGGAATTGGTTTTGCAAACCAGGTTAGTGTAATTTGATTTTGCTCTCCCTTAGGTTATCTAACGATGT
CGCACAAAAATAAATAAAATATTAGTATTGTATAGTCTACTTGTATCCCAATACATAAAATTTATAA
ATCTACCACTAAATTATACTCCTTCAATTTAAAATAAATATCGTTTAAGATTTGTACATAATTAAGAA
AAGTACTAAGTGTAAACAATTTACATGCTTACAATTCTGAAGTACTAGTATTCCCTTTAATAAAAAA
AAAGGAGCACTAGTATTGACTATAGGAGTAAAAGATTATTCGTAAATATATGTCATATTTCTATTGT
ACACTATAGAAGTATTGTCTCCATGGATTTAACGGATGCAATTCAATGTACTATCATTGTTTGAGTTC
AAAACCTGTTTAAGTCATGTGAGATCCTTGTGTACATCAGTAGGAGACAAAATTAGGTTTTGTAATTT
TTATCAGGTGCTTGTATATTTGTTTGATCAACAGTGTGTGTGAAAATACTAGAAGAAATGTTTTTTTT
TATCTCATGTGACAACAATTTCTCATATTTATGAATTGGGTTAATTAAGTCTTTGGTCTTATAAATAT
CTACAGTTTTGTTTTAGTCTTTATAAAAATAAATCACACTTTTTAATCCTTACAAAATTTTCTGTTAGA
GTTTTTAGTTCATGCTGTTAAGTGACACTAACAGACGCTGATGTGGCATTGACACGTCATTATTATTA
ATATTAACAAAAACACGTCAGAAAATGTTCTATTATTAATTAACCTTTTTAAATTAAGAATAAAA
ATATCAAATAAAGTTAAATTAATAAGTTAAAATATGAAGTTAAATTGAGGGAAAATTCTATGGTAC
ACCCAAAAATTTGAGTGTATCAATACCAATTTGTTAAAATAATAATTAATAAGTTGATTTTTGAA
GAAAAGTAATTTTTGGTAATTGACAATTATCAAATTAATATTATTTACCAAAGCGTCGACAA
AATAAATATAATTTTTCTGAATTTTTATTACTTATAACAAAGAATGTTGATTATTTTTATAAAAAATG
TTAAAAATTAATATTATTTTTATAACAATGGAATGATGTTTCTTATTATGAGATGATGTTTTCTAAA
ATATAACATTGATAAATAGATTTTTATTTATAAATAAATTGTTAATTTATCAATCTATGAAGCAAGA
GTACCGGTACAAAATCCAGACCCACAAAACCAAATCGAAGCTCAAACCTGGAAATGAAATCGAAGA
AGGAAGAAGGAAATCGGTCATGAGATACTGAGAACGAACTGAAATCGGTCCTGAACAAGATTATGG
TGTGAGGAAAGAAGAAGAAGAAATTGAACAGGGTTATGGTGTGAGGAAAGAAGAACAAGGTT
ATGGTTTATGAAAACAAGAAGAAAAAAAATGAATGAAATTTGGGTTTAGTTGATGGAAAGAAG
AAGTGGAGGGAGAAGAAGTTGAAGATGAAGAAGAAATTGGAATGGAAGAAGATCTCGGTGGTGG
AGAAGAGAAATGAGAAAAAATTGGATTTTTTTAATTAATAATTAAGGGTATTTGGGTAAATAATA
TACAATTAAGTTTTTGAAAACCTTATCAAAAAAATCTACAGTGACGTGTTTAAAAA
GTGTCATGCCACGTCAGCTCCGTTAGTGTAAAGTTAACAACATGGATTAACAACTAACAGAAAATTT
TGTAGAGACTAAAAATGTTATTTATTTTACAAAGATTAACAACTATAGATATTTATAGGAC
CAAAAATTAATTAGTATATTATAAAAATGTATAAACATTTTATACATGCATCTAATGATGTATTGA
CGTCTTTAATAAATATAAAAATACAAGAGTTGTCATATTCATTAATTTATGTGACAACATATTATTAG
ATGTATGTGTAATAATTTGTACAGTGACATAACATAATAATTATTAACCTAATTTTATATATATA
TATATATATATATATAAACTAACTTTTTTACTCCGTAATAAACTAACTGTTCTTGCAAAAAAG
AAAACCTGAAATTTAATAAATAAATTTTTATTTTACATTTTCGATTTATTTTATTAATTAATTAATATG
AATGTATCTATTAATTAATCAATCATCTCTTGGTACTTGACAAAAAATCATCTCTTGGTAACTT

TTTTATCTAACTGGCTCCCAAAAAAAAAAACTTATAATTTTACATTAATTCTATATTTGAAAGCATT
ATAAATCATACGAGATATTTTTCAAAAATTAATAGCAAATTTGTATTATTGGACTTATGCTAATAGT
AGGGACAAAAATTCTAGTGACTTTAGGAAAAACAAAATTCAAACCTCACTTTTAGTGAACGTGTGG
TTCTTGATGAACACATCTATACAGACACAGCCAATCGTAAGATAAAAGTAATTGTAAGATAACATCA
AAAAAATTACATCATCTTTTTATATAGTTATTATATTATATCCTAACTTTCAATCAATGGTATAAAGG
TTTCTCTTTAAAAGAATATAAAGAAAAATAAATAAAGGTTTCTTGGCACCCACACAAAGTCTTAATCA
GTCTTTCTCAACCCTATATCCACCTTTTTGGCATGAAAGTATTCTTGCTGGTGACCACTTTGGTCATGG
TTTCATTTAATTAAGAGAAAAATGATATAATGTCTTTAATTAATGATTAATAATATCTTGTTGACAAGT
TCCATTCATTGTAGCTATCTCTATCTTATTTAGTAATTACTTTGGACTTTGCCTTTGATTCTTAAGTA
ATACTGTATGCTACAAATGATACACGATTTTGGTCTGATCAATTAATCAAGTACTTAATTAATAATTT
AAAGTTCGCACTAATTGGCTTTTGAAGTCACTAATATTGTTTTGATGGAGACAGGCCGTGCCAGTTT
TCCTTTCAGAGATTGCACCTTCTAGAATACGTGGAGCATTGAATATACTGTTTCAGCTTGATATCACTC
TTGGCATTCTCTTTGCTAACCTTGTCAATTATGCCACCAACAAAGTAAGTTCCTTAATTGTATTGCATCCT
TTGTTTTGACATATATTAATTAGTTCATTAATTGGAATATTGTGTTAAAACTTTGAAAAATTTA
TCAATGATAGTTGAAGCTCAATTAATTGAGAATCGTGGGTTTCGAGAGCTCGTATCCGAGCATATAAA
ATGTATGCGTAGCTCTTTACCTATTTAGGAGACATTTTCCATTTTCATAGGTGAAAGCACCAAATCT
AACACATATATATGGTTGACTATTTAGTGTTTTGTGAGCCAAAGAAATTCTTAATCGAGAATTTAATG
ATAAAATTATAATGCTACATACTTGACTTTTCATGAAAAGTCATGCCAATTTAAATAATTATGAATTATT
TTACAATTCATTGTTGTTACTGATTGCTCATTATATATCTTTCCGTAAC[NF9381_low_10]AGAATCA
AAGGTCATTGGGGTTGGAGGATATCTCTGGGATTGGGAGGTATCCAGCATTACTCCTCACTTTAGG
GGCTTACTTGGTAGTGGACACCCCAAATAGTCTCATTGAACGTGGTCACTTGGACAAAGGAAAAGCT
GTTCTGAGAAAGATTCTGGCACGGACAACATTGAACCCGAGTTCTTAGAGTTAGTAGAAGCAAGTC
GTGTTGCTAAAGAGGTGAAACATCCATTAGAAATCTCCTCAAGCGCAATAACCGACCTCACTTGTCT
ATTTCCATTGCTCTAATGTTTGTACTAATCTTATGTTACATAGATAATATGATAGCCAAGTTTTAA
TTCATGGTTGCAATCGCTTAACAATTCTTGTTTTATAGAGAATTGTAGTCAAATACGTTTAAAAGTTB[
NF11816_high_7]AAAACCGCCTAATTGGAATAGCGAAAAGAAAAATAAAAAATTAAGACCTCGCA
GCCACAATTGCGATTGCAGACCCTTTGTATAACCTTTTATTGATAGTTGAATT[NF9381_low_61]AT
ATAAGCTTATTATAAAGTTATAGTCATTAATCTTTTATTGATTGATGTTATTTAAATATGGTGATAAAAA
AAAACAGATTTTTAGCAATCACTGGCATCAATGCGATAATGTTCTATGCTCCAGTTCTGTTCAACAC
CTTAGGATTTAAGAATGATGCTGCACTTTACTCTGCTGTGATTACTGGTGCAATCAATGTCATCTCAA
CTATAGTTTCAATATATTCAGTGGATAAACTTGGTCGTCGAAAGCTATTACTGGAAGCTGGTGTCAA
ATGTTGTTGTCACAAATGGTGATAGCAATTGTACTAGGAATCAAAGTGAAGGATCATTCTGAGGAAC
TCTCAAAGGGTATGCAGCTCTTGTAGTTGTTATGGTTTTGATTTTTGTGTCAGCATTGTCATGGTCAT
GGGGTCCACTTGCTTGGCTTATCCAAGTGAGATATTTCCACTAGAGACTCGTTCTGCAGGACAAAGT

