



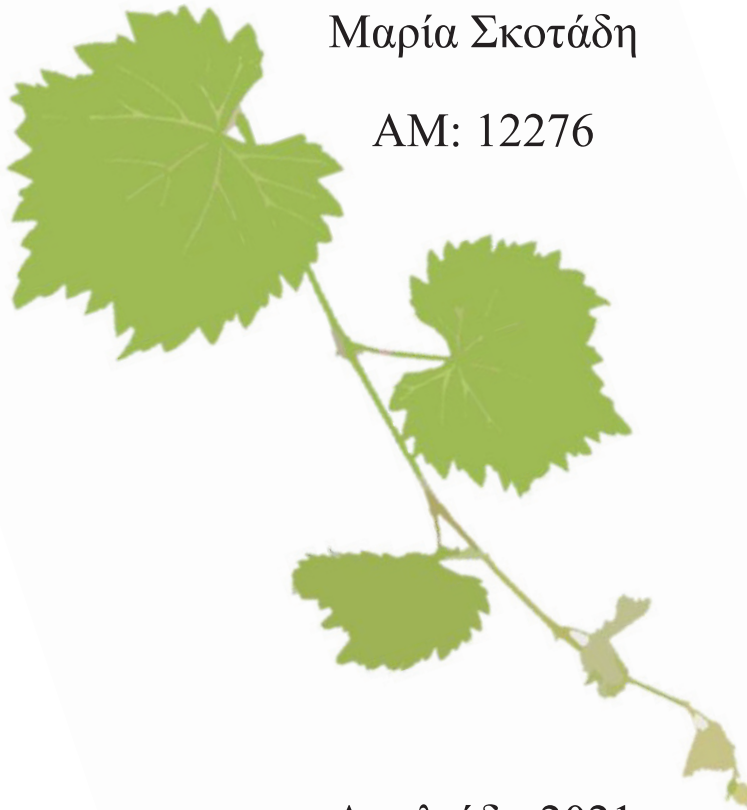
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ



**Συγκριτική ανάλυση του μεταβολικού προφίλ φύλλων  
αμπελιού (*Vitis vinifera*) που παρουσιάζουν διμορφισμό μετά  
την προσβολή του βλαστού από έντομο**

Μαρία Σκοτάδη

ΑΜ: 12276



Αμαλιάδα 2021

## **Τριμελής εξεταστική επιτροπή**

Δρ. Γεωργία Τοουλάκου (Επιβλέπουσα)

Πανεπιστημιακή Υπότροφος, Τμήμα Γεωπονίας, Παν. Πατρών

Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια ΙΤΕ/ΙΕΧΜΗ

Καθ. Γεώργιος Σαλάχας

Τμήμα Γεωπονίας, Παν. Πατρών

Αν. Καθ. Ειρήνη Καραναστάση

Τμήμα Γεωπονίας, Παν. Πατρών

*Στη μνήμη του Γεώργιου Καμπάση*

*Για σένα που έφυγες πολύ νωρίς και μας βλέπεις από τον ουρανό  
ψηλά στην πόλη των αγγέλων, σ αγαπάμε πολύ, μας λείπεις...*

## **Ευχαριστίες**

*Η παρούσα πτυχιακή εργασία υλοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μεταβολικής Μηχανικής και Συστημικής Βιολογίας στο Ινστιτούτο Χημικής Μηχανικής του Ιδρύματος Τεχνολογίας Έρευνας στο ΙΤΕ/ΙΕΧΜΗ. Με την ολοκλήρωση της θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του ινστιτούτου αλλά και όσους ήταν στο πλευρό μου.*

*Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου Δρ. Γεωργία Τσουλάκου για την εμπιστοσύνη της και την δυνατότητα που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την πτυχιακή μου εργασία καθώς και για όλες τις νέες γνώσεις που αποκόμισα από εκείνη κατά την διάρκεια της. Οι συμβουλές της και η καθοδήγηση της με βοήθησαν να εξελιχθώ και να φτάσω ως εδώ. Η αγάπη της για την επιστήμη με δίδαξε ότι κανένα μονοπάτι δεν είναι δύσκολο όταν το θες πραγματικά και παλεύεις γι αυτό.*

*Την Δρ. Μαρία Κλάπα κύρια ερευνήτρια και επικεφαλής του εργαστηρίου Μεταβολικής Μηχανικής και Συστημικής Βιολογίας του ΙΤΕ/ΙΕΧΜΗ για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπαιδευτώ σε ένα νέο πεδίο των επιστημών, τη μεταβολομική αλλά και για τις πολύτιμες συμβουλές της κατά την διάρκεια της.*

*Τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής Καθηγητή κ. Γεώργιο Σαλάχα, καθηγητής και την Αν. Καθηγήτρια Ειρήνη Καραναστάση του Τμήματος Γεωπονίας του Πανεπιστημίου Πατρών, για όλα όσα με δίδαξαν στα χρόνια το σπουδών μου αλλά και για την βοήθεια στην διόρθωση.*

*Ακόμα, δεν θα μπορούσα να παραλείψω τον Καθηγητή μου Βασίλειο Παπασωτηρόπουλο τον ευχαριστώ για όλα όσα αποκόμισα αλλά και για την εμπιστοσύνη που μου είχε δείξει στα πρώτα εργαστηριακά μου χρόνια. Ένα μεγάλο ευχαριστώ και στην καθηγήτρια μου Δρ. Κωνσταντίνα Ζέλιου που με συμβούλεψε και με καθοδήγησε στα πρώτα χρόνια των σπουδών μου, όποτε την χρειάστηκα ήταν δίπλα μου στηρίζοντας με τόσο στον ανθρώπινο όσο και στον εκπαιδευτικό τομέα και θα την θυμάμαι πάντα για την ειλικρίνεια και την εμπιστοσύνη της.*

*Ευχαριστίες οφείλονται και στον παραγωγό Γεώργιο Παπάζη από τα Γιάννενα που μας προμήθευσε με το φυτικό υλικό.*

*Σε αυτό το σημείο, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τους ανθρώπους που με στήριξαν μου πρόσφεραν τέσσερα πολύτιμα χρόνια και δεν έφυγαν ποτέ από το πλευρό μου τις φίλες και συναδέλφους μου Γεωργία Αρχοντή και Αγγελική Νομικού που στάθηκαν*

διπλά μου σαν οικογένεια. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα μέλη του Εργαστηρίου Μεταβολικής Μηχανικής και Συστημικής Βιολογίας (ΙΤΕ/ΙΕΧΜΗ), Μαριλένα Παντζίρη και Βανέσσα Σαββοπούλου η παρουσία τους στον εργαστηριακό χώρο δημιούργησε ένα ευχάριστο κλίμα συντροφικότητας και επιστημονικής αναζήτησης. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και σε έναν ακόμα φίλο και συνταξιδιώτη στο δρόμο της γνώσης Μιχάλη Ροζάκη.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ στα αγαπημένα μου πρόσωπα, στον πατέρα μου Πέτρο την μητέρα μου Κυράννα την αδελφή μου Παναγιώτα και την υπόλοιπη οικογένεια μου με την αγάπη τους και την πίστη τους με στήριζαν στο ταξίδι μου δίνοντας μου κουράγιο να προχωρώ και να προσπερνώ κάθε εμπόδιο. Τους χρωστάω μεγάλη ευγνωμοσύνη για όλα όσα είμαι και έχω πετύχει μέχρι σήμερα.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Σταυρούλα Καρπαθίου που με παρότρυνε να κάνω το μεγάλο βήμα στις σπουδές μου.

# I. Περίληψη

---

Τα φυτά κατά την ανάπτυξή τους καλούνται να αντιμετωπίσουν διάφορες βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις είτε σε επίπεδο φυτού αρχικά, είτε σε επίπεδο καλλιέργειας. Οι καταπονήσεις επιδρούν αρνητικά στην φυσιολογία των φυτών και στην ανάπτυξή τους και κατ' επέκταση στη γεωργική παραγωγή και στην ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων. Έχει υπολογιστεί ότι σε συνθήκες αγρού οι αποκλίσεις από τις ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης έχουν ως αποτέλεσμα το καθαρό προϊόν να αντιπροσωπεύει μόνο το 20-30 % αυτού που μπορεί εν δυνάμει να παραχθεί από τα φυτά. Οι απαιτήσεις της αγοράς για προϊόντα υψηλής διατροφικής αξίας και ποιότητας, δημιουργούν την ανάγκη για την περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασής τους των καταπονήσεων στην μοριακή φυσιολογία των φυτών σε ένα πρώτο επίπεδο και σε ένα δεύτερο επίπεδο σε σχέση με την αγροτική παραγωγή.

Οι νέες τεχνολογίες βιομοριακής ανάλυσης υψηλής απόδοσης (ή ομικές) μπορούν να προσφέρουν ολιστική και αξιόπιστη εικόνα της μοριακής φυσιολογίας των φυτών. Πιο συγκεκριμένα προτείνεται η μεταβολομική ανάλυση ως εργαλείο (α) μελέτης της *in vivo* φυσιολογίας των φυτών σε δεδομένο χρόνο και υπό δεδομένες συνθήκες και (β) παρακολούθησης αγροτικών καλλιέργειών. Η μεταβολομική αποτελεί μια ολιστική αναλυτική προσέγγιση του μεταβολισμού, παρέχοντας το μεταβολικό του «αποτύπωμα» και γεφυρώνοντας την απόσταση μεταξύ γονοτύπου και φαινοτύπου. Μέσω της μεταβολομικής δίνεται η δυνατότητα της μελέτης της *in vivo* φυσιολογίας ενός οργανισμού σε δεδομένο χρόνο και υπό δεδομένες συνθήκες και ο προσδιορισμός συγκέντρωση πολλών μικρών ελεύθερων οργανικών μορίων (μεταβολίτες) οι οποίοι αποτελούν τα αντιδρώντα και τα προϊόντα των μεταβολικών αντιδράσεων, παρέχοντάς το πλήρες μεταβολικό αποτύπωμα του οργανισμού.

Το αμπέλι αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερης οικονομικής σημασίας φυτά παγκοσμίως και για την παραγωγή του σταφυλιού αλλά κυρίως για την παραγωγή οίνων, και ιδιαίτερα οίνων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Οι καλλιέργειες αμπελιού, προσβάλλονται από διάφορα παθογόνα και εχθρούς, που σε αυτά συμπεριλαμβάνονται και ένας σημαντικός αριθμός εντόμων και ιών. Παρά το ευρύ φάσμα των εντόμων και των ιών που προσβάλλουν το αμπέλι, η γνώση γύρω από την επίδραση τους σε μοριακό επίπεδο στην ποιότητα των σταφυλιών και του κρασιού παραμένει περιορισμένη.

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η συγκριτική μελέτη του μεταβολικού προφίλ φύλλων αμπέλου που παρουσιάζουν διμορφισμό μετά την προσβολή του βλαστού από έντομο.

Στο πλαίσιο αυτό για την ολιστική ανάλυση του μεταβολισμού των φύλλων και τη μελέτη της επίδρασης της προσβολής, χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία υψηλής απόδοσης της μεταβολομικής με χρήση Χρωματογράφου Αερίων- Φασματόμετρου Μάζας (GC-MS). Με την ανάκτηση του μεταβολικού προτύπου ανιχνεύονται ποιοτικές και ποσοτικές αλλαγές στο μεταβολικό προφίλ που οφείλονται στην προσβολή του βλαστού από έντομο.

Συγκεκριμένα στην παρούσα πτυχιακή χρησιμοποιήθηκαν βλαστοί προσβεβλημένοι στους οποίους υπήρχαν φύλλα που παρουσίαζαν διμορφισμό και χωρίστηκαν σε φύλλα μάρτυρες και φύλλα προσβεβλημένα (ανάλογα με τη θέση στο σημείο προσβολής). Αναλύθηκαν τρία φύλλα από κάθε κατάσταση φυσιολογίας και τελικά ανακτήθηκαν 18 χρωματογραφήματα. Μετά την κανονικοποίηση και το φιλτράρισμα των δεδομένων καταλήξαμε στις σχετικές συγκεντρώσεις 54 μεταβολιτών. Στη συνέχεια για την εύρεση των μεταβολιτών που διαφοροποιούνται σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών καταστάσεων φυσιολογίας και συμβάλλουν στον διαχωρισμό των προτύπων, υπολογίζεται ο λόγος αλλαγής (fold change). Ο λόγος αλλαγής υπολογίζεται απλά ως ο λόγος των σχετικών επιφανειών κορυφής κάθε μεταβολίτη μεταξύ δύο καταστάσεων (προσβεβλημένα/μάρτυρες). Στα προσβεβλημένα φύλλα αρκετά μόρια παρουσιάζουν μικρότερες σχετικές συγκεντρώσεις σε σχέση με τα φύλλα μάρτυρες ενώ αυξάνονται δύο μόρια που ίσως σχετίζονται με την κινητοποίηση του αμύλου στα προσβεβλημένα φύλλα. Το πολυσυλλεκτικό αυτό μεταβολικό προφίλ, καθώς και οι επιμέρους αλλαγές στους μεταβολίτες, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ευαίσθητος βιοδείκτης μιας διαταραχής ή καταπόνησης.

Συμπερασματικά η Μεταβολομική καθώς και οι ολιστικές προσεγγίσεις της Συστημικής Βιολογίας μπορούν να βελτιώσουν δραστικά τις μεθόδους και τεχνικές παρακολούθησης της μοριακής φυσιολογίας των φυτών, της απόκρισης των φυτών στις καταπονήσεις της καλλιέργειας και του αγροτικού προϊόντος.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Εισαγωγή.....	9
1. Η καλλιέργεια του αμπελιού ( <i>Vitis vinifera</i> ).....	9
2. Το περιβάλλον της αμπέλου.....	10
2.1. Εδαφοκλιματικές συνθήκες.....	10
3. Μορφολογικά χαρακτηριστικά.....	11
4. Φυσιολογικές λειτουργίες φύλλων.....	13
4.1. Φωτοσύνθεση.....	13
4.1.1. C <sub>3</sub> φωτοσύνθεση.....	16
4.1.2. C <sub>4</sub> φωτοσύνθεση ή κύκλος των Hatch και Slack.....	17
4.1.3. Όξινος μεταβολισμός στα Crassulaceae (CAM).....	18
5. Αναπνοή – Κεντρικός Μεταβολισμός του άνθρακα.....	19
6. Βιοτικές καταπονήσεις.....	21
6.1. Επαγόμενη άμυνα έναντι εντόμων.....	21
6.2. Τα χαρακτηριστικά του εντόμου <i>Spissistilus festinus</i> που προσβάλλει το αμπέλι <sup>23</sup>	
7. Βιολογία συστημάτων.....	25
7.1. Μεταβολομική.....	25
7.1.1. Μεταβολομική Ανάλυση και Καταπονήσεις.....	27
7.1.2. Τεχνικές μεταβολομικής ανάλυσης.....	28
7.1.3. Μεταβολομική ανάλυση με Αέρια χρωματογραφία-Φασματομετρία μάζας (GC-MS).....	29
Σκοπος της μελέτης.....	40
Υλικά και μέθοδοι.....	41
1. Εκχύλιση μεταβολίτων.....	41
2. Παραγωγή μεταβολιτών.....	42
3. Ανάκτηση μεταβολικών προφίλ με Αέριο Χρωματογράφο – Φασματομέτρο Μάζας.....	43
4. Ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση κορυφών.....	44
5. Κανονικοποίηση, φιλτράρισμα και απομάκρυνση μη-εμπιστεύσιμων δεδομένων.....	45
Αποτελέσματα.....	48
1. Μεταβολικό πρότυπο φύλλων αμπελιού.....	48
2. Ποιοτικές συγκρίσεις χρωματογραφημάτων.....	49
3. Ποσοτική ανάλυση μεταβολικών προφίλ.....	50
Συμπεράσματα.....	57
Συζήτηση.....	58
Βιβλιογραφία.....	62



# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1. Η καλλιέργεια του αμπελιού (*Vitis vinifera*)

Το είδος *Vitis vinifera* (κν. αμπέλι ή κλήμα, οικ. Vitaceae) είναι αγγειόσπερμο αυτοφυές φυτό των εύκρατων κλιμάτων. Είναι πολυετές φυτό, φυλλοβόλο, αναρριχώμενος, και το ύψος του μπορεί να φτάσει δεκαπέντε μέτρα ύψος (Καραγιαννοπούλου, 2018). Ίχνη του φυτού εμφανίζονται και πριν την περίοδο των παγετώνων ενώ κατέχει ξεχωριστή θέση στη μεσογειακή χλωρίδα.

Η καλλιέργεια του αμπελιού για παραγωγή καρπού (νωπού και μεταποιημένου) και η παραγωγή κρασιού στην Ελλάδα αποτελεί γεωργική δραστηριότητα που παρουσιάζεται ήδη στους προϊστορικούς χρόνους (4500-1050 π.Χ.). Το κρασί στην αρχαιότητα αποτελούσε αγαπημένο ποτό των θεών, συνδεδεμένο με τον θεό Διόνυσο, αλλά και θνητών. Την εποχή εκείνη το κρασί το χρησιμοποιούσαν για θρησκευτικούς και θεραπευτικούς σκοπούς (Μαραγκού, 1992). Το κρασί διαδραμάτισε σημαντικό ρόλο στην οικονομία της Ελλάδας από την αρχαιότητα ως και σήμερα (Κουράκου-Δραγώνα, 2006).

Το αμπέλι καλλιεργείται κυρίως για τον καρπό του, ενώ τα φύλλα χρησιμοποιούνται στη μαγειρική. Καταναλώνεται νωπό ως φρούτο ενώ χρησιμοποιείται ως μεταποιημένο προϊόν στη ζαχαροπλαστική και μαγειρική. Πολύ σημαντική είναι η χρήση του καρπού για την παραγωγή οينوπνευματωδών ποτών (κρασί, τσίπουρο) (Καραγιαννοπούλου, 2018).

Τα τελευταία χρόνια πραγματοποιήθηκαν σημαντικές προσπάθειες για την ανάδειξη του διαχρονικού πλούτου του ελληνικού αμπελώνα και του σύγχρονου ελληνικού κρασιού, χαρίζοντας σε πολλούς ιστορικούς ελληνικούς αμπελώνες νομοθετική αναγνώριση και προστασία, επιπλέον και το δικαίωμα αναγραφής της ονομασίας τους στις ετικέτες των κρασιών τους. Η νομοθεσία, η αμπελοοινική παραγωγή και η αγορά του κρασιού, συνδέονται άμεσα με τις αντίστοιχες κοινοτικές οδηγίες (Πίκουλας, 2004).

