

2ο Συνέδριο

Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας

4,5 Οκτωβρίου 2012

στο Συνεδριακό Κέντρο
του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών



ΤΕΥΧΟΣ ΠΕΡΙΛΗΨΕΩΝ

2ο Συνέδριο Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας

4,5 Οκτωβρίου 2012

Συνεδριακό Κέντρο Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, Ιερά Οδός 75, Αθήνα

<http://abc2012.aua.gr>

<http://gbt.aua.gr>

ΤΕΥΧΟΣ ΠΕΡΙΛΗΨΕΩΝ

Οργανωτική Επιτροπή

Γεώργιος Καραμπουρνιώτης, Καθηγητής, Πρόεδρος της Ο.Ε.

Δημήτριος Μπουράνης, Καθηγητής, Πρόεδρος του Τμήματος

Σπυρίδων Κίντζιος, Καθηγητής

Ελένη Ντούνη, Επ. Καθηγήτρια

Ιορδάνης Χατζηπαυλίδης, Επ. Καθηγητής

Γεώργιος Λιακόπουλος, Λέκτορας

Παρασκευή Σκαμνιώτη, Λέκτορας

Αναστασία Ταμπακάκη, Λέκτορας

Στυλιανή Χωριανοπούλου, Λέκτορας

Δημοσθένης Νικολόπουλος, Ε.Ε.ΔΙ.Π.

Γραμματεία Συνεδρίου:

Αιμιλία Νικολοπούλου

Αίγλη Παπαθανασοπούλου

**Η Οργανωτική Επιτροπή του 2ου Συνεδρίου Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας
ευχαριστεί τις Πρυτανικές Αρχές του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών
για την έμπρακτη συμβολή τους στη διοργάνωση του Συνεδρίου**

Προσκεκλημένοι Ομιλητές (σύμφωνα με τη σειρά του προγράμματος)

Δημήτριος Μπέης, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών

Αριάδνη Χάγερ, Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών ΓΠΑ

Κωνσταντίνος Δελής, ΤΕΙ Καλαμάτας

Δημήτριος Τσιτσιγιάννης, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής ΓΠΑ

Ειρήνη Καρανασάση, ΤΕΙ Μεσολογγίου

Χορηγοί Συνεδρίου



ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ
Ι. Μπάσδρα & Σια Ο.Ε.

Βιβλία για τις επιστήμες της ζωής
www.academicbooks.gr

**Lab Supplies
Scientific**



ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΕΜΒΡΥΟ
επιστημονικά βιβλία
www.embryopub.gr



Αγλαύρου 6, 117 41, Αθήνα
Τηλ. 210 922 3246 - Fax 210 922 3252
Email: info@biosure.gr - Website: www.biosure.gr



ΚΡΙΤΙΩΝΟΣ 35, ΓΑΥΦΑΔΑ 166 74, ΑΘΗΝΑ
ΤΗΛ: 210 96 200 10, 210 96 13 479 FAX: 210 96 200 10
EMAIL: chembiot@otenet.gr
WEBSITE: www.chembiotin.com



Ενότητα: Γενετική και Εξελικτική Βιολογία

Section: Genetics and Evolutionary Biology

ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΤΗΣ β-ΛΑΚΤΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ

Ανδρέου Α¹, Μπεθάνης Κ², Ηλιόπουλος Η^{1,*}

¹ Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Γενετικής, Ιερά Οδός 75, 118 55, Αθήνα

² Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γενικό, Εργαστήριο Φυσιικής, Ιερά Οδός 75, 118 55, Αθήνα

* eliop@aua.gr

Περίληψη

Η β-λακτοσφαιρίνη μία μη-γλυκοζυλιωμένη λιποκαλίνη, είναι η βασική πρωτεΐνη του ορού του γάλακτος πολλών θηλαστικών, της οποίας η λειτουργικότητα συνδέεται με τη δέσμευση, προστασία και μεταφορά υψηλής αξίας υδρόφοβων βιομορίων. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν *in vitro* με διάφορες τεχνικές για τη δέσμευση υποστρωμάτων στην πρωτεΐνη β-λακτοσφαιρίνη έδειξαν ότι μπορεί να δεσμεύει στο λιπόφιλο κάλυκά της διάφορα υδρόφοβα υποστρώματα όπως λιπαρά οξέα, λιπίδια, ρετινοειδή, μικρά αλκάνια, αλειφατικές κετόνες και αρωματικές ενώσεις. Κρυσταλλογραφικές και άλλες φυσικοχημικές μελέτες καταδεικνύουν σαφώς τη δέσμευση του υποστρώματος στον κάλυκα.

Στην παρούσα εργασία γίνονται γονιδιακή ανάλυση της β-λακτοσφαιρίνης στα θηλαστικά, κρυσταλλογραφική και *in silico* μελέτη με σκοπό τη διερεύνηση της δυνατότητας συμπλοκοποίησης. Τα λιπίδια και τα στεροειδή που επιλέχθηκαν ως προσδέτες είναι τα: αραχιδονικό οξύ, αραχιδικό οξύ, λινολενικό οξύ, λινελαϊκό οξύ, ελαϊκό οξύ, στεατικό οξύ, μυριστελαϊκό οξύ, μυριστικό οξύ, λαουρικό οξύ, εργοστερόλη και 7-δεϋδροχοληστερόλη. Από τη μοριακή προτυποποίηση αλλά και τις υπάρχουσες φυσικοχημικές και τις κρυσταλλογραφικές μελέτες είναι φανερή η τάση των υποστρωμάτων να καλύψουν την υδρόφοβη επιφάνειά τους στην κοιλότητα του λιποκάλυκα, αφήνοντας εκτεθειμένες στο διαλύτη τυχόν πολικές ή υδρόφιλες ομάδες.

GENE ANALYSIS AND β -LACTOGLOBULIN COMPLEXES

Andreou A¹, Bethanis C², Eliopoulos E^{1,*}

¹ Agricultural University of Athens, Department of Agricultural Biotechnology, Laboratory of Genetics, Iera Odos 75, 118 55 Athens

² Agricultural University of Athens, Department of Science, Laboratory of Physics, Iera Odos 75, 118 55 Athens

* eliop@aua.gr

Abstract

β -Lactoglobulin, a non-glycosylated lipocalin, is the major whey protein of many mammal species, whose functionality is associated with the binding, protection and transportation of significant hydrophobic biomolecules. Binding studies conducted with various techniques *in vitro*, showed that the ligand binding site can accommodate various hydrophobic substrates such as fatty acids, lipids, retinoids, small alkanes, aliphatic ketones and aromatic compounds. Crystallographic and other physicochemical studies clearly demonstrate the accommodation of the biomolecule in the hydrophobic calyx.

In this work gene analysis of mammalian beta-lactoglobulins was performed to investigate conservation in the protein framework and crystallographic and *in silico* studies were carried out in order to elucidate protein complexation with hydrophobic ligands. Lipids and steroids chosen as ligands are: arachidonic acid, arachidic acid, linolenic acid, linoleic acid, oleic acid, stearic acid, myristoleic acid, myristic acid, lauric acid, ergosterol and 7-dehydrocholesterol. Results show that ligands tend to bind in such a way to maximize hydrophobic surface shielding in the lipocalyx cavity, leaving polar or hydrophilic groups exposed to solvent.

ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ ΣΤΟΙΧΙΣΗΣ ΠΡΩΤΟΤΑΓΟΥΣ ΚΑΙ ΤΡΙΤΟΤΑΓΟΥΣ ΔΟΜΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Σκουτέλη Α, Παπαθανασοπούλου Α, Ηλιόπουλος Η*

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Τομέας Γενετικής, Εργαστήριο Γενετικής, Ιερά Οδός 75, 118 55, Αθήνα

* eliop@aua.gr

Περίληψη

Η τριτοταγής δομή των πρωτεϊνών, που σχετίζεται άμεσα με τη λειτουργία τους, είναι πιο συντηρημένη εξελικτικά από την πρωτοταγή δομή. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι ομοιότητες και οι διαφορές των στοιχίσεων της πρωτοταγούς και της τριτοταγούς δομής, δέκα οικογενειών ενζύμων (Γαλακτική Αφυδρογονάση, Μηλική Αφυδρογονάση, Ισοπροπυλομηλική Αφυδρογονάση, Αφυδρογονάση της 3-Φωσφορικής Γλυκεραλδεΐδης, Διϋδρολιποαμιδική Αφυδρογονάση, Διϋδροφολική Αφυδρογονάση, 3-Οξοακυλο-αναγωγήση, Αναγωγήση της Θειορεδοξίνης, Δισουλφιδική Αναγωγήση της Θειορεδοξίνης, Καταλάση) με κοινή τριτοταγή αρχιτεκτονική (α/β δομές). Η σύγκριση των δύο στοιχίσεων (δομικής και γραμμικής) έγινε με αναφορά στα στοιχεία της δευτεροταγούς δομής των ενζύμων που εξετάστηκαν από κάθε οικογένεια.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και στις 10 οικογένειες ενζύμων που περιλαμβάνουν 98 πρωτεΐνες: Η απόκλιση μεταξύ δομικής και γραμμικής στοιχίσης είναι ανεξάρτητη από το πλήθος των αμινοξικών ακολουθιών της οικογένειας, από το μήκος αυτών, καθώς και από το πλήθος των κανονικών στοιχείων της δευτεροταγούς δομής των (β-πτυχωτές επιφάνειες, α-έλικες). Επίσης, επιβεβαιώνεται το συμπέρασμα ότι, τόσο στη γραμμική όσο και στη δομική στοιχίση, η εισαγωγή/απαλοιφή θέσεων στην αμινοξική ακολουθία είναι κυρίαρχη στους βρόχους. Και οι δύο μέθοδοι στοιχίσης, με ελάχιστες εξαιρέσεις, είναι ευαίσθητες και εντοπίζουν την εισαγωγή θέσεων, είτε πριν από κάποιο κανονικό στοιχείο της δευτεροταγούς δομής, είτε αμέσως μετά.

COMPARISON OF MULTIPLE SEQUENCES ALIGNMENT AND MULTIPLE STRUCTURES ALIGNMENT

Skouteli A, Papathanasopoulou A, Eliopoulos E*

Agricultural University of Athens, Dep. Agricultural Biotechnology, Genetics Laboratory, 75 Iera Odos, 118 55 Athens

* eliop@aua.gr

Abstract

Tertiary structure of proteins is more conserved from the primary structure, because it is directly linked to their function. Similarities and differences between multiple sequence and multiple structure alignments of 10 enzyme families (Lactate Dehydrogenase, Malate Dehydrogenase, Isopropylmalate Dehydrogenase, Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase, Dehydrolipoyl Dehydrogenase, Dehydrofolate Reductase, 3-oxoacyl Reductase, Thioredoxin Reductase, Thioredoxin Disulfide Reductase, Catalase) with common architecture (a/b structures) were studied. The comparison of the alignments was conducted with reference to the components of the secondary structure of the examined enzymes from every family.

The results showed that in all enzyme families that contain 98 members: The deviation between structural and sequence alignment is independent from the number of aligned amino acid sequences in a family, the length of the amino acid sequences and the number of regular secondary structure elements (b-sheets, a-helices).

It was concluded that in both sequence as well as structural alignment, insertion/deletion of aminoacid residues happens almost entirely in loop regions. Both alignment methods, sequence and structural, with few exceptions, are sensitive and detect insertion of gaps either before or after a regular element of the secondary structure.

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΔΟΜΙΚΗ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΑΝΤΙΛΗΨΗΣ ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΤΑ ΚΟΥΝΟΥΠΙΑ

Μαραγκουδάκης Σ, Παπαθανασοπούλου Α, Ηλιόπουλος Η*

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Τομέας Γενετικής, Εργαστήριο Γενετικής, Ιερά Οδός 75, 118 55, Αθήνα

* eliop@aua.gr

Περίληψη

Οι OBPs πρωτεΐνες είναι τα πρώτα συστατικά του οσφρητικού συστήματος των εντόμων, εντοπίζονται στις κεραίες τους και δεσμεύουν πτητικές ενώσεις (οσμές και φερομόνες). Η μεταφορά και πρόσδεση των ουσιών αυτών στους οσφρητικούς μεμβρανικούς υποδοχείς προκαλεί μεταβίβαση σήματος που καταλήγει σε συγκεκριμένες αντιδράσεις φυσιολογίας και συμπεριφοράς (είτε απώθηση, είτε προσέλκυση).

Η κατανόηση της δομής και λειτουργίας των οσφρητικών πρωτεϊνών των κουνουπιών ανοίγει το δρόμο για την ανάπτυξη εντομοαπωθητικών και εντομοελκυστικών ουσιών οι οποίες μπορούν, τελικά, να συμβάλλουν στην επιλεκτική απώθηση/προσέλκυση των κουνουπιών και την μείωση του αριθμού δηγμάτων αυτών και δι' αυτού της μετάδοσης ασθενειών. Στο *Anopheles gambiae*, (κουνούπι φορέας του *Plasmodium falciparum*, παρασίτου υπεύθυνου για την ελονοσία) από τα 57 γνωστά γονίδια που κωδικοποιούν OBPs πρωτεΐνες, έχουν προσδιοριστεί οι τρισδιάστατες δομές για 10 OBPs πρωτεΐνες και έχουν σχεδιαστεί κατάλληλα εντομοαπωθητικά φάρμακα. Τα εντομοαπωθητικά που είναι αποδοτικά στο *A. gambiae* δεν έχουν την ίδια δράση και στο *Aedes aegypti*, το κουνούπι που μεταφέρει τον ιό του κίτρινου πυρετού. Μέχρι σήμερα γνωστή είναι μόνο η τρισδιάστατη δομή της OBP1 του *A. aegypti* που είναι κυρίαρχη στα θηλυκά έντομα.

Σε αυτήν την εργασία αναλύεται η ομολογία μεταξύ των αμινοξικών ακολουθιών OBPs των δύο ειδών και δημιουργούνται αξιόπιστα δομικά μοντέλα 5 OBPs πρωτεϊνών του *A. aegypti*, με βάση τις τρισδιάστατες δομές των αντίστοιχων OBPs του *A. gambiae*. Αυτές θα χρησιμοποιηθούν στο σχεδιασμό κατάλληλων εντομοαπωθητικών ουσιών που θα δεσμεύονται από τις OBPs του *A. aegypti* για την αντιμετώπιση του κίτρινου και δάγκειου πυρετού.

GENETIC ANALYSIS AND MOLECULAR MODELLING OF OLFACTION PROTEINS IN MOSQUITOS

Maragoudakis S, Papathanasopoulou A, Eliopoulos E*

Agricultural University of Athens, Dep. Agricultural Biotechnology, Genetics Laboratory, 75 Iera Odos, 118 55 Athens

* eliop@aua.gr

Abstract

Odorant binding proteins (OBPs), the primary component of the insect olfaction system are located on the antennae. Transportation and binding of odorants to the membrane olfaction receptors initiates signal transduction resulting to specific physiological and behavioural responses (attraction or repulsion).

Understanding the structure and function of mosquito odorant binding proteins open ways for the development of insect attractant or repellent compounds, in order to reduce the number of insect bites and disease transmission. For the *Anopheles gambiae* (carrier of the parasite *Plasmodium falciparum* responsible for malaria) from the 57 genes that express OBPs, the three dimensional structures for ten proteins have been determined and relevant repellents have been designed. Effective repellents for *A. gambiae* may be ineffective for *Aedes aegypti*, the mosquito carrier of the yellow fever virus. To date only the 3D structure of OBP1 for *A. aegypti*, dominant on female mosquitoes, has been determined.

In this work, sequence analysis and comparisons are performed between OBPs of the two mosquito species and molecular modelling is carried out for 5 OBPs of *A. aegypti* with reference to the related 3D structures of *A. gambiae*. Those will be used for the design of suitable repellents for the *A. aegypti* in order to reduce yellow fever occurrence.

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ, *BACTROCERA OLEAE*

Ανδρουτσοπούλου Β*, Κοσμίδης Ν, Λουκάς Μ

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Τομέας Γενετικής, Εργαστήριο Γενετικής, Ιερά Οδός 75, 118 55, Αθήνα

* villyalma@yahoo.gr

Περίληψη

Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκαν με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης επί πηκτώματος αμύλου φυσικοί πληθυσμοί του εντόμου δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, με σκοπό την ανίχνευση του πολυμορφισμού σε τέσσερα ένζυμα με ιδιαίτερη σημασία και ενδιαφέρον για τη γενετική, μορφολογία και φυσιολογία του δάκου. Οι φυσικοί πληθυσμοί του δάκου της ελιάς συλλέχθηκαν από περιοχές εντός του Ελλαδικού χώρου καθώς και από χώρες που βρίσκονται στη λεκάνη της Μεσογείου, την κατεξοχήν περιοχή εξάπλωσης του δάκου, και μελετήθηκαν τα ένζυμα αφυδρογονάση της αλκοόλης (ADH), αφυδρογονάση του 6-φωσφορογλυκονικού (6-PGD), φωσφορογλυκομουτάση (PGM) και α-γλυκεροφωσφορικό (α-GPDH). Σε όλους τους πληθυσμούς και για τα τέσσερα ένζυμα οι αλληλόμορφοι κάθε γονιδίου σε κάθε πληθυσμό εμφανίζουν παραπλήσιες συχνότητες και την ίδια σειρά κατάταξης με βάση τις συχνότητές τους. Τα στοιχεία αυτά υποδηλώνουν την επίδραση επιλεκτικών πιέσεων στους φυσικούς πληθυσμούς επειδή το φαινόμενο της τυχαίας γενετικής παρέκκλισης, που αναμένεται να δρα σε μικρούς πληθυσμούς, δεν μπορεί να εξηγήσει από μόνο του τα αποτελέσματα, ούτε η γονιδιακή ροή (μέσω μετανάστευσης), δεδομένης της γεωγραφικής απόστασης μεταξύ των πληθυσμών προς μελέτη. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας θα μπορούσαν να αποβούν χρήσιμα: α) στην κατανόηση των παραγόντων που διαμορφώνουν τη γενετική δομή και διαφοροποίηση των φυσικών πληθυσμών του δάκου της ελιάς στις περιοχές μελέτης, β) στη βελτίωση των μεθόδων καταπολέμησης του δάκου και γ) στην εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την διασπορά από τον τόπο καταγωγής του στην Ευρώπη.

GENETIC STRUCTURE AND DIFFERENTIATION OF NATURAL POPULATIONS OF THE OLIVE FRUIT FLY, *BACTOCERA OLEAE*

Androutsopoulou V*, Cosmidis N, Loukas M

Agricultural University of Athens, School of Agricultural Biotechnology, Faculty of Genetics, Laboratory of Genetics, Iera Odos 75, 118 55, Athens

* villyalma@yahoo.gr

Abstract

At the present study natural populations of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, were analyzed using starch gel electrophoresis method, in order to detect polymorphism in enzymes encoded by four respectively genes, of particular interest for the genetics, morphology and physiology of olive fruit fly. The wild populations of olive fruit fly were collected from different regions of the Greek land as well as from countries across the Mediterranean basin, the principal region where the olive fruit fly is widespread. The aforementioned samples were analyzed for the genes encoding the enzymes of alcohol dehydrogenase (ADH), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGD), phosphoglycerate mutase (PGM) and α -glycerophosphate dehydrogenase (α -GPDH). For all the four enzymes, the alleles of each gene in all populations appear to have similar frequencies and the same pattern of succession, as much as it concerns allele frequencies. These elements suggest the possible impact of natural selection forces upon the natural populations. Neither the genetic drift (acting upon small populations) nor the genetic flow (through migration) given the geographic distances between the regions of study, can explain the results appropriately. The results of this study could be useful : a) to the understanding of the factors that determine the genetic structure and differentiation of the olive fruit fly natural populations, at the studied areas, b) to the improvement of the olive fruit fly control methods and c) to the extraction of conclusions, regarding the dispersion from its place of origin to Europe.

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΣΤΟΝ ΕΝΖΥΜΙΚΟ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟ ΤΗΣ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ (ADH) ΣΤΟ ΔΑΚΟ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ (*BACSTOCERA OLEAE*) ΣΕ ΟΜΟΙΟΓΕΝΕΣ ΚΑΙ ΕΤΕΡΟΓΕΝΕΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ

Περπεροπούλου Φ*, Κοσμίδης Ν

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Τομέας Γενετικής, Εργαστήριο Γενετικής, Ιερά Οδός 75, 118 55, Αθήνα

* ferenikip@gmail.com

Περίληψη

Η παρούσα εργασία μελετάει την επίδραση της θερμοκρασίας στον ενζυμικό πολυμορφισμό της αλκοολικής αφυδρογονάσης (ADH) στον δάκο της ελιάς σε δύο διαφορετικά γενετικά υποστρώματα. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν δυο θερμοκρασίες ανάπτυξης των προνυμφών του εντόμου εντός του ελαιοκάρπου, 20 ° C και 25 ° C, σε ένα ομοιογενές γενετικό υπόστρωμα (φυσικός πληθυσμός) και σε ένα ετερογενές γενετικό υπόστρωμα (απόγονοι της διασταύρωσης φυσικού πληθυσμού και εργαστηριακού πληθυσμού). Τα αποτελέσματα που πήραμε υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες αποδεικνύουν ότι ο ενζυμικός πολυμορφισμός της ADH και στα δύο γενετικά υποστρώματα δεν επηρεάζεται από την αλλαγή της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των προνυμφών του εντόμου εντός του ελαιοκάρπου.