GTAACAGTTTGTGCAACTTCCTCTTCACTGCTGTCATTGCACAAGCTTTCCTTTCAATGCTTTGCTATT
TCAAGTTTGGTAT(NF8855_low_9]CTTCTTTTTCTTCTCTGGTTGGATCTTGTTTCATGTCAACTTTTGT
CTTTTTCTTTCCCTGAGACAAAGAATGTCCCTATTGAAGAGATGACACAAAGAGTGTGGAAGCAGC
ATTGGTTTTGGAAGAGTTTTGTTGAAAATGATTATATTGAAGATGAGAAAGTAACTGGTGGAAATTC
CCCTAGCAGAAATGATCTTGTCTCAGTTGTAAATTAAAGGAATTTCTAGTACTAAGTTGTTTTGTCA
AATAAATGCATGGTTAGATTCGTTTGTATTACAGCTAACCAGACTTTATCATTCCCATTGTGTTAAGT
AGTTTTTGCTTGTAACATTGTAATGTTTGTAAAGTTATATTACTATGTTTCTTATGTTCCCATTATATTTT
CCAATGTATTATTATTGTCTTCTGTTTAAATTAGTTTTGGTTATTCATTTTCTATGAGATATTTTACCCC
TTGCAACAATAACCATTTTGTGCAATAGCTTCAGACTGTAACAAAAAGTGAGACAAATTGCAAATC
TAACAAATAAATTAACCAGACTTAAGAAGTTAGCTAGAAACATATTTGGTGGCCAAAAATATGATAA
ACATCATGTATTATATGGACGTAATTTAAATTATGGTCATACTTGAGTTGTTATTGTGGGCTAATTAA
CTTAGCCAATAAGCACAATCATGAGCAGCTCAACAACCTTAGGTGTTATGGCTGTATAAGGTGATCAA
TATAATACATGATTTAATTTGAAACCATATATCGCTCCAAATACTGAAATACTTACTGAGGATTGAGG
AGTTCTTATCAAACCACTCGTAGGAAAACATACTAAATCAGTTTGTACCAATCCGGCAATCCCAATG
AGAATGAATGAATCAATAGTATAGTAGTTGGATTCTATCAAATTGTGGAATGATACTTGAAATTACA
CAAAATACAAACAATTTCAATTTACCTCTTTGAATTAGTATACATCAATCATTTTCTCTTGGAGTTAG
ACAATTATTTTTTAAATTAGTAGTTTGATTAAATATGTACTCTTTATTTGGATTTAAATAAAGGACCTAC
AATTTTTTAAACATTCATTCAAGGCGAGTTTTAGCATGGGTAAATTGTCAAATTTCTCCATCTTATATC
AATTTTGTTTTACTTGTAATGAGTT

Εικόνα Π6: Γονιδιακή οργάνωση και θέσεις των *Tnt1* ενθέσεων των μεταλλαγμένων σειρών (NF11816_high_7, NF9381_low_10, NF9381_low_61, NF8855_low_9) του *MtSTP13*.

Αλληλουχίες ενθέσεων:

>NF9381_low_10 (plus strand)

TTAAGAGAGAGGAGAAGCAAAGGTCATTGGGGTTGGAGGATATCTCTGGGATTGGGAGGTATCCC
AGCATTACTCCTCACTTTAGGGGCTTACTTGGTAGTGGACACCCCAAATAGTCTCATTGAACGTGGTC
ACTTGACAAAGGAAAAGCTGTTCTGAGAAAGATTCGTGGCACGGACAACATTGAACCCGAGTTCTT
AGAGTTAGTAGAAGCAAGTCGTGTTGCTAAAGAGGTGAAACATCCATTCAGAAATCTCCTCAAGCGC
AATATCCGACCTCAACTTGTCATTTCCATTGCTCTAATGGTTTGTACTAATCTCATTGTTGCAATCGCTT
AACAAATCTTATTTTATATATAGAGATTTGATTCAAATAGTTTTAAAATTTAAAACCTCCCTAATTGG
ATTATCGAAAATTAATAAATATAAAAAATCTAAGATCTC

Εικόνα Π7: Η αλληλουχία της *Tnt1* ενθέσεων της μεταλλαγμένης σειράς NF9381_low_10 του *MtSTP13*.

>NF11816_high_7 (plus strand)

AAAACCGCCCTAATTGGAATAGCGAAAATTAAGAAAAATAAAAAATTAAGACCCCGCTCGCAGCC
ACAATTGCGATTGAAGACCCTTTGTATAACCTTTTATTGATAGTTGAATCATATAAGCTTATTATAAAG
TTATAGTCATTACTCCTTTTGATTGATGTTATTTAAATATGGTGATAAAAAAAAAAAAAACAGATTTT
TCAGCAATTCACTGGCATCAATGCGATAATGTTCTATGCTCCAGTTCTGTTCAACACCTTAGGATTCAA
GAATGATGCTGCACTTTACTCTGCTGTGATTACTGGTGCAATCAATGTTATCTCAACTATAGTTTCAAT
ATATTCAGTGGATAAACTTGGTCGTCGAAAGCTTACTCGAAGCCGGTGTCAAATGTTTCATCTCTC

Εικόνα Π8: Αλληλουχία της *Tnt1* ένθεσης της μεταλλαγμένης σειράς NF11816_high_7 του *MtSTP13*.

>NF9381_low_61 (plus strand)

CATATAAGCTTATTATAAAGTTATAGTCATTACTCCTTTTGATTGATGTTATTTAAATATGGTGATAAA
AAAAAAAAAAAAACAGATTTTTCAGCAATTCACTGGCATCAATGCGATAATGTTCTATGCTCCAGTTC
TGTTCAACACCTTAGGATTCAAGAATGATGCTGCACTTTACTCTGCTGTGATTACTGGTGCAATCAAT
GTTATCTCAACTATAGTTTCTGATGATGTCCATCTCA

Εικόνα Π9: Αλληλουχία της *Tnt1* ένθεσης της μεταλλαγμένης σειράς NF9381_low_61 του *MtSTP13*.

>NF8855_low_9 (minus strand)

ATACCAAACCTTGAAATAGCAAAGCATTGAAAGGAAAGCTTGTGCAATGACAGCAGTGAAGAGGAAG
TTGACACAAACTGTTACACTTTTGCCTGCAGAACGAGTCTCTAGTGGAATATCTCACTTGAATAAG
CCAAGCAAGTGGACCCCATGACCATGCAAATGCTGACACAAAAATACAAACCATAACAACACTACAAGA
GCTGCATACCCTTTTGAGAGTTCCTCAGAATGATCCTTCACTTTGATTCCTAGTACAATTGCTATCACC
ATTTGTGACAAGAACATTTGAACACCGGCTTCGAGTAATAGCTTTTCGACGACCAAGTTTATCCACTGA
ATATATTGAAACTGATGATGTCCATCTC

Εικόνα Π10: Αλληλουχία της *Tnt1* ένθεσης της μεταλλαγμένης σειράς NF8855_low_9 του *MtSTP13*.

ACAGTGGTAAATTTATTCCAATTTTACCTCCAAATTTATGTTTTGTCCATCATTTTCAAGACATTATATT
TGAATATGCATATGCCAATTGCTAATAGTCAATAGTTAATTGAGACAATTTTATTAATCATTACATTT
ATTCTTCTATTGTTTATATTAATCTAGATGAAATAACCTTAAACAACACTTATTTTAAAACACAGAGTA
CAAAATGCAAATTGTGTTTATATGTGGTCCACAGTTCATTAACACTCGAAAATCAAGTGAAACTCGAC
CAATGGCTTCCAGTATTGGTTAGAGGAAGTTTATGATCATTTACCCTAAAGAGTGAGATGGTGACA
TGATTGGTGTGAGATTAATAAATAAAGTGAAAACCAATGTGAATACCTCAAATGCAACTCATAAT
TCATTGATCTTTGTTTTTATTGAACCGACACGATGAAGTTGCAATCTAACACACGAGAATAAGGATGA
TTGCGAGCTTCTACTTAGAGAGTGATATGAACTGTTGTTGATAATATTGAGTAATTTTAAAGTATTGTTT
TACTATAGTCCATTTTTTTGGTGGTGACCGAGATTTGAACCCTGAATCTTGAATATATTATATATCATC
CCTATAAATTAAGTTAAGCTCACGAGGACTTACTATAGTCCATTTATCAAAGTGTGATATTTTAGAA
ACGGTCTATAATATTTCTCATTCTTTTCTATAAGAATTAGGTACCGTTTGGCCCGACTTTTTTTTTTTTT
CAGCTTCTACATTTTTAAGGAGAAGCTAGGCTAAACCTAATATCAATAAAGTACCTTCGAAGAAAA