## 2. Το περιβάλλον της αμπέλου

### 2.1. Εδαφοκλιματικές συνθήκες

Ο ρόλος του εδάφους στις καλλιέργειες αμπελιού είναι διττός. Κατά πρώτον αποτελεί το υπόβαθρο που στηρίζει το αμπέλι, και το υπόστρωμα όπου θα βρει τα ανόργανα θρεπτικά συστατικά και το νερό. Η θρέψη του αμπελιού εξαρτάται από τη σύσταση του εδάφους. Έτσι, στα πλούσια εδάφη το αμπέλι οι ρίζες αναπτύσσονται αρκετά και υπάρχει διαθεσιμότητα υγρασίας και έτσι αναπτύσσεται πυκνό φύλλωμα με κατά συνέπεια μεγάλη παραγωγή σταφυλιών, κάτι που συνήθως αντίκειται στην παραγωγή οίνων υψηλής ποιότητας λόγω μειωμένων σακχάρων και οξέων στον καρπό. Αντιθέτως, σε εδάφη με μειωμένη εδαφική υγρασία, το αμπέλι καρποφορεί μικρότερες ποσότητες με αποτέλεσμα την παραγωγή κρασιών καλής ποιότητας. Κατά συνέπεια μεταξύ των παραγόντων του περιβάλλοντος το έδαφος είναι αυτό στο οποίο αποδίδονται συχνότερα τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των σταφυλιών και των οίνων μίας περιοχής. Αυτός είναι ένας από τους βασικότερους λόγους για τον οποίο ορισμένοι αμπελώνες παράγουν φημισμένα κρασιά, ενώ γειτονικοί τους δεν κερδίζουν ανάλογες διακρίσεις. Από την άλλη μεριά, τέτοια φαινόμενα καθιστούν ξεκάθαρη τη σημασία που έχει η σχέση **έδαφος και αμπέλι** για την οινοπαραγωγή. (Κουνδούρας, 2012; Σταυρακάκης, 2013).

Το αμπέλι ευδοκιμεί καλύτερα σε εδάφη χονδρόκοκκα και μάλιστα χαλικώδη, όπου διακόπτεται η ομοιομορφία του εδάφους και το συμπαγές, γίνεται ευκολότερος ο αερισμός και η αποθήκευση του νερού και περιορίζεται η εξάτμιση. Τα αργιλώδη εδάφη κρίνονται ακατάλληλα για την καλλιέργεια του αμπελιού γιατί παρέχουν κακό αερισμό και δυσκολία στην άρδευση και στη πρόσληψη νερού από τα αμπέλια. Τα χουμώδη (οργανικά) εδάφη παράγουν σταφύλια τα οποία δίνουν κακής ποιότητας κρασί. Τα βαθιά αμμώδη έχουν υψηλές αποδόσεις δίνοντας σταφύλια καλής ποιότητας (Σταυρακάκης, 2013, Τσετούρας, 2014).

Η χημική σύσταση του εδάφους είναι ένας σημαντικός παράγοντας στην ποιότητα των σταφυλιών. Το κάλιο δίνει σταφύλια που είναι πλούσια στα σάκχαρα, το ασβέστιο αυξάνει τις αρωματικές ουσίες και το ποσοστό της αιθυλικής αλκοόλης. Αντίθετα τα οργανικά εδάφη προσφέρουν «φτωχά» κακής ποιότητας κρασί που περιέχουν πολύ σίδηρο, με μαύρο θόλωμα κάτι που πρέπει να αποφεύγουν οι παραγωγοί (Τσετούρας, 2014).

Το αμπέλι είναι στενά συνδεδεμένο με το μεσογειακό κλίμα, καθώς εκεί πρωτοεμφανίστηκε και αναπτύχθηκε η πρώτη καλλιέργεια. Λόγω όμως της πλαστικότητας του είδους, σε συνδυασμό με τη γενετική ποικιλομορφία, επέτρεψε την ευδοκίμηση της Ευρωπαϊκής αμπέλου και στις έξι ηπείρους σε διαφορετικά κλιματικά περιβάλλοντα, ωκεάνια, ηπειρωτικά, υγρά υποτροπικά, ημίξηρα ηπειρωτικά κ.α. (Σταυρακάκης, 2013).

### **3. Μορφολογικά χαρακτηριστικά**

Το αμπέλι είναι φυτό, που αποτελείται από τη ρίζα και το υπέργειο τμήμα, που περιλαμβάνει τον κορμό, τους βραχίονες και τις κληματίδες, από τις οποίες αναπτύσσονται τα φύλλα, οι έλικες και οι ταξιανθίες.

#### **Ρίζα**

Η ρίζα είναι το υπόγειο όργανο που στηρίζει το αμπέλι στο έδαφος και συντελεί στην απορρόφηση νερού και θρεπτικών στοιχείων. Το ριζικό σύστημα είναι αρχικά πασσαλώδες αλλά στη συνέχεια αναπτύσσονται πλευρικά ριζικά τριχίδια, μεγάλο μέρος των οποίων καταστρέφεται στη διάρκεια του χειμώνα. Αποτελεί περίπου το 30-40% του ξηρού βάρους ολόκληρου του αμπελιού στη ρίζα αποθηκεύονται μεταβολίτες (κυρίως αζωτούχες ενώσεις και υδατάνθρακες) που συμμετέχουν στην ανάπτυξη του υπέργειου μέρους και χρησιμοποιούνται για την έκπτυξη της νέας βλάστησης την άνοιξη (Ασημακοπούλου & Αλεξόπουλος, 2013).

Η ρίζα του αμπελιού διεισδύει βαθιά στη γη, προκειμένου να βρει υγρασία. Οι βαθιές ρίζες στο φυτό δίνουν αντοχή όχι μόνο στην καλοκαιρινή ξηρασία αλλά και τον χειμώνα καθώς το κρύο δεν φτάνει στα βαθιά στρώματα (Καραγιαννοπούλου, 2018).

#### **Βλαστός**

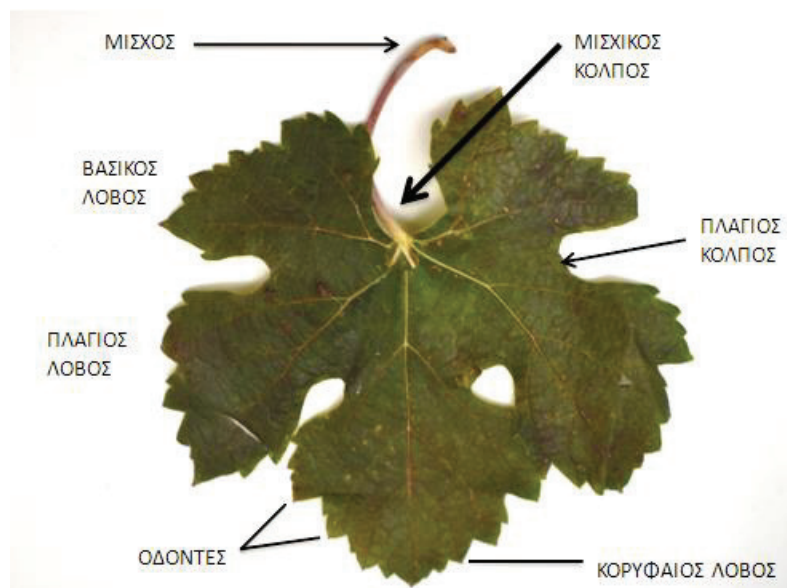
Ο βλαστός του αμπελιού είναι επιμήκης και κυλινδρικός. Προέρχεται από την έκπτυξη ενός λανθάνοντα οφθαλμού. Οι βλαστοί στην πορεία του χρόνου γίνονται ξυλώδεις βραχίονες που ονομάζονται βέργες ή κληματίδες. Το κλήμα έχει βλαστούς και κληματίδες διαφόρων ηλικιών. Στον βλαστό της αμπέλου διακρίνονται τα εξής μέρη: η αυξανόμενη κορυφή, οι κόμβοι, τα μεσογονάτια διαστήματα, τα φύλλα, οι οφθαλμοί, οι έλικες, οι ταξικαρπίες και μεσοκάρδιοι βλαστοί. Ο βλαστός διογκώνεται στα σημεία πρόσφυσης των φύλλων και διαμορφώνει τους κόμβους ή γόνατα. Τα

μεσογονάτια διαστήματα είναι ομαλά, σπάνια τριχωτά, και κατά μήκος γραμμωτά. Το μήκος και η διάμετρός τους διαφέρουν ανάλογα με τη θέση που βρίσκονται, τις συνθήκες του περιβάλλοντος, το είδος του κλαδέματος, του κορφολογήματος (Σταυρακάκης, 2013).

### Φύλλα

Οι καταβολές των φύλλων στο αμπέλι δημιουργούνται στους βλαστοφόρους οφθαλμούς οι οποίοι εκπτύσσονται την άνοιξη με τη νέα βλάστηση και δίνουν βλαστό και φύλλα.

Κάθε φύλλο αποτελείται από τρία βασικά μέρη, τη βάση, τον μίσχο και το έλασμα. Η βάση συνδέεται με το βλαστό, ο μίσχος είναι το τμήμα που συνδέει τη βάση με το έλασμα και το έλασμα αποτελεί το κυρίως μέρος του φύλλου στο οποίο επιτελούνται σημαντικές λειτουργίες όπως η διαπνοή, η αναπνοή και η φωτοσύνθεση.



Εικόνα 1. Μορφολογία φύλλου αμπελιού

Το έλασμα του φύλλου αποτελείται από τρεις κύριους ιστούς την επιδερμίδα, το μεσόφυλλο και τον αγωγό ιστό. Η επιδερμίδα έχει ρόλο προστατευτικού ιστού και διακρίνεται πάνω και κάτω στην επιδερμίδα. Τα φύλλα του αμπελιού είναι υποστοματικά δηλαδή φέρουν στην κάτω επιδερμίδα μεγάλο αριθμό στομάτων. Το μεσόφυλλο είναι παρεγχυματικός ιστός και διακρίνεται στο δρυφακτοειδές και στο σπογγώδες παρέγχυμα. Ο αγωγός ιστός διακρίνεται σε ηθμό ο οποίος μεταφέρει τα φωτοσυνθετικά προϊόντα από τα φύλλα στα υπόλοιπα μέρη του φυτού και σε ξύλο ο

οποίος μεταφέρει νερό και ανόργανα θρεπτικά συστατικά από τη ρίζα προς τον βλαστό και τα φύλλα (Αθανασιάδου, 2009).

### **Άνθος**

Τα άνθη του αμπελιού είναι μικρά, πρασινωπά, στρογγυλά ή κυλινδρικά. Στην πρώτη φάση σχηματισμού τους τα άνθη λέγονται μούρα. Τα άνθη αποτελούν ταξιανθία, που ονομάζεται βότρυς και βγαίνουν πάνω στους κόμπους, στην αντίθετη πλευρά από τα φύλλα. Είναι μικρά, ακτινωτά, αρσενικά, θηλυκά ή ερμαφρόδιτα (Καραγιαννοπούλου, 2018). Το άνθος φέρει πέντε νεκταροφόρους αδένες που εντοπίζονται μεταξύ των στημόνων και των πετάλων αφήνοντας ένα χαρακτηριστικό άρωμα κατά την άνθιση. Μετά την καρπόδεση οι αδένες ξηραίνονται και μένουν προσκολλημένοι στη βάση της ράγας (Σταυρακάκης, 2013).

### **Καρπός**

Ο καρπός της αμπέλου είναι ράγα σαρκώδης ενώ εντός της ράγας υπάρχουν 1-3 γίγαρτα και σπάνια 4 με μορφή αχλαδιού, με ράμφος που φαίνεται και ενδοσπέρμιο σκληρό κεράτινο που μπορεί να φυτρώσει πριν την ωρίμανση της ράγας (Αρβανιτίδης, 1991). Οι ράγες αποτελούν το 91-98% του βάρους του βότρυ και όταν ωριμάσει παίρνει άλλο σχήμα. Το χρώμα είναι κιτρινωπό, πρασινωπό, κόκκινο, μελανό, πορτοκαλί ανάλογα με την ποικιλία. Η συνεκτικότητα της σάρκας ποικίλλει και μπορεί να είναι σαρκώδης, μαλακή ή χυμώδης. Η γεύση και το άρωμα του καρπού εξαρτάται από την ποικιλία.

## **4. Φυσιολογικές λειτουργίες φύλλων**

### **4.1. Φωτοσύνθεση**

Η φωτοσύνθεση είναι η φυσικοχημική διαδικασία μέσω της οποίας τα φυτά και τα φωτοσυνθετικά βακτήρια χρησιμοποιούν την ηλιακή ενέργεια για να συνθέσουν οργανικές ενώσεις. Στα φυτά και σε ορισμένα είδη βακτηρίων, η διαδικασία της φωτοσύνθεσης έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση οξυγόνου και τη δέσμευση από την ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub> και χρησιμοποιείται για την σύνθεση υδατανθράκων. Άλλα ήδη βακτηρίων χρησιμοποιούν την ηλιακή ακτινοβολία για τη σύνθεση οργανικών ενώσεων, αλλά δεν παράγουν οξυγόνο (Ρουμπελάκη κ.α., 2003). Για τη μετατροπή της φωτεινής ενέργειας σε χημική πραγματοποιούνται πολυάριθμες αντιδράσεις και μηχανισμοί που περιγράφονται στην παρακάτω εξίσωση:



Η φωτοσύνθεση είναι μια ενδεργονική διαδικασία και σημαντικά πολύπλοκη. Περιλαμβάνει πολυάριθμες, στενά συνδεδεμένες μεταξύ τους φωτοευαίσθητες και θερμοευαίσθητες αντιδράσεις και έχουν σχέση με την απορρόφηση πρωτονίων, τη μεταφορά ηλεκτρονίων και τον μεταβολισμό του άνθρακα (Lawlor, 2001; Γανωτάκης και Κοτζαμπάσης, 2003; Αϊβαλάκης κ.α., 2005). Χωρίζεται σε δύο στάδια: Στις φωτεινές αντιδράσεις, οι οποίες απορροφούν ηλιακή ακτινοβολία, μεταφέρουν ενέργεια στα κέντρα αντίδρασης και περιλαμβάνουν και τις αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων και πρωτονίων οι οποίες οδηγούν στην παραγωγή NADPH και ATP. Και στο δεύτερο στάδιο ανήκουν οι σκοτεινές αντιδράσεις, οι οποίες περιλαμβάνουν την αναγωγή του CO<sub>2</sub> και τη σύνθεση υδατανθράκων με τη χρήση NADPH και ATP που παράγονται κατά τις φωτεινές αντιδράσεις (Ρουμπελάκη κ.α., 2003; Καραμπουρνιώτης κ.α. 2016).

Χωροταξικά, ο μηχανισμός της φωτοσύνθεσης εντοπίζεται μέσα σε ειδικά οργανίδια του κυττάρου τους χλωροπλάστες. Ο χλωροπλάστης περιβάλλεται από μια διπλή μεμβράνη, τον πλαστιδιακό φάκελο. Αυτές οι δύο μεμβράνες του χλωροπλάστη είναι αρκετά διαπερατές από το CO<sub>2</sub>, καθώς αποτελεί υπόστρωμα για τη σύνθεση υδατανθράκων κατά τις σκοτεινές αντιδράσεις. Το θεμελιώδες υλικό του πλαστιδίου ονομάζεται στρώμα και τα περισσότερα ένζυμα που βρίσκονται εκεί καταλύουν τις σκοτεινές αντιδράσεις. Στο εσωτερικό του στρώματος υπάρχει ένα δίκτυο μεμβρανών, τα θυλακοειδή που οργανώνονται σε μεμβρανικές στιβάδες και καλούνται grana. Στις μεμβράνες των θυλακοειδών βρίσκονται οι φωτοσυνθετικές μονάδες και αποτελούνται από πρωτεΐνες και φωτοσυνθετικές χρωστικές, οργανωμένες σε σύμπλοκα χρωστικών/πρωτεϊνών (Ρουμπελάκη κ.α., 2003).

### **Φωτεινές αντιδράσεις**

Κατά τις φωτεινές αντιδράσεις γίνεται απορρόφηση ηλιακής ακτινοβολίας και μετατροπή της σε χημική ενέργεια. Η απορρόφηση πραγματοποιείται από τις φωτοσυλλεκτικές κεραίες, στις οποίες περιέχονται φωτοσυνθετικές χρωστικές που απορροφούν σε διάφορα μήκη φωτός. Υπάρχουν τρία είδη φωτοσυνθετικών χρωστικών, η χλωροφύλλη α, η χλωροφύλλη β, και τα καροτενοειδή. Η χλωροφύλλη α είναι η κύρια χρωστική που απορροφά το μεγαλύτερο ποσοστό ηλιακής ενέργειας. Η χλωροφύλλη β και τα καροτενοειδή θεωρούνται βοηθητικές χρωστικές και

απορροφούν σε χαμηλότερα μήκη κύματος από τη χλωροφύλλη α. Η παρουσία τους όμως είναι απαραίτητη καθώς αυξάνουν το εύρος του ηλιακού φάσματος που μπορεί να απορροφηθεί για την παραγωγή ενέργειας (Μανέτας, 2005; Καραμπουρνιώτης, 2016).

Στις φωτοσυλλεκτικές κεραίες εκτός από φωτοσυνθετικές χρωστικές έχουμε και δομικές πρωτεΐνες. Η φωτοσυνθετική ροή των ηλεκτρονίων και η φωτοφωσφορυλίωση πραγματοποιούνται στις μεμβράνες θυλακοειδών στα μιτοχόνδρια. Τα φωτοσυλλεκτικά σύμπλοκα εντοπίζονται κυρίως στις εσωτερικές μεμβράνες στα grana που βρίσκονται σε στενή επαφή μεταξύ τους και δεν έρχονται σε επαφή με το στρώμα. Η φωτεινή ενέργεια που απορροφάται από τις χρωστικές οδηγείται στο ενεργό κέντρο του φωτοσυστήματος 2 (Μανέτας, 2005).

Για κάθε φωτόνιο που απορροφάται πραγματοποιείται μεταφορά ενός διεγερμένου ηλεκτρονίου σε ένα δέκτη ηλεκτρονίων του συστήματος 2. Τα ηλεκτρόνια, στη συνέχεια μεταφέρονται μέσω της πλαστοκινόνης στο σύμπλοκο των κυτοχρωμάτων b6 και f και στη συνέχεια στην πλαστοκινόνης. Ως δότης ηλεκτρονίων η τελευταία λειτουργεί στο φωτοσύστημα 1. Το διεγερμένο ηλεκτρόνιο, μέσω της φερρεδοξίνης, οδηγείται στην αναγωγή του NADP, ανάγοντας το σε NADPH<sub>2</sub>. Η συγκέντρωση των ηλεκτρονίων συσσωρεύεται στο εσωτερικό των θυλακοειδών και εκτονώνεται μέσω της ATP συνθέτασης, η οποία τη μετατρέπει σε ATP. Με αυτόν τον τρόπο παράγεται χρήσιμη ενέργεια για το φυτό (Μανέτας, 2005; Καραμπουρνιώτης κ.α., 2016).