**THE TEMPERATURE EFFECT ON THE ALCOHOL DEHYDROGENASE (ADH)
ENZYME POLYMORPHISM OF THE OLIVE FRUIT FLY (*BACTOCERA OLEAE*)
IN HOMOGENEOUS AND HETEROGENEOUS GENETIC BACKGROUND**

Perperopoulou F*, Cosmidis N

Agricultural University of Athens, School of Agricultural Biotechnology, Faculty of Genetics, Laboratory of Genetics, Iera Odos 75, 118 55, Athens

* ferenikip@gmail.com

Abstract

At the present study, the effect of the temperature on the alcohol dehydrogenase (ADH) enzyme polymorphism of the olive fruit fly (*Bactrocera oleae*) is studied in two different genetic backgrounds. Particularly, two different temperatures of larvae development (20° C and 25° C) were studied in an homogeneous genetic background (natural population) and in an heterogeneous genetic background (the hybrids of crosses between wild population and laboratory population). The results of the above-mentioned conditions demonstrate that the ADH enzyme polymorphism at both genetic backgrounds is not influenced by the temperature change during the larvae development inside the olive fruit.

**Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΙΑΚΟΥ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΣΤΟΝ ΕΝΖΥΜΙΚΟ
ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟ ΤΗΣ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ (ADH) ΣΤΟ ΔΑΚΟ
ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ (*BASTOCERA OLEAE*) ΣΕ ΟΜΟΙΟΓΕΝΕΣ ΚΑΙ ΕΤΕΡΟΓΕΝΕΣ
ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ**

Πούλιου Φ*, Κοσμίδης Ν

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Τομέας Γενετικής, Εργαστήριο Γενετικής, Ιερά Οδός 75, 118 55, Αθήνα

* rouliou_fot@yahoo.com

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η επίδραση του πληθυσμιακού μεγέθους, δηλαδή της διαφορετικής πληθυσμιακής πυκνότητας των προνυμφών του δάκου της ελιάς εντός του ελαιοκάρπου, στον ενζυμικό πολυμορφισμό της αλκοολικής αφυδρογονάσης (ADH) σε ομοιογενές και ετερογενές γενετικό υπόστρωμα . Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι συχνότητες των αλληλομόρφων της ADH δε μεταβάλλονται ανάλογα με το μέγεθος του πληθυσμού, δηλαδή ο ενζυμικός πολυμορφισμός της αλκοολικής αφυδρογονάσης είναι ανεξάρτητος του μεγέθους κάθε πληθυσμού και στα δύο μελετηθέντα γενετικά υποστρώματα . Τέλος, τα δεδομένα των πειραμάτων μας, όσο αφορά στο ετερογενές γενετικό υπόστρωμα, αποτελούν ισχυρή ένδειξη ότι η επιλογή δρα επί του γόνου της ADH και όχι επί άλλου γόνου με τον οποίο η ADH βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης.

THE POPULATION SIZE EFFECT ON THE ENZYME POLYMORPHISM OF THE ALCOHOL DEHYDROGENASE (ADH) OF THE OLIVE FRUIT FLY (*BACTOCERA OLEAE*) IN HOMOGENEOUS AND HETEROGENEOUS GENETIC BACKGROUND

Pouliou F*, Cosmidis N

Agricultural University of Athens, School of Agricultural Biotechnology, Faculty of Genetics, Laboratory of Genetics, Iera Odos 75, 118 55, Athens

* pouliou_fot@yahoo.com

Abstract

At the present study, the effect of the population size, i.e. the difference in population density of the olive fruit fly larvae, on the enzyme polymorphism of alcohol dehydrogenase (ADH) was studied in homogeneous and heterogeneous genetic background. The results showed that the allele frequencies of the Adh gene do not vary according to the size of the population, which means that the alcohol dehydrogenase enzyme polymorphism is independent of the size of each population studied in both genetic backgrounds. Finally, the data of our experiments, regarding the heterogeneous genetic background, strongly indicate that the selection acts on the Adh gene itself and not on any other gene in case that Adh reveals a pattern of linkage disequilibrium.

ΜΕΛΕΤΗ RANKL-ΕΠΑΓΩΜΕΝΩΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΣΕ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΖΩΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ ΚΑΙ ΝΕΕΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ

Ρηνώτας Ε^{1,2}, Νίτη Α¹, Κοντοπίδης Γ³, Κουλαδούρος Η¹, Ηλιόπουλος Η¹, Ντούνη Ε^{1,2,*}

¹ Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Γενετικής, Ιερά Οδός 75, 118 55, Αθήνα

² Ε.ΚΕ.Β.Ε. “Αλέξανδρος Φλέμιγκ”, Τμήμα Ανοσολογίας, Φλέμιγκ 34, 16672, Βάρη

³ Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Κτηνιατρική Σχολή, Τρικάλων 224, 43100, Καρδίτσα

* douni@aua.gr

Περίληψη

Η κυτταροκίνη RANKL (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) αποτελεί κεντρικό ρυθμιστή της οστικής απώλειας, μέσω της επαγωγής οστεοκλαστών. Η ερευνητική μας ομάδα δημιούργησε πρόσφατα διαγονιδιακές σειρές ποντικών που υπερεκφράζουν το ανθρώπινο RANKL με σκοπό α) τη μοντελοποίηση της ανθρώπινης RANKL-επαγόμενης παθογένειας, β) τη μελέτη των μηχανισμών παθογένεσης και γ) την αξιολόγηση νέων αναστολέων έναντι του RANKL *in vivo*. Με βάση τα επίπεδα έκφρασης του RANKL αναλύσαμε δύο διαγονιδιακές σειρές με φαινότυπο οστικής απώλειας και στα δύο φύλα. Η διαγονιδιακή σειρά Tg5516 με χαμηλά επίπεδα έκφρασης του RANKL ανέπτυξε έναν ήπιο οστεοπορωτικό φαινότυπο που παρουσιάζει απώλεια του σπογγώδους οστού καθώς και μειωμένες εμβιομηχανικές ιδιότητες σε ηλικία 3 μηνών. Υπερέκφραση του RANKL στη διαγονιδιακή σειρά Tg5519 οδήγησε σε έντονη οστεοπόρωση με απώλεια στο σπογγώδες οστό, πορώδη δομή στο φλοιώδες οστό, αυξημένη οστική ανακατασκευή και μειωμένη οστική αντοχή σε ηλικία 3 μηνών. Τα RANKL διαγονιδιακά μοντέλα οστεοπόρωσης αποτελούν ένα μοναδικό εργαλείο για την κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών στην οστική απορρόφηση καθώς και τη δοκιμή νέων αναστολέων του ανθρώπινου RANKL σε προκλινικό επίπεδο.

Παράλληλα, έχουμε δείξει πρόσφατα ότι η αντικατάσταση της γλυκίνης από αργινίνη στη θέση 278 (G278R) στην πρωτεΐνη RANKL αναστέλλει το σχηματισμό τριμερούς, με απώλεια της λειτουργικότητας του RANKL και έντονη υπολειπόμενη οστεοπέτρωση στα ποντίκια. Επίσης, δείξαμε ότι το μικρό μόριο SPD304, ένας αναστολέας του τριμερισμού του TNF, δένεται και αναστέλλει τον RANKL. Με βάση τη τριμερή δομή του RANKL και την αλληλεπίδρασή του με το SPD304, στην παρούσα φάση ερευνούμε σε λειτουργικές δοκιμές οστεοκλαστογένεσης την αποτελεσματικότητα νέων μικρών μορίων που έχουν σχεδιαστεί να παρεμποδίζουν το σχηματισμό τριμερών και τη δραστηριότητα του RANKL. Μέχρι τώρα έχουμε εντοπίσει αναστολείς του RANKL με καλύτερη ειδικότητα και μειωμένη τοξικότητα σε σχέση με το SPD304. Οι πιο αποτελεσματικοί αναστολείς θα αξιολογηθούν περαιτέρω στα διαγονιδιακά μας μοντέλα οστεοπόρωσης που υπερεκφράζουν το ανθρώπινο RANKL.

STUDY OF RANKL-MEDIATED PATHOGENIC MECHANISMS IN MOUSE MODELS AND DEVELOPMENT OF NEW THERAPEUTIC APPROACHES

Rinotas V^{1,2}, Niti A¹, Kontopidis G³, Couladouros E¹, Eliopoulos E¹, Douni E^{1,2,*}

¹ Agricultural University of Athens, Department of Agricultural Biotechnology, Laboratory of Genetics, Iera Odos 75, 118 55, Athens

² B.S.R.C. “Alexander Fleming”, Division of Immunology, Fleming 34, 16672, Vari

³ University of Thessaly, Veterinary School, Trikalon 224, 43100, Karditsa

* douni@aua.gr

Abstract

RANKL (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) is a central regulator of bone loss by mediating osteoclast-induced bone resorption. We have recently generated transgenic mice overexpressing human RANKL in order to a) model human RANKL-mediated pathologies, b) study the underlying pathogenic mechanisms and c) evaluate novel RANKL inhibitors *in vivo*. Depending on the human RANKL expression levels we detected two transgenic lines with bone loss phenotypes on both sexes. A low expressing Tg5516 line developed a mild osteoporotic phenotype, displaying trabecular bone loss as well as reduced biomechanical properties at 3 months of age. Overexpression of human RANKL in the high copy Tg5519 line resulted in severe osteoporosis with trabecular bone loss, severe cortical bone porosity, increased bone remodelling and decreased bone strength by the age of 3 months. These novel human RANKL transgenic models of osteoporosis represent a unique tool for understanding the pathogenic mechanisms in bone resorption as well as for the preclinical evaluation of novel human RANKL inhibitors.

Additionally, we have recently shown that the G278R substitution in RANKL disturbs trimer assembly, abrogates RANKL function and causes severe recessive osteopetrosis in mice. Notably, SPD304, a small molecule inhibitor of TNF trimerization, also binds and inhibits RANKL, suggesting similar inhibitory mechanisms. Based on the trimeric structure of RANKL and its interaction with SPD304 we are currently investigating in osteoclastogenesis assays the efficacy of novel small molecules that are designed to abrogate trimer formation and biological function. So far, we have identified very promising novel small molecules that inhibit the function of RANKL with higher specificity and less toxicity compared to SPD304. The more effective inhibitors will be evaluated in our unique human RANKL-expressing transgenic mouse models of osteoporosis.

ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΟΥ ΤΡΙΜΕΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΗΣ BAFF ΜΕ ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΟΓΕΝΕΣΗ

Βιολιτζή Φ^{1,2}, Ρηνώτας Β^{1,2}, Ντούνη Ε^{1,2,*}

¹ Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Γενετικής, 75 Ιερά Οδός, 118 55, Αθήνα

² Ε.ΚΕ.Β.Ε. “Αλέξανδρος Φλέμιγκ”, Τμήμα Ανοσολογίας, 34 Φλέμιγκ, 16672, Βάρη.

* douni@aua.gr

Περίληψη

Χρησιμοποιώντας τη προσέγγιση της Πρόσθιας Γενετικής η ερευνητική μας ομάδα αναγνώρισε πρόσφατα ένα κρίσιμο αμινοξύ για τον τριμερισμό των προσδετών που ανήκουν στην TNF υπεροικογένεια όπως ο RANKL και ο TNF. Μία αντικατάσταση από γλυκίνη-σε-αργινίνη στο κωδικόνιο 278 (G278R) της πρωτεΐνης RANKL οδηγεί στη δημιουργία ενός μη λειτουργικού αλληλομόρφου ο οποίος προκαλεί οστεοπέτρωση στα ποντίκια. Η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη αδυνατεί να σχηματίζει ομοτριμερή και επομένως, χάνει την ικανότητα να προσδένεται και να ενεργοποιεί τον RANKL υποδοχέα. Το αμινοξύ G278 βρίσκεται στην υδρόφοβη F-β-πτυχωτή επιφάνεια και είναι υψηλά συντηρημένο στα μέλη της TNF υπεροικογένειας. Μία παρόμοια αμινοξική αντικατάσταση στην πρωτεΐνη TNF καταστέλλει τον τριμερισμό και τη λειτουργία της. Ως εκ τούτου, επεκτείναμε τις έρευνές μας σε ένα άλλο μέλος της TNF υπεροικογένειας, την πρωτεΐνη BAFF (B cell activating factor), η οποία αποτελεί ένα ζωτικής σημασίας παράγοντα για την επιβίωση των B λεμφοκυττάρων και ένα πολλά υποσχόμενο στόχο για το Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο.

Στη μελέτη αυτή ερευνήσαμε εάν μία παρόμοια αντικατάσταση στην πρωτεΐνη BAFF του ανθρώπου, G249R, επηρεάζει τον σχηματισμό τριμερών και την πρόσδεση στον υποδοχέα. Η αγρίου τύπου και η μεταλλαγμένη BAFF πρωτεΐνη υποκλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pGEX για να παραχθεί GST-BAFF πρωτεΐνη σε *E.coli* και η εκκριτική μορφή της BAFF πρωτεΐνης απελευθερώθηκε με πέψη. Με χημικό crosslinking της εκκριτικής πρωτεΐνης BAFF και ανάλυσή σε Western Blot τα αποτελέσματά μας έδειξαν την παρουσία τριμερών, διμερών και μονομερών στην πρωτεΐνη αγρίου τύπου αλλά όχι στην μεταλλαγμένη πρωτεΐνη BAFF^{G249R} υποδεικνύοντας την αποτυχία αυθόρμητου σχηματισμού τριμερών. Επιπλέον, δείξαμε πως ο BAFF υποδοχέας δεν αλληλεπιδρά με την μεταλλαγμένη πρωτεΐνη BAFF^{G249R}. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι μία παρόμοια αμινοξική αντικατάσταση στην πρωτεΐνη BAFF, η G249R, αναστέλλει το σχηματισμό τριμερών και τη δέσμευση στον υποδοχέα της. Η γλυκίνη 249 θα μπορούσε να θεωρηθεί ένας νέος πιθανός στόχος για την αναστολή της λειτουργίας της πρωτεΐνης BAFF.

INHIBITION OF BAFF TRIMERIZATION WITH SITE-DIRECTED MUTAGENESIS

Violitzi F^{1,2}, Rinotas V^{1,2}, Douni E^{1,2,*}

¹ Agricultural University of Athens, Department of Agricultural Biotechnology, Laboratory of Genetics, 75 Iera Odos, 118 55, Athens

² B.S.R.C. “Alexander Fleming”, Division of Immunology, 34 Fleming, 16672, Vari.

* douni@aua.gr

Abstract

Using a forward genetics approach our research group has recently identified a critical amino acid for the trimerization of ligands belonging to the TNF superfamily such as RANKL and TNF. A glycine-to-arginine substitution at codon 278 (G278R) of RANKL resulted in a loss-of-function allele causing osteopetrosis in mice. The mutated protein fails to assemble into homotrimers and therefore, lacks the ability to bind and activate the RANKL receptor. G278 is located at the hydrophobic F-beta strand of the TNF-like core domain and is highly conserved within the TNF superfamily. Notably, a similar amino acid substitution in TNF abrogated its trimerization and function. Herein we extended our studies in another TNF superfamily member, BAFF (B cell activating factor), which is a critical survival factor for B lymphocytes and a promising therapeutic target for systemic lupus erythematosus (SLE).

In this study we investigated whether a similar substitution in BAFF, G249R, affects also the formation of trimers and the binding to its receptor. During this study we performed site-directed PCR mutagenesis in order to generate the G249R substitution. We subcloned both wild-type and mutated BAFF in the pGEX vector to produce chimeric GST-BAFF proteins in *E. coli*. GST-BAFF was isolated using glutathione agarose beads and soluble BAFF was released after cleavage with prescission protease. Chemical crosslinking of various amounts of soluble BAFF and analysis in western blot showed the presence of trimers, dimers and monomers in wild-type BAFF but not in BAFF^{G249R} indicating failure of spontaneous trimer assembly. Moreover, we showed that BAFF receptor interacted with BAFF, but not with BAFF^{G249R} using an ELISA assay. These results indicate that a similar residue substitution in soluble human BAFF, G249R, is critically involved in the abrogation of BAFF trimer assembly, and receptor binding. Glycine 249 could be considered a novel potential target for inhibiting BAFF function.

ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ DnaJC11 ΣΤΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΤΗ ΝΕΥΡΟΜΥΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΣΤΟ ΠΟΝΤΙΚΙ

Ιωακειμίδης Φ^{1,2}, Ρηνώτας Ε^{1,2}, Φασσέας Κ¹, Κόλλιας Γ², Ντούνη Ε^{1,2,*}

¹ Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Γενετικής, Ιερά Οδός 75, 118 55, Αθήνα

² Ε.ΚΕ.Β.Ε. “Αλέξανδρος Φλέμιγκ”, Τμήμα Ανοσολογίας, Φλέμιγκ 34, 16672, Βάρη

* douni@aua.gr

Περίληψη

Χρησιμοποιώντας N-αίθυλ-N-νιτροζουρία, ένα μεταλλαξογόνο που προκαλεί τυχαίες σημειακές πυρηνικές μεταλλάξεις, έχουμε δημιουργήσει ένα μοντέλο νευρομυϊκού συνδρόμου στο ποντίκι. Το σύνδρομο εκδηλώνεται στις 10 μέρες μετά τη γέννηση με ανώμαλη στάση των πίσω άκρων και συνεχίζει με ανώμαλο βάδισμα, τρόμο, αιματολογικές ανωμαλίες, καθυστερημένη ανάπτυξη και πρόωρη θνησιμότητα σε ηλικία ενός μηνός. Πρόκειται για αυτοσωμικό υπολειπόμενο χαρακτήρα με πλήρη διεισδυτικότητα. Η ιστολογική ανάλυση και ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης αποκάλυψε εκτεταμένη παρουσία κενοτοπιακών σχηματισμών προερχόμενων από μιτοχόνδρια τα οποία έχουν απωλέσει τις πτυχώσεις της εσωτερικής τους μεμβράνης (cristae). Μέσω ανάλυσης γενετικής σύνδεσης και αλληλούχισης εντοπίσαμε την υπεύθυνη μετάλλαξη εντός ενός εσωνίου σε ένα νέο μέλος της οικογένειας των DnaJC μοριακών συνοδών, το DnaJC11, η οποία επηρεάζει το μάτισμα του γονιδίου. Επιβεβαιώσαμε το ρόλο αυτής της μετάλλαξης σε πειράματα διάσωσης εκφράζοντας το ανθρώπινο ορθόλογο γονίδιο.

Η πρωτεΐνη DnaJC11 έχει στο παρελθόν προταθεί ότι εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια ιστών ανθρώπου και ποντικού. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν αυτή την πρόταση μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας και ανάλυσης στυπώματος Western. Αν και η DnaJC11 πρωτεΐνη είναι άγνωστης λειτουργίας, στο παρελθόν έχει βρεθεί να συν-ανοσοκαθίζει με έναν αριθμό πρωτεϊνών πολλές από τις οποίες παίζουν ρόλο στη διατήρηση της μορφολογίας των cristae. Αυτό συμφωνεί με τα δικά μας ευρήματα στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Οι τρέχουσες εργασίες μας εστιάζονται σε δοκιμές μιτοχονδριακής λειτουργίας και πιο εκτεταμένη ηλεκτρονική μικροσκοπία προκειμένου να χαρακτηρίσουμε καλύτερα το μιτοχονδριακό φαινόμενο στους μυς και το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα των μεταλλαγμένων ποντικών μας. Τα ευρήματά μας αποκαλύπτουν μια καινούργια μιτοχονδριακή πρωτεΐνη που παίζει ένα σημαντικό ρόλο στη σωστή μιτοχονδριακή δομή και τη νευρομυϊκή λειτουργία και δεδομένης της λειτουργικής υπερκάλυψης του γονιδίου στον άνθρωπο και το ποντίκι που δείξαμε, η DnaJC11 πρωτεΐνη πιθανόν να εμπλέκεται σε ανθρώπινες νευρομυϊκές ασθένειες.