GTACTTTTTTTAGAAATGCATAAAATTGAATGGAATGAGCTTTAACAAAAAGTTGTTGAATGCTATTTCC
AAAAAACTACTTCTCCGTAATTTATTTACAAGCACCTCTCTCAACTCACGCAGGCAACCTTTTCTTTT
ATTTTTTAATATTATTTTTCAATTTGTTTTGTCTTCCATTTTTTTAACTGGTCCATATAATGTTTTTAAA
GGAGGATCAATTTAATTTTATTATCTATTTTTGAAGGAATTTTATTATCTTTTTATCACTTATATATTTA
ATTTAATATCGTTTAATTATCACAACATCACAATATTTTTATCACTTATGCTGTCATTGAATGACACC
AAATATTTTTATTCCCTTTCTTCAACCTCACAAATACGCACACACACACATTAGCGTTTAGAGTAATAT
TTTATGTCCGCATGTCTGCTTTTTTTTTTTTTGTTATGCTAATGCGAATAATTTTTTTAGTGTTGCGTA
ATGCGTAAAATTATTAATTTTTATAAAATTTGATTTAATTAAGTAAGTATAGATGCCTAAAAATT
TTACACATTTATATTGTAACAACTATGCATATCTTTTTCTTATTAAAAAAACTTAACATATCTTTTTCA
ATGACACCAACATGTAACAAATATAATACCATATAATATAAATTCTTATCTTTTTAAATGATACCAAAA
ATATGATCTTCTTATAACAAAATTTGTTGTACAGTATAATTGAAAGAAAAAAAAAACTATTCTCTAGTT
TAGCTTAGTTGATATAGACAATGTATAAATATATGCAAGGTCGCGGCTTCAAACCTCGGACACCACA
AAAAAAAAAAAAAAAAAATTCATGTTTTGTACAATATTTTGCTAAACAACCTTTAACTTAAAAATACTTT
AGAACTAAAAAAAAAATAAAGAAACCAACAACCTTAGCTTTTTCTTAAAGAACTTTATTTAACTTT
GTTTTAAAGTAGCTTTTAGATCCAAAAAAAAATTTGGCCAAACGGTACCTTAAAAAGTGAAGACAACA
TAAAAATCTCTTTCAATTAATATTACTCCACTAATTTCTAAAATAATTGCCGTTTTAGTGCAAAAAATCC
AAATTAAGTGTCAGTTTGTATCAATGCAACATTAATTAATTTATTCCAATTATATCTTGTCTGTTTG
AGCTTAGCTCAACTGGTATAGACAATACATAATACTCCCTCCGGTCTTATTATAAGAAAAAATTGAC
TTCTTAGGTTAATAGAATAATTAATGTATCTTATCGTAAATATATACTAGATACATCACTTACACAATG
AACCAAAAAAATCAATTGTTTTTATAATAAGGACCGGAGGGAGTATATGCAAGGTTTGAGATTGCA
ATCCTGACCACCATAAAAAAAAAAATTCATTATATCTCACTTTTTCATTTATTACAATTGTTACTTTAA
TTGTCAATAGTTAACGATGATAATTTTAAAAAATTGTTACTCATGCTAATTTATTTATTTTAAAATTATT
TTAAAAGTATAGAGTATAAGATATGCAAATCTATTGACATGTGGTTCATAAATGATAAAAAACGTG
AATATTATGTGAACTCCAACGACGACTTATAATATTTATCAGAAGTATGATTATTTGTTTTAATGG
GTGAGCCAACACATATAAATACCTTAAAAGAGCAAAGATGATTGTGAACCTTCTACTTGAGTCGATCTT
TGTTAAAATATTTGAGTAATAGAACCCACCTATAAAATTTGTCAATATTCTTAAATTTTATTAGGGTT
TCTTGACAAAATTTAATTTATTGGGGTTTTGAGTAATAAGTTTTATGCACATTATTATTATATTAATATT
TATTACATAAGTATATGCATGCAGCCTTGTGTTGCGAATCGAACGGAACTATTCATGACATAGCC
ATTAAGAAGGGGACCTTAGTTGGTAAACTAATTTGATGTTTTTATTACTTAAGGTGAAAAACCTTT
GATGTTATTATTCCTCAATTTTATAATCCTTAAATTCATCGTACATAATAAGAGTTAAACACGTATGA
CATAGGACAAATATCTCACTTTCCGTTTGGAAGATAACTATAGTGTACATGGATTAGTTTTTATTA
TGGATGGTTGATAGAGTTTGCAAATTAATTTAGCAAAAAAGAAATATGTATATACTAATTAATTATCT
ATACATTAATCCAAAAGGTAATTTCTATTTTCTAATGAGTATTTAAAAACAAAACCTAGGGTGTTCGAG
GCTTTATGCTCAAATGAAAAAATATATGTTCAAGTATCTTATAATAATATATATATATTTTTTTAAGT

GAAGGTAGAGACAATTTAATTCTATAAGTTAAACAACATTTGCTCACTTCAACAGTCAACAAATTTAA
ATTATATAAATTGATGAATGCTACATGTTGGAATAGTGTATTGACTGTTTACAAAATAAAGACTCACT
CTTTCTATATATAAAGGACATCACTAAAATTCTATAAAAATCATATACAAGTTGGGTAAAGAATGTT
GTCTAGTGGAAGAAACAATGGGCACAGCCAAGTATCATCCATGGAAAGCACGTGTGGGGATGT
AAACCATCTCAACAAGCATGCTTGTGCTTGTGTGTTAGCTGCCACTATTATCTCTGCCATATTTGGTTA
TGGTGAGTGACTTTCTATTCTTTTTACTGTCTTTTCTTTACTCAAACCTTTATTTTCTACT[NF4652_inse
rtion_8]GTCTCATAATAGTTGTGCATTTGGAGGAATGAATTCAAGCAGGTTTATAGAAATCATTAG
GAGAATTATTTATGACTAACTTTTACTGAGATGAGAATAGACTAGACTAGACTAGACTGAATTAGTCT
TTGCAAGACTCAAGCTTGATTTGATAAAAAAAAAAATAAATCACGTCTTAGATCTGAGATGTTATCT
ATCATATACTTAATTTTAGGTTTGTATCTTACCTTTTTAACTAACAAAGTCTTTAAATAAGTAATATAT
CCTAAATAGACTAATGAATTAATAGACAAAAAAGTTGTGCTTTGTTTTGATATTCAACATGATAT
CGTAGATAATATGACTAAATATGATATCATATTTAATTATAGTTTATAACAATACATTTAATTAATTG
TTCAAAAAAACAATACATTTAATTATGCAAAAAGTTAATGTAGATTAACATACTAAATTGTTG
AAAATGTTGAAAAATTATAATTTAATACAAAGTATAAAATCTAATGTAACAATAATAGTAATGAAAA
AAAGTCTGATATGATATGTCTAAAATGCATTTTTTGGCATAAAATAGCTATGCAAAATCAACTAATAG
GTAATATTTTTTATTTAGTTACAACAGTGATGGCTGGAGCACTCTTATTCATAAAGGAAGAAGCTTG
AAATCAGTGACATGCAAGTGCAGCTTCTAGCAGGAATCTTAAATGCATGTGCATTACCAGCATGCAT
GATTGCAGGAAGATTATCCGATTACATAGGTGACGCTACACAATCATGCTATCGTCGATATTCTTCT
TCTTAGGCTCAATTTAATGGGGTATGGTTCATCTTTCCAATCTAATGATTGGAAGATGCATTGCA
GGATTTGGTGTGGTTTTGCACTTATCATAGTATCTGTTACAGTGCAGAAATTCATCTCCTTCTTAT
AGAGGTTTTCTAACTTCTCTACCAGATCTTCCATTAACATAGGTTTCTTACTTGGTTATCTCTCAAAT
ATTTCTTGAAAAATTATCTTTAAGACTTGGATGGAGAATAATGCTAGCTATTCCTCAATACCTTCAA
TTGGTTTGGTAATATTAATGTTGCAATTGGTAGAGTCACCAAGATGGTTAGTAATGCAAGGAAGATT
AGGTGATGCTAAGAAAGTTCTTTTATTAATCTCTAATTCAAAACAAGAAGCTGAACAAAGGATGAAG
GAAATAAAAAATGCTGTTGGAATTGATGAAAATTGCACCCAAAACATTGTTTCATGTTTCAAAGAAAA
CTCGTAGTGGTGGAGGAGCTTTAAAAGAAATGTTTTATAAACCTTCACCACATGTATATAGGATACTT
ATTGCAGCTATTGGTGTTCATATATTTCAAATATTTGTGGAGTTGAGGGTATTTTTTATATAGTCCA
AGAATTTTTGGAAGAATGGGAATCACTGATAAGGGTACACTTCTTTAGCTACAGTTGGTATTGGGA
TAAGCCAACTTTATTACATTACTATCATGTTTTTGTGGATAAAATTGGGAGAAGGATTCTATTAT
TGGTCAGTTCAGGAGGTGTGATTTTTCTATGTTAGGGTTATGTGTTTGTTCAGCTATAGTGGAGAAT
TCTAAATTAGGAGAAGAACCATTATGGGCCATAATTTACTATTATTGTTATATACATTATGGCAGG
TTTTAATGCTATTGGAATTGGGGCT[NF4778_insertion_7]GTGACATGGGTTTATAGCACAGAGAT
ATTTCCACTAAGGTTGAGAGCACAAGGACTTGGGGTTTGTGTGATTATGAATAGAATTACTAATGTG
GCAGTGGTACTAGTTTTATTTCAATTTATAAACTATAACATTGGGTGGAACCTTCTTTTTGTTTGT

GGTACAAATGTTTGGGTTGGTGGTGTACTATTCTTTCTTGCCTGAAACTAAAGGAAGATCATTAGA
AGATATGGAACTATCTTTGGGAAAAATTCCAACCTCTGAGGTACAAATGAAGTATGGAAAGCAACAAT
GCATAGTTTGGATAATCACACTTTTTCTTTAAAATAAAAAATTAAGGTAGGGATGTTGCTCCGG
TCTAAGGCAGAAAACTCAGTGAGTACTTACGAAGAAAATTACATTTACCTCGTTGTATATAATAACT
AATGGAACTTAGCTACATGTTGAATACAAACCAATCATTCTCTACTGGGCTAACTCCTTTGAGTTA
TTGAGATAATTAAGGGTCTTTGTATATATCTAGCTTATCTTTGAAGAAAATAAGTGAAAACGGTTTA
ACACTTGGTTTAGTTGAAGTACTAAAATCCTGTTTTTGGGTGCTTGTGTTGACA

Εικόνα Π11: Γονιδιακή οργάνωση και θέσεις ένθεσης των μεταλλαγμένων σειρών (NF4652_insertion_8 και NF4778_insertion_7) του *MtPMT3_1*.