### **Σκοτεινές αντιδράσεις**

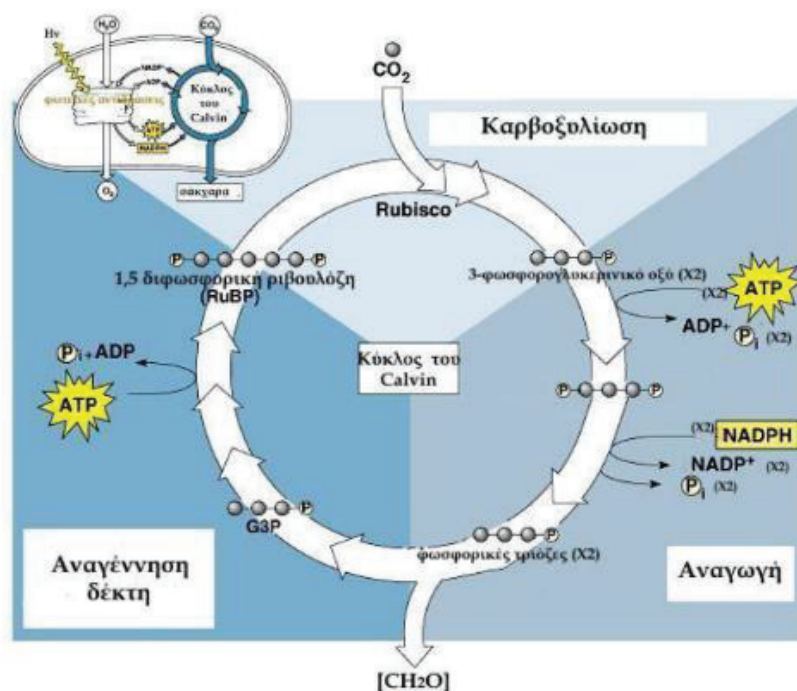
Στις σκοτεινές αντιδράσεις πραγματοποιείται η αφομοίωση του ατμοσφαιρικού CO<sub>2</sub> και η αναγωγή του μέχρι το επίπεδο του υδατάνθρακα. Η αναγωγή αυτή απαιτεί συνεχή παροχή ενέργειας η οποία προέρχεται από το ATP και το NADPH που παράχθηκαν από τις φωτεινές αντιδράσεις. Στις σκοτεινές αντιδράσεις η παρουσία του φωτός δεν είναι απαραίτητη αλλά εξαρτώνται από τη συνεχή τροφοδοσία σε ATP και NADPH που προϋποθέτει τη συνεχή πραγματοποίηση των φωτεινών αντιδράσεων (Taiz and Zeiger, 2010; Καραμπουρνιώτης κ.α., 2016). Όμως εκτός από την αναγκαία παροχή ενέργειας, η παρουσία φωτός επηρεάζει τις σκοτεινές αντιδράσεις ρυθμίζοντας τη σύνθεση και τη λειτουργία των ενζύμων και των υποστρωμάτων που συμμετέχουν σε αυτές (Stern et al, 2008; Alberts et al, 2008; Taiz and Zeiger, 2010).

Στα ανώτερα φυτά η διαδικασία αφομοίωσης  $\text{CO}_2$  επιτυγχάνεται μέσω τριών διαφορετικών οδών:

- A) Κύκλος του Calvin ή  $\text{C}_3$  φωτοσύνθεση
- B) Κύκλος Hatch και Slack ή  $\text{C}_4$  φωτοσύνθεση
- Γ) Όξινο μεταβολισμός στα Crassulaceae (CAM)

#### 4.1.1. $\text{C}_3$ φωτοσύνθεση

Στη  $\text{C}_3$  φωτοσύνθεση το  $\text{CO}_2$  ενσωματώνεται με τη μορφή μιας καρβοξυλομάδας σε ένα μόριο δέκτη με 3 άτομα άνθρακα και μέσω διαδοχικών αναγωγικών αντιδράσεων που ονομάζονται κύκλος του Calvin παράγονται υδατάνθρακες υπό μορφή τριόζων. Μόριο δέκτης είναι η 1,5 διφωσφορική ριβουλόζη ενώ την αντίδραση αυτή την καταλύει το ένζυμο καρβοξυλάση-οξυγονάση της 1,5-διφωσφορικής ριβουλόζης (RubisCO). Το  $\text{CO}_2$  μέσω διαδοχικών αντιδράσεων μετατρέπεται σε φωσφορυλιωμένα σάκχαρα ενώ ο δείκτης του  $\text{CO}_2$ , η 1,5 διφωσφορική ριβουλόζη, ταυτόχρονα αναγεννάται. Αυτός ο κύκλος λειτουργεί σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς καθώς και σε μερικούς προκαρυωτικούς. Η μεταβολική αυτή διεργασία συμπεριλαμβάνει επί μέρους αντιδράσεις που καταλύονται από ένζυμα που εντοπίζονται στο στρώμα των χλωροπλαστών.



Εικόνα 2. Η πορεία των βιοχημικών αντιδράσεων του κύκλου του Calvin.

(τροποποίηση σχήματος από [www.uair.edu](http://www.uair.edu))

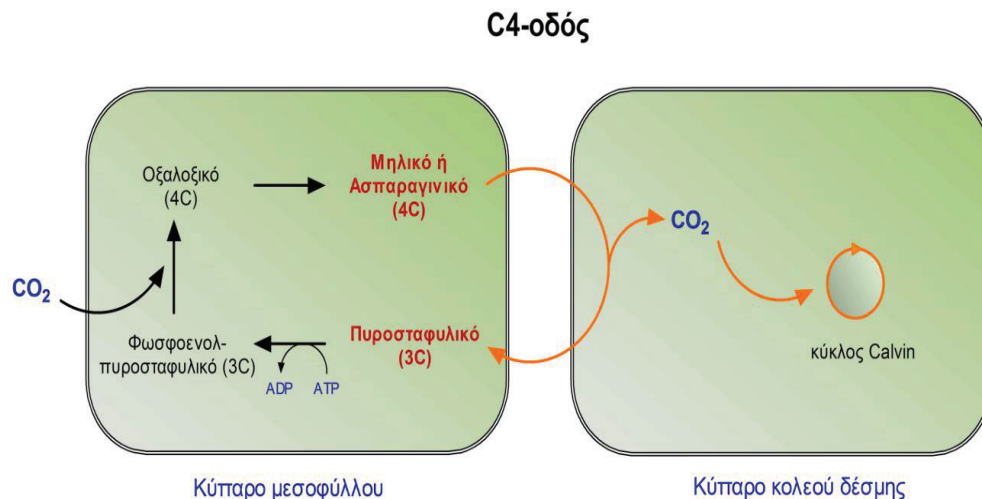


Για τη λειτουργία του κύκλου δεν είναι υποχρεωτική η ύπαρξη φωτεινής ακτινοβολία καθώς δεν περιλαμβάνει φωτοχημικές αντιδράσεις αλλά εξαρτάται από τον εφοδιασμό σε  $\text{CO}_2$  καθώς σε ATP και NADPH που προέρχονται από τις φωτεινές αντιδράσεις. Ο κύκλος έχει τρία επιμέρους στάδια, την καρβοξυλίωση, την αναγωγή και την αναγέννηση του δέκτη (Καραμπουρνιώτης κ.α., 2012).

Στο πρώτο και καθοριστικό στάδιο του κύκλου, το  $\text{CO}_2$  ενσωματώνεται με τη μορφή μιας καρβοξυλομάδας στο μόριο δέκτη, την 1,5-διφωσφορική ριβουλόζη (RubP) και παράγονται, ως το πρώτο προϊόν, δύο μόρια 3-φωσφογλυκερικού οξέος (3PGA). Στο δεύτερο στάδιο το 3PGA ανάγεται προς φωσφορικές τριόζες με κατανάλωση ATP και NADPH. Όταν το στάδιο πλέον έχει ολοκληρωθεί το  $\text{CO}_2$  έχει αναχθεί στο επίπεδο των υδατανθράκων, έχουμε δηλαδή κέρδος μιας υδατανθρακικής μονάδας. Το μόριο που παράγεται από τον κύκλο του Calvin είναι η 3-φωσφορογλυκεριναλδεύδη που προκύπτει από τη στοιχειομετρία της ενσωμάτωσης τριών μορίων  $\text{CO}_2$  σε τρεις περιστροφές του κύκλου. Στο τρίτο στάδιο πραγματοποιείται μια σειρά από αντιδράσεις που είναι απαραίτητες για την αναγέννηση του μορίου-δέκτη. Σε αυτό το στάδιο καταναλώνεται ενέργεια με τη μορφή ATP. Όταν συμπληρωθεί και το τρίτο στάδιο του κύκλου Calvin ολοκληρώνεται και αναγεννάται η 1,5-διφωσφορική ριβουλόζη και είναι διαθέσιμη ως υπόστρωμα της RubisCO για την επανέναρξη του κύκλου (Καραμπουρνιώτης κ.α., 2016).

#### **4.1.2. C<sub>4</sub> φωτοσύνθεση ή κύκλος των Hatch και Slack**

Η C<sub>4</sub> φωτοσύνθεση εξυπηρετεί στη δέσμευση, τη μεταφορά και τη συγκέντρωση ατμοσφαιρικού  $\text{CO}_2$  στις περιοχές που λειτουργεί ο κύκλος του Calvin. Στην C<sub>4</sub> είναι ενώσεις με τέσσερα άτομα άνθρακα και μεταφέρουν  $\text{CO}_2$  από τα κύτταρα του μεσόφυλλου όπου εκεί γίνεται η αρχική ενσωμάτωση  $\text{CO}_2$ , στα κύτταρα του δεσμικού κολεού και λειτουργεί ο κύκλος του Calvin (Stryer, 1994). Η C<sub>4</sub> φωτοσύνθεση περιλαμβάνει τέσσερα στάδια: α) την καρβοξυλίωση β) τη μεταφορά μεταβολιτών γ) την αποκαρβοξυλίωση και επανεδέσμευση του  $\text{CO}_2$  στον κύκλο του Calvin δ) την αναγέννηση του δέκτη (Taiz and Zeiger, 2010; Καραμπουρνιώτης, 2016).



Εικόνα 3. Το μεταβολικό μονοπάτι της C4 φωτοσύνθεσης (Πηγή: Μανέτας κ.α, 2015)

#### 4.1.3. Όξινο μεταβολισμός στα Crassulaceae (CAM)

Ο όξινο μεταβολισμός στα Crassulaceae (CAM), αποτελεί μια παραλλαγή του μεταβολισμού του άνθρακα, που συμβαίνει σε παχύφυλλα φυτά που είναι προσαρμοσμένα σε συνθήκες ξηρασίας, αυτό όμως δε σημαίνει ότι όλα τα CAM φυτά πρέπει να είναι παχύφυλλα. Τα περισσότερα CAM φυτά ανήκουν στην οικογένεια Crassulaceae, Euphorbiaceae και Cactaceae. Βασικό γνώρισμα των φυτών αυτών είναι ότι την ημέρα τα στόματα είναι κλειστά, ενώ παραμένουν ανοιχτά κατά τη διάρκεια της νύχτας. Η πρόσληψη του  $\text{CO}_2$  γίνεται κατά τη διάρκεια της νύχτας, ενώ ταυτόχρονα πραγματοποιείται το μεγαλύτερο μέρος της διαπνοής. Το  $\text{CO}_2$  αποταμιεύεται στα χυμοτόπια με τη μορφή του μηλικού οξέος. Η καρβοξυλίωση πραγματοποιείται τη νύχτα από την καρβοξυλάση του φωσφοενολικού πυροσταφυλικού οξέος (καρβοξυλάση της PEP) για να σχηματίσει το οξαλοξικό οξύ (OAA). Το φως της μέρας διευκολύνει την απελευθέρωση του μηλικού οξέος από τα χυμοτόπια για να ακολουθήσει η αποκαρβοξυλίωση του με αποτέλεσμα να ελευθερώνει  $\text{CO}_2$ . Η βιολογική σημασία των CAM δίνεται στην ανάπτυξη ενός μηχανισμού, που συμβάλλει στη μείωση απώλειας νερού κατά τη διάρκεια ανταλλαγής αερίων. Τα CAM φυτά επομένως μπορούν να θεωρηθούν φυτικά είδη που προσαρμόζονται σε συνθήκες ξηρασίας (Καράταγλης, 1999).

## 5. Αναπνοή – Κεντρικός Μεταβολισμός του άνθρακα

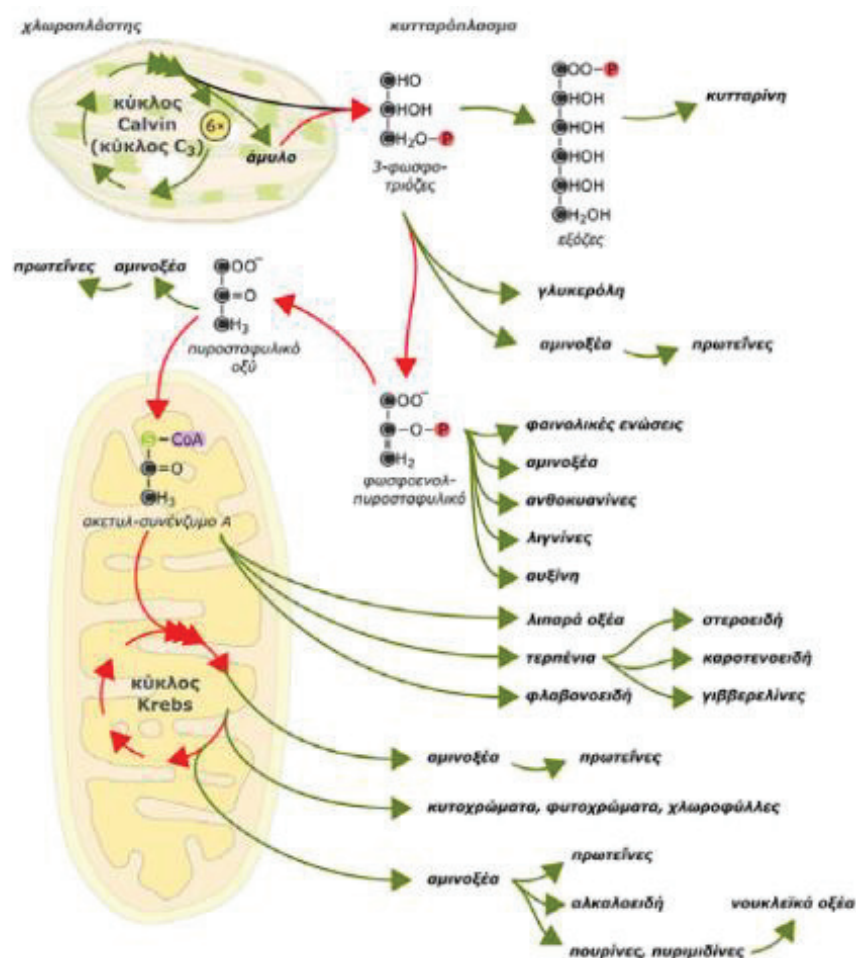
Η αναπνοή είναι η λειτουργία μέσω της οποίας τα κύτταρα όλων των οργανισμών εξασφαλίζουν την απαιτούμενη ενέργεια για την επιβίωσή τους μέσω της ελεγχόμενης οξείδωσης οργανικών υποστρωμάτων. Τα υποστρώματα είναι συνήθως φωτοσύνθεσης και της γλυκονεογένεσης. Μέσω της αναπνοής παράγονται οι κατάλληλες πρόδρομες ενώσεις για τη βιοσύνθεση πολυάριθμων απαραίτητων συστατικών. Η γλυκόζη αποτελεί το πιο συνηθισμένο αναπνευστικό υπόστρωμα ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις είναι κυρίως τα λιπαρά οξέα. Η ενέργεια που παράγεται αποθηκεύεται με τη μορφή φωσφορικών δεσμών υψηλών δεσμών (ATP), ή με τη μορφή αναγωγικών ισοδύναμων (NADPH), όπου κατά τη διάρκεια της διαδικασίας καταναλώνεται  $O_2$  και παράγονται ως υποπροϊόντα,  $CO_2$  και  $H_2O$  (Καραμπουρνιώτης κ.α. 2012). Η λειτουργία της αναπνοής συνοψίζεται στην απλουστευμένη εξίσωση που παρουσιάζεται πιο κάτω.



Εντούτοις η απλουστευμένη αυτή εξίσωση περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό αντιδράσεων, οι οποίες λαμβάνουν χώρα σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα και καταλύονται από διαφορετικά ένζυμα. Αυτή η σταδιακή οξείδωση των οργανικών ενώσεων επιτρέπει τη σύνθεση του ATP και του NADPH. Επιπρόσθετα, καθώς πραγματοποιούνται οι διαδοχικές αυτές αντιδράσεις, τα ενδιάμεσα προϊόντα μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως πρόδρομα μόρια για τη βιοσύνθεση άλλων μεταβολιτών. Στους μεταβολίτες αυτούς περιλαμβάνονται για παράδειγμα τα αμινοξέα τα οποία αποτελούν απαραίτητα δομικά συστατικά των πρωτεϊνών, ή πρόδρομα μόρια άλλων μεταβολιτών, ωσμορυθμιστές, τα νουκλεοτίδια για τη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων, πρόδρομες ενώσεις για τη σύνθεση χρωστικών και λιπιδίων, καθώς και πρόδρομα μόρια των δευτερογενών μεταβολιτών. Συνήθως ένα μέρος από τα αναπνευστικά υποστρώματα οξειδώνεται πλήρως σε  $CO_2$  και  $H_2O$ , ενώ τα υπόλοιπα χρησιμοποιούνται ως πρόδρομα μόρια για τη σύνθεση άλλων μεταβολιτών κυρίως όταν τα κύτταρα βρίσκονται σε φάση έντονης αύξησης ή/και διαφοροποίησης.

Στα κύτταρα η λειτουργία της αναπνοής αυτή συμβαίνει συντονισμένα ως ένα ενιαίο λειτουργικό σύνολο και χωρίζεται σε 4 κύρια στάδια: τη γλυκόλυση, τη συνδετική αντίδραση γλυκόλυσης-κύκλου του Krebs, τον κύκλο του Krebs ή κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων και την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων ή

αναπνευστική αλυσίδα. Στο κυτταρόπλασμα πραγματοποιείται η γλυκόλυση και τα άλλα τρία στάδια στα μιτοχόνδρια. (Καραμπουρνιώτης κ.α., 2012). Τα μεταβολικά αυτά μονοπάτια συνδέονται μέσω των ενδιάμεσων προϊόντων και με άλλα όπως το μονοπάτι των λιπαρών οξέων, τον κύκλο των φωσφοροπεντοζών και τα μονοπάτια που οδηγούν σε σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών. Επιπρόσθετα, μέσω των αναβολικών αυτών διαδικασιών παράγονται μόνο οι μεταβολίτες που χρειάζονται για την κάλυψη των αναγκών ανάπτυξης την παρούσα στιγμή αλλά μέσω των μεταβολικών αντιδράσεων δίνεται η δυνατότητα αποταμίευσης σκελετών άνθρακα και ενέργειας σε μεγαλομοριακές ενώσεις (πχ. άμυλο), οι οποίες διασπώνται όταν



Εικόνα 4. Ο κεντρικός μεταβολισμός του άνθρακα (Γλυκόλυση- Κύκλος Krebs) και τα μόρια που παράγονται από πρόδρομα μόρια του. Οι αντιδράσεις αναβολισμού σημειώνονται με πράσινα βέλη, ενώ αυτές του καταβολισμού με κόκκινα (Καραμπουρνιώτης κ.α., 2016)

υπάρξει ανάγκη στο φυτό. Αυτή η δυνατότητα των φύλλων και κατ' επέκταση των φυτών είναι καθοριστικής σημασίας, αφού τα φύλλα μέσω της λειτουργίας της φωτοσύνθεσης έχουν πλεόνασμα σκελετών άνθρακα και ενέργειας.