IDENTIFICATION OF THE ROLE OF DNAJC11 IN MITOCHONDRIAL STRUCTURE AND NEUROMUSCULAR FUNCTION IN MICE

Ioakeimidis F^{1,2}, Rinotas V^{1,2}, Fasseas C¹, Kollias G² and Douni E^{1,2,*}

¹ Agricultural University of Athens, Department of Agricultural Biotechnology, Laboratory of Genetics, Iera Odos 75, 118 55, Athens

² B.S.R.C. “Alexander Fleming”, Division of Immunology, Fleming 34, 16672, Vari

* douni@aua.gr

Abstract

Using N-ethyl-N-nitrosourea (ENU), a mutagen that causes nuclear point mutations at random, we have generated a mouse model of a neuromuscular syndrome. This syndrome manifests at 10 days after birth with abnormal hind limb posture and continuous with abnormal gait, tremors, muscle atrophy, blood abnormalities, growth retardation and premature lethality at one month of age. This is an autosomal recessive trait with complete penetrance. Histological analysis and transmission electron microscopy revealed severe vacuolation of the motor neurons of the spinal cord originating from mitochondria that have lost their cristae. By genetic mapping and sequencing we have found the causal mutation to be located within an intron of a novel member of the DnaJC family of co-chaperones, DnaJC11, affecting its splicing. We have verified the causal role of this mutation in rescue experiment by expressing the human ortholog.

The DnaJC11 protein has previously been suggested to be localized in the mitochondria of human and mouse tissues. We further support this suggestion by confocal microscopy and western blot analysis. Although this DnaJC member is of unknown function, it has been found to co-immunoprecipitate along with a number of proteins, some of which having been shown to play a role in the maintenance of cristae morphology. This is in line with our electron microscopy findings. Our current work is focused on mitochondrial functional assays and more extent electron microscopy to better characterize the mitochondrial morphology phenotype in muscle and the Central Nervous System of our mutants. Our findings reveal a novel mitochondrial protein that plays an important role in proper mitochondrial structure and neuromuscular function and given the functional redundancy between the mouse and human gene that we have shown, the DnaJC11 protein might prove a contributor in human neuromuscular diseases.

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΡΟΛΟΥ ΕΝΟΣ ΝΕΟΥ SLC25
ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ ΜΕΤΑΦΟΡΕΑ ΣΕ ΕΝΑ ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ
ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ ΣΤΟ ΠΟΝΤΙΚΙ**

Τερζενίδου Μ^{1,2}, Κανο Τ^{1,2}, Καρακώστας Α^{1,2}, Ιωακειμίδης Φ^{1,2}, Κόλλιας Γ², Ντούνη Ε^{1,2,*}

¹ Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Γενετικής, Ιερά Οδός 75, 118 55, Αθήνα

² Ε.ΚΕ.Β.Ε. “Αλέξανδρος Φλέμιγκ”, Τμήμα Ανοσολογίας, Φλέμιγκ 34, 16672, Βάρη

* douni@aau.gr

Περίληψη

Ακολουθώντας μεθόδους της πρόσθιας γενετικής μέσω της τυχαίας μεταλλαξογένεσης με N-αιθυλ-N-νιτροζουρία (ENU), ταυτοποιήσαμε πρόσφατα ένα νέο μοντέλο αυτοσωμικής υπολειπόμενης νευρολογικής νόσου στο ποντίκι. Τα συμπτώματα εμφανίζονται την τρίτη εβδομάδα της ζωής και χαρακτηρίζονται από αταξία, αστάθεια στην κίνηση, επιληπτικές κρίσεις και καθυστερημένη ανάπτυξη, με σοβαρή επιδείνωση που καταλήγει σε θνησιμότητα στην πλειοψηφία των ποντικών μέχρι την ηλικία των τριών μηνών. Με ανάλυση σύνδεσης σε επίπεδο γονιδιώματος εντοπίσαμε μια μη νοηματική σημειακή μετάλλαξη (C προς T) στην κωδική περιοχή ενός νέου γονιδίου μέλους της οικογένειας μιτοχονδριακών μεταφορέων SLC25 (Solute Carrier Family 25) η οποία εισάγει ένα πρώιμο κωδικόνιο λήξης και οδηγεί σε μη λειτουργική πρωτεΐνη. Όλες οι πρωτεΐνες της οικογένειας SLC25 βρίσκονται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και διαμέσου αυτής διακινούν διάφορους μεταβολίτες. Μεταλλάξεις στα γονίδια SLC25 βλάπτουν τις μιτοχονδριακές λειτουργίες επηρεάζοντας είτε την σύνθεση του ATP είτε την επιλεκτική μεταφορά διαλυτών ουσιών μέσα και έξω από τη μιτοχονδριακή μήτρα.

Αυτό το νέο μέλος της οικογένειας SLC25 είναι πολύ συντηρημένο μεταξύ των διαφόρων ειδών αλλά η λειτουργία του παραμένει εντελώς άγνωστη. Τα αποτελέσματά μας επιβεβαιώνουν το μιτοχονδριακό εντοπισμό του εν λόγω μέλους με συνεστατική μικροσκοπία και ανάλυση western blot. Επιπλέον, έχουμε διαπιστώσει ότι η άγριου τύπου πρωτεΐνη εκφράζεται κυρίως σε νευρομυϊκούς ιστούς σε αντίθεση με την μεταλλαγμένη πρωτεΐνη η οποία είναι μη ανιχνεύσιμη. Για να επιβεβαιώσουμε γενετικά τον ρόλο της συγκεκριμένης μετάλλαξης στον αταξικό φαινότυπο δημιουργήσαμε πρόσφατα διαγονιδιακά ποντίκια που φέρουν την γονιδιωματική περιοχή του SLC25 του ανθρώπου με σκοπό την πραγματοποίηση πειραμάτων διάσωσης. Οι τρέχουσες μελέτες μας επικεντρώνονται α) στον προσδιορισμό της κύριας θέσης της βλάβης, προκειμένου να συνδέσουμε την παθολογία του εγκεφάλου του μοντέλου ποντικού με εκείνη των συναφών ανθρώπινων νευροεκφυλιστικών ασθενειών, β) στον προσδιορισμό των μιτοχονδριακών δυσλειτουργιών, και γ) στη λειτουργική ανάλυση αυτής της νέας πρωτεΐνης που αποτελεί ένα νέο στόχο σε νευρολογικές ασθένειες όπως η αταξία.

STUDYING THE PATHOGENIC ROLE OF A NOVEL SLC25 MITOCHONDRIAL CARRIER IN A GENETIC MOUSE MODEL OF NEUROLOGICAL DISEASE

Terzenidou M^{1,2}, Kano T^{1,2}, Karakostas A^{1,2}, Ioakeimidis F^{1,2}, Kollias G², Douni E^{1,2,*}

¹ Agricultural University of Athens, Department of Agricultural Biotechnology, Laboratory of Genetics, Iera Odos 75, 118 55, Athens

² B.S.R.C. “Alexander Fleming”, Division of Immunology, Fleming 34, 16672, Vari

* douni@aua.gr

Abstract

Following a forward genetics approach through random mutagenesis with N-ethyl-N-nitrosourea (ENU), we have recently identified a novel mouse model of severe autosomal recessive neurological disease. The symptoms start at 3 weeks of age characterized by ataxia, unsteady locomotion, episodic crises, and growth retardation with severe disease progression that leads to lethality in the majority of the mice by the age of 3 months. Using genome-wide linkage analysis we identified a nonsense point mutation (C to T) in the coding region of a novel gene member of the mitochondrial carrier family or the Solute Carrier Family 25 (SLC25) that introduces a premature stop codon and results in a loss-of-function protein. All SLC25 members localize into the inner mitochondrial membrane where they shuttle a variety of metabolites across it. Mutations in SLC25 genes impair mitochondria functions by affecting either the synthesis of ATP, or the selective transport of solutes in and out of the mitochondrial matrix.

This novel SLC25 member is highly conserved among various species, but its function remains completely unknown. Our results confirm the mitochondrial localization of this SLC25 member by confocal and western blot analysis. Moreover, we identified that the wild-type SLC25 protein is predominantly expressed in neuromuscular tissues in contrast to the mutant protein that is undetectable. To genetically confirm the causal role of identified mutation in the ataxic phenotype we have recently generated transgenic mice carrying the human SLC25 genomic region for performing rescue experiments. Our ongoing studies are focused on a) the identification of the primary site of lesion in order to align the brain pathology of the mouse model with that of similar human neurodegenerative diseases, b) the identification of mitochondrial dysfunctions, and c) the functional analysis of this novel SLC25 protein which constitutes a novel pathogenic target in neurological diseases such as ataxia.

Ενότητα: Μοριακή Βιολογία, Βιοχημεία και Μικροβιολογία
Section: Molecular Biology, Biochemistry and Microbiology

**Η ΘΕΣΗ ΕΝΘΕΣΗΣ ΤΗΣ ΑΖΩΤΟΔΕΣΜΕΥΤΙΚΗΣ ΝΗΣΙΔΑΣ ΕΜΦΑΝΙΖΕΤΑΙ
ΣΥΝΤΗΡΗΜΕΝΗ ΣΕ ΑΖΩΤΟΔΕΣΜΕΥΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ *PSEUDOMONAS
STUTZERI* ΚΑΙ *PSEUDOMONAS* SPP. ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΑ ΑΠΟ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ
ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ**

**Βενιεράκη Α, Βεζύρη Ε, Βαμβακάς Α, Κατινάκη Π-Α, Δήμου Μ, Χατζηπαυλίδης Ι, Ταμπακάκη Α,
Κατινάκης Π***

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Τομέας Γ' Βιοχημείας-Ενζυμικής
Τεχνολογίας-Μικροβιολογίας και Μοριακής Βιολογίας, Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής
Μικροβιολογίας, Ιερά Οδός 75, 118 55 Αθήνα

* katp@aua.gr

Περίληψη

Η παρουσία αζωτοδεσμευτικών μηχανισμών σε είδη του γένους *Pseudomonas* αποτελεί αναμφισβήτητο γεγονός. Πλείστα από τα στελέχη αυτά ανήκουν φυλογενετικά στο είδος *Pseudomonas stutzeri*. Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε μέσω της αλληλούχισης και φυλογενετικής ανάλυσης γονιδίων η γενετική ποικιλομορφία 11 διαζωτροφικών απομονώσεων *Pseudomonas*, προερχόμενα από τη ριζόσφαιρα σιτηρών από διαφορετικές σιτοπαραγωγικές περιοχές της Ελλάδας. Αναλύθηκαν το 16S rRNA γονίδιο όπως επίσης και οι ITS1 περιοχές τους, και γονίδια που εμπλέκονται στην απονιτροποίηση, την αφομοίωση των νιτρικών και την αζωτοδέσμευση. Τα φυλογενετικά δέντρα που κατασκευάστηκαν βάσει των αποτελεσμάτων καταδεικνύουν ότι 2 από τις 11 απομονώσεις ανήκουν σε ένα νέο είδος *Pseudomonas* spp. ενώ τα υπόλοιπα 9 ανήκουν στο *P. stutzeri*. Επιπλέον ανάλυση Rep-PCR ενίσχυσε το αποτέλεσμα αυτό δίδοντας παρόμοιο προφίλ στα στελέχη που απομονώθηκαν από ριζόσφαιρες ομοίων φυτικών ποικιλιών. Εν τούτοις, διαφορετικό πρότυπο παρατηρείται ανάμεσα σε στελέχη που έχουν απομονωθεί από φυτά καλλιεργούμενα σε μακρινές μεταξύ τους τοποθεσίες ή εντελώς διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές. Επιπλέον, διερευνήθηκε εάν η θέση στο γονιδίωμα της αζωτοδεσμευτικής νησίδας παραμένει συντηρημένη μεταξύ των διαζωτροφικών στελεχών *P. stutzeri* και *Pseudomonas* spp. απομονωμένων από τη ριζόσφαιρα σιτηρών καλλιεργούμενων στην Ελλάδα.

THE NITROGEN FIXATION ISLAND INSERTION SITE IS CONSERVED IN DIAZOTROPHIC *PSEUDOMONAS STUTZERI* AND *PSEUDOMONAS* SPP. ISOLATED FROM DISTAL AND CLOSE GEOGRAPHICAL REGIONS

Venieraki A, Vezyri E, Vamvakas A, Katinaki P-A, Dimou M, Chatzipavlidis I,

Tampakaki A, Katinakis P*

Agricultural University of Athens, Department of Agricultural Biotechnology, Laboratory of General and Agricultural Microbiology, Iera Odos 75, 118 55 Athens

* katp@aua.gr

Abstract

The presence of nitrogen fixers within the genus *Pseudomonas* have been established and so far most of the strains isolated are phylogenetically affiliated to *Pseudomonas stutzeri*. In the present study, the genetic diversity of eleven diazotrophic *P. stutzeri* isolates obtained from the rhizosphere of cereals grown in Greece is investigated by applying phylogenetic reconstruction of 16S rRNA gene sequences in addition to sequencing of ITS1 region and genes involved in denitrification, nitrate assimilation, nitrogen fixation. The inferred phylogenetic trees clearly indicated that two out of eleven isolates belong to a new *Pseudomonas* spp. while the other nine strains belong to *P. stutzeri*. A Rep-PCR fingerprinting analysis revealed a similar banding pattern among *P. stutzeri* strains isolated from the rhizosphere of the same plant cultivars. However a distinct pattern was observed among strains isolated different plant cultivars grown at distal locations or different geographical regions. Employing a PCR-based approach we provided evidence that the insertion between the genes coding for cobalamin synthase and glutathione peroxidase of the putative nitrogen fixation island identified in *P. stutzeri* strains A1501 and DMS4166 is conserved among diazotrophic *P. stutzeri* and *Pseudomonas* spp. strains isolated from the rhizosphere of cereals grown in Greece.

ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΩΝ FKBP ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ ΤΗΝ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΒΙΟΪΜΕΝΙΩΝ

Ζωγράφου Χ, Δήμου Μ, Σκαγιά Α, Βεζύρη Ε, Βενιεράκη Α, Κατινάκης Π*

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εργ. Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας, Ιερά Οδός 75, 118 55, Αθήνα

* bmbi2kap@aua.gr

Περίληψη

Οι πεπτιδουλ-πρόλυλ *cis/trans* ισομεράσες (PPIases, EC 5.2.1.8) επιταχύνουν την αργή *cis/trans* ισομερίωση των πεπτιδουλ-πρόλυλ δεσμών ενώ μπορούν να βοηθούν και στο σωστό δίπλωμα των πρωτεϊνών. Οι PPIases αποτελούνται από τουλάχιστον τρεις διαφορετικές οικογένειες, τις κυκλοφιλίνες, τις FK506-δεσμεύουσες πρωτεΐνες (FKBPs) και τις παρβουλίνες, οι οποίες δεν παρουσιάζουν δομική συσχέτιση και παρεμποδίζονται από την κυκλοσπορίνη Α, το FK-506 και την 5-υδρόξυ-1,4-ναφθοκινόνη, αντίστοιχα. Οι βακτηριακές PPIases αν και δεν είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη σε εργαστηριακές συνθήκες, διαθέτουν σημαντικό ρόλο στην επιβίωση σε διάφορες περιβαλλοντικές και παθολογικές καταστάσεις. Στην παρούσα μελέτη παρουσιάζουμε το φαινότυπο στελεχών *Escherichia coli*, στα οποία έχουν απαλοιφθεί ή υπερεκφραστεί τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις FKBP πρωτεΐνες. Ο φαινότυπος αυτών των στελεχών μελετήθηκε σε συνθήκες κολύμβησης, ομαδικής κίνησης σε επιφάνεια και σε συνθήκες σχηματισμού βιοϊμενίου και προέκυψε πως κάποια μέλη της οικογένειας επηρεάζουν τόσο τις μορφές ομαδικής συμπεριφοράς όσο και τη λειτουργία της κολύμβησης. Τέλος, λόγω του ότι οι PPIases αποτελούν τρεις οικογένειες με συγκλίνουσα εξέλιξη, μελετήσαμε τη λειτουργική συμπληρωματικότητα των μελών της FKBP οικογένειας με τα μέλη των υπολοίπων οικογενειών, στις παραπάνω συνθήκες.

MEMBERS OF THE FKBP FAMILY AFFECT BACTERIAL MOTILITY AND BIOFILM FORMATION

Zografou C, Dimou M, Skagia A, Vezyri E, Venieraki A, Katinakis P*

Agricultural University of Athens, Lab of General and Agricultural Microbiology, Iera Odos 75, 118 55, Athens

* bmbi2kap@aua.gr

Abstract

Peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases (PPIases, EC 5.2.1.8) catalyse the *cis/trans* isomerization of peptidyl-prolyl bonds in different folding states of a target protein, while, they can also act on polypeptides, as folding helper enzymes. At least three different families, cyclophilins, FK506-binding proteins (FKBPs) and parvulins constitute the enzyme class of PPIases. These families are structurally unrelated and can be distinguished by being inhibited by cyclosporin A, FK-506 and 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone, respectively. Bacterial PPIases although appear to be non essential for growth under laboratory conditions they have significant roles in survival in environmental and pathogenic niches. In the present study we phenotypically characterized *Escherichia coli* FKBP deletion and over-expression strains and we show that some family members affect swimming motility as well as specific forms of bacterial social behavior such as swarming motility and biofilm formation. Finally, since PPIases constitute three convergently evolved gene families, we clarified the functional redundancy of the FKBP family members with the rest members of all three families under these conditions.

ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΜΕΛΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΠΑΡΒΟΥΛΙΝΩΝ ΤΟΥ *AZOTOBACTER VINELANDII*

Σκαγιά Α, Δήμου Μ, Ζωγράφου Χ, Βεζύρη Ε, Βενιεράκη Α, Κατινάκης Π*

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εργ. Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας, Ιερά Οδός 75, 118 55, Αθήνα

* bmbi2kap@aua.gr

Περίληψη

Στην τελική διαμόρφωση των πρωτεϊνών, οι περισσότεροι πεπτιδικοί δεσμοί διαθέτουν *trans* διαμόρφωση ενώ περίπου το 6% των πεπτιδουλ-πρόλυλ πεπτιδικών δεσμών παρουσιάζει *cis* διαμόρφωση. Η αργή *cis/trans* ισομερίωση των πεπτιδουλ-πρόλυλ δεσμών επιταχύνεται από τις πεπτιδουλ-πρόλυλ *cis/trans* ισομεράσες (PPIases, EC 5.2.1.8), οι οποίες μπορούν να βοηθούν και στο σωστό δίπλωμα κατά τη διαδικασία επαναδίπλωσης των πρωτεϊνών. Οι πεπτιδουλ-πρόλυλ *cis/trans* ισομεράσες αποτελούνται από τουλάχιστον τρεις διαφορετικές οικογένειες, τις κυκλοφιλίνες, τις FK506-δεσμεύουσες πρωτεΐνες (FKBPs) και τις παρβουλίνες, οι οποίες δεν παρουσιάζουν δομική συσχέτιση και παρεμποδίζονται από την κυκλοσπορίνη Α, το FK-506 και την 5-υδρόξυ-1,4-ναφθοκινόνη, αντίστοιχα. Το *Azotobacter vinelandii* είναι ένα αζωτοδεσμευτικό βακτήριο του εδάφους, το οποίο, βάσει ομολογίας, βρέθηκε ότι διαθέτει τέσσερα μέλη της οικογένειας των παρβουλινών. Στην παρούσα μελέτη, περιγράφουμε την έκφραση και τη απομόνωση τριών ανασυνδυασμένων παρβουλινών του *A. vinelandii* στο *Escherichia coli* και δείχνουμε πως δύο από αυτά τα ένζυμα παρουσιάζουν *in vitro* ενεργότητα πεπτιδουλ-πρόλυλ *cis/trans* ισομεράσης ενώ το τρίτο διαθέτει μόνο χαμηλή ενεργότητα τσαπερόνης.

BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF *AZOTOBACTER VINELANDII* PARVULIN FAMILY MEMBERS

Skagia A, Dimou M, Zografou C, Vezyri E, Venieraki A, Katinakis P*

Agricultural University of Athens, Lab of General and Agricultural Microbiology, Iera Odos 75, 118 55, Athens

* bmbi2kap@aua.gr

Abstract

In folded proteins, most peptide bonds are found in *trans* conformation, whereas 6% of all Xaa-Pro peptide bonds show *cis* conformation. The peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases (PPIases, EC 5.2.1.8) evolved to accelerate the slow *cis/trans* isomerization of peptidyl-prolyl bonds in different folding states of a target protein. Recently, it was shown that they could also act on polypeptides, as folding helper enzymes, during the refolding of proteins. At least three different families, cyclophilins, FK506-binding proteins (FKBPs) and parvulins, constitute the enzyme class of PPIases. These families are structurally unrelated and can be distinguished by being inhibited by cyclosporin A, FK-506 and 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone, respectively. Homology searches indicated that *Azotobacter vinelandii*, a soil nitrogen-fixing bacterium, possesses four members of the parvulin family. In the present study, we describe the expression and purification of three recombinant parvulins from *A. vinelandii* in *Escherichia coli* and we show that two of the enzymes possess *in vitro* peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase activity while the third possesses only low levels of chaperone activity.

ΔΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΤΗΣ ΚΥΚΛΟΦΙΛΙΝΗΣ-Α ΚΑΙ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΙΚΗΣ ΑΚΕΤΥΛΟΜΕΤΑΦΟΡΑΣΗΣ

Χριστοφορίδης Η¹, Δήμου Μ², Κατινάκης Π², Μπεθάνης Κ¹, Καρπούζας Μ^{1,*}

¹ Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Γενικό Τμήμα, Τομέας Φυσικών και Χημικών Επιστημών, Εργαστήριο Φυσικής, Ιερά Οδός 75, 118 55, Αθήνα

² Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Τομέας Βιοχημείας, Ενζυμικής Τεχνολογίας, Μικροβιολογίας και Μοριακής Βιολογίας, Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας, Ιερά Οδός 75, 118 55, Αθήνα

* mkarp@aua.gr

Περίληψη

Οι ισομεράσες προλίνης, όπως οι κυκλοφιλίνες, καταλύουν την *cis-trans* ισομερίωση πεπτιδικών δεσμών που συμμετέχει η προλίνη, επιταχύνοντας έτσι το πρωτεϊνικό δίπλωμα. Το βακτηρίδιο *Azotobacter vinelandii* είναι ένας γεωργικού ενδιαφέροντος, αερόβιος οργανισμός του εδάφους, που δεσμεύει το ατμοσφαιρικό άζωτο. Η κρυσταλλική δομή της Κυκλοφιλίνης Α από το βακτήριο *A. vinelandii* (AvCyPA) λύθηκε σε ανάλυση 2.2Å, ενώ η δομή της σε σύμπλοκο με το συνθετικό τετραπ εππίδιο succinyl-Ala-Phe-Pro-Phe-p-nitroanilide (sucAFPpNA) λύθηκε σε ανάλυση 1.9Å. Το συγκεκριμένο πεπτίδιο, που χρησιμοποιήθηκε σαν υπόστρωμα για την μελέτη της δράσης ισομεράσης, περιέχει προλίνη που υιοθετεί την *cis*- διαμόρφωση και παρουσιάζει διαφορετική διαμόρφωση από εκείνη που παρατηρείται σε ανάλογες δομές. Οι συγκρίσεις δομών μεταξύ του ελεύθερου και του συμπλοκοποιημένου ενζύμου ή/και με παρόμοιες δομές παρέχει επιπρόσθετες πληροφορίες για την σχέση δομής και λειτουργίας του. Παράλληλα, δομικές μελέτες πάνω στην κυκλοφιλίνη από ένα νέο οργανισμό ενισχύουν τις υπάρχουσες μελέτες και βοηθούν στην καλύτερη κατανόηση της σχέσης μεταξύ της αμινοξικής διαφοροποίησης και ενζυμικής λειτουργίας.

Οι φωσφορικές ακετυλομεταφοράσες καταλύουν την αντιστρεπτή μεταφορά της ακετυλομάδας από ακέτυλο-φώσφορο στο συνέζυμοΑ, σχηματίζοντας ακέτυλο-συνέζυμοΑ και ανόργανο φώσφορο. Έχουμε κρυσταλλώσει ένα ισόμορφο του ενζύμου από το *E. coli*, μεγέθους ~700 αμινοξέων και εργαζόμαστε στην επίλυση της κρυσταλλικής δομής. Δομές της ελεύθερης μορφής της EcPTA και συμπλόκων της με υποστρώματα/προϊόντα της καταλυόμενης αντίδρασης θα είναι χρήσιμες στην προσπάθεια διαφώτισης του καταλυτικού μηχανισμού του ενζύμου. Παράλληλα, σκοπεύουμε να χρησιμοποιήσουμε μεθόδους SAXS προκειμένου να πάρουμε περισσότερες πληροφορίες γύρω από το βαθμό πολυμερισμού, την σχετική θέση των μονομερών στη δομή και τις αλλοστερικές επιδράσεις των δεσμευτών.

STRUCTURAL ANALYSIS OF BACTERIAL CYCLOPHILIN-A AND PHOSPHATE ACETYLTRANSFERASE ENZYMES

Christoforides E¹, Dimou M², Katinakis P², Bethanis K¹, Karpusas M^{1,*}

¹ Agricultural University of Athens, Department of Science, Physics Laboratory, Iera Odos 75, 118 55, Athens

² Agricultural University of Athens, Department of Biotechnology, Laboratory of General and Agricultural Microbiology, Iera Odos 75, 118 55, Athens

* mkarp@aua.gr

Abstract

Peptidyl-Prolyl Isomerases, such as cyclophilins, catalyze the cis-trans isomerization of peptide bonds preceding prolyl residues, therefore accelerating protein folding. *Azotobacter vinelandii* is a well known agricultural, aerobic, soil-dwelling bacterium, which fixes atmospheric nitrogen. The crystal structure of Cyclophilin A from *A. vinelandii* (AvCyPA) was determined by molecular replacement at 2.2 Å resolution. In addition, the crystal structure of the protein complexed with the synthetic tetrapeptide succinyl-Ala-Phe-Pro-Phe-p-nitroanilide (sucAFPpNA) was determined at 2.0 Å resolution. The tetrapeptide, which was used as a substrate for the assay that confirmed PPIase activity of the enzyme, is bound as a proline cis-isomer and adopts different conformation from those observed in other related structures. Comparisons between the uncomplexed and complexed structures as well as other CypA structures provides additional insights about structure-function relationships of this enzyme. Also structural studies for a cyclophilin from a new organism may complement existing studies and help achieve a better understanding of the link between sequence variation and enzymatic function.

Phosphate acetyltransferases catalyse the reversible transfer of the acetyl group from acetyl-P to CoA, forming acetyl-CoA and inorganic phosphate. We have crystallized one PTA isoform from *E. coli* of ~700 residues in length and we will pursue the determination of its crystal structure. Structures of the uncomplexed EcPTA or its complexes with substrates/products of the catalyzed reaction will be useful in the elucidation of the catalytic mechanism of this enzyme. In addition, we plan to use SAXS methods in order to provide additional information about the oligomerization state, model relative positions of monomers and allosteric effects of ligands.

**ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΟΥ ΕΚΚΡΙΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΤΥΠΟΥ III ΤΟΥ
BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΣΥΝΤΗΡΗΜΕΝΑ
ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΣΤΗ ΖΥΜΗ**

Φωτιάδης Χ, Ταμπακάκη Α*

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Εργ. Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας, Ιερά Οδός 75, 118 55, Αθήνα

* tamprakaki@aua.gr

Περίληψη

Τα εκκριτικά συστήματα τύπου III είναι συντηρημένα σε βακτηριακά παθογόνα ζώων και φυτών αλλά απαντούν και σε ριζόβια, σε μη παθογόνα επιφυτικά βακτήρια και σε ορισμένα ενδοσυμβιωτικά. Τα συστήματα αυτά μεταφέρουν απευθείας πρωτεΐνες στα κύτταρα των ξενιστών και επηρεάζουν διάφορες κυτταρικές διεργασίες. Ανάλογα με τον ξενιστή, οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες μπορεί να προωθούν ή να παρεμποδίζουν την εκδήλωση παθογένειας ή συμβίωσης ή να μην επηρεάζουν καθόλου το φυτό. Αν και πολλές από αυτές τις πρωτεΐνες εμφανίζουν μικρή ομοιότητα στην αλληλουχία τους με πρωτεΐνες γνωστής λειτουργίας, οι στόχοι τους στα κύτταρα των ξενιστών φαίνεται να είναι συντηρημένοι σε όλους σχεδόν τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Η διελεύκανση των μηχανισμών λειτουργίας των πρωτεϊνών αυτών είναι ζωτικής σημασίας για την κατανόηση των στρατηγικών που χρησιμοποιούνται από παθογόνα και συμβιωτικά βακτήρια. Πρόσφατα, η ζύμη έχει αναδειχθεί ως αντιπροσωπευτικό σύστημα-μοντέλο για την ταυτοποίηση και το λειτουργικό χαρακτηρισμό πρωτεϊνών-τελεστών από παθογόνα βακτήρια φυτών και ζώων, γιατί διαθέτει πολλές συντηρημένες πρωτεΐνες και διεργασίες με ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Μέχρι σήμερα, το σύστημα της ζύμης δεν έχει χρησιμοποιηθεί για τη διερεύνηση των λειτουργιών ριζοβιακών πρωτεϊνών-τελεστών.

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήσαμε το *Saccharomyces cerevisiae* ως αντιπροσωπευτικό σύστημα-μοντέλο για να διερευνηθεί ο ρόλος των πρωτεϊνών-τελεστών του συμβιωτικού βακτηρίου *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, το οποίο κωδικοποιεί τουλάχιστον 30 πρωτεΐνες-τελεστές. Για το σκοπό αυτό, 21 πιθανές πρωτεΐνες-τελεστές υπερεκφράστηκαν στη ζύμη και εξετάστηκαν οι συνέπειες τους στην ανάπτυξη και βιωσιμότητά της κάτω από διαφορετικές συνθήκες. Μεταξύ των πρωτεϊνών που ελέγχθησαν, δύο εμφάνισαν έντονη αναστολή ανάπτυξης στη ζύμη. Περαιτέρω μελέτες πραγματοποιήθηκαν για να εξεταστεί η αναστολή ανάπτυξης που προκαλείται από τις πρωτεΐνες αυτές. Ειδικότερα, καθορίστηκε ότι η αναστολή ανάπτυξης που προκαλείται από μια εκ των δύο πρωτεϊνών οφείλεται σε παύση της ανάπτυξης και ότι η πρωτεΐνη αυτή προκαλεί επιπλέον αναστολή της κυτταρικής αναπνοής στη ζύμη.

IDENTIFICATION OF *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* TYPE III EFFECTORS AFFECTING CONSERVED EUKARYOTIC CELLULAR PATHWAYS IN YEAST

Fotiadis C, Tampakaki A*

Agricultural University of Athens, Department of Agricultural Biotechnology, Lab. of General & Agricultural Microbiology, Iera Odos 75, 118 55, Athens

* tampakaki@aau.gr

Abstract

The type III secretion systems (T3S) are widely conserved in plant and animal bacterial pathogens but are also present in rhizobia, in some non-pathogenic plant-associated bacteria and in certain endosymbionts. The T3S directly inject proteins (effectors) into host cells and manipulate host cellular processes. Depending on the host, the secreted proteins may be beneficial or detrimental for pathogenesis or symbiosis or appear not to affect the plant. Although many effectors share little sequence similarity with proteins of known function, their host targets appear to be conserved across eukaryotic organisms. Deciphering the mechanisms of action of these proteins is vital to advancing our understanding of pathogenic and symbiotic bacterial strategies. Recently, yeast emerged as a surrogate model for the identification and functional characterization of T3S effector proteins from animal and plant pathogenic bacteria because yeast has many proteins and processes well conserved in higher eukaryotes. So far, this system has not yet been used to explore the functions of the rhizobial effectors.

In the present study, we utilized *Saccharomyces cerevisiae* as a surrogate model to gain insight into the role of type III effectors from the symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 which encodes at least 30 effectors. To this purpose, we overexpressed 21 putative T3S effector in yeast and examined their consequences of induced expression of these proteins on the growth and viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under different conditions. Among the effectors tested were two with strong growth inhibition phenotype in yeast. Further studies were conducted to explore the growth-inhibiting activity of these effectors. Specifically, we demonstrated that the growth inhibition caused by one of the two effectors was due to yeast growth arrest and that this effector also resulted in inhibition of yeast respiration.

**ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΠΟΙΚΙΛΟΜΟΡΦΙΑ ΑΖΩΤΟΔΕΣΜΕΥΤΙΚΩΝ
ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ ΑΠΟ ΤΗ ΡΙΖΟΣΦΑΙΡΑ ΣΙΤΗΡΩΝ
ΚΑΛΛΙΕΡΓΟΥΜΕΝΩΝ ΣΤΟΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΑΓΡΟ ΤΟΥ ΓΕΩΠΟΝΙΚΟΥ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ**

**Κεφαλογιάννη Η*, Ζιντίλας Α, Χαριδήμου Α, Βενιεράκη Α, Ταμπακάκη Α, Κατινάκης Π,
Χατζηπαυλίδης Ι**

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Τομέας Βιοχημείας, Ενζυμικής Τεχνολογίας, Μικροβιολογίας και Μοριακής Βιολογίας, Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας, Ιερά Οδός 75, 118 55, Αθήνα

* bmic7kei@aua.gr

Περίληψη

Τα μικροαερόφιλα, αζωτοδεσμευτικά βακτήρια του γένους *Azospirillum* (alphaproteobacteria), ανήκουν στους μικροοργανισμούς που προάγουν την αύξηση των φυτών, διαθέτουν έντονη κινητικότητα και βρίσκονται στο έδαφος ή στην περιοχή της ριζόσφαιρας. Ορισμένες από τις ιδιότητές τους, οι οποίες συμβάλουν στην προώθηση της ανάπτυξης των φυτών είναι: η παραγωγή ινδολοξικού οξέος (IAA), η ικανότητα διαλυτοποίησης του φωσφόρου και η αζωτοδέσμευση. Επιπλέον, τα βακτήρια αυτά έχουν την ικανότητα να κινούνται ομαδικά σε επιφάνειες (swarming and swimming motility). Στην παρούσα μελέτη, απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα σιτηρών (*Secale cereale* και *Zea mays*) καλλιεργούμενων στον πειραματικό αγρό του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών δύο αζωτοδεσμευτικά βακτήρια (B και 4₂ αντίστοιχα) τα οποία διαπιστώθηκε ότι ανήκουν στο είδος *Azospirillum brasilense*. Στη συνέχεια εκτιμήθηκε, η απόδοση της αζωτοδεσμευτικής δραστηριότητας των βακτηρίων, η ικανότητα παραγωγής IAA καθώς και ο βαθμός διαλυτοποίησης του φωσφόρου. Επιπλέον διερευνήθηκε η επίδραση διαφορετικών περιβαλλοντικών συνθηκών (θερμοκρασία και αλατότητα) στην αύξηση και στη δυνατότητα ομαδικής κίνησης σε επιφάνειες (swarming and swimming motility). Σε υπό εξέλιξη πείραμα μελετάται η επίδραση των συγκεκριμένων στελεχών σε φυτά υπό ελεγχόμενες συνθήκες ανάπτυξης.

**GENETIC AND PHENOTYPIC DIVERSITY OF N₂-FIXING BACTERIA ISOLATED
FROM THE RHIZOSPHERE OF CEREALS GROWN IN EXPERIMENTAL FIELD
OF AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS**

Kefalogianni I*, Zintilas A, Charidimou A, Venieraki A, Tampakaki A, Katinakis P, Chatzipavlidis I

Agricultural University of Athens, Department of Agricultural Biotechnology, Laboratory of General & Agricultural Microbiology, Iera Odos 75, 118 55, Athens

* bmic7kei@aua.gr

Abstract

The microaerophilic, diazotrophic, plant growth promoting rhizobacteria of the genus *Azospirillum* (alphaproteobacteria) are highly motile, soil and rhizosphere inhabitants. Some of the traits that contribute to their ability to promote plant growth are: indole acetic acid (IAA) synthesis, phosphorus solubilization and nitrogen fixation. Additionally, azospirilla are able either to swim (polar flagellum) or swarm (lateral flagella). Two diazotrophic bacteria designated as B and 4a₂ were isolated from the rhizosphere of cereals (*Secale cereale* and *Zea mays* respectively) grown in the experimental field of Agricultural University of Athens and were characterized as *Azospirillum brasilense*. In addition their nitrogen fixation efficiency, IAA production and phosphorus solubilization capacity were assessed. Furthermore, it was examined the influence of different environmental conditions (temperature and salinity) on their growth, swarming and swimming behavior. These strains are currently evaluated for their influence on the plants under growth chamber conditions.

ΤΑ ΜΟΡΙΑΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΗΣ ΔΙΑΠΑΥΣΗΣ ΣΤΟ ΕΝΤΟΜΟ *SESAMIA NONAGRIOIDES* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

Γκουβίτσας Θ., Κούρτη Α*

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας, Ιερά Οδός 75, 118 55, Αθήνα

* akourti@aua.gr

Περίληψη

Η διάπαυση είναι μια γενετικά ελεγχόμενη κατάσταση μειωμένης ανάπτυξης (μορφογένεσης ή αναπαραγωγής) των εντόμων, της οποίας η έκφραση ρυθμίζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες (φωτοπερίοδο). Η κατάσταση αυτή αποτελεί μία ιδιαίτερη στρατηγική επιβίωσης των εντόμων κατά τη διάρκεια περιόδων δυσμενών συνθηκών. Από γενετική προσέγγιση, γονίδια που εμπλέκονται στη λειτουργία των βιολογικών ρολογιών, την αντίσταση στο stress και στην ανάπτυξη, προσαρτώνται και στα μονοπάτια της διάπαυσης. Το έντομο *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) είναι κατάλληλο για μελέτη της διάπαυσης, γιατί εισέρχεται σε προαιρετική προνυμφική διάπαυση ελεγχόμενη φωτοπεριοδικά. Τα κερκαδικά ρολόγια είναι μοριακοί μηχανισμοί μέτρησης του χρόνου που διανέμεται σε ένα εύρος κυτταρικών τύπων των οργανισμών. Πρώτο βήμα της μελέτης φωτοπεριοδικών ρολογιών ήταν η απομόνωση και αλληλούχιση των ωρολογιακών γονιδίων *period* (*per*), *timeless* (*tim*), *cycle* (*cyc*) and *cryptochrome* (*cry*) στη *S. nonagrioides*. Μελετήσαμε την έκφραση των γονιδίων αυτών κάτω από συνθήκες μη διάπαυσης (LD16:8) και διάπαυσης (LD:10:14). Κάτω από LD16:8 τα *per*, *tim*, *cyc* and *cry* mRNA εμφάνισαν μέγιστα 5h μετά την έναρξη της σκοτόφαση. Κάτω από LD:10:14 τα *per*, *tim*, *cyc* και *cry* mRNA επίπεδα εμφάνισαν ένα ημερήσιο ρυθμό και η έκφραση τους ελαττώνονταν στη φωτόφαση και αυξάνονταν στη σκοτόφαση. Την ρύθμιση της διάπαυσης την προσεγγίσαμε και μέσω του άξονα της αντίστασης στο stress με τη μεταγραφική μελέτη πέντε heat shock γονιδίων που απομονώσαμε και κλωνοποιήσαμε (*SnoHsp19.5*, *SnoHsp20.8*, *SnoHsp70*, *SnoHsc70* και *SnoHsp83*). Το γονίδιο *SnoHsp19.5* εκφραζόταν συνεχώς, ενώ το *SnoHsp20.8* επάγονταν μόνο κατά τον τερματισμό της διάπαυσης δείχνοντας ότι παίζουν διακριτούς ρόλους στη ρύθμιση της διάπαυσης. Το *SnoHsp70* δεν εκφραζόταν στη διάρκεια της διάπαυσης ενώ το *SnoHsc70* επάγονταν κατά την είσοδο των προνυμφών στη βαθειά διάπαυση, που σημαίνει ότι παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό βοηθητικών πρωτεϊνών σε ειδικά στάδια της διάπαυσης. Το *SnoHsp83* επιδεικνύει μια παρόμοια εικόνα με το *SnoHsc70* κάτω από συνθήκες διάπαυσης.

THE MOLECULAR COMPONENTS OF DIAPAUSE IN THE MOTH *SESAMIA NONAGRIOIDES* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

Gkouvitsas Th, Kourti A*

Agricultural University of Athens, Department of Agricultural Biotechnology, Laboratory of Molecular Biology, Iera Odos 75, 118 55, Athens, Greece

* akourti@aua.gr

Abstract

Diapause is a period of endocrine-mediated metabolic and developmental arrest induced by changes in abiotic cues indicating the onset of adverse environmental conditions. From a genetic perspective, genes involved in clock function, stress resistance and development have been co-opted into insect diapause pathways. Circadian clocks are molecular time-keeping mechanisms that reside in a diverse range of cell types of organisms. The insect *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) has a number of advantages to investigate diapause such as larval facultative diapause and photoperiod controlling of the induction and termination of diapause. As a step to approach photoperiodic clocks we sequenced the clock genes, *period* (*per*), *timeless* (*tim*), *cycle* (*cyc*) and *cryptochrome* (*cry*) in *S. nonagrioides*. We examined temporal profiles of *per*, *tim*, *cyc* and *cry* expressions in the head of larvae, under LD16:8 (non diapausing conditions) and LD:10:14 (diapausing conditions). Under LD16:8 the *per*, *tim*, *cyc* and *cry* mRNA exhibited a peak 5h after onset of the scotophase. A clear diel rhythm of *per*, *tim*, *cyc* and *cry* mRNA levels was detected at 10L:14D: expression was downregulated during the photophase and upregulated during the scotophase. Under 16L:8D, the amplitude was similar to that observed under 10L:14D, but the peak shifted 5 h after onset of the scotophase. We also investigated the rhythmicity of diapause in the moth *S. nonagrioides* through the access of stress resistance studying the transcriptional regulation of five heat shock genes. *SnoHsp19.5* gene was consistently expressed, while *SnoHsp20.8* was down-regulated in deep diapause and was up-regulated at the termination of diapause, suggesting that these two genes play distinctive roles in the regulation of diapause. *SnoHsp70* is down regulated during diapause, while *SnoHsc70* is induced as the larvae enter in deep diapause. Our results show that *SnoHsc70* may play important roles in assisting protein conformation during specific stages of diapause. *SnoHsp83* displays a similar pattern to *SnoHsc70* under diapause conditions.

**ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΠΑΡΟΔΙΚΗΣ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΟ
ΛΕΠΙΔΟΠΤΕΡΟ ΕΝΤΟΜΟ *SESAMIA NONAGRIOIDES***

Κοντογιαννάτος Δ¹, Swevers L², Ιατρού Κ², Κούρτη Α^{1*}

¹ Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας, Ιερά Οδός 75, 118 55, Αθήνα

² Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών "Δημόκριτος" (ΕΚΕΦΕ "ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ"), Ινστιτούτο Βιολογίας, Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Εντόμων και Βιοτεχνολογίας, Αγία Παρασκευή, Αθήνα

* akourti@aua.gr

Περίληψη

Στα έντομα των οποίων ο μόνιμος γενετικός μετασχηματισμός δεν έχει ακόμα επιτευχθεί, είτε γιατί δεν αποτελούν έως τώρα πειραματικά μοντέλα, είτε γιατί δεν επιδέχονται γενετικής τροποποίησης, δίνεται η δυνατότητα παροδικής γονιδιακής αποσιώπησης, με χρήση της τεχνικής του RNAi. Η παροδική αποσιώπηση αυτή, μπορεί να επιτευχθεί με διάφορους τρόπους όπως είναι: α. η απευθείας έγχυση στην αιμολεμφική κοιλότητα των εντόμων, *in vitro* ή *in vivo* συνθετικών δίκλωνων RNA μορίων (dsRNAs), β. η εκτροφή τους σε θρεπτικά υποστρώματα που έχουν εμπλουτιστεί με γενετικά τροποποιημένα βακτήρια τα οποία συνθέτουν *in vivo* τα επιθυμητά dsRNAs, γ. ύστερα από μόλυνση με χρήση γενετικά ανασυνδυασμένων βακροϊών που κωδικοποιούν για τα επιθυμητά dsRNAs στα κύτταρα του εντόμου ξενιστή. Οι τεχνικές αυτές έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε πειράματα λειτουργικής γονιδιωματικής σε διάφορα είδη του ζωικού βασιλείου. Στην εργασία αυτή αξιολογούμε την χρήση των τριών αυτών τεχνικών για την αποσιώπηση ενός γονιδίου που κωδικοποιεί για μια εστεράση της ορμόνης νεότητας (Juvenile hormone esterase), στο Λεπιδόπτερο έντομο *Sesamia nonagrioides*. Τα αποτελέσματα μας μπορούν να βρουν ευρεία εφαρμογή στην βιοτεχνολογική καταπολέμηση επιβλαβών εντόμων για την γεωργία.

EVALUATION OF TRANSIENT GENE KNOCKDOWN TECHNIQUES IN THE LEPIDOPTERAN INSECT *SESAMIA NONAGRIOIDES*

Kontogiannatos D¹, Swevers L², Iatrou K², Kourti A^{1*}

¹ Agricultural University of Athens, Department of Agricultural Biotechnology, Laboratory of Molecular Biology, Iera Odos 75, 118 55, Athens, Greece

² National Centre for Scientific Research “Demokritos”, Institute of Biology, Insect Molecular Genetics and Biotechnology Group, Athens

* akourti@aua.gr

Abstract

RNAi is a valuable tool for reverse functional genomics providing a new biological tool for researchers to studying biological functions and procedures in insects and other organisms. In genetically transformable insect species, RNAi can be triggered by the expression of a long double stranded hairpin RNA from a transgene containing a gene fragment cloned as an inverted repeat. In non model insect species for which systematic recovery of mutants is not feasible, RNAi can be triggered directly, by delivering the dsRNA target into the insect's gut or hemolymph, using several techniques. These techniques include: a. direct injection or feeding with *in vitro* or *in vivo* synthesized dsRNAs, b. plant, baculoviral or bacterial mediated delivery of the dsRNA to the chosen stage (from egg to adult) of the experimental specimen. In this study we evaluate several approaches in order to silence a juvenile hormone esterase gene in the moth *Sesamia nonagrioides*. Our results can find practical applications in biotechnology-based insect pest management.

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΔΙΣΦΑΙΝΟΛΗΣ-Α ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΕΝΤΟΜΟΥ *SESAMIA NONAGRIOIDES*

Μιχαήλ Ξ, Κοντογιαννάτος Δ, Κούρτη Α*

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας, Ιερά Οδός 75, 118 55, Αθήνα

* akourti@aua.gr

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια, η πιθανή καταστροφική επίδραση των χημικών ενδοκρινικών διαταρακτών (endocrine disrupting chemicals-EDCs) στην ανθρώπινη υγεία και στο οικοσύστημα, έχουν γίνει κύριο αντικείμενο επιστημονικής έρευνας. Η Δισφαινόλη Α (BPA) είναι ένα ευρέως παραγόμενο χημικό στην βιομηχανία πολυανθρακικών πλαστικών και επόξυ-ρητινών. Επειδή είναι ακόμα λίγα τα δεδομένα για την επίδραση της BPA στα ασπόνδυλα, μελετήσαμε την επίδραση της στο έντομο *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae), προκειμένου να εξακριβωθούν οι οικολογικές επιπτώσεις της στο περιβάλλον. Για την μελέτη της επίδρασης της BPA στον οργανισμό της *S. nonagrioides*, προνόμφες 1^{ου} αναπτυξιακού σταδίου εκτέθηκαν μέχρι το τέλος του 6^{ου} σταδίου σε επιλεγμένες συγκεντρώσεις BPA (1 μg / L, 10 μg / L, 100 μg / L, 1 mg / L και 10 mg / L) μέσω της τροφής τους. Στην μελέτη εκτιμήθηκαν τα ποσοστά επιβίωσης, η αύξηση του σωματικού βάρους των προνυμφών, η παρουσία μη φυσιολογικών φαινοτύπων καθώς και οι μεταβολές στα αναπαραγωγικά όργανα των εντόμων (όρχεις και ωοθήκες). Τα αποτελέσματά μας δείχνουν την άμεση αλληλεπίδραση του ξενοοιστρογόνου Δισφαινόλη Α στα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου *S. nonagrioides*. Επιπλέον, χρησιμοποιήσαμε semi-quantitative RT-PCR για να μελετήσουμε την έκφραση σε μεταγραφικό επίπεδο πέντε γονιδίων heat shock protein, που έχουμε ήδη απομονώσει και ταυτοποιήσει στη *S. nonagrioides*. Αυτά τα γονίδια είναι τα *SnoHsp70*, *SnoHsc70*, *SnoHsp83*, *SnoHsp19.5* και *SnoHsp20.8*. Εφαρμογή της BPA μέσω της τροφής ή μέσω ένεσης στην αιμολέμφο έδειξε να επάγει τη σύνθεση των *SnoHsp19.5* και *SnoHsp20.8* mRNAs. Τα επίπεδα έκφρασης του *SnoHsp70* δεν επηρεάστηκαν ενώ αντιθέτως είχαμε επαγωγή τόσο του *SnoHsc70* όσο και του *SnoHsp83*. Τα γονίδια *Hsc70* και *Hsp90* παίζουν έναν κρίσιμο ρόλο στη μεταβίβαση του σήματος των στεροϊδών ορμονών στα σπονδυλωτά. Στην περίπτωση της *S. nonagrioides* τα γονίδια αυτά έδειξαν να επάγονται από τη BPA, γεγονός που υποδεικνύει ότι συμπεριφέρεται σαν ενδοκρινικός διαταράκτης.

THE EFFECTS OF BISPHENOL-A IN THE DEVELOPMENTAL PROGRESSION OF THE MOTH *SESAMIA NONAGRIOIDES*

Michail X. Kontogiannatos D, Kourti A*

Agricultural University of Athens, Department of Agricultural Biotechnology, Laboratory of Molecular Biology, Iera Odos 75, 118 55, Athens, Greece

* akourti@aua.gr

Abstract

Endocrine disruptors (EDs) are a structurally diverse group of compounds that may adversely affect the health of humans and wildlife by interaction with the endocrine system. The monomer bisphenol A (BPA) is one of the most common chemicals that behave as an endocrine disruptor. In vertebrates and invertebrates, BPA causes estrogen-like developmental effects. However, there is still little detailed information about the molecular action of BPA in invertebrates. *S. nonagrioides* 1st instar larvae were exposed until the end of 6th (last) instar to selected concentrations of BPA (1 µg/L, 10 µg/L, 100 µg/L, 1 mg/L and 10mg/L) applied in their artificial diets. In this study we evaluate developmental and metamorphosis endpoints that may indicate the possible impact of BPA on terrestrial insects. Survival rate was evaluated and then weight gain, abnormal phenotypes and the impact of BPA on reproductive organs (ovaries and testis) were tested in different BPA concentrations through insects' artificial diet. Our results suggest a direct interaction of the environmental xenoestrogen BPA with the insect's developmental progression. Additionally, semi-quantitative RT-PCR was used to identify the effects of BPA at the transcriptional level of five heat shock protein genes that we have isolated and characterized previously from *S. nonagrioides*. These genes were the *SnoHsp70*, *SnoHsc70*, *SnoHsp83*, *SnoHsp19.5* and *SnoHsp20.8* genes. Application of BPA via the oral route or via intra-haemocoel injection induced the synthesis of the *SnoHsp19.5* and *SnoHsp20.8* mRNAs. The expression levels of *SnoHsp70* were not affected. In contrast, *SnoHsc70* as well as *SnoHsp83*, which play a pivotal role in vertebrate sex steroid signal transduction, were significantly elevated by BPA. Our results demonstrate that BPA behaves as an edysone-mimic in the moth *S. nonagrioides*.

Ενότητα: Φυσιολογία Φυτών και Φυτοπαθολογία

Section: Plant Physiology and Phytopathology

ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΤΟΞΙΚΟΓΟΝΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *ASPERGILLUS FLAVUS* ΚΑΙ ΤΩΝ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΕΙ ΣΕ ΚΕΛΥΦΩΤΑ ΦΙΣΤΙΚΙΑ “ΑΙΓΙΝΗΣ”

Αντωνόπουλος ΔΦ^{1,2}, Γεωργιάδου Μ³, Αγορίτσης ΣΠ¹, Γιαννιώτης Σ³, Τσιτσιγιάννης ΔΙ^{1,*}

¹ Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, Ιερά Οδός 75, 118 55, Αθήνα

² ΤΕΙ Καλαμάτας, Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, Εργαστήριο Φυτοπροστασίας, Αντικάλamos, Καλαμάτα, 24100

³ Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εργαστήριο Μηχανικής Τροφίμων, Επεξεργασίας και Συντήρησης Γεωργικών Προϊόντων, Ιερά Οδός 75, 118 55, Αθήνα

* dimtsi@aia.gr

Περίληψη

Μια από τις μεγαλύτερες απειλές για την ασφάλεια και ποιότητα των τροφίμων είναι οι μυκοτοξίνες, ιδιαίτερα τοξικοί και καρκινογόνοι παραγόμενοι μεταβολίτες χαμηλού μοριακού βάρους από ορισμένα είδη μυκήτων. Η αφλατοξίνη που παράγεται από τους μύκητες *Aspergillus flavus* και *A. parasiticus* αποτελεί μία από τις πλέον καρκινογόνες μυκοτοξίνες και έχει εντοπιστεί σε υψηλές συγκεντρώσεις στην Ελλάδα, μεταξύ άλλων, και σε κελυφωτά φιστικά. Ο στόχος αυτής της μελέτης ήταν η αξιολόγηση συλλογής 20 απομονώσεων ζυμών και 4 μη τοξικογόνων στελεχών *A. flavus*, που απομονώθηκαν από πειραματικούς φιστικεώνες του Ν. Φθιώτιδας, για την αντιμετώπιση του *A. flavus* και των αφλατοξινών του. Οι ζύμες MR7 (*Candida* sp.) και FR6 (*Aureobasidium pullulans*) αξιολογήθηκαν σε *in vitro* πειράματα κατά του αφλατοξικογόνου παθογόνου *A. flavus*, στέλεχος Δ1.3 AF2, και κρίθηκαν ως οι αποτελεσματικότερες, γιατί οδήγησαν σε σημαντική μείωση της ανάπτυξης του παθογόνου κατά 40-50% και σε περίπου 1000 φορές ελάττωση της ικανότητας κονιδιογένεσής του, σε σχέση με το μάρτυρα, επί της ψύχας κελυφωτών φιστικιών «Αιγίνης». Η επίδραση των συγκεκριμένων ζυμών στην παραγωγή της αφλατοξίνης υπολογίστηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και οδήγησε σε σημαντική μείωση της εν λόγω παραγωγής κατά 89% (FR6) και 85% (MR7), αντίστοιχα, σε σχέση με το μάρτυρα. Επίσης, κατά την αξιολόγηση των 4 μη-τοξικογόνων στελεχών *A. flavus* που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βιολογικοί παράγοντες καταπολέμησης της ασθένειας σε φιστικεώνες, τα μη τοξικογόνα στελέχη AF38, AF51 και AF57 μείωσαν σημαντικά τις παραγόμενες αφλατοξίνες (μέτρηση με HPLC) AFB1, B2 και G1 του στελέχους Δ1.3 AF2 κατά 41%, 48% και 69% αντίστοιχα, ενώ το στέλεχος AF45 δεν είχε καμία επίδραση σε σχέση με το μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης συμβάλλουν στην ανάπτυξη σύγχρονων μεθόδων βιολογικής αντιμετώπισης, φιλικές προς το περιβάλλον, με απώτερο σκοπό την προσέγγιση λύσεων αντιμετώπισης του προβλήματος των μυκοτοξινών των κελυφωτών φιστικιών και προστασίας του καταναλωτή από τις μυκοτοξίνες

BIOLOGICAL CONTROL OF THE TOXIGENIC FUNGUS *ASPERGILLUS FLAVUS* AND AFLATOXINS THAT ARE PRODUCED TO THE SHELLED PISTACHIO NUTS “AIGINIS”

Antonopoulos DF^{1,2}, Georgiadou M³, Agoritsis SP¹, Gianniotis S³, Tsitsiyiannis DI^{1*}

¹ Agricultural University of Athens, Laboratory of Plant Pathology, Iera Odos Str. 75, 118 55, Athens, Hellas

² TEI of Kalamata, School of Agricultural Technology, Laboratory of Crop Protection, Antikalamos, Kalamata, 24100, Hellas

³ Agricultural University of Athens, Laboratory of Food Process Engineering, Iera Odos Str. 75, 118 55, Athens, Hellas

* dimtsi@aua.gr

Abstract

One of the most significant threats for food quality and safety are the mycotoxins, particularly toxic and carcinogenic low molecular weight metabolites produced by certain fungal species. Aflatoxins produced by the fungi *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* are highly carcinogenic mycotoxins that several times have been detected at high concentrations levels in pistachio nuts in Greece. The aim of this study was to evaluate a collection of 20 yeast isolates and 4 non-toxigenic strains of *A. flavus*, isolated from experimental pistachio orchards located at Fthiotida County for the management of *A. flavus* and aflatoxins. The yeast isolates MR7 (*Candida* sp.) and FR6 (*Aureobasidium pullulans*) were selected as the most effective against the aflatoxigenic pathogen *A. flavus*, strain $\Delta 1.3$ AF2 because they led to a 40-50% reduction of *Aspergillus* growth and to a significant reduction in conidiogenesis by approximately 1000 times, in comparison to the control. These 2 yeast strains were further tested on shelled pistachio nuts cultivar “Eginis” for their role in aflatoxin production (assessed by High Performance Liquid Chromatography-HPLC) and led to a significant decrease by 89% (FR6) and 85% (MR7), respectively, in comparison to the control. Evaluation of the non-toxigenic *A. flavus* strains as biological control agents of the disease and mycotoxin in pistachio orchards, AF38, AF51 and AF57 reduced significantly the production of the aflatoxins (assessed by HPLC) AFB1, B2 and G1 of the $\Delta 1.3$ AF2 strain by 41%, 48% and 69%, respectively, whereas AF45 strain did not show any effect in comparison to the control. The results of this study contribute to the development of environmentally friendly methods of biological management of mycotoxins in pistachio nuts.

ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΕΡΓΑΛΕΙΑ ΠΕΡΙΠΟΙΗΣΗΣ ΠΥΚΝΟΦΥΤΕΙΑΣ

Δήμιου Β

Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης (Δ.Π.Θ), Δασολογίας και Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Τομέας Συγκομιδής και Τεχνολογίας Δασικών Προϊόντων, Εργαστήριο Υλοχρηστικής, Πανταζίδου 193, Ορεστιάδα

vdimou@fmenr.duth.gr

Περίληψη

Με τον όρο *πυκνοφυτεία* εννοούμε τη συστάδα ηλικίας 10-20 ετών στην οποία τα δένδρα έχουν ξεπεράσει το ύψος της υποβλάστησης. Οι περισσότερες μέθοδοι περιποίησης της πυκνοφυτείας περιλαμβάνουν παρεμβάσεις απομάκρυνσης κακόμορφων δέντρων (αρνητική επιλογή) και στη συνέχεια υποστήριξης των ατόμων του μέλλοντος (θετική επιλογή). Στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται δυο μέθοδοι περιποίησης της πυκνοφυτείας που συνδυάζουν στοιχεία και των δυο επιλογών: αυτή της μερικής κλάδευσης και αυτή της κυκλικής απόξεσης. Η πρώτη μέθοδος εφαρμόζεται, ανάλογα με τη διάμετρο του δέντρου, με δίχειρο ψαλίδι (κλαδευτήρι) ή αλυσοπρίονο. Χαρακτηρίζεται από το τσάκισμα της κορυφής του δέντρου και την αναδίπλωσή της προς τα κάτω, γεγονός που οδηγεί στη σταδιακή ξήρανση του δέντρου. Η μέθοδος παρέχει στα άτομα του μέλλοντος έναν καλύτερο αυξητικό χώρο και συμβάλλει στην αναχαίτιση της αύξησης της παρεδαφιαίας βλάστησης, καθώς το τσακισμένο δέντρο ρίχνεται πάνω στην υπάρχουσα παρεδαφιαία βλάστηση και σε ανταγωνιστικά άτομα. Η μέθοδος της κυκλικής απόξεσης εφαρμόζεται με ειδικό μαχαίρι περιποίησης με το οποίο καταστρέφουμε το φλοιό μαζί με το κάμβιο σε μια κυκλική λωρίδα σε στηθιαίο ύψος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη βαθμιαία ξήρανση του δέντρου μέσα σε μια χρονική περίοδο από 2 έως 4 χρόνια. Στην μέθοδο αυτή, η κομοστέγη των ατόμων του μέλλοντος λαμβάνει όλο και περισσότερο φως, καθώς τα ανταγωνιστικά άτομα σχηματίζουν διαρκώς μικρότερα φύλλα. Και στις δυο μεθόδους δεν απομακρύνουμε υλικό από τη συστάδα, αλλά το αφήνουμε στο σταθμό, με αποτέλεσμα να συμβάλλουμε στη σταθερότητά του και τον εμπλουτισμό του εδάφους. Οι δυο μέθοδοι προτείνονται για την οικολογική προσέγγισή τους και το χαμηλό κόστος.

METHODS AND TOOLS OF IMPROVING A YOUNG-GROWTH STAND

Dimou V

Demokriton University of Thrace (DUTH), Forestry and Management of the Environment and Natural Resources, Laboratory Timber Harvesting, Pantazidou str. 193, Orestiada

vdimou@fmenr.duth.gr

Abstract

The term 'young-growth stand' is used to signify a stand consisting of 10-20 year old trees that have outgrown the understory. Most methods of improving young-growth stands include the removal of poorly-shaped trees (negative selection) and subsequently the favoring of individuals with the best potential (positive selection). The present paper gives an overview of two methods of improving a young stand: partial pruning and ring barking, both of which combine elements of negative and positive selections. Partial pruning is applied with loppers (pruning shears) or chainsaws depending on the tree diameter. It involves partially cutting the tree top which then folds downwards, a process that ultimately leads to its gradual drying out. This method gives desired trees more growing area and helps curb the growth of unwanted ground vegetation, since the withered trees finally fall on top of existing ground vegetation and competing trees. The method of ring barking (*girdling*) is performed with a special knife which is used to destroy the bark together with the cambium in a ring at breast height, leading to the gradual drying of the tree in a time span of two to four years. In this way the canopy of healthier trees receives more sunlight as neighboring competing trees give growth to increasingly smaller leaves. In both methods no material is removed from the stand; on the contrary, it is left on the forest ground to promote soil stability and enhance enrichment with nutrients. Both methods are proposed on the grounds of their ecologically-friendly approach and low cost.

ΟΙ ΦΩΤΟΧΗΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΤΟΥ ΦΩΤΟΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ II ΩΣ ΜΕΣΟ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΦΥΤΩΝ *MENTHA PULEGIUM* ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΑ ΦΥΤΟΔΩΜΑΤΟΣ

Ποδαροπούλου Λ¹, Ακουμιανάκη-Ιωαννίδου Α^{1*}, Λιακόπουλος Γ²

¹ Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Εργ. Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου, Ιερά οδός 75, 118 55 Αθήνα

² Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Εργ. Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών, Ιερά οδός 75, 118 55 Αθήνα

* akouman@aua.gr

Περίληψη

Οι διάφορες εφαρμογές φυτεμένων δωματίων βαίνουν αυξανόμενες τα τελευταία χρόνια στη χώρα μας και ιδιαίτερα στα αστικά περιβάλλοντα. Σε αυτό συνετέλεσε ο περιορισμός των ελεύθερων κοινόχρηστων χώρων στον αστικό ιστό, η σημαντική μείωση και υποβάθμιση του πρασίνου και η τάση για χρήση αυτοφυών και αρωματικών ειδών. Η εκτεταμένη χρήση φυτεμένων δωματίων τα τελευταία χρόνια έχει δημιουργήσει αρκετούς προβληματισμούς σε ότι αφορά στην επιλογή του φυτικού υλικού, λόγω των ιδιαίτερων συνθηκών ανάπτυξης αυτών (θερμοκρασία, ακτινοβολία, κ.ά), σε σχέση με τη σύσταση και το πάχος του υποστρώματος ανάπτυξης, με στόχο τη δημιουργία ενός οργανωμένου αισθητικά και λειτουργικά πρασίνου σε συνθήκες φυτοδωμάτος το οποίο θα έδινε τη δυνατότητα ποικίλων δραστηριοτήτων. Ο φθορισμός της χλωροφύλλης *in vivo* αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο απεικόνισης της φυσιολογικής κατάστασης των φυτών όταν αυτά αναπτύσσονται σε συνθήκες λιγότερο ή περισσότερο περιοριστικές για την ανάπτυξη τους, όπως αυτές των φυτοδωματίων και χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη για την αξιολόγηση της ανάπτυξης του είδους *Mentha pulegium* (φλισκούνη) σε τρία υποστρώματα με βασικό συστατικό την ελαφρόπετρα (Ε) με συμμετοχή 60% και συστατικά το έδαφος (Εδ) και τη φυτική κομπόστα (Κ). Η αξιολόγηση της ανάπτυξης των φυτών έγινε μετρώντας κατά τη διάρκεια του πειράματος τις παραμέτρους λειτουργίας του φωτοσυστήματος II (PSII), το ύψος, και στο τέλος του πειράματος (6 μήνες μετά) το ξηρό βάρος υπέργειου μέρους των φυτών στη προσέγγιση συνδυασμού βιομετρικών και φυσιολογικών παραμέτρων προκειμένου να διαπιστωθεί η καταλληλότητα του είδους για χρήση του σε φυτοδώματα. Έριζα μοσχεύματα του είδους φυτεύτηκαν τον Απρίλιο του 2010 σε πλαστικά κιβώτια διαστάσεων 40x60 cm στον πυθμένα των οποίων τοποθετήθηκε διαστρωμάτωση υλικών συστήματος φυτοδωμάτος, σε τρία διαφορετικά υποστρώματα πάχους 7 cm, με την ακόλουθη κατ' όγκο σύνθεση: Α=6:4 (Ε:Κ), Β= 6:4 (Ε:Εδ) και Γ=6:2:2 (Ε:Κ:Εδ). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα το έδαφος ως συστατικό του υποστρώματος Β (κυρίως) και Γ (δευτερευόντως), είχε τη μεγαλύτερη επίδραση στην ανάπτυξη των φυτών δίνοντας φυτά με μεγαλύτερο ύψος, μεγαλύτερο ξηρό βάρος υπέργειου σε σχέση με το υπόστρωμα χωρίς έδαφος. Στα φυτά της μεταχείρισης Β, οι τιμές του ETR (φαινόμενος ρυθμός φωτοχημικής ροής ηλεκτρονίων) ήταν υψηλότερες συγκριτικά με τα φυτά της μεταχείρισης Α, ενώ οι τιμές της Φ_{PSII} (λειτουργική φωτοχημική απόδοση του PSII) ήταν υψηλές, χωρίς όμως σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων. Επιπρόσθετα, οι διαφορές των τιμών της Φ_{PSII0} μεταξύ των περιόδων δειγματοληψίας κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού ήταν σε συμφωνία τόσο με το αναπτυξιακό δυναμικό κάθε μεταχείρισης όσο και με το επίπεδο της καταπόνησης λόγω συνδυασμού υψηλών θερμοκρασιών και περιορισμένης διαθεσιμότητας υγρασίας. Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού τα φυτά έδωσαν υψηλές τιμές της παραμέτρου Φ_{PSII0} υποδηλώνοντας απουσία σοβαρών βλαβών από καταπόνηση. Το γεγονός αυτό είναι σημαντικό δεδομένης της περιόδου μέτρησης η οποία χαρακτηρίζεται από σημαντική παρουσία παραγόντων καταπόνησης. Συμπερασματικά, η προσθήκη εδάφους στο υπόστρωμα ανάπτυξης των φυτών είχε ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη ανάπτυξη και καλύτερη απόκριση στην καταπόνηση λόγω ξηροθερμικών συνθηκών. Οι παράμετροι λειτουργίας του PSII μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ένας ευαίσθητος και εύκολα μετρήσιμος δείκτης της φυσικής κατάστασης των φυτών κάτω από συνθήκες φυτεμένου δωματίου.

ASSESSMENT OF GROWTH OF *MENTHA PULEGIUM* IN A GREEN ROOF SYSTEM THROUGH THE STUDY OF PSII PHOTOCHEMICAL PARAMETERS

Podaropoulou L¹, Akoumianaki-Ioannidou A^{1,*}, Liakopoulos G²

¹ Agricultural University of Athens, Department of Crop Science, Laboratory of Floriculture and Landscape Architecture, 75 Iera Odos Street, 118 55, Athens

² Agricultural University of Athens, Department of Agricultural Biotechnology, Division of Plant Biology, Laboratory of Plant Physiology, 75 Iera Odos Street, 118 55, Athens

* akouman@aua.gr

Abstract

Various applications of green roofs increase constantly in Greece, especially in urban areas. The restriction of free public spaces in the urban areas, the significant reduction and degradation of green and also the tendency to use native and aromatic species contributed to the development of green roofs. The extensive use of green roofs in recent years has created several concerns with regard to the selection of plant material, because of the special circumstances under which these plants grow (e.g. temperature, solar radiation), especially focusing on substrate properties such as composition and depth, aiming at an attractive and functionally effective result which would be able to support various activities. *In vivo* chlorophyll fluorescence offers a powerful tool for monitoring and assessing the physiological state of plants, especially when they grow under limiting environmental conditions such as those of green roofs. This technique was used in the present study to assess growth of *Mentha pulegium* plants grown in three different substrates based on pumice (E) added at 60% and additionally, on the following addends: soil (E_δ) or compost (K). Assessment of plant growth was based on photosystem II (PSII) photochemical parameters and plant height measured during the experimental growth period, and on dry weight of above-ground plant biomass at the end of the experimental period (6 months later). Thus, a combination of biometric and physiological plant characteristics was used to test the suitability of the particular plant species in green roofs. Rooted cuttings of *Mentha pulegium* were planted on April 2010 in plastic containers (40×60 cm) in the bottom of which an appropriate infrastructure of layering materials was placed. Total depth was 7 cm and three different substrates with the following volume composition were tested: A=6:4 (E:K), B= 6:4 (E:E_δ) και Γ=6:2:2 (E:K:E_δ). According to the results, soil as a component of substrate B (mainly) and of substrate Γ (secondarily), had the largest effect on plant growth giving plants with greater height, greater dry weight compared to soilless substrate (A). In plants of treatment B, values of ETR (apparent rate of photochemical electron transport rate) were higher compared to plants of treatment A, while values of Φ_{PSII} (effective quantum yield of PSII photochemistry) were high, but with no significant differences compared to the other two treatments. Additionally, differences in values of Φ_{PSII0} between sampling periods during the summer was in agreement with both the growth potential of each treatment and the level of stress due to the combination of high temperatures and limited soil water availability. It is worth noticing that during the summer, plants showed relatively high values of the Φ_{PSII0} parameter indicating that no considerable damages had been established. This is important given that the measurement period was characterized by the presence of significant stressors. In conclusion, the addition of soil in plant growth substrate resulted in higher growth and better response to stress due to xerothermic conditions. The photochemical parameters of PSII can be used as a sensitive and easily measurable indicator of the physiological condition of plants under green roofs growth conditions.

**ΧΡΗΣΗ ΒΙΟΣΗΜΑΝΤΩΝ ΤΟΥ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗ *LEMNA MINOR* ΓΙΑ ΤΗΝ
ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΔΥΟ ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΩΝ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟ
ΤΡΟΠΟ ΔΡΑΣΗΣ**

Μουζάκη-Παξινού Α-Χ*, Φουντουλάκης Μ, Αράπης Γ

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής, Εργαστήριο Οικολογίας και Προστασίας Περιβάλλοντος, Ιερά οδός 75, 118 55, Αθήνα

* joy_pax@yahoo.gr

Περίληψη

Η χρήση φυτοφαρμάκων στην γεωργία έχει δημιουργήσει αυξημένη ανησυχία στον κοινωνικό και επιστημονικό ιστό λόγω των επιπτώσεων και των ενδεχόμενων κινδύνων για την υγεία του ανθρώπου και του περιβάλλοντος. Ο πιθανός κίνδυνος για τους οργανισμούς καταγράφεται μέσω των επιπτώσεων που παρατηρούνται σε εργαστηριακά πειράματα σε μεμονωμένους οργανισμούς (βιοδείκτες) και βιοσημαντές.

Το Tritosulfuron είναι ένα ζιζανιοκτόνο της ομάδας των σουλφονιουριών, που παρεμποδίζουν την βιοσύνθεση αμινοξέων. Το Metribuzine, από την άλλη πλευρά, είναι ένα ζιζανιοκτόνο της ομάδας των τριαζινών, που παρεμποδίζουν το φωτοσύστημα II. Και τα δύο αυτά ζιζανιοκτόνα, που έχουν διαφορετικό τρόπο δράσης, μπορούν να καταλήξουν σε επιφανειακά νερά και αποτελούν πιθανό κίνδυνο για τα υδρόβια φυτά. Η τοξικότητά τους μελετήθηκε στην *Lemna minor*, ένα γρήγορα αναπτυσσόμενο υδροχαρές φυτό που χρησιμοποιείται συχνά ως βιοδείκτης σε οικοτοξικολογικές μελέτες δόσης-αποτελέσματος με τη χρήση καθορισμένων πρωτόκολλων OECD. Η εκτίμηση τοξικότητας έγινε σύμφωνα με την παρεμπόδιση της ανάπτυξης καλλιεργειών *Lemna minor* μετά από 7 μέρες. Επιλέχθηκαν τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις (EC100, EC75, EC50 and EC25), σύμφωνα με τα αποτελέσματα προκαταρκτικών πειραμάτων και δοκιμών που έγιναν για να εκτιμηθεί η τοξικότητα του κάθε ζιζανιοκτόνου. Πρόσθετα, μετρήθηκαν φασματοσκοπικά τις μέρες 1, 3 και 5 της έκθεσης, η ανταπόκριση της υπεροξειδάσης της γουαϊακόλης (GPOD), της ρεδοκτάσης της γλουταθειόνης (GR) και της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD), που λαμβάνουν μέρος στο αντιοξειδωτικό μηχανισμό. Στην έρευνα αυτή χρησιμοποιήθηκαν οι δραστηριότητες των αντιοξειδωτικών αυτών ενζύμων ως βιοσημαντές, ώστε να εκτιμηθεί η τοξικότητα των δύο αυτών ζιζανιοκτόνων, που έχουν διαφορετικό τρόπο δράσης, στον υδρόβιο βιοδείκτη *Lemna minor*.

Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας θα συζητηθούν στη συνέχεια και θα γίνει προσπάθεια να αναδειχθεί η πιθανή χρήση των αποκρίσεων των βιοσημαντών σε έρευνες βιοπαρακολούθησης υδάτων.

THE USE OF VARIOUS BIOMARKERS OF THE BIOINDICATOR *LEMNA MINOR* TO ESTIMATE THE TOXICITY OF TWO HERBICIDES WITH DIFFERENT MODE OF ACTION

Mouzaki-Paxinou A-Ch*, Foudoulakis M, Arapis G

Agricultural University of Athens, Department of Crop Science, Laboratory of Ecology and Environmental Sciences, 75IeraOdos St., 118 55, Athens

* joy_pax@yahoo.gr

Abstract

The beneficial use of pesticides in agriculture has raised social and scientific concern as regards their effects and potential risks for human health and the environment. Potential risk for organisms is identified on the basis of responses of individual organisms (bioindicators) and biomarkers observed in controlled laboratory experiments.

Tritosulfuron is a sulfonylurea herbicide, which is an amino acid synthesis inhibitor. Metribuzine, on the other hand, is a triazinone herbicide, a photosystem II inhibitor. Both of these herbicides, with a different mode of action, may end up in surface waters and present potential risk for aquatic vascular plants. Therefore their toxicity was evaluated on *Lemna minor*, a fast growing duckweed plant regularly used as a bioindicator in ecotoxicological dose-response studies with standard OECD protocols. Toxicity assessments were based on the inhibition of the growth of *Lemna minor* cultures after 7 days. Four different concentrations were chosen (EC_{100} , EC_{75} , EC_{50} and EC_{25}), based on the results of pre-tests and tests performed in order to estimate the toxicity of each herbicide. In addition, the responses of guaiacol peroxidase (G-POD), glutathione reductase (GR) and superoxide dismutase (SOD) involved in the antioxidative system were measured spectrophotometrically on day 1, day 3 and day 5 of the exposure. These antioxidative enzyme activities were used as biomarkers in the present study to evaluate the toxic effect of these two herbicides with a different mode of action, on the aquatic bioindicator *Lemna minor*.

The results of the present study will be discussed further on, with emphasis on the possible use of these responses as plant biomarkers for freshwater biomonitoring surveys.

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΡΕΔΟΥΚΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΔΕΥΔΡΟΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ ΟΞΕΩΣ ΣΕ
ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΜΕΝΟΥΣ ΕΝΣΠΕΡΜΟΥΣ ΚΑΙ ΠΑΡΘΕΝΟΚΑΡΠΙΚΟΥΣ ΚΑΡΠΟΥΣ
ΤΟΜΑΤΑΣ ΤΥΠΟΥ “CHERRY”**

Τσανικλίδης Γ*, Μπενοβίας Α, Αϊβαλάκης Γ

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εργαστήριο Φυσιολογίας και μορφολογίας φυτών, Ιερά οδός 75, 118 55, Αθήνα

* giorgos.tsaniklidis@gmail.com

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση της πρόκλησης παρθενοκαρπίας με εφαρμογή συνθετικών αυξινών, μιας διαδεδομένης καλλιεργητικής πρακτικής, σε ένα βασικό ένζυμο του μεταβολισμού του ασκορβικού οξέος (AsA), την δευδροασκορβική ρεδοκτάση (DHAR), σε αναπτυσσόμενους καρπούς τομάτας τύπου cherry. Για τον σκοπό αυτό μελετήθηκαν η δραστικότητα του ενζύμου, το πλήθος των μεταγραφημάτων των δύο χαρακτηρισμένων στο γονιδίωμα της τομάτας ισοτύπων της *DHAR* καθώς και η συγκέντρωση του υποστρώματος του ενζύμου, το δευδροασκορβικό οξύ (DHA), προϊόν του μεταβολισμού του AsA. Η δραστικότητα του ενζύμου βρέθηκε σημαντικά αυξημένη κατά τα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης των καρπών και πιθανά συνδέεται με την συγκέντρωση του DHA η οποία επίσης βρέθηκε αυξημένη στα ίδια στάδια. Τα αποτελέσματα αυτά συνδέονται και με το πλήθος των μεταγραφημάτων αθροιστικά βρέθηκε αυξημένο κατά τα πρώιμα στάδια ανάπτυξης των καρπών. Οι ένσπερμοι και παρθενοκαρπικοί καρποί φάνηκε να ακολουθούν το ίδιο πρότυπο αναφορικά με τη δραστικότητα και τη ρύθμιση του ενζύμου ενώ βρέθηκαν μόνο επιμέρους διαφορές μεταξύ των δύο μεταχειρίσεων σε ορισμένα στάδια ανάπτυξης των καρπών.

STUDY OF DEHYDROASCORBATE REDUCTASE IN DEVELOPING SEEDED AND PARTHENO-CARPIC FRUITS OF CHERRY TOMATOES

Tsaniklidis G*, Benovias A, Aivalakis G

Agricultural University of Athens, Laboratory of Plant Physiology and Morphology, Iera Odos 75, 118 55, Athens

* giorgos.tsaniklidis@gmail.com

Abstract

In this work we studied the effect of synthetic auxin induced parthenocary, a popular agricultural practice, in dehydroascorbate reductase (DHAR), a basic enzyme of L-ascorbate (AsA) metabolism, in developing fruits of cherry tomatoes. For this purpose we studied, the DHAR enzyme activity, the gene expression of the two characterized isoforms of *DHAR* in tomato, and the concentration of the substrate of the enzyme, dehydroascorbic acid (DHA), a product of AsA metabolism. The enzyme activity was found considerably higher during the early stages of fruit development and it is possibly connected to DHA concentration, which was also found higher at these stages. The combined gene expression of the two isoforms was also found higher in the earlier stages of the development of the fruits. Seeded and parthenocarpic fruits seemed to follow the same pattern concerning the activity and regulation of the enzyme and only minor differences were found between fruits of the two treatments in some of the studied stages of fruit development.

Ενότητα: Ενζυμική Τεχνολογία και Βιοαισθητήρες

Section: Enzyme Technology and Biosensors

ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ L-ΑΣΠΑΡΑΓΙΝΑΣΗ ΜΕ ΣΤΟΧΟ ΤΗΝ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ

Κοντούρη Κ*, Λάμπρου Ν

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας, Ιερά οδός 75, 118 55, Αθήνα

* anniekontouri@yahoo.gr

Περίληψη

Το ένζυμο L-ασπαραγινάση καταλύει την μετατροπή της L-ασπαραγίνης σε L-ασπαραγινικό οξύ και αμμωνία. Η ενδοφλέβια χορήγηση του ενζύμου, που έχει απομονωθεί από το βακτήριο *E. coli*, έχει αποδειχθεί πολύ αποτελεσματική στη χημειοθεραπεία κατά της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ανάπτυξη μιας ολοκληρωμένης μεθόδου έκφρασης και καθαρισμού του ανασυνδυσμένου ενζύμου σε κύτταρα *E. coli* και η δημιουργία τροποποιήσεων στο ένζυμο με μεθόδους πρωτεϊνικής μηχανικής, ώστε να προκύψουν νέες μορφές με τροποποιημένη εκλεκτικότητα ως προς το υπόστρωμα. Το ένζυμο κλωνοποιήθηκε σε *E. coli* και μελετήθηκε η έκφρασή του σε διαφορετικά στελέχη και διαφορετικά θρεπτικά μέσα με σκοπό τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών που εξασφαλίζουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης. Αναπτύχθηκε βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο καθαρισμού του ανασυνδυσμένου ενζύμου με εφαρμογή χρωματογραφία ιοντοαναταλλαγής σε στήλη CM-Sepharose. Νέες μορφές L-ασπαραγινάσης σχεδιάστηκαν με βάση δομικές πληροφορίες χρησιμοποιώντας μοριακή μοντελοποίηση. Δομική ανάλυση έδειξε ότι το κατάλοιπο Asn-24 συμβάλει στη διαμόρφωση της αρχιτεκτονικής του ενεργού κέντρου και επιλέχθηκε για περαιτέρω μελέτη. Βιβλιοθήκη μεταλλαγμένων μορφών πραγματοποιήθηκε με κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση κορεσμού στη θέση 24 με τη μέθοδο της επικαλυπτόμενης επιμήκυνσης χρησιμοποιώντας την τεχνική της PCR. Οι νέες μορφές που απομονώθηκαν χαρακτηρίστηκαν κινητικά και διαπιστώθηκε ότι η θέση 24 συμβάλει σημαντικά στον καθορισμό και διαμόρφωση της εκλεκτικότητας του ενζύμου ως προς τα υποστρώματα L-ασπαραγίνη και L-γλουταμίνη.