Αλληλουχίες ενθέσεων:

>NF4652_insertion_8 (minus strand)

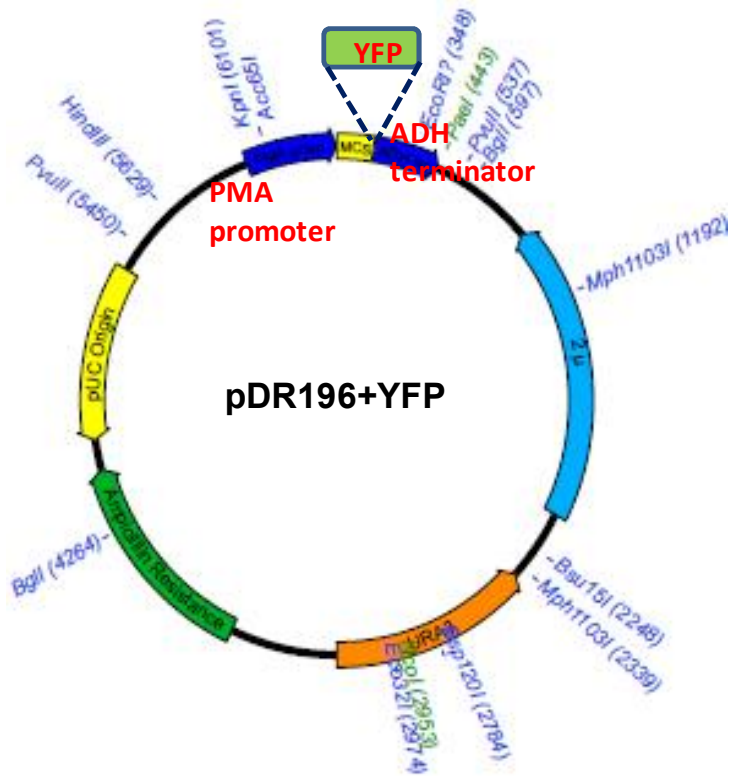
CCCAACAGTAGAAAATAAAATTTGAGTAAAAGAAAAGACAGTAAAAGAATAGAAAGTCACTCACC
ATAACCAATATGGCAGAGATAATAGTGGCAGCTAACACACAAGCACAAGCATGCTTGTGAGATG
GTTTACATCCCCACAAGTGTTCATGGATGATACTTGGCTGTGCCATTTGTTTCTTTTCCACTAGA
CAACATTCITTAACCCAACCTGTATATGATTTTTATAGAATTTTAGTGATGTCCTTTATATATAGAAAG
AGTGAGTCTTTATTTGTAAACAGTCAATACACTATTCCAACATGTAGCATTCAATTTATATAATT
TAAATTTGTTGACTGTTGAAGTGAGCAAATGTTGTTAACTTATAGAATTAATTTGTCTCTACCCTCAC
TTAAAAAATAAATATTATAAGATACTTGAACATATATTTTTTCATTTGAGCATAAAGCCTC

Εικόνα Π12: Αλληλουχία της μεταλλαγμένης σειράς NF4652_insertion_8 του *MtPMT3_1*.

>NF4778_insertion_7 (plus strand)

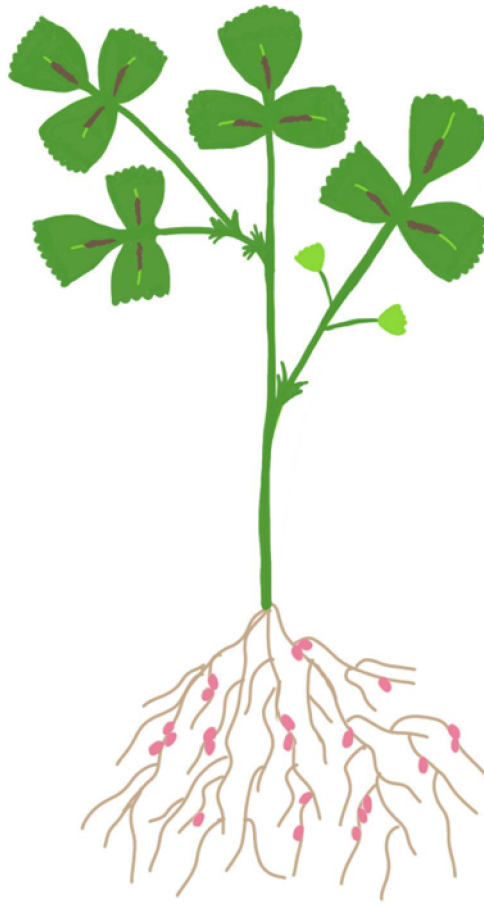
CCCAACAGTGACATGGGTTTATAGCACAGAGATATTTCCAATAAGGTTGAGAGCACAAGGACTTGGG
GTTTGTGTGATTATGAATAGAATTACTAATGTGGCAGTGGTTACTAGTTTTATTCAATTTATAAACT
ATAACATTGGGTGGAACCTTCTTTTTGTTTGGTACAAATGTTTTGGGTTGGTGGTTTTACTATTCT
TTCTTGCCTGAAACTAAAGGAAGATCATTAGAAGATATGGAACTATCTTTGGGAAAAATTCCAACCT
TGAGGTACAAATGAAGTGTGGAAGCAACAATGCATAGTTTTGGATAATCACACTTTTTCTTTAAAA
TAAAAAATTAAGGTAGGGATGTTGCTCCGGTCTAAAGCAGAAAACTTTCTAACTCGATGAGTACT
TACGAAAAAATTACATTTACCTCGTTGTATATAATAACTAATGGGAACCTTAGCTAC

Εικόνα Π13: Αλληλουχία της μεταλλαγμένης σειράς NF4778_insertion_7 του *MtPMT3_1*.



Εικόνα Π14: Κλωνοποίηση της κωδικής αλληλουχίας των γονιδίων-στόχων στο πλασμίδιο pDR196+YFP.

Βιβλιογραφία



7. Βιβλιογραφία

- Afoufa-Bastien, Medici A., Jeauffre J., Coutos-Thévenot P., Lemoine R., Atanassova R and Laloi M.** (2010). "The *Vitis vinifera* sugar transporter gene family: phylogenetic overview and macroarray expression profiling." BMC plant biology **10**(1): 245.
- Altschul S. , Gish W., Miller W., Myers E. and Lipman D. J.** (1990). "Basic local alignment search tool." Journal of Molecular Biology **215**(3): 403-410.
- Aluri S. and Büttner M.** (2007). "Identification and functional expression of the Arabidopsis thaliana vacuolar glucose transporter 1 and its role in seed germination and flowering." Proceedings of the National Academy of Sciences **104**(7): 2537-2542.
- Ampe F., Kiss E., Sabourdy F. and Batut J.** (2003). "Transcriptome analysis of Sinorhizobium meliloti during symbiosis." Genome Biology **4**(2): R15-R15.
- Appleby C. A.** (1992). "The origin and functions of haemoglobin in plants." Science Progress (1933-) **76**(3/4 (301/302): 365-398.
- Baud S., Wuillème S., Lemoine R., Kronengerger J., Caboche M., Lepiniec L. and Rochat C.** (2005). "The AtSUC5 sucrose transporter specifically expressed in the endosperm is involved in early seed development in Arabidopsis." The Plant Journal **43**(6): 824-836.
- Becker A., Bergès H., Krol E., Bruand C., Ruberg S., Capela D., Lauber E., Meilhoc E., Ampe F., de Bruijn F.J., Fournet J., Francez-Charjot A, Kahn D., Küster H., Liebe C., Pühler A., Weidner S. and Batut J.** (2004). "Global Changes in Gene Expression in Sinorhizobium meliloti 1021 under Microoxic and Symbiotic Conditions." Molecular Plant-Microbe Interactions **17**(3): 292-303.
- Benedito V., Dai X. , He, J. , Zhao, P. X. and Udvardi, M. K.** (2006). "Functional genomics of plant transporters in legume nodules." Functional Plant Biology **33**(8): 731-736.
- Benedito V., Torres-Jerez I., Murray J., Andriankaja A., Allen S., Kakar K., Wandrey M., Verdier J., Zuber H., Ott T., Moreau S., Niebel A., Frickey T., Weiller G., He Ji, Dai X., Zhao P., Tang Y., Udvardi M.** (2008). "A gene expression atlas of the model legume Medicago truncatula." The Plant Journal **55**(3): 504-513.
- Bonifacino J. and Traub L.** (2003). "Signals for Sorting of Transmembrane Proteins to Endosomes and Lysosomes." Annual Review of Biochemistry **72**(1): 395-447.