## 6. Βιοτικές καταπονήσεις

Οι φυτικοί οργανισμοί βρίσκονται συνεχώς σε επαφή με ένα εχθρικό βιοτικό περιβάλλον (έντομα, νηματώδεις, ιοί, βακτήρια κλπ). Μέσω της εξέλιξης και λόγω της μη ικανότητας των φυτών να μετακινηθούν, ανέπτυξαν μηχανισμούς προσαρμογής και εγκλιματισμού για θωρακιστούν έναντι των διαφορετικών παραγόντων καταπόνησης. Κατά συνέπεια δημιούργησαν δομές άμυνας και αγκάθια, τρίχες, εφυμενίδα καθώς και βιοχημικό οπλόστάσιο (πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες) για την αντιμετώπιση των καταπονήσεων (Καραμπουρνιώτης κ.α., 2012; Λεβίζου, 2019).

### 6.1. Επαγόμενη άμυνα έναντι εντόμων

Τα έντομα προκαλούν ζημιές μηχανικές στους ιστούς, το είδος και η ένταση των οποίων εξαρτώνται από την τακτική κατανάλωσης τροφής που επιλέγει το έντομο. Τόσο τα έντομα όσο και τα φυτά αποστέλλουν και δέχονται χημικά μηνύματα κατά τη διάρκεια της αλληλεπίδρασης όπου καθορίζεται η πρόοδος της προσβολής ή της αμυντικής αντίδρασης. Τα έντομα μέσω των διαφόρων μελών του σώματος όπως κεραιών, των μερών του στόματος ή των ποδιών τους βρίσκουν τον κατάλληλο ιστό για κατανάλωση και από την άλλη τα φυτά ανιχνεύουν τον τραυματισμό των κυττάρων τους και αντιδρούν κατάλληλα. Όταν καταρρίπτεται προϋπάρχουσα άμυνα ενεργοποιείται η επαγόμενη άμυνα για την αντιμετώπιση του εισβολέα κάτι που συμβαίνει και στην περίπτωση των παθογόνων. Αν υπάρχει επιτυχία στον συνδυασμό της προϋπάρχουσας και επαγόμενης άμυνας τότε έχουμε αποτέλεσμα ανθεκτικότητας σε ευρύ φάσμα ειδών εντόμων (Heil, 2007; Svodova and Boland, 2010; Καραμπουρνιώτης κ.α., 2012).

Το ανοσοποιητικό σύστημα των φυτών έναντι των βιοτικών παραγόντων καταπόνησης στηρίζεται σε ένα σύστημα επιτήρησης του κάθε κυττάρου που αντιλαμβάνεται τον κίνδυνο ενεργοποιώντας την επαγόμενη άμυνα και παράλληλα μεταδίδει την πληροφορία σε διασυστηματικό επίπεδο, ώστε ο οργανισμός να είναι έτοιμος σε μελλοντική προσβολή.

Η ενεργοποίηση της επαγόμενης άμυνας μετά από μία προσβολή χωρίζεται σε τρία στάδια:

## 1. Το στάδιο αντίληψης

Το στάδιο της αντίληψης είναι σημαντικό, διότι συνδέεται με την ταχύτητα εκδήλωσης της επαγόμενης άμυνας, όσο και με την αποφυγή άστοχης εκδήλωσης. Η διάκριση μεταξύ κατανάλωσης ιστών από έντομα και απλών μηχανικών τραυμάτων γίνεται μέσω της αντίληψης του μοριακού πρότυπου του φυτοφάγου (Herbivore-Associated Molecular Pattern, HAMP) στο οποίο συμπεριλαμβάνονται οι κατάλληλοι διεγέρτες (διεγέρτες που σχετίζονται με φυτοφάγα - Herbivore-Associated elicitors, HAEs). Αυτοί οι διεγέρτες χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Στην πρώτη έχουμε μόρια τα οποία προέρχονται από τα φυτοφάγα και συνήθως εντοπίζονται στα υγρά της ωοτοκίας ή στις εκκρίσεις σιελογόνων αδένων. Στη δεύτερη έχουμε ποικιλία μοριακών δομών που προέρχονται από τραυματισμένους φυτικούς ιστούς, αλλά έχουν τροποποιηθεί από τη δράση των φυτοφάγων. Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν ορισμένα μόρια που βρίσκονται στο σάλιο των εντόμων και αποτελούν τροποποιημένες μορφές λιπιδίων (λιπαρά οξέα ενωμένα με αμινοξέα) και λιπαρά οξέα που περιέχουν θείο (σελιφερίνες). Το λιπαρό οξύ προέρχεται από το έντομο ενώ το αμινοξύ από τους φυτικούς ιστούς.

Οι διεγέρτες που προαναφέρθηκαν λαμβάνουν μέρος μόνο σε αλληλεπιδράσεις συγκεκριμένου φυτικού είδους με συγκεκριμένο είδος εντόμου και δεν αφορούν γενικευμένα σήματα προσβολών. Ο τρόπος διατροφής των εντόμων φαίνεται να επηρεάζει τον μηχανισμό αντίληψης των σημάτων κινδύνου. (Heil, 2007; Svodova and Boland, 2010; Καραμπουρνιώτης, 2012).

## 2. Στάδιο διαβίβασης σήματος

Με την αντίληψη των διεγερτών έχουμε τη διαβίβαση σήματος προκειμένου να δρομολογηθεί ο μηχανισμός της επαγόμενης άμυνας. Στη διαβίβαση εμπλέκεται η καλμοντουλίνη, η οποία ενεργοποιείται με την αύξηση συγκέντρωσης του κυτταροπλασματικού ασβεστίου και παρατηρείται σε πολλές προσβολές εντόμων. Υπάρχουν κάποιες ενδείξεις ότι σε αλληλεπιδράσεις τύπου «γονίδιο προς γονίδιο» στη διαβίβαση σήματος εμπλέκονται οι μιτωτικές κινάσες. Τον ρόλο του κεντρικού σήματος διαβίβασης στην επαγόμενη άμυνα έναντι των εντόμων έχει η ορμόνη γιασμονικό οξύ. Το γιασμονικό οξύ έχει σημαντικό ρόλο στο κεντρικό σήμα διαβίβασης στην επαγόμενη άμυνα, προκαλώντας την έκφραση εκατοντάδων αμυντικών γονιδίων. Τόσο η συστεμίνη, όσο και το γιασμονικό οξύ μεταφέρονται

διασυστηματικά μέσω του ηθμού και ενεργοποιούν την έκφραση γονιδίων τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή παραμποδιστών των πρωτεϊνών, των πτητικών σημάτων και των δευτερογενών μεταβολιτών. (Heil, 2007; Svodova and Boland,2010; Καραμπουρνιώτης, 2012).

### 3. Στάδιο της απάντησης

Ως τελικό αποτέλεσμα από την αντίληψη προσβολής από φυτοφάγα έντομα, έχουμε την ενεργοποίηση μηχανισμών επαγόμενης άμυνας. Οι αμυντικοί μηχανισμοί πραγματοποιούνται τόσο σε τοπικό, όσο και σε διασυστηματικό επίπεδο. Αυτές οι αντιδράσεις μπορεί να έχουν είτε άμεσο, είτε έμμεσο χαρακτήρα, μέσω της προσέλκυσης «των εχθρών του εχθρού» (Heil 2007; Svodova and Boland 2010).

#### 6.2. Τα χαρακτηριστικά του εντόμου *Spissistilus festinus* που προσβάλλει το αμπέλι

Το έντομο *Spissistilus festinus* είναι ένα είδος Hampback, από το γένος *Spissistilus* και είναι ευρέως διαδεδομένο στη νότια Αμερική καθώς και στην κεντρική και βόρεια Αμερική. Είναι ένα έντομο με πράσινο χρώμα μήκους 6 έως 7 mm, έχει ένα πρόνωτο που καταλήγει στο πίσω μέρος στο άκρο της κοιλίας, ενώ χαρακτηριστικό του είναι δύο σημεία που εξέχουν και θυμίζουν ώμους. Τα αρσενικά είναι ελαφρώς μικρότερα από τα θηλυκά (Godoy, Miranda and Nishida, 2006).



Εικόνα 5. Φωτογραφία ενήλικου ατόμου του εντόμου *Spissistilus festinus*

Το *Spissistilus festinus* προσβάλλει μίσχους και βλαστούς του φυτού-ξενιστή και με τα μασητικού-μυζητικού τύπου στοματικά μόρια του τρέφεται κυρίως με το περιεχόμενο των αγγείων του ηθμού. Κατά τη διάρκεια της προσβολής δημιουργείται ένας δακτύλιος νεκρωτικού ιστού που περιγράφεται ως νεκρωτική ζώνη (Wildermuth 1915, Beyer et al. 2017). Το αμπέλι αποτελεί ένα σημαντικό φυτό ξενιστή για την

αναπαραγωγή του εντόμου ενώ έως τώρα η προσβολή από το έντομο αποτελεί προσβολή μικρής οικονομικής σημασίας (Smith, 2013; Preto et al. 2018;). Το ενδιαφέρον γύρω από το έντομο *S. festinus* έχει αυξηθεί δραματικά μετά από μια αναφορά που το καταδεικνύει ως φορέα του ιού ερυθρά κηλίδα της αμπέλου (GRBV) σε μια μελέτη θερμοκηπίου (Bahder, et al. 2016). Η GRBV είναι μια σοβαρή ίωση του αμπελιού με σημαντικές επιπτώσεις στην παραγωγή και κατά συνέπεια οικονομική απειλή, γιατί προκαλεί καθυστέρηση ωρίμανσης, μείωση συγκέντρωσης σακχάρων στο σταφύλι καθώς και αλλαγές στις συγκεντρώσεις των δευτερογενών μεταβολιτών που σχετίζονται με το άρωμα, τη γεύση και το χρώμα (Calvi 2011, Al Rwahnih et al. 2013, Sudarshana et al. 2015, Wallis and Sudarshana 2016, Blanco-Ulate et al. 2017). Στην Ελλάδα δεν υπάρχουν έως τώρα καταγραφές για πληθυσμούς του εντόμου σε αμπελώνες.



Εικόνα 6. Προσβολή βλαστού από το έντομο *Spissistilus festinus*



## 7. Βιολογία συστημάτων

Η Συστημική Βιολογία αποτελεί ένα νέο πεδίο και αναφέρεται στην ποσοτική ανάλυση των δυναμικών αλληλεπιδράσεων των διαφόρων συστατικών ενός βιολογικού συστήματος και έχει ως στόχο την ολιστική κατανόηση του συστήματος ολιστικά. Το πεδίο αυτό έχει στόχο τη διαμόρφωση και ανακάλυψη καινούργιων ιδιοτήτων των κυττάρων, ιστών, οργανισμών που λειτουργούν ως σύστημα του οποίου η θεωρητική περιγραφή είναι δυνατή με τη χρήση τεχνικών που εμπίπτουν με στην αρμοδιότητα της συστημικής βιολογίας. Ως αντικείμενο μελέτης είναι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών των βιολογικών συστημάτων και πως αυτές εγείρουν τη λειτουργία-συμπεριφορά του εν λόγω συστήματος. Η διαδικασία είναι η ακόλουθη. Κατασκευάζεται ένα υπολογιστικό μοντέλο για να προτείνει συγκεκριμένες ελέγξιμες υποθέσεις για ένα βιολογικό σύστημα, στην συνέχεια ακολουθεί η πειραματική επιβεβαίωση και τέλος χρησιμοποιώντας τη νεοαποκτηθείσα ποσοτική περιγραφή βελτιώνεται το υπολογιστικό μοντέλο-θεωρία.

Η συστηματική βιολογία σε συνδυασμό με τη μαθηματική μοντελοποίηση και την θεωρία ανάλυσης δικτύων έδωσαν τη δυνατότητα ολιστικής μελέτης α) των διαφορετικών επιπέδων κυτταρικής λειτουργίας και β) ενός βιολογικού συστήματος (Kell DB. Theodor Bucher, 2005).

### Πεδία της βιολογίας συστημάτων

Τα πεδία της βιολογίας συστημάτων είναι η γονιδιωματική (Genomics), η μεταγραφωματική (Transcriptomics), η πρωτεομική (Proteomics) και η μεταβολομική (Metabolomics) που αποτελεί την πιο πρόσφατη τεχνική ανάλυση. Η μεταβολομική σκιαγραφεί και γεφυρώνει την απόσταση μεταξύ φαινότυπου και γενότυπου συμπληρώνοντας την εικόνα της βιολογίας συστημάτων (Kell, 2004).

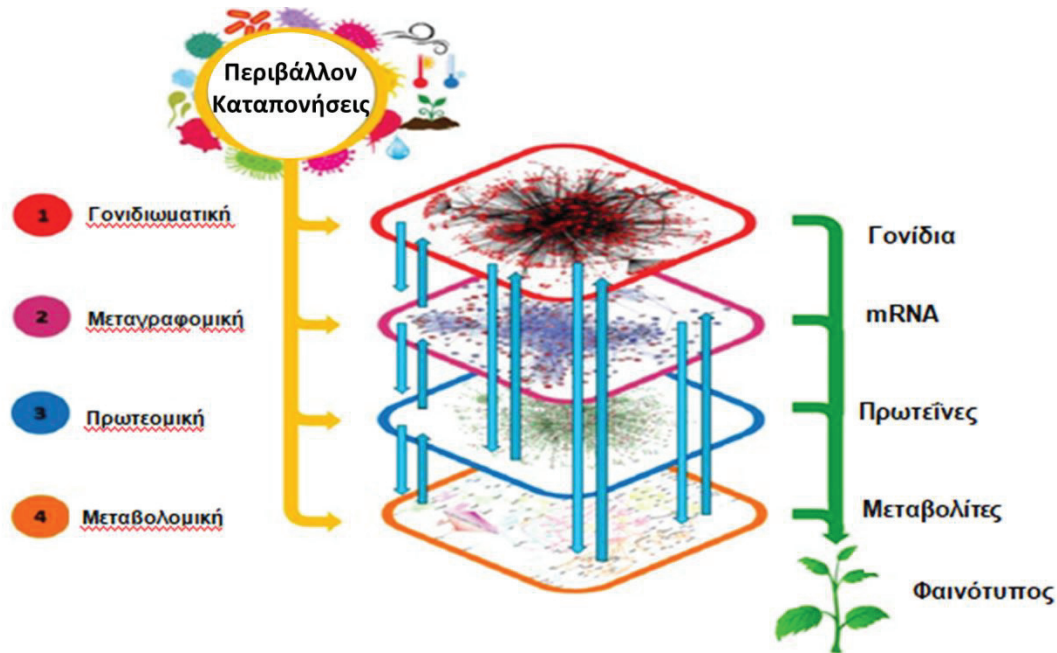
#### 7.1. Μεταβολομική

Η υψηλής απόδοσης ανάλυση της φυσιολογίας ενός Βιολογικού Συστήματος σε μεταβολικό επίπεδο ονομάζεται μεταβολομική. Η μεταβολομική ως υψηλή απόδοση τεχνικής, αφορά τον ταυτόχρονο προσδιορισμό και ποσοτικοποίηση της σχετικής συγκέντρωσης μεγάλου αριθμού ελεύθερων μεταβολιτών μικρού μοριακού βάρους (αμινοξέα, σάκχαρα, λιπαρά οξέα, δευτερογενείς μεταβολίτες) υπό συγκεκριμένες συνθήκες φυσιολογίας. Είναι μια ολιστική αναλυτική προσέγγιση της μεταβολικής

φυσιολογίας ενός οργανισμού που παρέχει το μεταβολικό αποτύπωμα σε δεδομένο χρόνο και δεδομένες συνθήκες. Σε σχέση με τις άλλες τεχνικές υψηλής απόδοσης πλεονεκτεί, με τα περισσότερα πλεονεκτήματα να αφορούν κυρίως το κυτταρικό επίπεδο λειτουργίας που μελετάμε με αυτήν την τεχνική δηλαδή τον μεταβολισμό.

Τα πλεονεκτήματα είναι τα εξής: (Goodacre et al., 2004)

1. Προσεγγίζει όλα τα επίπεδα κυτταρικής ρύθμισης, δηλαδή τις ρυθμίσεις που συντελούνται σε επίπεδο μεταγραφής, μετάφρασης



Εικόνα 7. Τα επίπεδα της κυτταρικής λειτουργίας. Από το μοριακό επίπεδο στον φαινότυπο (Claude Y. Hamany Djande et al., 2020)

2. Ο μεταβολισμός από τα τέσσερα επίπεδα πληροφορίας αντιπροσωπεύει το επίπεδο εκείνο που συνδέεται στενότερα με τον φαινότυπο και την φυσιολογία ενός βιολογικού συστήματος. Τα τελικά προϊόντα αποτελούν οι ελεύθεροι μεταβολίτες του κυττάρου και αποτελούν τα πραγματικά μεταβολικά γεγονότα σε μια δεδομένη στιγμή της ζωής ενός κυττάρου.

3. Η μεταβολομική ανάλυση ενός δείγματος είναι πιο οικονομική σε σχέση με άλλες ομικές αναλύσεις και γι' αυτό και θα μπορούσε να εφαρμοστεί σε αναλύσεις ρουτίνας σε νοσοκομεία ακόμα και σε προτυποποιημένες μονάδες αγροτικής παραγωγής.

4. Με τη μεταβολομική μπορούν να καταγραφούν οι μεταβολές στα επίπεδα των μεταβολιτών που δεν οφείλονται μόνο σε γενετικές αλλαγές αλλά και σε περιβαλλοντικές αλλαγές και καταπονήσεις.

5. Η πολύπλοκη ρύθμιση των στενά συνδεδεμένων αντιδράσεων του μεταβολικού δικτύου έχει ως αποτέλεσμα ελάχιστες διαφοροποιήσεις στο πρωτέωμα (αλλαγή συγκέντρωσης ολιγάριθμων ενζύμων) δημιουργώντας αλλαγές στη συγκέντρωση πολλών μεταβολιτών.

Η μεθοδολογία όμως παρουσιάζει και κάποια αρνητικά:

1. Δεν έχει αναπτυχθεί μέχρι στιγμής κάποια τεχνική που θα δίνει τη δυνατότητα για ταυτόχρονη ανάλυση όλων των κατηγοριών των μεταβολιτών. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι μεταβολίτες ανήκουν σε διαφορετικές χημικές ομάδες, παρουσιάζουν έχουν διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες και συγκεντρώσεις.

2. Ένα μεταβολίτης μπορεί να συμμετέχει σε πολλά μεταβολικά μονοπάτια, προκαλώντας δυσχέρειες στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων (Fiehn, 2002; Griffin, 2004; Griffin, 2006; Goodacre et al., 2005).