ALTERATION OF SUBSTRATE SPECIFICITY OF L-ASPARAGINASE BY PROTEIN ENGINEERING

Kontouri L*, Labrou N

Agricultural University of Athens, Department of Agricultural Biotechnology, Laboratory of Enzyme Technology, Iera Odos 75, 118 55, Athens

* anniekontouri@yahoo.gr

Abstract

L-asparaginase catalyzes the conversion of L-asparagine to L-aspartic acid and ammonia. The intravenous administration of the enzyme, isolated from the bacterium *E. coli*, has proved very effective in chemotherapy of acute lymphoblastic leukemia. The purpose of this study is to develop an integrated protocol for the expression and purification of the recombinant enzyme and to design and create mutant enzyme forms with altered substrate specificity. The expression of the enzyme was investigated in different *E. coli* strains and in different culture media to determine the optimal conditions for achieving higher expression levels. An optimized purification protocol was developed using a single chromatographic step on ion-exchange column CM-Sephrose. New mutant forms of the enzyme were designed using information from the crystal structure, employing molecular modeling. Structural analysis showed that Asn-24 contributes indirectly to active site architecture and was selected for further study. A library of mutant enzymes was constructed using PCR-based site-saturation mutagenesis at position 24. The library was screened using activity assays and new enzyme variants were isolated and characterized using kinetic analysis. The results showed that the position 24 contributes significant in determining the substrate specificity of the enzyme towards the substrates L-asparagine and L-glutamine.

**ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΙΣΟΕΝΖΥΜΩΝ ΤΗΣ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ ΑΠΟ
ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ: ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΝΕΡΟΥ**

Χρονοπούλου Ε*, Λάμπρου Ν

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας, Ιερά Οδός 75, 118 55, Αθήνα

* exronop@gmail.com

Περίληψη

Οι μεταφοράσες της γλουταθειόνης (GSTs, EC 2.5.1.18) εμπλέκονται στη Φάση II της κυτταρικής αποτοξίνωσης από ηλεκτρονιόφιλες υδρόφοβες τοξικές ενώσεις, όπως τα φυτοπροστατευτικά. Η δράση αυτή επιτυγχάνεται είτε καταλύοντας την χημική συμπύκνωσή των ενώσεων αυτών με τη γλουταθειόνη είτε μη-καταλυτικά, δεσμεύοντας τις ενώσεις αυτές με υψηλή συγγένεια με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της δράσης τους. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανάπτυξη απλής αναλυτικής μεθόδου προσδιορισμού υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε δείγματα νερού, βασιζόμενη στη χρήση GSTs. Από τα ισοένζυμα τα οποία μελετήθηκαν (hGSTA1-1, hGSTP1-1, hGSTT2-2 and hGSTO1-1) το ισοένζυμο hGSTA1-1 φαίνεται να αναστέλλεται περισσότερο παρουσιάζοντας τη μεγαλύτερη αναστολή της δραστηριότητας (>95%) με τα εντομοκτόνα dieldrin και spiromesifen. Ισχυρότερη αναστολή παρατηρήθηκε στους 37⁰C και σε pH 6,5, με τιμές IC₅₀ 17,9 ± 1,7 μM και 12,1 ± 3,4 μM για το dieldrin και spiromesifen, αντίστοιχα. Μοριακή μοντελοποίηση σε συνδυασμό με κινητική ανάλυση έδειξε ότι οι ενώσεις αυτές αλληλεπιδρούν με το ένζυμο στην περιοχή του ενεργού κέντρου και συμπεριφέρονται σαν αναστολείς μικτού-τύπου (K_i 2.3±0.1 και 0.1±0.01 μM, έναντι GSH και CDNB, αντίστοιχα). Οι πρότυπες καμπύλες (0–10 μM) οι οποίες σχεδιάστηκαν (σταθερή απόκλιση 4.1%) με γνωστές συγκεντρώσεις των δύο εντομοκτόνων, επιτρέπουν τον ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό τους σε δείγματα νερού με αποτελέσματα συγκρίσιμα της HPLC μεθόδου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ισοένζυμο hGSTA1-1 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη νέων απλών μεθόδων αναλυτικού προσδιορισμού φυτοπροστατευτικών με ικανοποιητική ακρίβεια, συνδυάζοντας χαμηλό κόστος και ελάχιστη προετοιμασία δείγματος. Η ανάπτυξη τέτοιων μεθόδων για τον εύκολο και άμεσο προσδιορισμό υπολειμματικότητας φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε περιβαλλοντικά και βιολογικά δείγματα κρίνονται απαραίτητες για την προστασία του περιβάλλοντος και της δημόσιας υγείας.

**INHIBITION OF GLUTATHIONE TRANSFERASES BY PESTICIDES:
DEVELOPMENT OF A SIMPLE ANALYTICAL ASSAY FOR THE
QUANTIFICATION OF PESTICIDES IN WATER**

Chronopoulou E*, Labrou N

Agricultural University of Athens, Department of Agricultural Biotechnology, Laboratory of Enzyme Technology, Iera Odos 75, 118 55, Athens

* exronop@gmail.com

Abstract

Glutathione transferases (GSTs; EC 2.5.1.18) form a group of multifunctional enzymes that are involved in phase II cellular detoxification mechanism. Here, screening of the inhibition potency of a wide range of pesticides toward selected human GST isoenzymes (hGSTA1-1, hGSTP1-1, hGSTT2-2 and hGSTO1-1) was carried out. The purpose of this project was to develop simple assays for the determination of pesticides in water samples, based on GSTs. The insecticides dieldrin and spiromesifen were identified as potent reversible inhibitors toward hGSTA1-1 with IC₅₀ values equal to $17.9 \pm 1.7 \mu\text{M}$ and $12.1 \pm 3.4 \mu\text{M}$, respectively. Based on *in silico* docking analysis and kinetic inhibition studies it was concluded that dieldrin and spiromesifen bind specifically to the enzyme presumably at a distinct position that partially overlaps with both the G- and H-site. The ability of dieldrin and spiromesifen to inhibit hGSTA1-1 activity was exploited for the development of analytical quantification assays for these two pesticides. Linear calibration curves were obtained for dieldrin and spiromesifen, with useful concentration in the range of 0–10 μM . The reproducibility of the assay response, expressed by relative standard deviation, was in the order of 4.1% (N = 28). The method was successfully applied to the determination of these pesticides in real water samples without sample preparation steps. The enzyme-based assays have potential advantages over bioassays and other analytical methods based on HPLC and GC/MS in terms of lower cost and technical complexity. Moreover, they provide reasonable sensitivity for certain applications, such as the direct determination of pesticide residues in water samples.

**ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ IN VITRO ΑΜΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΤΕΤΡΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΚΑΙ
ΝΕΟΝΙΚΟΤΙΝΟΕΙΔΩΝ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΩΝ
ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ ΠΟΝΤΙΚΟΥ (N2A)**

Μαυρίκου Σ*, Φλαμπούρη Ε, Κίντζιος Σ

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών, Ιερά Οδός 75, 118 55, Αθήνα

* sophie_mav@aua.gr

Περίληψη

Ο στόχος της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη των επιδράσεων οχτώ εντομοκτόνων διαφορετικής χημικής δομής, τριών αμιδίων του τετρονικού οξέος (spiromesifen, spirotetramat) και πέντε νεονικοτινοειδών (imidacloprid, clothianidin, thiacloprid, acetamiprid, thiamethoxam) σε διαφοροποιημένα και μη διαφοροποιημένα κύτταρα νευροβλαστώματος N2a. Τα κύτταρα κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας εκτέθηκαν σε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις του κάθε εντομοκτόνου (3, 10, 30 και 100μΜ) για 24 και 48 ώρες σε συνθήκες που ευνοούσαν και που δεν ευνοούσαν τη διαφοροποίησή τους. Κατόπιν, για την εκτίμηση της κυτταροτοξικότητας/βιωσιμότητας των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν οι βιοχημικές δοκιμές MTT και NRU. Παράλληλα μελετήθηκε μικροσκοπικά η παρεμπόδιση της προέκτασης των νευρικών αξόνων με χρώση των κυττάρων με Coomassie Brilliant Blue. Επιπλέον πραγματοποιήθηκαν βιοχημικές μελέτες για την επίδραση των εντομοκτόνων στους ενζυμικούς και βιολογικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς των κυττάρων. Συγκεκριμένα μετρήθηκαν η δραστηριότητα της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD) με τη μέθοδο του νιτρο-μπλε τετραζολίου (NBT), υπεροξείδωση των λιπιδίων με τη μέθοδο του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBA) καθώς και η μεταβολή της συγκέντρωσης του ανηγμένου και του οξειδωμένου γλουταθείου με τη μέθοδο Ellman. Με την ίδια μέθοδο πραγματοποιήθηκε και προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση (AChE). Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των ολικών πρωτεϊνών των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Bradford. Τέλος αναπτύσσεται μέθοδος βολταμετρικού προσδιορισμού των πέντε νεονικοτινοειδών εντομοκτόνων σε ποτενσιοστάτη σε εκτωπόμενα ηλεκτρόδια άνθρακα με/και χωρίς τη χρήση κυττάρων N2a.

IN VITRO EFFECTS OF TETRONIC ACID AMIDES AND NEONICOTINOIDS ON MOUSE NEUROBLASTOMA CELL LINE (N2A)

Mavrikou S*, Flampouri E, Kintzios S

Agricultural University of Athens, Department of Agricultural Biotechnology, Laboratory of Plant Physiology, Iera Odos 75, 118 55, Athens

* sophie_mav@aua.gr

Abstract

The aim of this work was to study the effects of eight insecticides with different chemical structures, three tetronic acid amides (spiromesifen, spirodiclofen, spirotetramat) and five neonicotinoids (imidacloprid, clothianidin, thiacloprid, acetamiprid, thiamethoxam) on differentiating and non-differentiating mouse N2a neuroblastoma cells. The cells were exposed to four different concentrations of each insecticide (3, 10, 30 and 100 μ M) for 24 and 48 hours under differentiating and non-differentiating conditions. Cytotoxicity and cell viability were estimated by the MTT and neutral red uptake (NRU) assays. In addition, the axon outgrowth impairment was measured microscopically after a coomassie brilliant blue staining. Furthermore, the effects of the insecticides on the enzymatic and biological antioxidative cell mechanisms were studied. More specifically, Superoxide dismutase (SOD) activity was measured by the nitro-blue tetrazolium (NBT) method, lipid peroxidation was measured by the thiobarbituric acid assay (TBA) and the change at the levels of GSH and GSSG concentrations were measured by the Ellman method. The same assay was used for the determination of Acetylcholinesterase (AChE) activity. The total protein concentration was determined by the Bradford method. Finally, a potentiometric method with carbon screen printed electrodes for the determination of the 5 neonicotinoids is being developed.

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΣΤΟΥΣ
ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥΣ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ
ΣΟΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΦΑΙΝΟΜΕΝΩΝ
ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΔΙΑΙΡΕΣΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ**

Μοσχοπούλου Γ*, Κίντζιος Σ

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Τομέας Βιολογίας Φυτών,
Εργαστήριο Μορφολογίας και Φυσιολογίας Φυτών, Ιερά Οδός 75, 118 55, Αθήνα

* geo_mos@aia.gr

Περίληψη

Σκοπός της εργασίας ήταν η βελτίωση κυτταρικού βιοαισθητήρα BERA 6^{ns} γενιάς για την ανίχνευση σουπεροξειδίου (O₂⁻) σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις (<0.1 nM) από εκείνες που ανίχνευε ο βιοαισθητήρας που αναπτύχθηκε σε προηγούμενη μελέτη (Moschoroulou and Kintzios 2006). Επίσης πέρα από την βελτίωση θελήσαμε να διερευνήσουμε τον μηχανισμό μοριακής αναγνώρισης με τη χρήση των μεμβρανικών τροποποιημένων κυττάρων. Σε προηγούμενες μελέτες φάνηκε η εμπλοκή του ασβεστίου κατά την αλληλεπίδραση μορίου στόχου και ηλεκτροεισαγώμενου μορίου στις κυτταρικές μεμβράνες των κυττάρων, το αποτέλεσμα της οποίας ανίχνευε ο αισθητήρας. Έτσι έγινε μια διερεύνηση παρεμποδίζοντας τις SERCA αντλίες ασβεστίου του ενδοπλασματικού δικτύου και μελετώντας τη μεταβολή του ασβεστίου πριν και μετά την αλληλεπίδραση με το O₂⁻, έτσι ώστε να εντοπιστεί αν υπάρχει εμπλοκή του ενδοπλασματικού δικτύου στην μετακίνηση ασβεστίου, καθώς και επίσης να επιβεβαιωθεί ο ρόλος του συγκεκριμένου κατιόντος στο μηχανισμό μοριακής αναγνώρισης μέσω μεταβολής του μεμβρανικού δυναμικού. Εν συνεχεία, ο βελτιωμένος βιοαισθητήρας BERA 6^{ns} γενιάς, που αναπτύχθηκε, χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη του O₂⁻ κατά την διάρκεια της κυτταροδιαίρεσης του υδρόβιου φυτού *Spirodela polyrrhiza* σε συνδυασμό με διάφορες βιοχημικές αναλύσεις, προκειμένου να ερευνηθεί η πιθανή σχέση μεταξύ των επιπέδων των ελευθέρων ριζών και της κυτταρικής διαίρεσης. Τέλος, ο βελτιωμένος βιοαισθητήρας BERA 6^{ns} γενιάς εφαρμόστηκε σε πιο πολύπλοκα συστήματα, για την ανίχνευση του O₂⁻ κατά την διάρκεια της *in vitro* διαφοροποίησης κυττάρων νευροβλαστώματος της κυτταρικής σειράς N2a και παράλληλα αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας μια φθορισμομετρική μέθοδο για την ανίχνευση O₂⁻ και ελευθέρων ριζών γενικότερα. Παράλληλα έγινε και η πρώτη δοκιμή για εφαρμογή του στην κλινική ιατρική με ελπιδοφόρα αποτελέσματα.

DEVELOPMENT OF MEMBRANE-ENGINEERING TECHNOLOGY IN CELL-BASED BIOSENSORS FOR THE DETECTION OF SUPEROXIDE AND ITS APPLICATION ON STUDIES OF CELL DIVISION AND DIFFERENTIATION

Moschopoulou G*, Kintzios S

Agricultural University of Athens, Department of Agricultural Biotechnology, Division of Plant Biology, Laboratory of Plant Physiology, 75 Iera Odos Street, 118 55, Athens

* geo_mos@aua.gr

Abstract

The present study was aimed at improving the cell-based biosensor 6th generation BERA for the detection of superoxide at lower concentrations (<0.1 nM) than the biosensor which was reported in our previous study (Moschopoulou and Kintzios 2006). Also, we investigated the mechanism behind membrane-engineering. In previous studies it was shown that superoxide dismutation triggers changes to the membrane potential of membrane-engineered fibroblast cells and that these changes were associated with changes in $[Ca^{2+}]_{cyt}$. So we inhibited selectively the sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) and we studied the changes of calcium before and after the addition of superoxide in order to find if $[Ca^{2+}]_{ret}$ is involved. Furthermore, the biosensor was applied for monitoring the cell division of *Spirodela polyrrhiza* in order to investigate the level of superoxide and its role in comparison with other biochemical measurements. Additionally, the ultra-sensitive biosensor was applied in more complicated systems like monitoring the *in vitro* neuronal cell differentiation and was tested in clinical research with promising perspectives.

Moschopoulou G., Kintzios S. (2006) Application of "membrane-engineering" to bioelectric recognition cell sensors for the detection of picomole concentrations of superoxide radical: a novel biosensor principle. Anal. Chimica Acta 573-574: 90-96.

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΚΑΙΝΟΤΟΜΟΥ ΠΛΑΤΦΟΡΜΑΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ ΚΑΙ ΠΟΤΑ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ

Μπλούγος ΠΣ^{1*}, Κίντζιος Σ¹, Γιαλούρης Κ²

¹ Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών, Ιερά Οδός 75, 118 55, Αθήνα

² Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Γενικό Τμήμα, Εργαστήριο Πληροφορικής, Ιερά Οδός 75, 118 55, Αθήνα

* psb@addinad.com

Περίληψη

Αντικείμενο αυτής της έρευνας είναι η ανάπτυξη μίας καινοτόμου αυτοματοποιημένης πλατφόρμας για την ανίχνευση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε τρόφιμα και ποτά. Το αυτόνομο αυτοματοποιημένο σύστημα βασίζεται στην τεχνολογία της Μεθόδου Βιοηλεκτρικής Αναγνώρισης (Bioelectric Recognition Assay - BERA), σε συνδυασμό με τη χρήση τεχνητών νευρωνικών δικτύων(ANN). Επιπλέον, μια ειδικά σχεδιασμένη ηλεκτρονική συσκευή αναπτύχθηκε και χρησιμοποιήθηκε με σκοπό την λήψη και επεξεργασία των σημάτων κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

Ο Βιοαισθητήρας Γενικής Τοξικότητας (General Toxicity Sensor - GTS) έχει ως στόχο την ανίχνευση οργανοφωσφορικών, καρβαμιδικών και πυρεθροειδών φυτοφαρμάκων. Ο Βιοαισθητήρας βαθμονομήθηκε για την ανίχνευση των τριών ομάδων φυτοφαρμάκων με τη χρήση τεσσάρων διαφορετικών κυτταρικών σειρών (N2a, SK-N-SH, Vero, HAK). Για κάθε ομάδα φυτοφαρμάκων που ελέγχθηκε, αναγνωρίστηκε η καλύτερα ανταποκρινόμενη και πιο εκλεκτική κυτταρική σειρά. Ο Βιοαισθητήρας ρυθμίστηκε με δοκιμές σε έξι διαφορετικές συγκεντρώσεις φυτοφαρμάκων – αραιώσεις του Μέγιστου Επιπέδου Υπολειμμάτων(MRL) για κάθε ομάδα (μάρτυρας, MRL/20, MRL/10, MRL/2, MRL and 2xMRL).

Περισσότερα από 1500 δείγματα δοκιμάστηκαν για κάθε ομάδα φυτοφαρμάκων και τα αποτελέσματα χρησιμοποιήθηκαν για την εκπαίδευση του Τεχνητού Νευρωνικού Δικτύου (Artificial Neural Network - ANN), με άλλα λόγια του υπολογιστικού συστήματος ταξινόμησης που είναι ικανό να αλληλεπιδρά με τον βιοαισθητήρα ως λογισμικό ταξινόμησης φυτοφαρμάκων και μπορεί να εκπαιδεύεται κατά τη χρήση και συνεπώς να βελτιώνει την ακρίβεια ταξινόμησης. Μέσα από τη συνεχή αξιολόγηση, ο Βιοαισθητήρας Γενικής Τοξικότητας απέδωσε εξαιρετικά, έχοντας ικανότητα διάγνωσης (επιτυχία ταξινόμησης φυτοφαρμάκων) της τάξης του 85-87%, ανάλογα με την ομάδα φυτοφαρμάκων που εξετάστηκε.

NOVEL AND AUTOMATED BIOSENSOR PLATFORM FOR PESTICIDE RESIDUE DETECTION

Blouchos PS^{1*}, Kintzios S¹, Yialouris C²

¹ Agricultural University of Athens, Faculty of Agricultural Biotechnology, Laboratory of Plant Physiology, Iera Odos 75, 118 55, Athens

² Agricultural University of Athens, Faculty of Science, Laboratory of Informatics, Iera Odos 75, 118 55, Athens

* psb@addinad.com

Abstract

The objective of this research is the development of a novel and automated, biosensor platform for pesticide residue detection. The autonomous automated system is primarily based on the **Bioelectric Recognition Assay (BERA)** technology, combined with artificial intelligence. Furthermore a specially designed electronic interface is realized in order to acquire and manipulate the corresponding signals from the real time analysis.

The **General Toxicity Sensor (GTS)** aimed at the detection of organophosphate, carbamate & pyrethroid pesticides. General Toxicity Sensor was calibrated against these three different pesticide groups using four different cell lines (N2a, SK-N-SH, Vero, HAK). For each pesticide group tested, we identified the optimally and more selectively responding cell line. The GTS was calibrated against a range of six different concentrations – dilutions of the Minimum Residue Level for each group (control, MRL/20, MRL/10, MRL/2, MRL and 2xMRL).