- Boorer J., Loo D., Wright E.** (1994). Steady-state and presteady-state kinetics of the H⁺/hexose cotransporter (STP1) from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Xenopus* oocytes. *Journal of Biological Chemistry* **269**(32):20417-24
- Brock** (2007). Τόμος ΙΙ. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.
- Brouquisse R., Gaudillère J.-P., and Raymond P.** (1998). "Induction of a Carbon-Starvation-Related Proteolysis in Whole Maize Plants Submitted to Light/Dark Cycles and to Extended Darkness." *Plant Physiology* **117**(4): 1281-1291.
- Büttner M.** (2007). "The monosaccharide transporter(-like) gene family in *Arabidopsis*." *FEBS Letters* **581**(12): 2318-2324.
- Büttner M.** (2010). "The *Arabidopsis* sugar transporter (AtSTP) family: an update." *Plant Biology* **12**: 35-41.
- Büttner M. and Sauer N.** (2000). "Monosaccharide transporters in plants: structure, function and physiology." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1465**(1–2): 263-274.
- Büttner, M., Truernit E., Baier K., Scholz-Starke J., Sontheim M., Lauterbach C., Huss V., and Sauer N.** (2000). "AtSTP3, a green leaf-specific, low affinity monosaccharide-H⁺ symporter of *Arabidopsis thaliana*." *Plant, Cell & Environment* **23**(2): 175-184.
- Chen, L. Q., Cheung L. S., Feng L., Tanner W. and Frommer W. B.** (2015). "Transport of sugars." *Annual Review of Biochemistry* **84**: 865-894.
- Cho J. , Burla B., Lee D., Ryoo N., Hong S., Kim H., Eom J., Choi S., Bhoo S., Hahn T., Neuhaus E., Martinoia E. and Jeon J.** (2010). "Expression analysis and functional characterization of the monosaccharide transporters, OsTMTs, involving vacuolar sugar transport in rice (*Oryza sativa*)." *New Phytologist* **186**(3): 657-668.
- Cho M., Lim H., Shin D. and Jeon J.** (2010). Role of the plastidic glucose translocator in the export of starch degradation products from the chloroplasts in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **190**(1):101-112
- 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*." *The Plant Journal* **39**(4): 487-512.
- Cooper J.** (2007), "Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue". *Journal of Applied Microbiology* **103**(5): 1355-1365.

- Cooper G., and Hausman R.** (2011). TO KYTTAPO Μια Μοριακή Προσέγγιση. ΠΡΩΤΗ ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΚΔΟΣΗ.
- Chauhan S., Forsthoefel N., Ran Y., Quigley F., Nelson D. and Bohnert H.J.** (2000). "Na⁺/myo-inositol symporters and Na⁺/H⁺-antiport in *Mesembryanthemum crystallinum*." The Plant Journal **24**(4): 511-522.
- Cralle H. and Heichel G.** (1985). "Interorgan photosynthate partitioning in alfalfa." Plant Physiology **79**(2): 381-385.
- Deng D., Xu C., Sun P., Wu J., Yan C., Hu M., Yan N.** 2014. "Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1." Nature **510**(7503): 121–125.
- D' Erfurth I., Cosson V., Eschstruth A., Lucas H., Kondorosi A. and Ratet P.** (2003). Efficient transposition of the Tnt1 tobacco retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*. The Plant Journal **34**(1):95-106.
- D' haeseleer K., De Keyser A., Goormachtig S. and Holsters M.** (2010). "Transcription Factor MtATB2: About Nodulation, Sucrose and Senescence." Plant and Cell Physiology **51**(9): 1416-1424.
- diCenzo G., Milunovic B., Cheng J. and Finan T. M.** (2013). "The tRNA^{arg} gene and *engA* are essential genes on the 1.7-Mb pSymB megaplasmid of *Sinorhizobium meliloti* and were translocated together from the chromosome in an ancestral strain." Journal of Bacteriology **195**(2): 202-212.
- Doidy J., Grace E., Kuhn C., Simon-L., Casieri L., and Wipf D.** (2012). Sugar transporters in plants and in their interactions with fungi." Trends in Plant Science **17**(7): 413-422.
- Dusotoit-Coucaud A., Porcheron B., Brunel N., Kongsawadworakul P., Frachel J., Viboonjun U., Chrestin H., Lemoine R. and Soulainan S.** (2010). "Cloning and Characterization of a New Polyol Transporter (HbPLT2) in *Hevea brasiliensis*." Plant and Cell Physiology **51**(11): 1878-1888.
- El Yahyaoui F., Küster H., Ben Amor B., Hohnjec N., Puchler A., Beeker A., Gouzy J., Vernie T., Niebel A., Godiard L and Gamas P.** (2004). "Expression Profiling in *Medicago truncatula* Identifies More Than 750 Genes Differentially Expressed during Nodulation, Including Many Potential Regulators of the Symbiotic Program." Plant Physiology **136**(2): 3159-3176.
- Ehrhardt D.W., Wais R. and Long S.R.,** (1996). Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. Cell **85**(5), 673-81.

Fedorova M., van de Mortel J., Matsumoto P. A., Cho J., Town C. D., Vanden Bosch K. A., Gantt J. S and Vance C. P. (2002). "Genome-Wide Identification of Nodule-Specific Transcripts in the Model Legume *Medicago truncatula*." Plant Physiology **130**(2): 519-537.

Fillion L., Ageorges A., Picaud S., Coutos-Thevenot P., Lemoine R., Romieu C and Delrot S. (1999). "Cloning and Expression of a Hexose Transporter Gene Expressed during the Ripening of Grape Berry." Plant Physiology **120**(4): 1083-1094.

Flemetakis, E., M. Dimou, Cotzur D., Efrose R. C., Aivalakis G., Colebatch G., Udvardi M. and Katinakis P. (2003). A sucrose transporter, LjSUT4, is up-regulated during *Lotus japonicus* nodule development. Journal of Experimental Botany **54**(388):1789-9.

Fotelli M., Tsikou D., Kolliopoulou A., Aivalakis G., Katinakis P., Udvardi M. K., Rennenberg H. and Flemetakis E. (2011). "Nodulation enhances dark CO₂ fixation and recycling in the model legume *Lotus japonicus*." Journal of Experimental Botany **62**(8): 2959-2971.

Foucher F. and Kondorosi E. (2000). "Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*". Plant Molecular Biology **43** (5-6): 772-786.

Fukao T., Yeung E. and Bailey-Serres J. (2012). "The Submergence Tolerance Gene *Delays Leaf Senescence* under Prolonged Darkness through Hormonal Regulation in Rice." Plant Physiology **160**(4): 1795-1807.

Gahrtz M., Schmelzer E., Stolz J. and Sauer N. (1996). "Expression of the *PmSUC1* sucrose carrier gene from *Plantago major* L. is induced during seed development." The Plant Journal **9**(1): 93-100 .

Gao Z., Maurousset L., Lemoine R., Yoo S-D., van Nocker S. and Loescher W. (2003). "Cloning, Expression, and Characterization of Sorbitol Transporters from Developing Sour Cherry Fruit and Leaf Sink Tissues." Plant Physiology **131**(4): 1566-1575.

Gogorcena, Y., Gordon A. J., Escuredo P. R., Minchin F. R., Witty J. F., Moran J. F. and Becana M. (1997). "N₂ Fixation, Carbon Metabolism, and Oxidative Damage in Nodules of Dark-Stressed Common Bean Plants." Plant Physiology **113**(4): 1193-1201.

Gordon, A. (1995). "Sucrose Metabolism to Support N₂ Fixation in Legume Root Nodules." Springer Netherlands: 533-538.

- Gordon, A., Ougham H. and James C.** (1993). "Changes in Levels of Gene Transcripts and their Corresponding Proteins in Nodules of Soybean Plants Subjected to Dark-Induced Stress." Journal of Experimental Botany **44**(9): 1453-1460.
- Gordon A. , Ryle G., Mitchell D., and Powell D.** (1985). "The Flux of ¹⁴C-Labelled Photosynthate through Soyabean Root Nodules during N₂ Fixation" Journal of Experimental Botany **36**(5):756-769.
- Graf A., Schlereth A., Stitt M. and Smith A.** (2010). "Circadian control of carbohydrate availability for growth in Arabidopsis plants at night." Proceedings of the National Academy of Sciences **107**(20): 9458-9463.
- Graham P. and Vance C.** (2003). "Legumes: Importance and Constraints to Greater Use." Plant Physiology **131**(3): 872-877.
- Grandbastien M.** (1998). "Activation of plant retrotransposons under stress conditions." Trends in Plant Science **3**(5): 181-187.
- Hardy R., Burns R. and Holsten R.** (1973). "Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation." Soil Biology and Biochemistry **5**(1): 47-81.
- Harrison M.** (1996). "A sugar transporter from *Medicago truncatula*: altered expression pattern in roots during vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizal associations." The Plant Journal **9**(4): 491-503.
- Henderson P. and Maiden M.** (1990). "Homologous sugar transport proteins in *Escherichia coli* and their relatives in both prokaryotes and eukaryotes." Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences **326**(1236): 391-410.
- Hillis D. and Bull J.** (1993). "An Empirical Test of Bootstrapping as a Method for Assessing Confidence in Phylogenetic Analysis." Systematic Biology **42**(2): 182-192.
- Hofmann J., Hess P., Szaksits D., Blochl A., Wiczorek K., Daxbock-Horvath S., Bohlmann H., van Bel A. J. and Grundler F.M.** (2009). "Diversity and activity of sugar transporters in nematode-induced root syncytia." Journal of Experimental Botany **60**(11): 3085-3095.
- Hunt S. and Layzell D.** (1993). "Gas Exchange of Legume Nodules and the Regulation of Nitrogenase Activity." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **44**(1): 483-511.