### **7.1.1. Μεταβολομική Ανάλυση και Καταπονήσεις**

Οι καταπονήσεις που συσχετίζονται με το περιβάλλον ανάπτυξης των φυτών είναι ένα πολύ σημαντικός παράγοντας μείωσης της απόδοσης των καλλιεργειών. Τα φυτά έρχονται αντιμέτωπα με έναν ή περισσότερους παράγοντες καταπόνησης κατά τη διάρκεια του βιολογικού κύκλου τους. Ο τρόπος που επιδρούν οι παράγοντες καταπόνησης καθώς και οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας αποτελούν ερευνητικό αντικείμενο αιχμής με στόχο την ανάπτυξη εργαλείων πρόβλεψης των καταπονήσεων πριν γίνουν ορατές στον φαινότυπο και κατ' επέκταση βελτιωμένων γονοτύπων, που να είναι ανθεκτικότεροι στις καταπονήσεις και με υψηλότερες αναμενόμενες αποδόσεις. Έχει μεγάλη σημασία η μελέτη της επίδρασης των παραγόντων καταπόνησης και σε σχέση με την κλιματική αλλαγή (ξηρασία, αύξηση CO<sub>2</sub>) και με τη γεωργική παραγωγή. Οι νέες τεχνολογίες βιομοριακής ανάλυσης υψηλής απόδοσης (ή ομικές αναλύσεις) στη συστημική βιολογία μπορούν να προσφέρουν μια ολιστική και αξιόπιστη εικόνα της μοριακής φυσιολογίας. Σε αυτό το επίπεδο, η μεταβολομική ανάλυση θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο παρακολούθησης της ποιότητας των φυτικών καλλιεργειών εφόσον βρίσκει εφαρμογή τα τελευταία χρόνια όλο και πιο συχνά για τη μελέτη απόκρισης των

φυτών σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις (οικομεταβολομική) (Duque, A.S., et al., 2013). Σε βιβλιογραφικές μελέτες με φυτά-μοντέλα έχουν δείξει για παράδειγμα ότι η υδατική καταπόνηση ή υψηλή αλατότητα στο έδαφος ή στο θρεπτικό μέσο προκαλεί στα φυτά την αύξηση της συγκέντρωσης συγκεκριμένων μεταβολιτών που μπορούν να δράσουν οσμωπροστατευτικά μειώνοντας ή εμποδίζοντας τις απώλειες νερού λόγω διαφοράς ωσμωτικού δυναμικού. Ανάλογα με το είδος του φυτού, διαφορετικοί μεταβολίτες μπορούν να δράσουν ως συμβατοί οσμωλύτες και να προστατεύσουν τα φυτά από καταπονήσεις. Τα σάκχαρα, τα αμινοξέα και οι μπεταΐνες αποτελούν κύριες χημικές ενώσεις που παράγουν τα φυτά ως ωσμωπροστατευτικά (Τοουλάκου et al. 2016, Manolaki et al. 2020).

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η επίδραση του περιβάλλοντος ανάπτυξης στον μεταβολισμό των φυτών είναι καταλυτική και πρέπει να μελετηθεί με συστημικό και συστηματικό τρόπο γιατί επηρεάζει το αρχικό στάδιο των φυτών κατ' επέκταση την καλλιέργεια και την παραγωγή. Με τις σύγχρονες μεθόδους υψηλής απόδοσης όπως η μεταβολομική θα μπορούσαν να βοηθήσουν στην έγκαιρη διάγνωση παρεκκλίσεων από την αναμενόμενη κατάσταση ανάπτυξης (φυσιολογίας) ώστε να υπάρχει αρκετός χρόνος για την αντιμετώπιση τους πριν να επηρεαστεί η ποσότητα και η ποιότητα της παραγωγής. Αυτό θα οδηγήσει και στη δημιουργία πρωτοκόλλων για την προτυποποίηση και πιστοποίηση της παραγωγής και της ποιότητας προϊόντων αγροδιατροφής, βάση σύγχρονων μεθόδων υψηλής ακρίβειας και ευαισθησίας (Τοουλάκου, 2013).

### **7.1.2. Τεχνικές μεταβολομικής ανάλυσης-**

Για τη μεταβολομική ανάλυση χρησιμοποιούνται κλασσικές μέθοδοι που επιτρέπουν την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση μιγμάτων οργανικών και μορίων χαμηλού μοριακού βάρους. Η σπουδαιότητα αυτής της καινοτομίας είναι ότι διερευνά ολόκληρο το μεταβολικό πρότυπο και όχι μόνο μια συγκεκριμένη τάξη μορίων.

Ανάμεσα στις αναλυτικές πλατφόρμες που εφαρμόζονται στον τομέα της μεταβολομικής, οι ευρέως χρησιμοποιούμενες τις τελευταίες 2 δεκαετίες βασίζονται σε 3 μεγάλες αναλυτικές τεχνικές που είναι κατάλληλες για μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση. Σε αυτές ανήκουν η φασματομετρία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) φασματοσκοπία, η αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS) και η υγρή χρωματογραφία φασματοσκοπία μάζας (LC-MS). Έως τώρα δεν

υπάρχει μια καθολική αναλυτική πλατφόρμα, που θα μπορούσαν να ανακτηθούν ταυτόχρονα όλοι οι μεταβολίτες που υπάρχουν *in vivo* τη δεδομένη στιγμή στον οργανισμό. Η κάθε μια από αυτές τις τεχνικές αναλύσεις έχει τα δικά της πλεονεκτήματα και μοναδικά χαρακτηριστικά. Πολλές φορές, είναι προτιμότερο να συνδυάζονται 2 ή 3 αναλυτικές πλατφόρμες για την εξαγωγή ολοκληρωμένων αποτελεσμάτων, καλύπτοντας την ποσοτικοποίηση ενός ευρύτερου φάσματος μεταβολιτών.

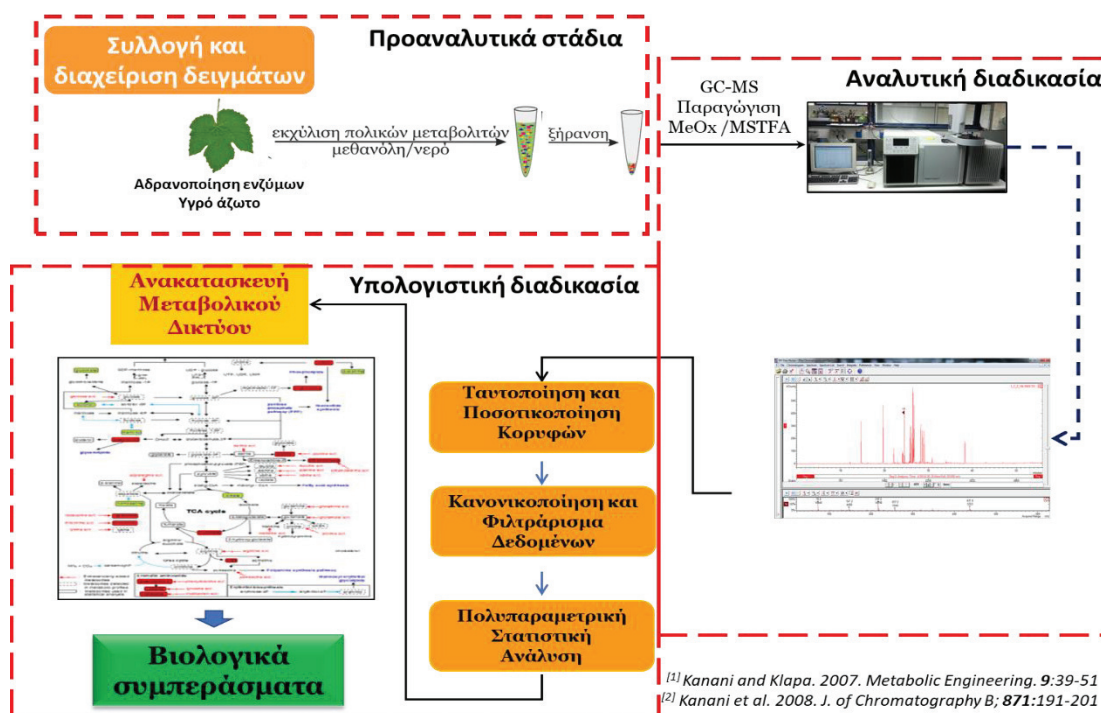
Ο συνδυασμός αέριας ή υγρής χρωματογραφίας για διαχωρισμό με την φασματομετρία μάζας για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση ενός μίγματος ενώσεων αποτελεί ένα ισχυρό αναλυτικό εργαλείο στη μεταβολομική ανάλυση.

### **7.1.3. Μεταβολομική ανάλυση με Αέρια χρωματογραφία-Φασματομετρία μάζας (GC-MS)**

Η μεταβολομική είναι μια πολυβηματική διαδικασία, η οποία έχοντας ως αφορμή ένα βιολογικό ερώτημα, με τον κατάλληλο πειραματικό σχεδιασμό έχει ως στόχο την εξαγωγή σημαντικών βιολογικών συμπερασμάτων. Στη μεταβολομική ανάλυση, όπως και στις υπόλοιπες υψηλής απόδοσης αναλύσεις ακολουθούνται συγκεκριμένα βήματα υπό συγκεκριμένες συνθήκες ανάλογα με το βιολογικό δείγμα και την εκάστοτε ομική πλατφόρμα.

Συνοπτικά τα στάδια της Μεταβολομικής ανάλυσης είναι τα εξής:

1. Προαναλυτικά στάδια. Συλλογή, πάγωμα των ενζυμικών διαδικασιών αποθήκευση του βιολογικού δείγματος
2. Κατάλληλη προετοιμασία και εκχύλιση του δείγματος ανάλογα με το εκάστοτε πρωτόκολλο
3. Ανάκτηση του μεταβολικού προτύπου
4. Κανονικοποίηση και φιλτράρισμα των δεδομένων
5. Πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση
6. Ανακατασκευή του μεταβολικού δικτύου.



Εικόνα 8. Η μεταβολομική ως μία πολυβηματική διαδικασία. Τα επιμέρους στάδια της μεταβολομικής ανάλυσης (Εικόνα από αρχείο Εργαστηρίου Μεταβολικής Μηχανικής και Συστημικής Βιολογίας).

πολυβηματική αυτή διαδικασία αποτελείται από προ-αναλυτικά (συλλογή και τον χειρισμό του δείγματος, το πάγωμα των ενζυμικών διαδικασιών) και αναλυτικά στάδια (εκχύλιση του δείγματος και χρήση αναλυτικής πλατφόρμας) και το υπολογιστικό μέρος (ταυτοποίηση μοριών, κανονικοποίηση και φιλτράρισμα και ανακατασκευή δικτύου) (Εικόνα 8).

Στις επόμενες υποενότητες αναλύονται τα παραπάνω βήματα χρησιμοποιώντας την αναλυτική πλατφόρμα της Αέριας τα οποία και ακολουθήθηκαν στην παρούσα εργασία.

## 1. Προαναλυτικά στάδια

Ένα από τα πιο σημαντικά στάδια άλλα υποτιμώμενα σε μια μελέτη είτε στη μεταβολομική είτε όχι είναι η συλλογή και η προετοιμασία των δειγμάτων πριν την ανάλυση τους. Το προ-αναλυτικό στάδιο στην μεταβολομική έχει μεγάλη σημασία καθώς είναι πολύ σημαντικό το μεταβολικό πρότυπο που αποκτάμε να αντιπροσωπεύει την *in vivo* κυτταρική φυσιολογία. Γι' αυτό τον σκοπό, οποιαδήποτε απαιτούμενη προ-αναλυτική διαδικασία θα πρέπει να προσαρμόζεται κατάλληλα ώστε να υπάρχει ελάχιστη επίδραση στην κυτταρική φυσιολογία (Kanani, Chrysanthopoulos, & Klara, 2008). Υπάρχουν δύο προ-αναλυτικές φάσεις. Η πρώτη είναι η συλλογή και αποθήκευση του δείγματος. Στη δεύτερη φάση έχουμε την προ-

επεξεργασία των αποθηκευμένων δειγμάτων ώστε να αναλυθούν με μεταβολομική ανάλυση.

Το «πάγωμα» των ενζυμικών διεργασιών του βιολογικού δείγματος αποτελεί σημαντικό αντικείμενο της έρευνας των επιστημών ζωής. Για τη μεταβολομική η αδρανοποίηση των ενζυμικών διεργασιών, αποτελεί ζωτικής σημασίας στάδιο της προ-αναλυτικής διαδικασίας το οποίο θα πρέπει να εξασφαλίζει καθόλου ή ελάχιστες αλλαγές στα επίπεδα μεταβολιτών αλλά και να αποτελεί μια γρήγορη και εύκολα αναπαραγωγίσιμη μέθοδο. Μια από τις πιο συνηθισμένες μεθόδους παγώματος των κυττάρων είναι σε υγρό άζωτο ή η λύση των κυττάρων με έναν οργανικό διαλύτη, όπως η μεθανόλη.

## 2. Εκχύλιση μεταβολιτών

Στη μεταβολομική ανάλυση έχουμε σαν κύριο στόχο μέσω των προ-αναλυτικών σταδίων την αποτελεσματική απομόνωση του μέγιστου αριθμού μεταβολιτών του βιολογικού συστήματος που μελετάται κάθε φορά, προκειμένου το μεταβολικό πρότυπο που ανακτάται να αντιπροσωπεύει την κοντινότερη δυνατή στην πραγματική *in vivo* φυσιολογία. Η διαδικασία που περιγράφεται πιο πάνω ονομάζεται εκχύλιση και κρίνεται μεγάλης σημασίας να είναι αποτελεσματική, μη επιλεκτική και μη-καταστροφική μέθοδος. Συνήθως οι μεταβολίτες εκχυλίζονται είτε μόνο με οργανικούς διαλύτες (μεθανόλη, χλωροφόρμιο), είτε με οργανικούς διαλύτες σε συνδυασμό με νερό ή σε συνδυασμό με άλλους οργανικούς διαλύτες κάτω από διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας. Τα υδατικά διαλύματα αποτελούν την καλύτερη επιλογή για τους πολικούς μεταβολίτες αλλά έχουν μειωμένη απόδοση στην εκχύλιση λιπιδίων σε αντίθεση με τους οργανικούς διαλύτες. Όμως η εκχύλιση των μεταβολιτών δεν εξαρτάται μόνο από τους διαλύτες που χρησιμοποιούνται αλλά και από την αποτελεσματική απελευθέρωση τους από τα κύτταρα και την αποφυγή πιθανών παρεμβολών. Σε αυτή την εργασία, χρησιμοποιείται η αναλυτική πλατφόρμα Αέριας Χρωματογραφίας- Φασματομετρίας Μάζας δηλαδή μελετώνται μόνο πολικοί και ημιπολικοί μεταβολίτες του κεντρικού μεταβολισμού του άνθρακα. Ως κατάλληλος διαλύτης χρησιμοποιείται η μεθανόλη, η οποία πέρα από την ειδικότητα που έχει στην καταστολή των ενζυμικών διεργασιών, προκαλεί το άνοιγμα των πόρων της κυτταρικής μεμβράνης ώστε να γίνει δυνατή η εκχύλιση των πολικών και ημιπολικών μεταβολιτών. Το τελικό στάδιο της εκχύλισης είναι ο διαχωρισμός των

μεταβολιτών από τις κυτταρικές μεμβράνες, πρωτεΐνες και νουκλεοτίδια που διεξάγεται στη συνέχεια συνήθως με φυγοκέντρηση σε χαμηλή θερμοκρασία.

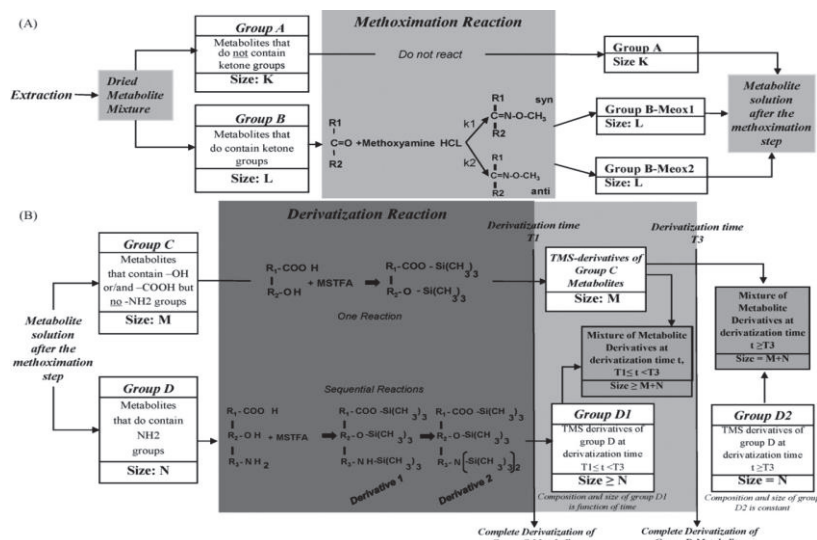
### 3. Παραγωγή Μεταβολιτών

Στις μεταβολομικές μελέτες που χρησιμοποιείται η Αέρια Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μάζας ο διαχωρισμός γίνεται στην αέρια φάση με βάση το μοριακό τους βάρος και τη δομή τους. Οι περισσότεροι μεταβολίτες δεν είναι πτητικοί και θερμικά σταθερά γι' αυτό και είναι απαραίτητη η παραγωγή τους από έναν ή περισσότερους παράγοντες παραγωγής. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι είναι οι μεθυλ-οξίμη (Methoxime, MeOx), η οποία μετατρέπει σε μεθοξυ-αμινομάδες τις κετονικές και αλδεϋδικές ομάδες των μορίων του δείγματος το N-μεθυλ-τριμεθυλπυριτο-τριφθορο-ακεταμίδιο (N-methyl-trimethylsilyl trifluoroacetamide, MSTFA), το οποίο αντικαθιστά τα ενεργά άτομα του υδρογόνου στις υδροξυλομάδες (-OH), καρβοξυλομάδες (-COOH) και αμινομάδες (-NH) με μια τριμέθυλπυριτο-ομάδα (Trimethylsilyl, TMS) (Sakamoto et al. 2010). Η αναλογία MeOx και MSTFA τροποποιείται ανάλογα με το είδος του ιστού.

Λόγω της ετερογένειας των μεταβολιτών, είναι δυνατόν η παραγωγή να επηρεάσει κάθε ομάδα με διαφορετικό τρόπο και να αποδώσει, σε ειδικές περιπτώσεις πολλαπλά παράγωγα. Σύμφωνα με τους Kannī & Klara 2008 οι μεταβολίτες ομαδοποιούνται σε τρεις διαφορετικές κατηγορίες ανάλογα με την χημική τους δομή και τα παράγωγα που σχηματίζουν. Η πρώτη κατηγορία αφορά μεταβολίτες που μετά από παραγωγή σχηματίζουν ένα παράγωγο και στη δομή τους σχηματίζουν υδροξυλομάδες (-OH) ή και καρβοξυλομάδες (-COOH). Τα ενεργά υδρογόνα των υδροξυλομάδων και καρβοξυλομάδων αντιδρούν ταυτόχρονα και γρήγορα με το MSTFA.

Η δεύτερη κατηγορία αποτελείται από μεταβολίτες οι οποίοι περιέχουν και κετονομάδες εκτός από υδροξυλομάδες και καρβοξυλομάδας. Οι μεταβολίτες αυτοί αντιδρούν με το MeOx παράγοντας παράλληλα δύο παράγωγα ( MeOx 1 και MeOx 2) τα οποία γεωμετρικά είναι ισομερή. Τα δύο γεωμετρικά ισομερή έχουν σταθερό λόγο εντός ενός βιολογικού δείγματος, ο οποίος είναι χαρακτηριστικός για κάθε μεταβολίτη. Ο λόγος αυτός χρησιμοποιείται ως κριτήριο για τον έλεγχο σταθερότητας των συνθηκών λειτουργίας του μηχανήματος.





Εικόνα 9 Σχεδιαγραμματική απεικόνιση της ομαδοποίησης των μεταβολιτών ανάλογα με τη χημική τους δομή και τα παράγωγα που σχηματίζουν (Kanani et al., 2008).