More than 1500 samples were tested from each pesticide group and the results were used for training an **Artificial Neural Network (ANN)**, in other words the computational classifier system able to interact with the biosensors as a pesticide classification software, able to learn during use and therefore to improve its classification accuracy. Upon consequent validation, the GTS system performed exceptionally well, with a diagnostic ability (correct pesticide classification rate) of 85-87%, depending on the target pesticide group.

ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ KRESOXIM-METHYL: Q₀ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΤΗ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ III ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ ΣΕ ΣΕΙΡΕΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ

Φλαμπούρη Ε*, Μαυρίκου Σ, Κιντζιος Σ

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Τομέας Βιολογίας Φυτών, Εργαστήριο Μορφολογίας και Φυσιολογίας Φυτών, Ιερά Οδός 75, 118 55, Αθήνα

* flampouri_kel@aua.gr

Περίληψη

Η παρούσα έρευνα είχε ως στόχο την μελέτη των βιοχημικών φαινομένων και μηχανισμών που ενέχονται στην τοξική δράση ουσιών που ανήκουν στην κατηγορία των Q₀ παρεμποδιστών του συμπλόκου III της αναπνευστικής αλυσίδας. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα συστήματα μελέτης σταθερές σειρές κυττάρων θηλαστικών σε κυτταροκαλλιέργειες. Στα πλαίσια αυτά, εξετάστηκε η επίδραση του kresoxim-methyl, ενός μυκητοκτόνου που ανήκει στην κατηγορία των στρομπιλουρίνων και χρησιμοποιείται ευρέως στη γεωργία ως φυτοπροστατευτικό προϊόν, σε κύτταρα νευροβλαστώματος ποντικού (N2a). Αρχικά προσδιορίστηκε η κυτταροτοξικότητα του παρεμποδιστή μέσω των δεικτών κυτταρικής βιωσιμότητας Neutral Red και MTT και κατόπιν επιλέχθηκαν δύο συγκεντρώσεις του μυκητοκτόνου που δεν επηρεάζουν τη βιωσιμότητα των κυττάρων (non-lethal doses) ώστε να χρησιμοποιηθούν κατά τον κύριο πειραματισμό. Στη συνέχεια εξετάστηκαν μια σειρά ενζυμικών και μη-ενζυμικών μηχανισμών που εμπλέκονται στην αντιοξειδωτική άμυνα για να αξιολογηθεί η οξειδωτική κατάσταση των κυττάρων. Η έκθεση των κυττάρων στον παρεμποδιστή προκάλεσε σημαντική μείωση της βιωσιμότητας μετά από 1h και 24h επώαση και είναι πιθανώς αποτέλεσμα της δράσης του μυκητοκτόνου στην αναστολή της ροής ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα. Τα LC₅₀ N2a ήταν 50μg mL⁻¹, ενώ για τα πειράματα του οξειδωτικού στρες χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις 0,1μg mL⁻¹ και 0,2μg mL⁻¹ για τις 24h και 50μg mL⁻¹ για την 1h.

BIOCHEMICAL EFFECTS OF COMPLEX III Q_o SITE RESPIRATORY CHAIN INHIBITOR KRESOXIM-METHYL ON MAMMALIAN CELL LINES

Flampouri E*, Mavrikou S, Kintzios S

Agricultural University of Athens, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Plant Biology,
Laboratory of Plant Physiology, 75 Iera Odos Street, 118 55, Athens

* flampouri_kel@aua.gr

Abstract

The present study was aimed at investigating the biochemical mechanisms involved in the toxic action of complex III Q_o site inhibitors. For this purpose mammalian cell lines were used as experimental model systems. In this framework, the action of kresoxim-methyl, a widely used agricultural fungicide of the stobilurins group, was examined on murine neuroblastoma cells (N2a). The cytotoxicity of the inhibitor was investigated by measuring the Neutral Red uptake and MTT assays and non-lethal doses of the fungicide were chosen for further studies. Additionally, for evaluating the cellular oxidative status of the exposed cell lines, a series of enzymatic and non-enzymatic antioxidant mechanisms were assayed. After 1h and 24h treatment, the inhibitor produced a significant reduction in cell viability, possibly induced by the mode of action of the fungicide which disrupts electron transport in the respiratory chain. The LC₅₀ value of the fungicide was 50µg mL⁻¹, while the concentrations used for the oxidative stress assessment were 0,1µg mL⁻¹ and 0,2µg mL⁻¹ for 24h and 50µg mL⁻¹ for 1h treatments.

Ενότητα: Φυσιολογία Φυτών

Section: Plant Physiology

Η ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΣΙΔΗΡΟΥ ΣΕ ΦΥΤΑ ΑΡΑΒΟΣΙΤΟΥ ΠΟΥ ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΝΤΑΙ ΥΠΟ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΕΛΛΕΙΨΗΣ ΘΕΙΟΥ

Μανιού Φ*, Χωριανοπούλου Σ, Μπουράνης Δ

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Τομέας Βιολογίας Φυτών,
Εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών, Ιερά Οδός 75, 118 55 Αθήνα

* filippa.maniou@yahoo.gr

Περίληψη

Η διδακτορική διατριβή επιχειρεί να διερευνήσει τη στρατηγική του φυτού υπό συνθήκες έλλειψης θείου για την πρόσληψη, την κατανομή, κινητοποίηση και αναδιανομή του σιδήρου μέσα στο φυτό, τις μορφολογικές και ανατομικές αλλαγές που παρατηρούνται σε όλα τα φυτικά όργανα, καθώς και επιλεγμένες σχετικές φυσιολογικές και μοριακές λειτουργίες ρύθμισης. Για τον σκοπό αυτό, φυτά αραβοσίτου 7 ημερών αναπτύχθηκαν σε υδροπονική καλλιέργεια για 19 ημέρες υπό συνθήκες έλλειψης θεικών έναντι φυτών σε πλήρες θρεπτικό διάλυμα.

Ξεκινώντας με τις μορφομετρικές αλλαγές, μέχρι στιγμής μελετήθηκαν τα επόμενα: το συνολικό ύψος του υπέργειου τμήματος, το μήκος και η επιφάνεια του ελάσματος και κολεού του κάθε φύλλου, το μήκος κάθε τύπου ρίζας και επιλεγμένων τμημάτων σε κάθε τύπο ρίζας, το μήκος και ο αριθμός των πλαγίων ριζών, το μήκος του μεσοκοτυλίου και οι διαστάσεις του κόμβου. Ακολούθως, προσδιορίστηκαν η διαπνοή του φυτού, το νωπό και ξηρό βάρος κάθε φυτικού οργάνου, το περιεχόμενο τους σε νερό και οι αντίστοιχες περιεκτικότητες της ξηρής μάζας σε ολικό σίδηρο, ολικό θείο και θειικά των φυτών που αναπτύχθηκαν συγκριτικά στα δύο θρεπτικά υποστρώματα. Στη συνέχεια απεικονίστηκε η παρουσία σιδήρου στην επιφάνεια ολόκληρου του ριζικού συστήματος των φυτών που αναπτύσσονται στα δύο διαφορετικά θρεπτικά διαλύματα με την εφαρμογή Prussian blue.

Τα μέχρι στιγμής αποτελέσματα δείχνουν ότι την 10^η ημέρα της έλλειψης θεικών τα περισσότερα φυτικά όργανα παρά τις μειώσεις υποστηρίζονται επαρκώς από τα επίπεδα θείου και σιδήρου που περιέχουν. Από τις σχετικές κατανομές θρεπτικών επιβεβαιώνεται η γνωστή από τη βιβλιογραφία πολύ στενή σχέση του σιδήρου το θείο. Η αντίστοιχη θρεπτική κατάσταση σε θείο την 19^η ημέρα της έλλειψης μειώθηκε έντονα. Ως αποτέλεσμα, τα φυτά -S: α) παρουσιάζουν σημαντικές μορφολογικές διαφορές έναντι των φυτών μαρτύρων, β) η παρουσία σιδήρου στην επιφάνεια του ριζικού συστήματος είναι εντονότερη και γ) τα επίπεδα σιδήρου στα διάφορα φυτικά όργανα του φυτού μειώνονται σημαντικά.

WHOLE PLANT IRON HOMEOSTASIS IN MAIZE GROWING UNDER CONDITIONS OF SULFATE DEPRIVATION

Maniou F*, Chorianopoulou SN, Bouranis DL

Agricultural University of Athens, Department of Agricultural Biotechnology, Plant Biology Division,
Laboratory of Plant Physiology, Iera Odos 75, 118 55 Athens, Greece.

* filippa.maniou@yahoo.gr

Abstract

This PhD dissertation aims at studying various aspects of the strategy which is put forward in maize under sulfate deprivation for the uptake, distribution, mobilization and redistribution of iron within the plant. Corresponding morphological and anatomical changes that are addressed in all organs, along with selected physiological and molecular control processes are considered. To this end, seven-day-old maize plants were grown in a hydroponics setup for nineteen days under S deprivation against plants grown under full nutrition.

Beginning with the morphometric changes, the following parameters have been studied: total shoot height, the length and surface of each leaf 's blade and sheath, the length of each root type and its sectors, length and number of lateral roots, mesocotyl length and crown size. Subsequently, the transpiration rate, the fresh and dry mass of each organ, their water content and the corresponding total iron, sulfur and sulfate contents were determined per organ on dry mass basis in plants grown comparatively in the two nutrient regimes. Then, the presence of iron precipitates on each root's surface within the entire root system of plants grown in each treatment was visualized by applying Prussian blue dye.

So far, the available data indicate that during the 10th day of S-deprivation most of the plant organs were fully supported in their S and Fe nutrition, despite the decreases of their levels. The known from the literature intimate relationship between iron and sulfur was confirmed by the obtained nutrient distributions among organs. The 19th day's corresponding S nutritional status under the S-deprivation was strongly diminished. As a result, during this day the -S plants: a) presented significant morphological differences compared to control ones, b) the presence of iron on the surface of the root system was stronger and c) the iron levels in the various plant organs were found to be significantly reduced.

ΒΙΟΕΝΙΧΥΣΗ ΤΟΥ ΣΙΔΗΡΟΥ ΣΕ ΚΑΡΠΟΥΣ ΤΟΜΑΤΑΣ**Χουλιάρας Γ¹, Διαμαντόπουλος Π¹, Αϊβαλάκης Γ², Κατινάκης Π^{1*}**

¹ Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Τομέας Βιοχημείας, Ενζυμικής Τεχνολογίας, Μικροβιολογίας και Μοριακής Βιολογίας, Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας, Ιερά Οδός 75, 118 55 Αθήνα

² Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Τομέας Βιολογίας Φυτών, Ιερά Οδός 75, 118 55 Αθήνα

* katp@aua.gr

Περίληψη

Η αναιμία που προέρχεται από την έλλειψη σιδήρου αφορά το 30 % του παγκόσμιου πληθυσμού, καθιστώντας το στοιχείο του σιδήρου ένα εκ των σημαντικότερων θρεπτικών στοιχείων της ανθρώπινης διατροφής. Τα φρούτα και τα λαχανικά, εν γένει, συμβάλλουν στην απορρόφηση του σιδήρου και για αυτό θα μπορούσαν με βιοτεχνολογικές μεθόδους να παραχθούν προϊόντα «σίδηρο-ενισχυμένα». Η τομάτα, ως φυτό μοντέλο, μπορεί να αποτελέσει αντικείμενο βιοενίσχυσης του σιδήρου. Σε αυτή την εργασία επιχειρήθηκε η μελέτη της έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν τη φερριτίνη με *Real Time* σε διάφορα στάδια ανάπτυξης του καρπού της τομάτας. Αποκτήθηκε ο κλώνος cLEG 63D15 και με *in silico* ανάλυση μελετήθηκε ισότυπος που κωδικοποιεί το γονίδιο της φερριτίνης. Τα σχετικά επίπεδα των μεταγραφημάτων ήταν υψηλότερα στο ώριμο πράσινο στάδιο του καρπού και πολύ χαμηλότερα στο στάδιο αλλαγής χρώματος και του ώριμου κόκκινου. Στη συνέχεια εντοπίστηκε ο σίδηρος στους ιστούς του καρπού δύο υβριδίων, μικρόκαρπης τομάτας (*conchita* F1 και *cerelino* F1) στα τρία στάδια ανάπτυξης του καρπού. Υψηλή συγκέντρωση εντοπίστηκε στις κοτυληδόνες του εμβρύου. Παρόλο που τόσο τα μεταγραφήματα του γονιδίου όσο και η παρουσία του σιδήρου ήταν υψηλότερη στο στάδιο του ώριμου πράσινου καρπού, θα μπορούσε μέσω της υπερέκφρασης του γονιδίου να καταστεί ο ώριμος καρπός περισσότερο αποτελεσματικός στην κάλυψη μεγαλύτερου μέρους των αναγκών του σιδήρου στη διατροφή του ανθρώπου.

IRON BIOFORTIFICATION OF TOMATO FRUITS

Chouliaras I¹, Diamantopoulos P¹, Aivalakis G², Katinakis P¹*

¹ Agricultural University of Athens, Faculty of Agricultural Biotechnology, Laboratory of Molecular Biology, 75, Iera Odos, 118 55, Athens

² Agricultural University of Athens, Faculty of Agricultural Biotechnology, Laboratory of Plant Physiology, 75, Iera Odos, 118 55, Athens

* katp@aua.gr

Abstract

The iron deficiency anemia has been estimated to affect about 30 % of world population, making the trace element iron by far the most prevalent nutritional essential. Fruits and vegetables enhance the iron absorption and thus could be an ideal choice to develop iron-fortified fruits. Tomato, as a model plant, could be developed as functional food to overcome the iron deficiency. In this study, an effort was carried out to identify genes coding for ferritin. The clone cLEG 63D15 was obtained and the expression of an isozyme was studied with RT-PCR. The Relative expression of ferritin isotypes revealed that the transcript levels were higher at mature green stage of fruit and the lowest at red ripe. Moreover, iron was localized in fruit tissues of two cherry tomatoes hybrids *conchita F1* and *cerelino F1* at three different stages of development. In conclusion, it could be said that both iron and transcripts of ferritin genes are more abundant at mature green stage. As a future aspect of iron biofortification, tomato plant could be a candidate plant for transformation in order to overexpress ferritin so as to meet the human dietary needs.

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΣΧΕΣΗΣ ΜΕΤΑΞΥ ΑΝΘΟΚΥΑΝΙΝΩΝ ΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ ΑΕΡΙΩΝ: ΜΙΑ ΠΡΩΤΗ ΠΙΘΑΝΗ ΕΞΗΓΗΣΗ ΓΙΑ ΤΟΝ ΦΩΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΟ ΡΟΛΟ ΤΩΝ ΑΝΘΟΚΥΑΝΙΝΩΝ

Παιδής Γ, Χανιά Ε, Κυριακίδου Χ, Νικολόπουλος Δ, Λιακόπουλος Γ*

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Τομέας Βιολογίας Φυτών,
Εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών, Ιερά Οδός 75, 118 55 Αθήνα

* gliak@aua.gr

Περίληψη

Η παρουσία φύλλων με υψηλές συγκεντρώσεις ανθοκυανινών εμφανίζεται ως μόνιμο οικοφυσιολογικό χαρακτηριστικό σε έναν αριθμό φυτικών ειδών, ποικιλιών ή μορφοτύπων. Δεδομένων των οπτικών τους ιδιοτήτων, η παρουσία τους έχει σχετιστεί με την αύξηση του φωτοπροστατευτικού δυναμικού των φύλλων. Ωστόσο, έως σήμερα, ο ρόλος αυτός των ανθοκυανινών δεν έχει αποδειχθεί καθώς αφενός τα πειραματικά δεδομένα τα οποία προέρχονται από έναν αριθμό διαφορετικών φυτικών ειδών είναι αντικρουόμενα και αφετέρου έχουν διατυπωθεί διάφορες υποθέσεις για τον πιθανό ή τους πιθανούς μηχανισμούς μέσω των οποίων οι ανθοκυανίνες μπορεί να ασκούν τον φωτοπροστατευτικό τους ρόλο.

Λεπτομερής ανάλυση προηγούμενων πειραμάτων αποκάλυψε ότι, στη συντριπτική πλειονότητα των περιπτώσεων, τα ανθοκυανιούχα φύλλα εμφανίζουν υψηλότερο διαπνευστικό ρυθμό συγκριτικά με τα πράσινα φύλλα. Η σημασία της διαφοράς αυτής είχε υποβαθμιστεί έως σήμερα ίσως επειδή δεν συνάδει με την αρχική υπόθεση εργασίας υπό την οποία έχουν σχεδιαστεί τα παραπάνω πειράματα. Ωστόσο, είναι προφανές πως εάν αποδειχθεί η παραπάνω επίδραση των ανθοκυανινών, δίνεται ικανοποιητική εξήγηση στο μηχανισμό φωτοπροστασίας του ανθοκυανιούχου φίλτρου.

Πράγματι, σύγκριση ανθοκυανιούχων και πράσινων φύλλων του είδους *Berberis thunbergii* έδειξε ότι η στοματική αγωγιμότητα των πρώτων είναι κατά μέσο όρο 68% υψηλότερη αυτής των δεύτερων. Επίσης, τα ανθοκυανιούχα φύλλα έδωσαν κατά 18% υψηλότερες τιμές της λειτουργικής φωτονιακής απόδοσης της φωτοχημείας του φωτοσυστήματος II γεγονός το οποίο είχε ως αποτέλεσμα τον διπλασιασμό της φαινόμενης φωτοχημικής ροής ηλεκτρονίων (ETR). Καθώς και για τις δύο κατηγορίες φύλλων διαπιστώθηκε ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ στοματικής αγωγιμότητας και ETR και δεδομένου ότι το ETR σχετίζεται με τη σειρά του με την φωτοσυνθετική ταχύτητα, συμπεραίνεται πως η αυξημένη στοματική αγωγιμότητα είναι αρκετή για να δικαιολογήσει την υψηλότερη φωτοσυνθετική απόδοση των ανθοκυανιούχων φύλλων συγκριτικά με τα πράσινα.

Συμπερασματικά, η αυξημένη ανταλλαγή αερίων φαίνεται πως εξασφαλίζει ικανοποιητική τροφοδοσία του χλωροπλαστικού στρώματος με CO₂ μειώνοντας με τον πλέον άμεσο τρόπο την πιθανότητα φωτοπαρεμπόδισης της φωτοσυνθετικής συσκευής. Περαιτέρω έρευνες θα πρέπει να εστιαστούν στη διευκρίνιση του μηχανισμού μέσω του οποίου τα ανθοκυανιούχα φύλλα παρουσιάζουν υψηλότερους ρυθμούς ανταλλαγής αερίων.

INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN FOLIAR ANTHOCYANINS AND GAS EXCHANGE: A FIRST POSSIBLE EXPLANATION FOR THE PHOTOPROTECTIVE ROLE OF ANTHOCYANINS

Paidis G, Chania I, Kyriakidou Ch, Nikolopoulos D, Liakopoulos G*

Agricultural University of Athens, Department of Agricultural Biotechnology, Plant Biology Division, Laboratory of Plant Physiology, Iera Odos 75, 118 55 Athens, Greece

* gliak@aua.gr

Abstract

The presence of leaves with high concentrations of anthocyanins appears as a permanent ecophysiological feature in a number of plant species, varieties or morphs. Given their optical properties, their presence has been associated with increasing photoprotective capacity of these leaves. However, to date, the role of anthocyanins has not been proven as both the experimental data derived from a number of different plant species is conflicting and also several hypotheses have been formulated concerning the potential mechanisms by which anthocyanins may exert their photoprotective role.

Detailed analysis of previous experiments revealed that, in the vast majority of cases, anthocyanic leaves show higher transpiration rates compared to green leaves. The significance of this finding has been underestimated perhaps because it is not consistent with the original hypotheses under which the above experiments had been designed. However, it is obvious that if the above effect of anthocyanins is proven, a satisfactory explanation is given concerning the mechanism of photoprotection of the anthocyanic filter.

Indeed, comparison between anthocyanic and green leaves of *Berberis thunbergii* showed that stomatal conductance of the former is on average 68% higher than that of the latter. Also, the anthocyanic leaves showed by 18% higher effective quantum yield of photosystem II photochemistry which resulted in doubling of the apparent photochemical electron transport rate (ETR). As for both leaf types a strong positive correlation between stomatal conductance and ETR was found and since the ETR in turn is associated with the photosynthetic rate, it is concluded that increased stomatal conductance could be enough to justify the higher photosynthetic efficiency of anthocyanic leaves compared to their green counterparts.

In conclusion, the increased gas exchange rates seem to ensure adequate supply of the chloroplast layer with CO₂ thus decreasing in the most direct manner the risk of photoinhibition of the photosynthetic apparatus. Further research should focus on the elucidation of the mechanism by which anthocyanic leaves exhibit higher gas exchange rates.