- Iannetta P., De Lorenzo C., James E. and Fernández-Pascual M.** (1993). "Oxygen Diffusion in Lupin NodulesI. Visualization of diffusion barrier operation." Journal of Experimental Botany **44**(9): 1461-1467.
- Ishizaki, K., Larson T., Schauer N., Fernie A., Graham I. A. and Leaver C.** (2005). "The Critical Role of Arabidopsis Electron-Transfer Flavoprotein:Ubiquinone Oxidoreductase during Dark-Induced Starvation." The Plant Cell **17**(9): 2587-2600.
- Johnson D., Hill J. and Thomas M.** (2006). "The monosaccharide transporter gene family in land plants is ancient and shows differential subfamily expression and expansion across lineages." BMC Evolutionary Biology **6**(1): 64.
- Johnson D. and Thomas M.** (2007). "The monosaccharide transporter gene family in Arabidopsis and rice: a history of duplications, adaptive evolution, and functional divergence." Molecular biology and evolution **24**(11): 2412-2423.
- Jones, K., Kobayashi H., Davies B., Taga M. and Walker G.** (2007). "How rhizobial symbionts invade plants: the Sinorhizobium-Medicago model." Nature reviews. Microbiology **5**(8): 619-633.
- Juchaux-Cachau M., Landouar-Arsivaud L., Pichaut J., Campion C., Pocheron B., Jeauffre J., Noiraud-Romy N., Simoneau P., Maurousset L. and Lemoine R.** (2007). "Characterization of AgMaT2, a Plasma Membrane Mannitol Transporter from Celery, Expressed in Phloem Cells, Including Phloem Parenchyma Cells." Plant Physiology **145**(1): 62-74.
- Julius B., Leach K., Tram T., Mertz R. and Braun D.** (2017). "Sugar Transporters in Plants: New Insights and Discoveries." Plant and Cell Physiology **58**(9): 1442-1460.
- Kalloniati C., Krompas P., Karalias G., Udvardi M., Rennenberg H., Herschbach C. and Flegelakis E.** (2015). "Nitrogen-Fixing Nodules Are an Important Source of Reduced Sulfur, Which Triggers Global Changes in Sulfur Metabolism in Lotus japonicus." The Plant Cell **27**(9): 2384-2400.
- Kaminker J., Bergman C., Kronmiller B., Carlson J., Svirskas R., Patel S., Frise E., Wheeler D. A., Lewis S. E., Rubin G. M., Ashburner M. and Celniker S. E.** (2002). "The transposable elements of the Drosophila melanogaster euchromatin: a genomics perspective." Genome Biology **3**(12): research0084.1-84.2.
- Kiyosue T., Abe H., Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K.** (1998). "ERD6, a cDNA clone for an early dehydration-induced gene of Arabidopsis, encodes a

putative sugar transporter1." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **1370**(2): 187-191.

Klepek Y., Geiger D., Stadler R., Kleb F., Landouar-Arsinaud L., Lemoine R., Hedrich R. and Sauer N. (2005). "Arabidopsis POLYOL TRANSPORTER5, a New Member of the Monosaccharide Transporter-Like Superfamily, Mediates H(+)-Symport of Numerous Substrates, Including myo-Inositol, Glycerol, and Ribose." The Plant Cell **17**(1): 204-218.

Klepek Y., Volke M., Konrad Kai R., Wippel K., Hoth S., Hedrich R and Sauer N. (2010). "Arabidopsis thaliana POLYOL/MONOSACCHARIDE TRANSPORTERS 1 and 2: fructose and xylitol/H⁺ symporters in pollen and young xylem cells." Journal of Experimental Botany **61**(2): 537-550.

Komaitis F., Kalliampakou K., Botou M., Nikolaidis M., Kalloniati C., Skliros D., Du B., Rennenberg H., Amoutzias G. D., Frillingos S. and Fletmetakis E. (2020). "Molecular and Physiological Characterization of the MST gene family in *Medicago truncatula*." Journal of Experimental Botany **71**(10): 3110-3125.

Kouchi H., Nakaji K., Yoneyama T. and Ishizula J. (1985). Dynamics of carbon photosynthetically assimilated in nodulated soybean plants under steady state conditions. 3. Time course study on ¹⁴C incorporation into soluble metabolites and respiratory evolution of CO₂ from roots and nodules. Annals of Botany **56**: 333-346

Kouchi H., Shimomura K., Hata S., Hirota A., Wu G-J Kumagai H., Tajima S., Sugunuma N., Suzuki A., Aoki T., Hayashi M., Yokohama 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**(4): 263-274.

Krishnakumar V., Kim M., Rosen B., Karamycheva S., Bidwell S., Tang H. and Town C. D. (2015). "MTGD: The *Medicago truncatula* Genome Database." Plant and Cell Physiology **56**(1): e1-e1.

Kryvoruchko, I., Sinharoy S., Torres-Jerez I., Sosso D., Pislariu C., Guan D., Murray J., Benedito V., Frommer W. and Udvardi M. (2016). "MtSWEET11, a Nodule-Specific Sucrose Transporter of *Medicago truncatula*." Plant Physiology **171**(1): 554-565.

Küster H., Hohnjec N., Krajinski F., El Yahyaoui F., Manthey K., Gouzy J., Doudrup M., Meyer F., Kalinowski J., Brechenmacher L., van Tuinen D. (2004). "Construction and validation of cDNA-based Mt6k-RIT macro- and microarrays to

explore root endosymbioses in the model legume *Medicago truncatula*." Journal of Biotechnology **108**(2): 95-113.

Law C., Maloney P. and Wang Da-Neng (2008). "Ins and Outs of Major Facilitator Superfamily Antiporters." Annual Review of Microbiology **62**(1): 289-305.

Layzell, D., Hunt S. and Palmer G. (1990). "Mechanism of Nitrogenase Inhibition in Soybean Nodules : Pulse-Modulated Spectroscopy Indicates that Nitrogenase Activity Is Limited by O₂." Plant Physiology **92**(4): 1101-1107.

Lee E., Matsumura Y., Soga K., Hoson T. and Koizumi N. (2007). "Glycosyl Hydrolases of Cell Wall are Induced by Sugar Starvation in Arabidopsis." Plant and Cell Physiology **48**(3): 405-413.

Lemoine R. (2000). "Sucrose transporters in plants: update on function and structure." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **1465**(1): 246-262.

Lemoine R., Bürkle L., Barker L., Sakr S., Kuhn C., Regnaca M., Gaillard C., Delrot C., Frommer W. B. (1999). "Identification of a pollen-specific sucrose transporter-like protein NtSUT3 from tobacco." FEBS Letters **454**(3): 325-330.

Leong S., Williams P., and Ditta G. (1985). "Analysis of the 5' regulatory region of the gene for delta-aminolevulinic acid synthetase of *Rhizobium meliloti*." Nucleic Acids Research **13**(16): 5965-5976.

Lin J. and Wu S. (2004). "Molecular events in senescing Arabidopsis leaves." The Plant Journal **39**(4): 612-628.

Madigan M., Martinko J., Bender K., Buckley D., & Stahl D. (2015), ed. Brock biology of microorganisms, Pearson: Boston

Matamoros M., Baird L., Escuredo P., Dalton D., Minchin F., Iturbe-Ormaetxe I., Rubio M., Moran J., Gordon A. and Becana M. (1999). "Stress-Induced Legume Root Nodule Senescence. Physiological, Biochemical, and Structural Alterations." Plant Physiology **121**(1): 97-112.

McComb E. and Rendig V. (1962). "Ononitol (4-O-methyl-myo-inositol) as a constituent of *Medicago sativa*". Archives of Biochemistry and Biophysics **99** (1): 192-193.

Meyer S., Lauterbach C., Niedermeier M., Barth I., Sjolund R. and Sauer N. (2004). "Wounding Enhances Expression of AtSUC3, a Sucrose Transporter from Arabidopsis Sieve Elements and Sink Tissues." Plant Physiology **134**(2): 684-693.

Minchin F. (1997). "Regulation of oxygen diffusion in legume nodules." Soil Biology and Biochemistry **29**(5): 881-888.

- Minchin F., Summerfield R., Hadley P., Roberts E. and Rawsthorne S.** (1981). "Carbon and nitrogen nutrition of nodulated roots of grain legumes." Plant, Cell & Environment **4**(1): 5-26.
- Miyashita Y. and Good A.** (2008). "NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase is essential for the survival of *Arabidopsis thaliana* during dark-induced carbon starvation." Journal of Experimental Botany **59**(3): 667-680.
- Monahan-Giovanelli H., Arango P. and Gage D.** (2006). "Architecture of infection thread networks in developing root nodules induced by the symbiotic bacterium *Sinorhizobium meliloti* on *Medicago truncatula*". Plant Physiology **140**(2), 661-670.
- Neuhaus H.** (2007). "Transport of primary metabolites across the plant vacuolar membrane." FEBS Letters **581**(12): 2223-2226.
- Noiraud N., Delrot S., and Lemoine R. (2000). "The Sucrose Transporter of Celery. Identification and Expression during Salt Stress." Plant Physiology **122**(4): 1447-1456.
- Noiraud N., Maurousset L. and Lemoine R.** (2001). "Transport of polyols in higher plants." Plant Physiology and Biochemistry **39**(9): 717-728.
- Nørholm M., Nour-Eldin H., Brodersen P., Mundy J. and Halkier B. (2006). "Expression of the *Arabidopsis* high-affinity hexose transporter STP13 correlates with programmed cell death." FEBS Letters **580**(9): 2381-2387.
- Oldroyd G., Harrison M., and Udvardi M.** (2005). "Peace Talks and Trade Deals. Keys to Long-Term Harmony in Legume-Microbe Symbioses." Plant Physiology **137**(4): 1205-1210.
- Pao S., Paulsen I. and Saier M.** (1998). "Major facilitator superfamily". Microbiology and molecular biology reviews **62**(1): 1-34.
- Paulsen P.A., Custódio T.F., Pedersen B.P.** (2019). "Crystal structure of the plant symporter STP10 illuminates sugar uptake mechanism in monosaccharide transporter superfamily." Nature Communications **10**(1): 407.
- Parthasarathy L., Seelan R., Tobias C., Casanova M., Parthasarathy R.** (2006). "Mammalian inositol 3-phosphate synthase: its role in the biosynthesis of brain inositol and its clinical use as a psychoactive agent". Sub-Cellular Biochemistry **39**: 293–314.
- Pego J. V. and Smeekens S. C.** (2000). "Plant fructokinases: a sweet family get-together". Trends in plant science, **5**(12): 531-536.