Στην τρίτη κατηγορία έχουμε μεταβολίτες που διαθέτουν και αμινομάδες. Αντίθετα από τις υδροξυλομάδες (-OH) και τις καρβοξυλομάδες (-COOH), τα δύο ενεργά υδρογόνα της αμινομάδας αντιδρούν διαδοχικά και πιο αργά δημιουργώντας πολλαπλά παράγωγα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο χρόνος που απαιτείται για την ολοκλήρωση της παραγωγίσης αυτών των μεταβολιτών είναι πολύ μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο χρόνο για τους μεταβολίτες των δύο παραπάνω κατηγοριών μπορεί να ξεπερνά τις 24 ώρες. Στο τέλος όμως, εξαιτίας της διαδοχής των αντιδράσεων ένα παράγωγο θα πρέπει να ανιχνεύεται το οποίο θα είναι ανάλογο με την αρχική συγκέντρωση του μεταβολίτη. Το άθροισμα των πολλαπλών παραγώγων που ανιχνεύεται στους χρόνους αυτούς δεν είναι ανάλογο με την ποσότητα του μεταβολίτη στο αρχικό δείγμα, χρησιμοποιείται ειδικός μαθηματικός αλγόριθμος για τον υπολογισμό του συντελεστή βάρους ( $w$ ) του κάθε παράγωγου για έναν μεταβολίτη και έπειτα υπολογίζεται το σταθμισμένο άθροισμα αυτών. Όμως, η διαδικασία της παραγωγίσης εισάγει σφάλματα που θα πρέπει να διορθωθούν ώστε να μην έχουμε πειραματικά σφάλματα.

#### 4. Ανάκτηση μεταβολικού προτύπου

Ανάμεσα στις αναλυτικές πλατφόρμες που εφαρμόζονται στον τομέα της μεταβολομικής, οι ευρέως χρησιμοποιούμενες τις τελευταίες 2 δεκαετίες βασίζονται σε 3 μεγάλες αναλυτικές τεχνικές που είναι κατάλληλες για μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση. Σε αυτές ανήκουν η φασματομετρία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) φασματοσκοπία, η αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας

(GC-MS) και η υγρή χρωματογραφία φασματοσκοπία μάζας (LC-MS). Έως τώρα δεν υπάρχει μια καθολική αναλυτική πλατφόρμα, που θα μπορούσαν να ανακτηθούν ταυτόχρονα όλοι οι μεταβολίτες που υπάρχουν *in vivo* τη δεδομένη στιγμή στον οργανισμό. Η κάθε μια από αυτές τις τεχνικές αναλύσεις έχει τα δικά της πλεονεκτήματα και μοναδικά χαρακτηριστικά. Πολλές φορές, είναι προτιμότερο να συνδυάζονται 2 ή 3 αναλυτικές πλατφόρμες για την εξαγωγή ολοκληρωμένων αποτελεσμάτων, καλύπτοντας την ποσοτικοποίηση ενός ευρύτερου φάσματος μεταβολιτών.

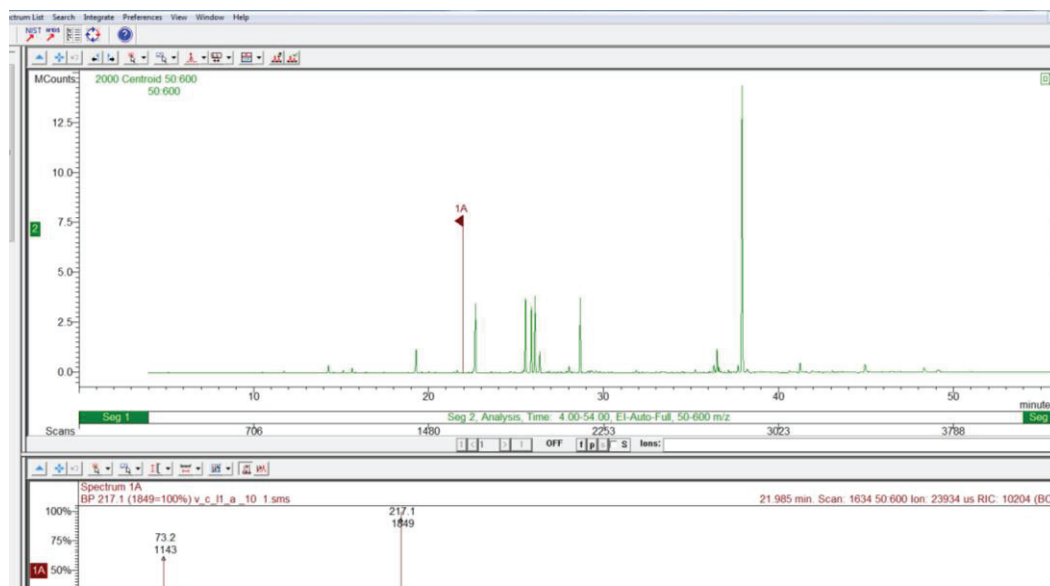
Ο συνδυασμός αέριας ή υγρής χρωματογραφίας για διαχωρισμό με τη φασματομετρία μάζας για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση ενός μίγματος ενώσεων αποτελεί ένα ισχυρό αναλυτικό εργαλείο στη μεταβολομική ανάλυση.

### **Ανάκτηση μεταβολικού προτύπου με Αέρια Χρωματογραφία - Φασματοσκοπία μάζας**

Το GC-MS αποτελείται από δύο στοιχεία, τον αέριο χρωματογράφο και το φασματόμετρο μάζας. Το μείγμα των μεταβολιτών, εγχέεται στον αέριο χρωματογράφο αφού γίνει πρώτα πτητικό μέσω παραγωγίσις, ακολουθεί ο διαχωρισμός των συστατικών του με βάση το μοριακό βάρος και τη δομή τους. Αμέσως μετά, το ήδη διαχωρισμένο μείγμα περνάει στο φασματόμετρο μάζας και γίνεται η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών. Με την αέρια χρωματογραφία έχουμε υψηλότερη διαχωριστική ικανότητα σε σχέση με την υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με το χαμηλό κόστος εξοπλισμού και ανάλυσης αλλά και με την εκτενή βιβλιοθήκη δεδομένων και πρωτοκόλλων που αποτελούν τα βασικότερα πλεονεκτήματα της μεθόδου γι' αυτό και προτιμάται περισσότερο στις μεταβολομικές αναλύσεις.

Η αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS) αναφέρεται στη βιβλιογραφία από τους James και Martin το 1952. Το GC-MS αποτελείται από δύο στοιχεία, τον αέριο χρωματογράφο και το φασματόμετρο μάζας. Βασική λειτουργία του αέριου χρωματογράφου είναι η εξαέρωση του δείγματος που εισάγεται σε μια ειδική, θερμαινόμενη υπό κενό υποδοχή, ο διαχωρισμός των μορίων του μίγματος εν μέσω μιας ειδικά κατασκευασμένης χρωματογραφικής στήλης και τέλος η ανίχνευση της κάθε ουσίας από τον ειδικό ανιχνευτή. Μόνο τα πτητικά και θερμικά σταθερά μόρια μπορούν να ποσοτικοποιηθούν. Όμως, επειδή δε διαθέτουν όλα τα μόρια τις

παραπάνω ιδιότητες είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί η αντίδραση του ξηρού μείγματος μεταβολιτών με έναν ή δύο παράγοντες παραγωγίσις όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως προκειμένου οι μεταβολίτες να γίνουν πτητικοί και θερμικά σταθεροί (Kanani et al., 2008). Η θερμοκρασία που πραγματοποιείται η χρωματογραφία ξεκινάει από τους 70°C φτάνοντας και τους 310°C. Η κινητή φάση του χρωματογράφου αερίων είναι ένα αδρανές αέριο (συνήθως ήλιο) όπου με τη βοήθειά του τα συστατικά του δείγματος περνούν μέσα στη στήλη η οποία αποτελεί τη χρωματογραφική στήλη την στατική φάση. Τα μόρια που βρίσκονται στη χρωματογραφική στήλη διαχωρίζονται στην αέρια φάση με βάση το μέγεθος και το σχήμα τους με τα μικρά και γραμμικά μόρια να εκλούνται πρώτα και τα μεγαλύτερα και πιο πολύπλοκα στη συνέχεια. Ο χρόνος παραμονής στη στήλη είναι χαρακτηριστικός για το εκάστοτε μόριο



Εικόνα 10. Χρωματογράφημα όπως προκύπτει από το λογισμικό Varian Inc MS Workstation

Σε αντίθεση με την αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS), η υγρή χρωματογραφία φασματομετρία μάζας (LC-MS) διενεργείται με το δείγμα να είναι σε υγρή φάση. Η κινητή φάση είναι υγρή και μεταβάλλεται η σύσταση της από υδρόφιλη σε υδρόφοβη με τη χρήση διαφορετικής πολικότητας οργανικών διαλυτών (βαθμιδωτή). Ανάλογα με τη συγγένεια προς την στατική η οποία μπορεί να είναι υδρόφιλη είτε υδρόφοβη και την κινητή φάση, τα μόρια μπαίνουν σε διαδικασία διαχωρισμού και εκλούνται μόλις διαλυθούν στην αντίστοιχη κινητή φάση.

Αφού τα μόρια διαχωριστούν είτε μέσω της υγρής είτε μέσω της αέριας χρωματογραφίας εισέρχονται στο φασματόμετρο μάζας το οποίο αποτελείται από

ιοντική παγίδα, τον αναλυτή μάζας και τον ανιχνευτή. Τα μόρια που εισέρχονται μέσω της γραμμής μεταφοράς (transfer line) στο φασματόμετρο, εισάγονται στην ιοντική παγίδα βομβαρδίζονται από δέσμες ηλεκτρονίων, σπάνε σε θραύσματα και ιονίζονται. Τα θραύσματα αυτά στην πραγματικότητα είναι φορτισμένα ιόντα ορισμένης μάζας και είναι χαρακτηριστικά του κάθε μορίου. Τα ιόντα στη συνέχεια υπόκεινται σ' ένα ηλεκτρομαγνητικό πεδίο και ανάλογα με τον λόγο μάζα/φορτίο ( $m/z$ ) ακολουθούν ορισμένη τροχιά μέσα στην ιοντική παγίδα του φασματόμετρου μάζας. Το φασματόμετρο μάζας είναι ένα όργανο που ποσοτικοποιεί τα μόρια και χρησιμοποιεί ως μέθοδο τον λόγο  $m/z$  με  $m$  τη μάζας και  $z$  το φορτίο του. Βασική αρχή προσδιορισμού των ιόντων μέσω του φασματόμετρου μάζας είναι ότι κάθε ιόν θα διαγράψει διαφορετική τροχιά στο ηλεκτρομαγνητικό πεδίο ανάλογα με τον λόγο μάζας προς το φορτίο ( $m/z$ ). Ο λόγος αυτός συνήθως αντιπροσωπεύει το μοριακό βάρος του θραύσματος καθώς τα περισσότερα θραύσματα φέρουν φορτίο +1. Το φασματόμετρο καλύπτει ένα εύρος  $m/z$  από 50-650. Το γράφημα που δημιουργεί το φασματόμετρο ονομάζεται φάσμα μάζας (mass spectrum).

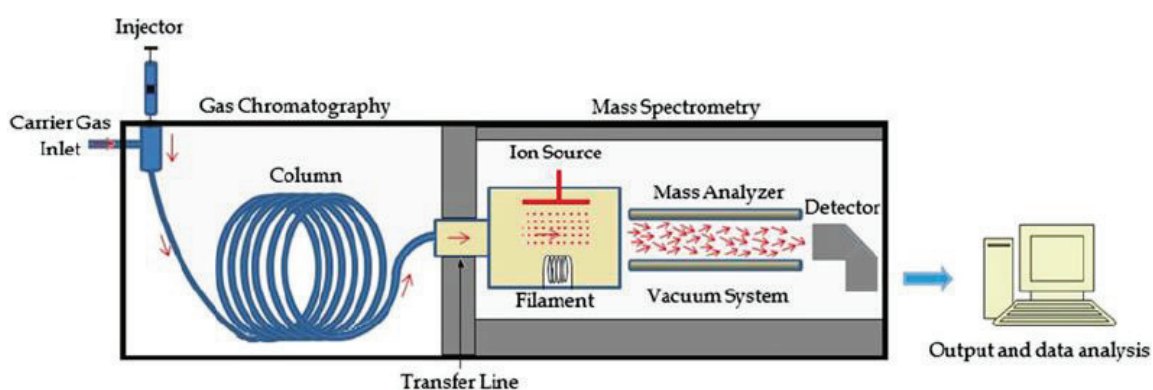
Από τον συνδυασμό χρωματογράφου και φασματόμετρου μάζας, τα δεδομένα που προκύπτουν είναι τρισδιάστατα. Από αυτές τις δύο διαστάσεις γίνεται αναφορά στο φάσμα μάζας (mass spectrum) και στην τρίτη ο χρόνος παραμονής στον χρωματογράφο αερίων κατά τον οποίο αποκτήθηκαν τα δεδομένα του φάσματος μάζας. Η τρισδιάστατη δομή των δεδομένων φαίνεται στην Εικόνα 5. Ο άξονας  $x$  αντιπροσωπεύει τον χρόνο παραμονής, ο άξονας  $y$  την ένταση, και ο άξονας  $z$  τους λόγους  $m/z$ . Το φάσμα μάζας αναπαρίσταται στο επίπεδο  $y-z$ . Στο επίπεδο  $x-y$  αναπαρίσταται η γραφική παράσταση της έντασης ενός επιλεγμένου ιόντος σε συνάρτηση με τον χρόνο.

Με την αέρια χρωματογραφία έχουμε υψηλότερη διαχωριστική ικανότητα σε σχέση με την υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με το χαμηλό κόστος εξοπλισμού και ανάλυσης αλλά και με την εκτενή βιβλιοθήκη δεδομένων και πρωτοκόλλων που αποτελούν τα βασικότερα πλεονεκτήματα της μεθόδου γι' αυτό και προτιμάται περισσότερο στις μεταβολομικές αναλύσεις.

Το πρότυπο που προκύπτει μέσω της φασματομετρίας μάζας με ιονισμό ηλεκτρονίων είναι συγκεκριμένο και χαρακτηριστικό για το εκάστοτε μόριο, η GC-MS δίνει την δυνατότητα ταυτοποίησης άγνωστων κορυφών. Για τον λόγο αυτό η βιβλιοθήκες των GC-MS είναι πιο ανεπτυγμένες σε σχέση με αυτές των LC-MS. Το

πρόβλημα με την τεχνολογία της LC-MS συμπεριλαμβάνει το φαινόμενο της καταστολής ιόντων, όπου δημιουργείται όταν ένα ή περισσότερα συνεκλούμενα μόρια αλλάζουν τον βαθμό ιονισμού ενός αναλυτή με αποτέλεσμα το σήμα του να αυξάνεται ή να μειώνεται. Ένα από τα θετικά της LC-MS είναι η ελάχιστη προετοιμασία του δείγματος αλλά και η μη-ανάγκη παραγωγίσις, η οποία είναι αναγκαία στην GC-MS τεχνική.

Εκτός των φασματομετρικών μεθόδων, άλλη μια χρησιμοποιούμενη αναλυτική πλατφόρμα είναι και η NMR, η οποία μέσω των μαγνητικών της ιδιοτήτων, προσδιορίζει τη δομή των μορίων. Ένα από τα πλεονεκτήματα που έχει η NMR σε σχέση με τις φασματομετρικές μεθόδους είναι η μη-ανάγκη προ-επεξεργασίας του προς ανάλυση του δείγματος, η εύκολη ποσοτικοποίηση και η παροχή αναλυτικών πληροφοριών για τις στερεοχημικές ιδιότητες των μορίων (Seeger & Sturm, 2007). Όμως, δεν επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση περισσότερων από μερικές δεκάδες μεταβολιτών γι' αυτό η φασματομετρία μάζας σε συνδυασμό με την αέρια χρωματογραφία ή την υγρή χρωματογραφία αποτελούν τις προτιμητέες τεχνικές στις μεταβολομικές αναλύσεις.



Εικόνα 11 Διάταξη Αέριου Χρωματογράφου-Φασματόμετρου μάζας (GC-MS)

(Abdul-Hamid Emwas et al., 2015)

## 5. Ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση κορυφών

Η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιείται με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού και η ταυτοποίηση των κορυφών γίνεται χρησιμοποιώντας τους χρόνους κατακράτησης και τα φάσματα των TMS-παραγώγων που έχουν δημοσιευθεί μέχρι σήμερα, και που διατίθενται σε βιβλιοθήκες φασμάτων όπως η NIST, καθώς και προτύπων διαλυμάτων μεταβολιτών που αναλύθηκαν στο εν λόγω όργανο. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται η χαρακτηριστική βιβλιοθήκη μεταβολιτών του κάθε είδους. Λόγω πιθανών σφαλμάτων σφαλμάτων που εντοπίζονται στις βιβλιοθήκες, οι

ταυτοποιήσεις επαληθεύτηκαν από δύο ή και παραπάνω πηγές. Οι υπόλοιπες κορυφές που δεν είναι δυνατόν να ταυτοποιηθούν χαρακτηρίζονται ως άγνωστες. Τα χαρακτηριστικά στοιχεία (χρόνος κατακράτησης, όνομα, κατηγορία, φάσμα και χαρακτηριστικό ιόν) του κάθε παραγώγου αποθηκεύονται μέσω του λογισμικού και στη συνέχεια γίνεται ανάγνωση όλων των χρωματογραφημάτων και η αυτοματοποιημένη πλέον (μέσω ορισμένων ρυθμίσεων) ταυτοποίηση όλων των κορυφών. Ταυτοποιούνται μεταβολίτες τριών κύριων κατηγοριών (Κατηγορία 1: Οργανικά οξέα, Κατηγορία 2: Σάκχαρα και Αλκοόλες Κατηγορία 3: Αμινοξέα).

Για τον χαρακτηρισμό αλλά και την μετέπειτα ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών, λόγω του υψηλού ποσοστού αλληλοεπικαλυπτόμενων παραγώγων, όλες οι κορυφές εκφράζονται σύμφωνα με το χαρακτηριστικό τους ιόν και όχι με τη συνολική τους ιοντική ένταση. Το χαρακτηριστικό ιόν έχει την ιδιότητα να εμφανίζεται στο φάσμα ενός μόνο από τα αλληλεπικαλυπτόμενα παράγωγα και η έντασή του είναι ανάλογη της συνολικής ιοντικής έντασης του παραγώγου αυτού και συνεπώς επιτρέπει την ποσοτικοποίηση και των αλληλοεπικαλυπτόμενων μεταβολιτών.

## **6. Κανονικοποίηση, φιλτράρισμα και απομάκρυνση μη-εμπιστευσιμων δεδομένων**

Η κανονικοποίηση είναι ένα από τα σημαντικότερα στάδια στη μεταβολομική ανάλυση. Σκοπός της είναι ο έλεγχος της σταθερότητας, επαναληψιμότητας, της ποιότητας και της ακρίβειας των μετρήσεων μέσω της απομάκρυνσης μη εμπιστευσιμων δεδομένων αλλά και μέσω της αποκατάστασης ισορροπιών που διαταράσσονται συχνά στην διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών.