- Pérez Guerra, J., Coussens G., De Keyser A., De Rycke R., De Bodt S., Van de Velde W., Goormachtig S. and Holsters M.** (2010). "Comparison of Developmental and Stress-Induced Nodule Senescence in *Medicago truncatula*." Plant Physiology **152**(3): 1574-1584.
- Peters N., Frost J. and Long S.** (1986). "A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes". Science **233**: 977-980.
- Pislariu C., Murray J., Wen J., Cosson V., Muni R., Wang M., Benedito A., Andriankaja A., Cheng X., Jerez I., Mondy S., Zheng S., Taylor M., Tagede M., Ratet P., Mysore K., Chen R. and Udvardi M.** (2012). "A *Medicago truncatula* Tobacco Retrotransposon Insertion Mutant Collection with Defects in Nodule Development and Symbiotic Nitrogen Fixation." Plant Physiology **159**(4): 1686-1699.
- Pomeranz Y. and Meloan C.** (1994). "Food Analysis. Practice and Theory". Chapman and Hall, N.Y. London
- Pommerrenig B., Papini-Terzi F. and Sauer N.** (2007). "Differential Regulation of Sorbitol and Sucrose Loading into the Phloem of *Plantago major* in Response to Salt Stress." Plant Physiology **144**(2): 1029-1038.
- Popova L. and Riddle K.** (1996). "Development and accumulation of ABA in fluridone-treated and drought-stressed *Vicia faba* plants under different light conditions." Physiologia Plantarum **98**(4): 791-797.
- Poschet G., Hannich B. and Büttner M.** (2010). "Identification and Characterization of AtSTP14, a Novel Galactose Transporter from *Arabidopsis*." Plant and Cell Physiology **51**(9): 1571-1580.
- Poschet G., Hannich B., Raab S., Jungkunz I., Klemens P., Krueger S., Wic S., Neuhaus H., and Büttner M.** (2011). "A Novel *Arabidopsis* Vacuolar Glucose Exporter Is Involved in Cellular Sugar Homeostasis and Affects the Composition of Seed Storage Compounds." Plant Physiology **157**(4): 1664-1676.
- Prell J. and Poole P.** (2006). "Metabolic changes of rhizobia in legume nodules." Trends in Microbiology **14**(4): 161-168.
- Quezada-Calvillo R., Robayo C., Nichols B.** (2006). "Carbohydrate Digestion and Absorption". Missouri: Saunders, Elsevier. pp. 182–185.
- Ramakers, C., Ruijter J., Lekanne Deprez R. and Moorman A.** (2003). "Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data." Neuroscience Letters **339**(1): 62-66.

- Ramsperger-Gleixner, M., Geiger D., Hedrich R and Sauer S.** (2004). "Differential Expression of Sucrose Transporter and Polyol Transporter Genes during Maturation of Common Plantain Companion Cells." Plant Physiology **134**(1): 147-160.
- Redmond, J., Batley M., Djordjevic M., Innes R., Kuempel E. and Rolfe B.** (1986). Flavones induce expression of nodulation genes in *Rhizobium*. Nature **323**: 632-635.
- Reinders A., Panshyshyn J. and Ward J.** (2005). "Analysis of transport activity of Arabidopsis sugar alcohol permease homolog AtPLT5." Journal of Biological Chemistry **280**(2): 1594-1602.
- Rottmann, T., Zierer W., Subert C., Sauer N. and Stadler R.** (2016). "STP10 encodes a high-affinity monosaccharide transporter and is induced under low-glucose conditions in pollen tubes of Arabidopsis." Journal of Experimental Botany **67**(8): 2387-2399.
- Rottmann T., Klebl F., Schneider S., Kischka D., Rüscher D., Sauer N. and Stadler R.** (2018). "Sugar Transporter STP7 Specificity for L-Arabinose and D-Xylose Contrasts with the Typical Hexose Transporters STP8 and STP12." Plant Physiology **176**(3): 2330-2350.
- Saier M.** (1994). "Computer-aided analyses of transport protein sequences: gleaning evidence concerning function, structure, biogenesis, and evolution." Microbiological Reviews **58**(1): 71-93.
- Sanchez D., Lippold F., Redestig H., Hannah M., Erban A., Krämer U., Kopka J. and Udvardi M.** (2008). "Integrative functional genomics of salt acclimatization in the model legume *Lotus japonicus*." The Plant Journal **53** (6): 973-987.
- Sarath, G., Pfeiffer N., Sodhi C. and Wagner F.** (1986). "Bacteroids Are Stable during Dark-Induced Senescence of Soybean Root Nodules." Plant Physiology **82**(2): 346-350.
- Sauer, N., Friedländer K. and Gräml-Wicke U.** (1990). "Primary structure, genomic organization and heterologous expression of a glucose transporter from *Arabidopsis thaliana*." The EMBO journal **9**(10): 3045-3050.
- Schneider S., Beyhl D., Hedrich R. and Sauer N.** (2008). "Functional and Physiological Characterization of Arabidopsis Inositol Transporter 1, a Novel Tonoplast-Localized Transporter for myo-Inositol." The Plant Cell **20**(4): 1073-1087.

- Schneider S., Schneidereit A., Konrad Kai R., Hajirezaei M., Gramann M., Hedrich R. and Sauer N.** (2006). "Arabidopsis INOSITOL TRANSPORTER4 Mediates High-Affinity H(+) Symport of Myoinositol across the Plasma Membrane." Plant Physiology **141**(2): 565-577.
- Schneider S., Schneidereit A., Udvardi P., Hammes U., Gramann M., Dietrich P., Sauer N.** (2007). "Arabidopsis INOSITOL TRANSPORTER2 Mediates H(+) Symport of Different Inositol Epimers and Derivatives across the Plasma Membrane." Plant Physiology **145**(4): 1395-1407.
- Schneidereit A., Scholz-Starke J. and Büttner M.** (2003). "Functional Characterization and Expression Analyses of the Glucose-Specific AtSTP9 Monosaccharide Transporter in Pollen of Arabidopsis." Plant Physiology **133**(1): 182-190.
- Schneidereit A., Scholz-Starke J., Sauer N. and Büttner M.** (2005). "AtSTP11, a pollen tube-specific monosaccharide transporter in Arabidopsis." Planta **221**(1): 48-55.
- Scholz-Starke J., Büttner M. and Sauer N.** (2003). "AtSTP6, a New Pollen-Specific H+-Monosaccharide Symporter from Arabidopsis." Plant Physiology **131**(1): 70-77.
- Schulz A., Beyhl D., Marten I., Wormit A., Neuhaus E., Poschet G., Büttner M., Schneider S., Sauer N. and Hedrich R.** (2011). "Proton-driven sucrose symport and antiport are provided by the vacuolar transporters SUC4 and TMT1/2." The Plant Journal **68**(1): 129-136.
- Schultze M. and Kondorosi A.** (1998). "Regulation of symbiotic root nodule development". Annual Review of Genetics **32**: 33-57
- Shimokawa N., Okada J., Haglund K., Dikic I., Koibuchi N. and Miura M.** (2002). "Past-A, a Novel Proton-Associated Sugar Transporter, Regulates Glucose Homeostasis in the Brain." The Journal of Neuroscience **22**(21): 9160-9165.
- Skoog D., Holler F., Nieman T.** (1998). "Principles of Instrumental Analysis", 5th Edition, Saunders College Publishing, Philadelphia, (μετάφραση 5^{ης} έκδοσης από Μ. Ι. Καραγιάννη, Κ. Η. Ευσταθίου, Ν. Χανιωτάκης).
- Sokolov, L., Déjardin A. and Kleczkowski L.** (1998). "Sugars and light/dark exposure trigger differential regulation of ADP-glucose pyrophosphorylase genes in *Arabidopsis thaliana* (thale cress)." Biochemical Journal **336**(3): 681-687.
- Song, S., Vieille C.** (2009). "Recent advances in the biological production of mannitol". Applied Microbiology and Biotechnology **84** (1): 55–62.

Stadler R., Büttner M., Ache P., Hedrich R., Inashikina N., Metzger M., Shearson M., Smith S.M. and Sauer N. (2003). "Diurnal and Light-Regulated Expression of AtSTP1 in Guard Cells of Arabidopsis." Plant Physiology **133**(2): 528-537.

Stougaard J. (2000) "Regulators and regulation of legume root nodule development". Plant Physiol. **124**(2), 531-40.

Suliman, S. and Tran L. (2014). "Symbiotic nitrogen fixation in legume nodules: metabolism and regulatory mechanisms." International journal of molecular sciences **15**(11): 19389-19393.

Ta T., Madowall F. and Faris M. (1987). "Utilization of carbon from photosynthesis and nodule CO₂ fixation in the fixation and assimilation of nitrogen by alfalfa root nodules". Canadian Journal of Botany **65**: 2537–2541.

Taiz L. and Zeiger E. (2002). Plant physiology. 3rd edn." Annals of Botany **91**(6): 750-751.

Tadege M., Ratet P. and Mysore K. (2005)." Insertional mutagenesis: a Swiss Army knife for functional genomics of *Medicago truncatula*". Trends in Plant Science **10**(5):229-35.

Tadege M., Wen J., He J., Tu H., Kwak Y., Eschstruth A., Cayrel A., Endre G., Zhao P., Chabaud M., Ratet P. and Mysore K. (2008). "Large-scale insertional mutagenesis using the *Tnt1* retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*." The Plant Journal **54**(2): 335-347.

Tang H., Krishnakumar V., Bidwell S., Rosen B., Chan A., Zhou S., Gentzbittel L., Childs K., Yandell M., Grundlach H., Mayer K., Schwarz D. and Town C. (2014). "An improved genome release (version Mt4.0) for the model legume *Medicago truncatula*." BMC Genomics **15**(1): 312.

Taylor N., Heazlewood J., Day D. and Millar A. (2004). "Lipoic acid-dependent oxidative catabolism of α -keto acids in mitochondria provides evidence for branched-chain amino acid catabolism in Arabidopsis." Plant physiology **134**(2): 838-848.

Trinh T., Ratet P., Kondorosi E., Durand P., Kamaté K., Bauer P. and Kondorosi A. (1998). Rapid and efficient transformation of diploid *Medicago*

truncatula and *Medicago sativa* ssp. *falcata* lines improved in somatic embryogenesis. Plant Cell Reports **17**: 345-355.

Truernit E., Schmid J., Epple P., Illig J. and Sauer N. (1996). "The sink-specific and stress-regulated Arabidopsis STP4 gene: enhanced expression of a gene encoding a monosaccharide transporter by wounding, elicitors, and pathogen challenge." The Plant Cell **8**(12): 2169-2182.

Truernit E., Stadler R., Baier K. and Sauer N. (1999). "A male gametophyte-specific monosaccharide transporter in Arabidopsis". The Plant Journal, **17**(2): 191-201.

Tsikou D., Kalloniati C., Fotelli M. N., Nikolopoulos D., Katinakis P., Udvardi M., Rennenberg H. and Flemetakis E. (2013). "Cessation of photosynthesis in *Lotus japonicus* leaves leads to reprogramming of nodule metabolism." Journal of Experimental Botany **64**(5): 1317-1332.

Uchiumi T., Ohwada T., Itakura M., Mitsui H., Nukui N., Dawadi P., Kaneko T., Tabata S., Yokoyama T., Tejima K. and Saeki K. (2004). "Expression Islands Clustered on the Symbiosis Island of the *Mesorhizobium loti* Genome." Journal of Bacteriology **186**(8): 2439-2448.

Udvardi M. and Day D. (1997). "METABOLITE TRANSPORT ACROSS SYMBIOTIC MEMBRANES OF LEGUME NODULES." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **48**(1): 493-523.

Vance C. (2001). "Symbiotic Nitrogen Fixation and Phosphorus Acquisition. Plant Nutrition in a World of Declining Renewable Resources." Plant Physiology **127**(2): 390-397.

Van de Velde W., Pérez Guerra J. C., De Keyser A., De Rycke R., Rombauts S., Maunoury N., Mergaert P., Kondorosi E., Holsters M. and Goormachtig S. (2006). "Aging in legume symbiosis. A molecular view on nodule senescence in *Medicago truncatula*". Plant Physiology **141**(2): 711-720.

Vance C. and Heickel G. (1991). "Carbon in N₂ fixation: Limitation or exquisite adaptation". Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **42**, 373-392.

Vauclare P., Bligny R., Gout E., De Meuron V. and Widmer F. (2010). "Metabolic and structural rearrangement during dark-induced autophagy in soybean (*Glycine max*

L.) nodules: an electron microscopy and ^{31}P and ^{13}C nuclear magnetic resonance study." Planta **231**(6): 1495-1504.

Verdier J., Benedito V. and Udvardi M. (2012). The *Medicago Truncatula* gene expression atlas (Mtgea): a tool for legume seed biology and biotechnology. Seed Development: OMICS Technologies toward Improvement of Seed Quality and Crop Yield, Springer: 111-127.

Voisin, A., Salon C., Jeudy C. and Warembourg F. (2003). "Symbiotic N_2 fixation activity in relation to C economy of *Pisum sativum* L. as a function of plant phenology." Journal of Experimental Botany **54**(393): 2733-2744.

Walsh K., Vessey J. and Layzell D. (1987). "Carbohydrate supply and N_2 fixation in soybean : the effect of varied daylength and stem girdling." Plant Physiology **85**(1): 137-144.

Wang H., Liu D., Sun J. and Zhang A. (2005). "Asparagine synthetase gene TaASN1 from wheat is up-regulated by salt stress, osmotic stress and ABA." Journal of plant physiology **162**(1): 81-89.

Wang M., Yu C., Zhao H. (2016). "Identification of an important motif that controls the activity and specificity of sugar transporters." Biotechnology and Bioengineering **113**(7): 1460-1467.

Warembourg F. and Roumet C. (1989). "Why and how to estimate the cost of symbiotic N_2 fixation? A progressive approach based on the use of ^{14}C and ^{15}N isotopes." Plant and Soil **115**(2): 167-177.

Weber A., Servaites J., Geiger D., Kofler H., Hille D., Groner F., Hebbeker U. and Flugge U. (2000). "Identification, Purification, and Molecular Cloning of a Putative Plastidic Glucose Translocator." The Plant Cell **12**(5): 787-802.

Weschke W., Panitz R., Sauer N., Wang O., Neubohn B., Weber H. and Wobus U. (2000). "Sucrose transport into barley seeds: molecular characterization of two transporters and implications for seed development and starch accumulation." The Plant Journal **21**(5): 455-467.

Williams L., Lemoine R. and Sauer N. (2000). "Sugar transporters in higher plants – a diversity of roles and complex regulation." Trends in Plant Science **5**(7): 283-290.

Wilson P., Fred E. and Salmon M. (1933). "Relation between carbon dioxide and elemental nitrogen assimilation in leguminous plants." Soil Science **35**(2): 145-166.

Wingenter K., Schulz A., Wormit A., Wic S., Trentmann I., Hoermiller I., Heyer A. G., Marten I., Hedrich R. and Neuhaus E. (2010). "Increased Activity of the

- Vacuolar Monosaccharide Transporter TMT1 Alters Cellular Sugar Partitioning, Sugar Signaling, and Seed Yield in Arabidopsis." Plant Physiology **154**(2): 665-677.
- Wolfenstetter S., Wirsching P., Dotzauer D. Schneider S. and Sauer N.** (2012). "Routes to the Tonoplast: The Sorting of Tonoplast Transporters in Arabidopsis Mesophyll Protoplasts." The Plant Cell **24**(1): 215-232.
- Wormit A., Trentmann O., Feifer I., Lohr C., Tjaden C., Meyer S., Schmidt U., Martinoia E. and Neuhaus E.** (2006). "Molecular Identification and Physiological Characterization of a Novel Monosaccharide Transporter from Arabidopsis Involved in Vacuolar Sugar Transport." The Plant Cell **18**(12): 3476-3490.
- Wright K., Roberts A., Martens H., Sauer N. and Oparka K.** (2003). "Structural and Functional Vein Maturation in Developing Tobacco Leaves in Relation to AtSUC2 Promoter Activity." Plant Physiology **131**(4): 1555-1565.
- Xia J. and Wishart D.** (2016). "Using MetaboAnalyst 3.0 for Comprehensive Metabolomics Data Analysis." Current Protocols in Bioinformatics **55**(1): 14.10.11-14.10.91.
- Yamada K., Osakabe Y., Mizoi J., Nakashima K., Fujita Y., Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K.** (2010). "Functional Analysis of an Arabidopsis thaliana Abiotic Stress-inducible Facilitated Diffusion Transporter for Monosaccharides." The Journal of Biological Chemistry **285**(2): 1138-1146.
- Yamada K., Osakabe Y. and Yamaguchi-Shinozaki K.** (2017). "A C-terminal motif contributes to the plasma membrane localization of Arabidopsis STP transporters." PLoS ONE **12**(10): e0186326.
- Yan N.** 2015. "Structural Biology of the Major Facilitator Superfamily Transporters." Annual Review of Biophysics **44**(1): 257-83.
- Βουδούρης Ε. Κ. και Κοντομηνάς Μ. Γ.** (1987). "Ανάλυση Τροφίμων: Θεωρία και Εφαρμογές", Ιωάννινα.
- Γαλανού Δ. Σ. και Βουδούρη Ε. Κ.** (1975). "Εισαγωγή στην Εξέταση των Τροφίμων", Εκδόσεις Πανεπιστημίου Αθηνών.
- Πολυχρονιάδου-Αληχανίδου Α.** (1990). "Ανάλυση Τροφίμων", Θεσσαλονίκη.
- Χατζιωάννου Θ. Π.** (1996). "Εργαστηριακές Ασκήσεις Ποσοτικής Αναλυτικής Χημείας", Αθήνα