Η μεταβολομική ανάλυση με τη χρήση της χρωματογραφίας αερίων-φασματομετρίας μάζας απαιτεί δύο τύπους κανονικοποίησης. Ο πρώτος έχει σχέση με τις διαφοροποιήσεις μεταξύ της πραγματικής συγκέντρωσης ενός μεταβολίτη σ' ένα δείγμα και της τελικής μετρήσιμης συγκέντρωσης μετά την ποσοτικοποίηση από την εκάστοτε αναλυτική πλατφόρμα. Ο τύπος αυτός περιλαμβάνει την διαίρεση κάθε μεταβολικού προτύπου με την αντίστοιχη επιφάνεια κορυφής του εσωτερικού προτύπου (=Σχετικές Επιφάνειες Κορυφών, Relative Peak Areas, RPAs) για τη διόρθωση σφαλμάτων που επηρεάζουν το ίδιο όλους τους μεταβολίτες. Διαιρώντας, λοιπόν, το εμβαδό της κορυφής κάθε μεταβολίτη με το εμβαδό του εσωτερικού προτύπου, προκύπτει ένα σχετικό εμβαδό βάσει του οποίου γίνεται και η όλη στατιστική ανάλυση. Ως εσωτερικό πρότυπο, ορίζουμε έναν μεταβολίτη γνωστής

συγκέντρωσης ο οποίος φυσιολογικά δεν υπάρχει στο βιολογικό σύστημα που μελετάμε. Στις μεταβολομικές μελέτες συνήθως, ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιείται η ριβιτόλη, η επιφάνεια κορυφής της οποίας ποσοτικοποιείται με το ιόν 217 ή 319.

Το πειραματικό στάδιο που έχει τη μεγαλύτερη αστάθεια και διακυμάνσεις στα δεδομένα είναι αυτό της παραγωγίσης. Η παραγωγή όπως αναφέρθηκε και σε παραπάνω ενότητα, αφορά την αντίδραση όλων των μεταβολιτών που υπάρχουν στο ξηρό βιολογικό δείγμα, με ένα ή περισσότερους παράγοντες παραγωγίσης. Μία σημαντική παράμετρος που λαμβάνεται υπ' όψιν κατά την παραγωγή είναι η προστιθέμενη ποσότητα των παραγόντων παραγωγίσης, η οποία θα πρέπει πάντα να είναι περισσότερη προκειμένου να είναι δυνατή η αντίδραση με όλους τους ελεύθερους μεταβολίτες στο εκχυλισμένο δείγμα. Η δεύτερη παράμετρος αφορά το χρόνο παραγωγίσης, ο οποίος θα πρέπει να είναι αρκετός ώστε η μετρημένη ποσότητα των παραγόντων να είναι ανάλογη με την αρχική συγκέντρωση του μεταβολίτη στο βιολογικό δείγμα. Κάποιες από αυτές τις αποκλείσεις προκύπτουν από το γεγονός ότι αρκετοί μεταβολίτες σχηματίζουν περισσότερα του ενός παράγωγα, ενώ στην περίπτωση του MSTFA η ταχύτητα αντίδρασης ποικίλει ως προς την οργανική ομάδα.

Το 2007 όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη ενότητα οι Kanani & Klara ανέπτυξαν μια στρατηγική διόρθωσης των μεταβολομικών δεδομένων που ανακτώνται με GC-MS, όπου οι μεταβολίτες ομαδοποιούνται σε 3 διαφορετικές κατηγορίες ανάλογα με την χημική τους δομή και τα παράγωγα που σχηματίζουν. Οι κατηγορίες των μεταβολιτών που αναλύθηκαν σε παραπάνω ενότητα υπόκεινται διαφορετικό βαθμό επεξεργασίας στο στάδιο της κανονικοποίησης.

## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

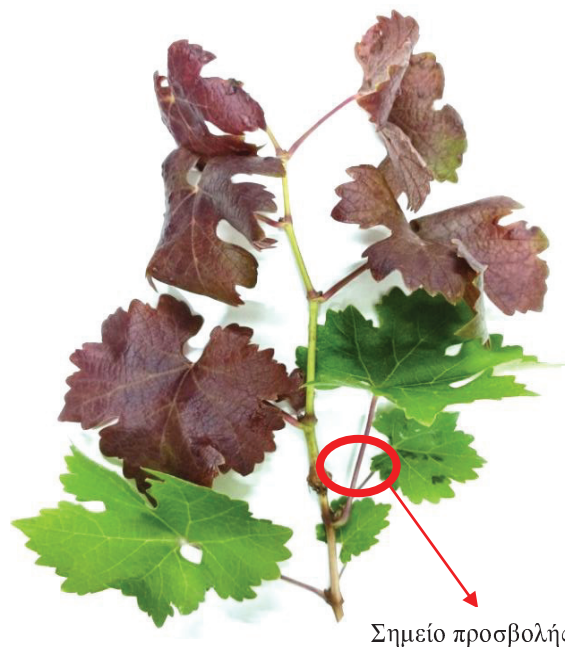
Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας αποτελεί η **μελέτη της αλλαγής στο μεταβολικό προφίλ φύλλων του αμπελιού (*Vitis vinifera*)**, που παρουσιάζουν διμορφισμό μετά την προσβολή του βλαστού από έντομο, με **χρήση βιομοριακών μεθόδων υψηλής απόδοσης στο πλαίσιο της Συστημικής Βιολογίας** όπως **Μεταβολομική Ανάλυση** με Αέριο Χρωματογράφο-Φασματοόμετρο Μάζας.



# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## 1. Εκχύλιση μεταβολίτων

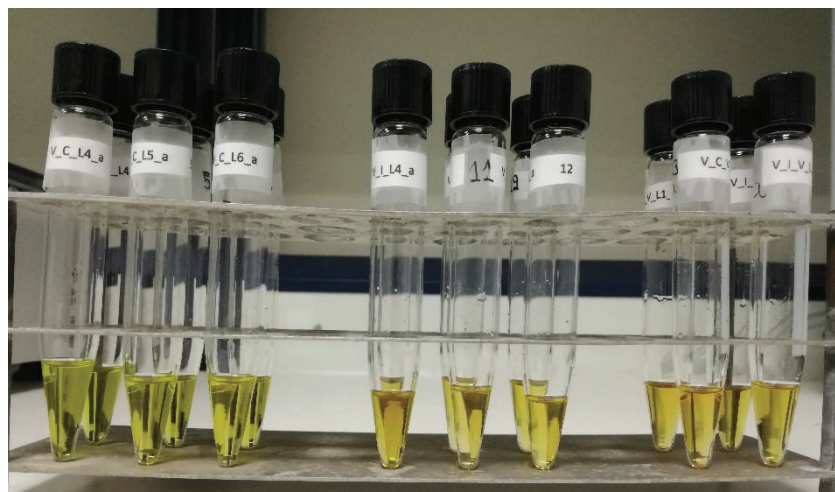
Οι βλαστοί συλλέχθηκαν από αμπέλια σε προσβεβλημένο αμπελώνα στα Ιωάννιν στο Εργαστήριο Μεταβολικής Μηχανικής και Συστημικής Βιολογίας του ΙΤΕ/ΙΕΧΜΗ από τον γεωπόνο κ. Γεώργιο Παπάζη. Τα φύλλα διαχωρίστηκαν ανάλογα με το χρώμα και τη θέση του σημείου προσβολής σε υγιή (control, C) και προσβεβλημένα (Infected, I) ξεχωριστά για κάθε βλαστό και αποθηκευτήκαν στους -80 °C. Στη συνέχεια 3 υγιή φύλλα (C) και 3 προσβεβλημένα (I) από κάθε βλαστό λειοτριβήθηκαν ξεχωριστά σε γουδί με υγρό άζωτο. 100 mg από κάθε δείγμα εκχυλίστηκαν με πρωτόκολλο μεθανόλης/νερού το οποίο τροποποιήθηκε κατάλληλα (Papadimitropoulos et al., 2018). Στα δείγματα προστέθηκαν 10 μl ριβιτόλη Alfa Aesar (1 mg/ml) και 20 μl γλυκόζη <sup>13</sup>C CLM (1 mg/ml) ως εσωτερικά πρότυπα. Τέλος τα δείγματα ξηράνθηκαν υπό κενό και φυλάχθηκαν στο ψυγείο μέχρι την περαιτέρω ανάλυσή τους.



Εικόνα 12 Διμορφισμός φύλλων αμπελιού μετά την προσβολή από έντομο (Φωτογραφία Γ. Παπάζης)

Αναλυτικά τα βήματα του πρωτοκόλλου εκχύλισης είναι τα εξής:

1. Εκχύλιση ιστού με προσθήκη μεθανόλης και ομογενοποίηση παρουσία πάγου.
2. Μεταφορά σε υδατόλουτρο στους 70°C για αναστολή κάθε ενζυμικής δραστηριότητας.
3. Προσθήκη νερού ίσης ποσότητας με την μεθανόλη.
4. Ανάδευση.
5. Φυγοκέντρηση για την κατακρήμνιση των μεγαλομοριακών ενώσεων.
6. Μεταφορά υπερκείμενου σε προζυγισμένο δοκιμαστικό σωλήνα.
7. Ξήρανση σε φυγόκεντρο υπό κενό.
8. Αποθήκευση ιζήματος στους -4°C.



Εικόνα 13. Εκχυλισμένα δείγματα φύλλων αμπελιού

## 2. Παραγωγή μεταβολιτών

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία διπλωματική χρησιμοποιήθηκαν ως παράγοντες παραγωγής η μεθυλοξίμη (Methoxime, MeOx) και το N-μεθυλ-τριμεθυλπυριτοτριφθορο-ακεταμίδιο (N-methyl-trimethylsilyl-trifluoroacetamide, MSTFA). Οι παράγοντες παραγωγής πρέπει να υπάρχουν σε περίσσεια για την παραγωγή όλων των Μεταβολιτών.

Μέθοδος παραγωγής:

1. Ξήρανση του δείγματος για 45 min στο SpeedVac
2. Προσθήκη 100μl MeOx και επώαση στους 40°C για 90min.
3. Προσθήκη του παράγοντα MSTFA σε διπλάσιο όγκο από τον αντίστοιχο του MeOx (200μl) και επώαση για 9h σε θερμοκρασία δωματίου.

### 3. Ανάκτηση μεταβολικών προφίλ με Αέριο Χρωματογράφο – Φασματόμετρο Μάζας

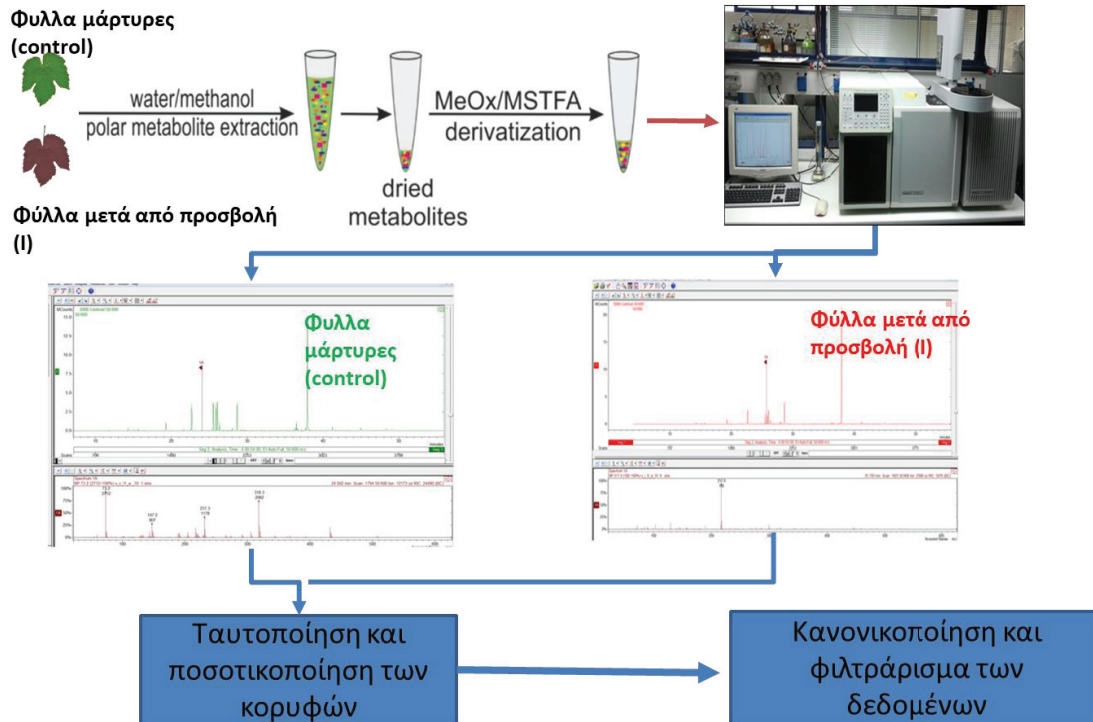
Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για τις συνθήκες έγχυσης και χρωματογράφησης περιγράφηκε από τους Paradimitropoulos et. al., 2018. Χρησιμοποιήθηκε αναλογία του δείγματος προς το φέρον αέριο (split ratio) 1/40. Οι συνθήκες λειτουργίας του GC-MS, η υγρασία, η παροχή αερίου και ο θόρυβος που μπορεί να προκληθεί από υπολείμματα στη στήλη και κατ' επέκταση στην ιοντική παγίδα ελέγχονταν καθημερινά μέσω ειδικής μεθόδου.

Μετά την πάροδο τουλάχιστον 9 ωρών από την προσθήκη του παράγοντα παραγωγής MSTFA, γίνεται η πρώτη έγχυση στο GC-MS (Εικόνα 13) Τα μόρια των πτητικών παραγώγων εισέρχονται στη στήλη μέσω φέροντος αερίου (στη συγκεκριμένη περίπτωση ήλιο 99.999%) και διαχωρίζονται. **Ο χρόνος παραμονής ή κατακράτησης** τους στη στήλη (**retention time, Rt**) εξαρτάται από το μοριακό τους βάρος και τη δομή τους, συνεπώς τα χαμηλού M.B γραμμικά μόρια παρουσιάζουν το μικρότερο χρόνο κατακράτησης. Από κάθε βιολογικό δείγμα πραγματοποιούνται τρεις ή τέσσερις εγχύσεις έτσι ώστε τα αποτελέσματα που θα προκύψουν να είναι δυνατόν να υποστούν στατιστική επεξεργασία.



Εικόνα 13. Ο Αέριος Χρωματογράφος-Φασματόμετρο Μάζας του Εργαστηρίου Μεταβολικής Μηχανικής και Συστημικής Βιολογίας στο ΙΤΕ/ΙΕΧΜΗ.

Στο συγκεκριμένο πραγματοποιήθηκαν 18 εγχύσεις (6 βιολογικές επαναλήψεις επί 3 τεχνικές επαναλήψεις (εγχύσεις) για την κάθε βιολογική), συνεπώς ανακτήθηκαν 18 χρωματογραφήματα τα οποία στη συνέχεια αναλύθηκαν ποιοτικά και ποσοτικά.



Εικόνα 14. Η μεταβολομική ως μία πολυβηματική διαδικασία. Συλλογή δείγματος, Εκχύλιση μεταβολιτών, Παραγωγή δειγμάτων και Χρήση Χρωματογράφου Αερίων- Φασματόμετρου Μάζας (GC-MS) για την ανάκτηση χρωματογραφήματων

#### 4. Ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση κορυφών

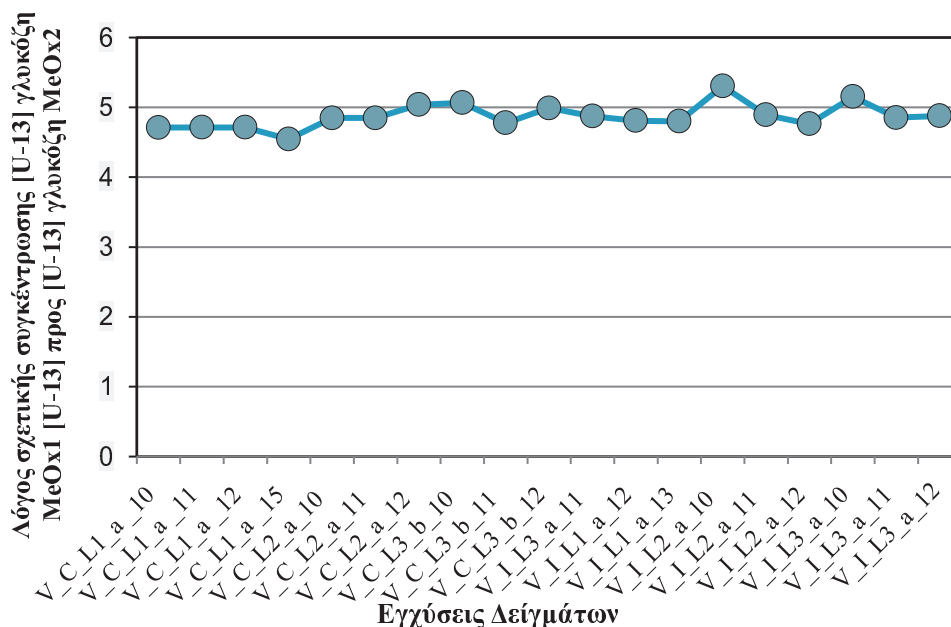
Μετά την ανάκτηση των χρωματογραφήματων γίνεται η ταυτοποίηση των κορυφών σε ένα χρωματογράφημα το οποίο χρησιμοποιείται ως χρωματογράφημα αναφοράς. Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε ως χρωματογράφημα αναφοράς το V\_C\_L1\_a 10h. Επειδή κάθε παράγωγο μεταβολίτη χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένο χρόνο παραμονής και φάσμα μάζας, ανατρέχοντας α) στην βιβλιοθήκη του εργαστηρίου Μεταβολικής Μηχανικής και Συστημικής Βιολογίας του ΙΤΕ/ΙΕΧΜΗ, και β) στην εμπορική βιβλιοθήκη NIST (έκδοση 2.0a) κατασκευάστηκε μια αυτόματη μέθοδος με το σύνολο των κορυφών/παραγώγων που ταυτοποιήθηκαν στο χρωματογράφημα αναφοράς. Για κάθε κορυφή/παράγωγο καταγράφεται: το ταυτοποιημένο όνομα, ο χρόνος στον οποίο εντοπίζεται, και από το φάσμα μάζας επιλέγεται ένα ιόν η επιφάνεια κορυφής του οποίο θα χρησιμοποιηθεί για την

ποσοτικοποίηση της συγκεκριμένης κορυφής/παραγώγου (χαρακτηριστικό ιόν ποσοτικοποίησης).

Η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των κορυφών έγινε με βάση την βιβλιοθήκη κορυφών του εργαστηρίου (MESBL peak library), που είναι ενσωματωμένη στο λογισμικό ανάλυσης μεταβολομικών δεδομένων με χρήση χρωματογραφίας αερίων – φασματομετρίας μάζας (GC-MS) M-IOLITE που έχει αναπτυχθεί στο εργαστήριο (Maga-Nteve and Klara, 2016). Ταυτοποιήθηκαν στο χρωματογράφημα αναφοράς (V\_CL\_10h) **90 κορυφές παραγώγων** μεταβολιτών ενώ ποσοτικοποιήθηκαν **54 μεταβολίτες**.

## 5. Κανονικοποίηση, φιλτράρισμα και απομάκρυνση μη-εμπιστεύσιμων δεδομένων

Προκειμένου τα μεταβολικά πρότυπα να είναι συγκρίσιμα είναι απαραίτητο να έχουν ανακτηθεί στις ίδιες συνθήκες του GC-MS. Για τον λόγο αυτό πριν από την κανονικοποίηση γίνεται υπολογισμός του λόγου των δύο παραγώγων της  $[U^{13}C]$ -γλυκόζης, ο οποίος λόγος πρέπει να είναι σταθερός. Οι τιμές που προέκυψαν στον συγκεκριμένο πείραμα παρουσιάζονται στην εικόνα 16.



Εικόνα 15. Διάγραμμα τιμών του λόγου της σχετικής συγκέντρωσης  $[U^{13}C]$  γλυκόζης MeOx1 προς σχετική συγκέντρωση  $[U^{13}C]$  γλυκόζης MeOx2 στο σύνολο των ανακτηθέντων χρωματογραφημάτων.

Αφού εξασφαλισθεί ότι τα μεταβολικά πρότυπα έχουν προκύψει από τις ίδιες συνθήκες ανάλυσης του GC-MS τότε ακολουθεί η κανονικοποίηση των δεδομένων

που προέκυψαν. Η κανονικοποίηση είναι στάδιο απαραίτητο για να εξαλειφθούν οι διαφορές που προέρχονται από πειραματικά σφάλματα αλλά και να καταστούν συγκρίσιμα τα δείγματα μεταξύ τους. Η κανονικοποίηση διακρίνεται σε δύο στάδια. Αρχικά, στο πρώτο στάδιο γίνεται διαίρεση όλων των εμβαδών κορυφής κάθε μεταβολικού προτύπου με το αντίστοιχο εμβαδόν κορυφής του εσωτερικού προτύπου της ριβιτόλης με χαρακτηριστικό ιόν ποσοτικοποίησης το 217 (RPAs-Relative peak areas) ενώ στο δεύτερο στάδιο γίνεται η διόρθωση των πειραματικών αποκλίσεων λόγω της παραγωγίσης (πολλαπλά παράγωγα). Πιο συγκεκριμένα, για τους μεταβολίτες που περιέχουν κετονομάδες (κατηγορία 2), στην ανάλυση εισάγεται μόνο το ένα παράγωγο, το πιο σταθερό και επαναλήψιμο μεταξύ των ενέσεων του ίδιου δείγματος. Για τους μεταβολίτες που διαθέτουν αμινομάδες (κατηγορία 3), εάν έχει ποσοτικοποιηθεί παραπάνω από ένα παράγωγο υπολογίζεται το σταθμισμένο άθροισμα των σχετικών επιφανειών κορυφής όλων των παραγώγων τους.

Στη συνέχεια ακολουθεί η απαραίτητη επεξεργασία τους, το φιλτράρισμα το οποίο αφορά την απομάκρυνση κορυφών από την τελική ανάλυση δεδομένων. Σε αυτό το στάδιο αφαιρούνται από τα τελικά δεδομένα ανάλυσης είτε παράγωγα μεταβολιτών είτε μεταβολικά πρότυπα (εγχύσεις) για την αποφυγή λανθασμένων βιολογικών συμπερασμάτων. Αναλυτικότερα, στην περίπτωση των μεταβολιτών φιλτράρονται εκτός ανάλυσης: α) οι κορυφές που προέρχονται από τη χρωματογραφική στήλη και τους παράγοντες παραγωγίσης, β) η μικρότερη από τις δύο κορυφές των MeOx παραγώγων για τους μεταβολίτες της κατηγορίας 2, γ) οι κορυφές που αντιστοιχούν σε άγνωστους μεταβολίτες οι οποίοι στο μόριό τους διαθέτουν αμινομάδα (μεταβολίτες κατηγορίας 3), δ) οι κορυφές με μεγάλο εύρος επιφάνειας (carry over), ε) οι κορυφές που δεν εντοπίζονται συστηματικά μεταξύ των ενέσεων του ίδιου δείγματος, και ως προς τα μεταβολικά πρότυπα στ) αυτά στα οποία ο μέσος όρος του συντελεστή διακύμανσής ξεπερνά το 20% μεταξύ των επαναλήψεων του ίδιου δείγματος ή/και μεταξύ των δειγμάτων της ίδιας πειραματικής ομάδας καθώς και ζ) πρότυπα χαμηλής ποιότητας.

Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός, η κανονικοποίηση και η απομάκρυνση των μη εμπιστευσιμων δεδομένων πραγματοποιείται με βάση τα σχετικά πρωτόκολλα του εργαστηρίου όπως περιγράφονται στο Papadimitropoulos et al, 2018 και έχουν εφαρμοστεί στο λογισμικό M-IOLITE του εργαστηρίου (Maga-Nteve and Klara,

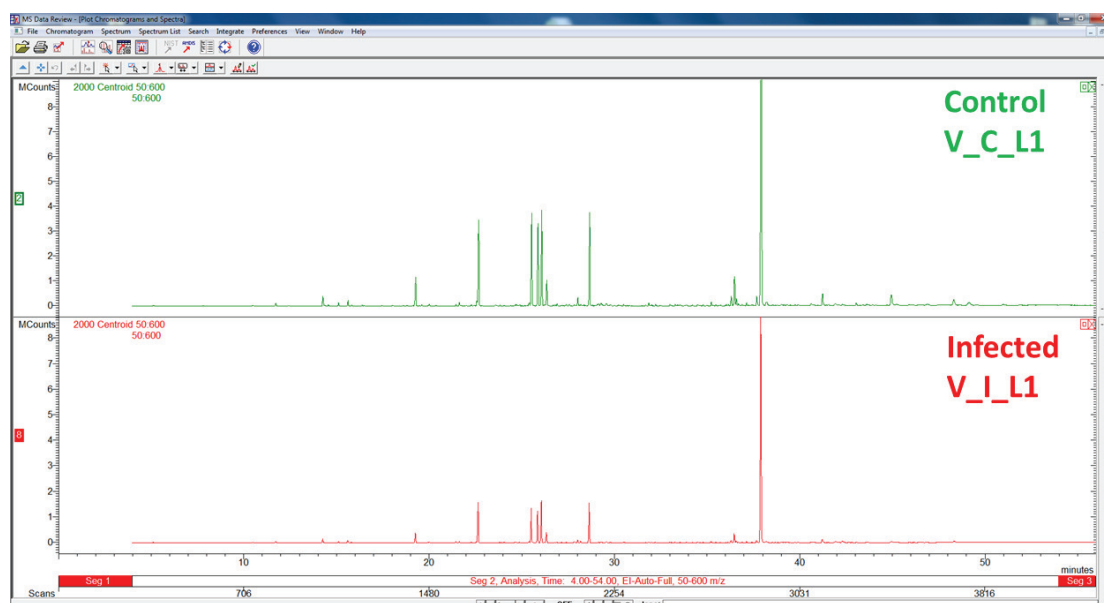
2016, *miolite2.iceht.forth.gr*; Maga-Nteve, Vasilopoulou, Constantinou, Margarity, & Klara, 2017).

Με τη μέθοδο που κατασκευάστηκε ελέγχονται αυτόματα όλα τα χρωματογραφήματα και καταγράφεται το μεταβολικό προφίλ από το κάθε ένα. Τελικά δημιουργείται ένας πίνακας που περιέχει τα παράγωγα των μεταβολιτών με τις αντίστοιχες επιφάνειες κορυφών για όλα τα δείγματα. Επειδή η αυτόματη μέθοδος μπορεί να εισάγει κάποια σφάλματα ή να μην μετρήσει κάποιες κορυφές, η επέμβαση του πειραματιστή για ορισμένα σημεία κρίνεται απαραίτητη ώστε να ταυτοποιηθούν και να ποσοτικοποιηθούν σωστά οι κορυφές.

# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

## 1. Μεταβολικό πρότυπο φύλλων αμπελιού

Στο προαναφερθέν πείραμα πραγματοποιήθηκαν 18 εγχύσεις (6 βιολογικές επαναλήψεις επί 3 τεχνικές επαναλήψεις (εγχύσεις) για την κάθε βιολογική), συνεπώς ανακτήθηκαν 18 χρωματογραφήματα. Μέσω της μεθόδου που περιγράφηκε παραπάνω, ανιχνεύθηκαν 200 διαφορετικά παράγωγα μεταβολιτών. Ορισμένα παράγωγα μεταβολιτών που ανιχνεύθηκαν αντιστοιχούσαν σε μια μοναδική κορυφή στο χρωματογράφημα, ωστόσο σε αρκετές περιπτώσεις δύο ή και περισσότερα παράγωγα μεταβολιτών αλληλεπικαλύπτονταν και σχημάτιζαν μια σύνθετη κορυφή. Συνολικά υπολογίστηκαν **3600 εμβαδά κορυφών** (18 δείγματα \* 200 μεταβολίτες). Ενδεικτικά κάποια χρωματογραφήματα από τα φύλλα του αμπελιού παρουσιάζονται στην Εικόνα 16.



Εικόνα 16. Ενδεικτικά χρωματογραφήματα από τις δύο καταστάσεις φυσιολογίας (control και infected)

Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται οι μεταβολίτες που ανιχνεύθηκαν ποιοτικά και ποσοτικοποιήθηκαν, μετά την κανονικοποίηση και το φιλτράρισμα των αποτελεσμάτων ανα κατηγορία μεταβολιτών. Οι μεταβολίτες αυτοί εντάσσονται και στις τρεις αναμενόμενες κατηγορίες (Κατηγορία 1: Οργανικά οξέα, Κατηγορία 2: Σάκχαρα και Αλκοόλες Κατηγορία 3: Αμινοξέα) και σε άγνωστους μεταβολίτες.

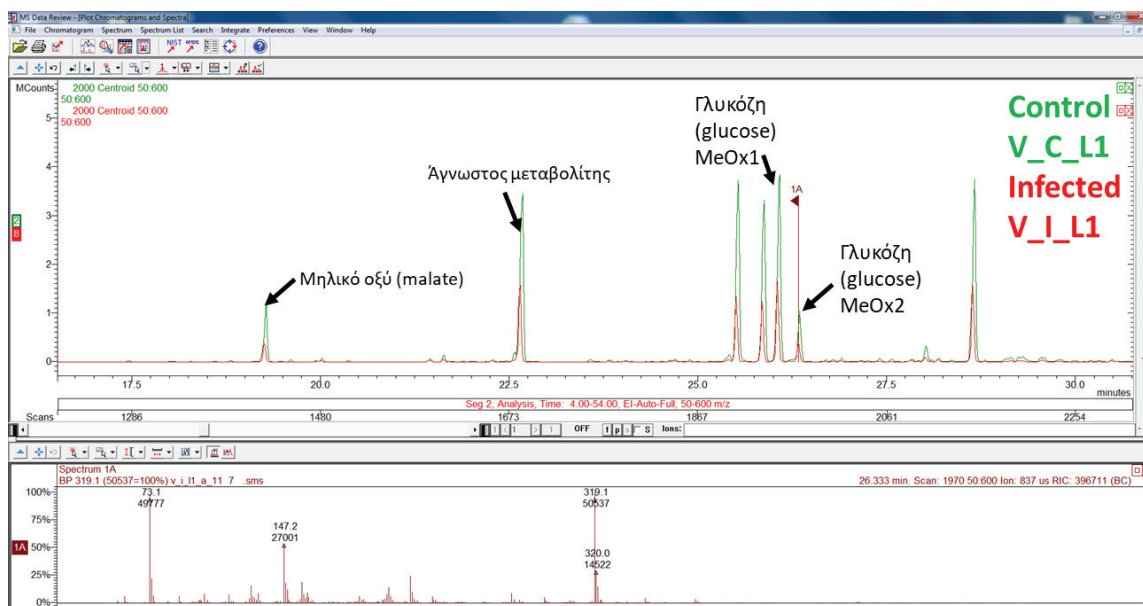


**Πίνακας 1. Μεταβολομική ανάλυση φύλλων. Μεταβολίτες που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα φύλλων ανά κατηγορία.**

Κατηγορία 1	Κατηγορία 2	Κατηγορία 3	Άγνωστοι μεταβολίτες
Myo-inositol	Glucose	Glutamate	Un_0231
Malate	Fructose	Ethanolamine	Un_0050
Sorbitol	Glucopyranose	Pyroglutamate	P3705
Phosphate		b-alanine	Tom35.28
Glucaric acid		Glycine	Tom30.24
Threonate		Glutamine	Unrev_478
Caffeic acid		Threonine	Un_0096
Glycerol		Allotreonine	Tom33.63
Trehalose		Leucine	Unrev 479
Octadecanoic acid		Aspartate	A_199
Clyconate		Lysine	Un_0017
Succinate			Un_0238
Glucuronic acid			Un_0243
Fumarate			un_225
Citric acid			Un_0248
a-linolenic acid			U_057
Myo-inositol-1 or 2-Phosphate			P1754
Lactate			
Phytol			
3- methyl benzoate			
9,12-(Z,Z)-Octadecadienoic acid			
Pyruvate			

## 2. Ποιοτικές συγκρίσεις χρωματογραφημάτων

Η ποιοτική σύγκριση αφορά τον προσδιορισμό του αν υπάρχουν ή όχι κάποιοι μεταβολίτες και άρα κάποιες κορυφές στα χρωματογραφήματα. Στην παρούσα πτυχιακή έγιναν οι συγκρίσεις των χρωματογραφημάτων των φύλλων που προέρχονται από το ίδιο κλαδί στις διαφορετικές καταστάσεις φυσιολογίας παρακάτω καταγράφονται οι αλλαγές που θεωρούνται σημαντικές. Στην εικόνα 17 παρουσιάζονται κάποιες ποιοτικές αλλαγές μεταξύ χρωματογραφήματος από φύλλο μάρτυρα (control) και χρωματογραφήματος από φύλλο προσβεβλημένο (infected). Πριν την ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών ελέγχονται τα χρωματογραφήματα ποιοτικά για τυχόν διαφορετικούς μεταβολίτες από τη μια κατάσταση φυσιολογίας στην άλλη. Οι περισσότερες μεταβολές που ανιχνεύθηκαν μεταξύ των δειγμάτων ήταν ποσοτικές και όχι ποιοτικές.



Εικόνα 17. Σύγκριση χρωματογραφημάτων Φύλλα Μαρτυρες (Control) και Προσβεβλημένα (Infected). Επισημαίνονται κάποιες διαφορές σε ορισμένους μεταβολίτες.

### 3. Ποσοτική ανάλυση μεταβολικών προφίλ

Αφού ανακτηθούν τα μεταβολικά πρότυπα προκύπτουν τρισδιάστατα δεδομένα (χρόνος παραμονής, μάζα προς φορτίο ( $m/z$ ) και ένταση σήματος). Μετά την ταυτοποίηση των μεταβολιτών με βάση εμπορικές βιβλιοθήκες και την βιβλιοθήκη του εργαστηρίου και (βλ. Υλικά και μέθοδοι) όλα αυτά τα δεδομένα οργανώνονται σε έναν δυσδιάστατο πίνακα. Ακολουθεί η στατιστική επεξεργασία και το φιλτράρισμα των μη εμπιστεύσιμων δεδομένων, οι οποίοι αφορά την απομάκρυνση κορυφών από την τελική ανάλυση δεδομένων (βλ. Υλικά και μέθοδοι). Το μεταβολικό προφίλ κάθε βιολογικής επανάληψης φαίνεται στον **Πίνακα 2**. Στον πίνακα φαίνονται ο μέσος όρος επιφάνειας κορυφής για κάθε μεταβολίτη καθώς και ο συντελεστής διακύμανσης ο οποίος αφορά την διακύμανση των μετρήσεων μεταξύ των ενέσεων για κάθε βιολογικό δείγμα.

Πίνακας 2. Μεταβολίτες που ανιχνεύθηκαν ποσοτικά και ποσοτικοποιήθηκαν, μετά την κανονικοποίηση και το φιλτράρισμα των αποτελεσμάτων

	Φύλλα Μάρτυρες (Control)						Φύλλα προσβεβλημένα (Infected)					
	V_C_L1 AVE	COV	V_C_L2 AVE	COV	V_C_L3 AVE	COV	V_I_L1 AVE	COV	V_I_L2 AVE	COV	V_I_L3 AVE	COV
sucrose	21,485	1.58%	32,482	12.67%	24,916	4.83%	33,692	0,006	38,647	0.59%	32,476	2.64%
glucose total	29,188	1.97%	25,020	1.64%	18,896	1.01%	33,311	0,007	16,316	0.34%	18,014	0.28%
myo-inositol	14,206	2.22%	25,143	2.27%	16,050	3.61%	17,542	0,055	18,350	4.83%	17,968	3.07%
Un_0231 (P3677/Tom36.92)	15,757	6.63%	0,921	32.92%	1,573	7.24%	1,200	0,183	0,911	7.37%	1,283	3.99%
fructose	4,051	2.49%	2,774	5.11%	2,454	1.45%	3,040	0,133	1,531	1.16%	1,793	2.52%
malate	1,680	1.48%	1,673	2.12%	2,250	0.91%	1,363	0,030	0,720	1.05%	1,400	1.84%
Sorbitol	1,903	49.37%	1,501	13.95%	1,334	5.48%	1,483	0,338	1,064	10.46%	1,311	26.24%
U_0050 (P2509/unknown_no111) (sugar)	1,339	25.47%	1,755	5.49%	1,627	22.43%	1,406	0,139	1,314	0.23%	1,790	25.84%
glutamate	0,555	9.28%	3,020	2.01%	1,051	8.44%	0,887	0,131	2,142	8.12%	0,581	11.22%
P3705 (Tom37.39)	1,384	3.67%	1,202	8.20%	1,373	4.26%	0,993	0,054	0,829	12.27%	1,131	1.30%
Phosphate	0,261	20.26%	2,998	27.81%	0,654	65.31%	0,166	0,167	3,380	25.83%	0,244	10.70%
glucaric acid	1,057	3.16%	0,792	6.67%	0,810	2.63%	0,916	0,064	0,771	4.04%	1,651	3.01%
threonate	0,451	1.91%	0,457	4.03%	0,592	3.28%	0,486	0,040	0,320	2.52%	0,596	2.54%
caffeic acid	0,419	14.20%	0,451	9.21%	0,489	6.45%	0,462	0,188	0,287	3.74%	0,470	22.76%
Tom35.28	0,426	25.46%	0,554	5.04%	0,337	23.13%	0,363	0,154	0,501	15.79%	0,475	30.74%
Glycerol	0,309	8.87%	0,455	8.72%	0,405	34.51%	0,465	0,104	0,418	13.26%	0,351	15.31%

Tom30.24	0,524	9.15%	0,231	1.32%	0,372	1.88%	0,351	0,025	0,135	1.16%	0,172	0.28%
Ethanolamine	0,089	7.21%	0,493	10.34%	0,344	10.47%	0,136	0,066	0,579	5.06%	0,318	8.52%
trehalose	0,268	18.94%	0,363	11.58%	0,226	21.12%	0,307	0,063	0,986	15.23%	0,719	1.55%
Unrev_478 (Tom33.79)	0,186	19.53%	0,292	20.89%	0,376	26.55%	0,253	0,062	0,259	18.54%	0,253	4.34%
Un_0096 (P1552)	0,293	6.64%	0,274	4.04%	0,255	9.35%	0,278	0,022	0,320	9.72%	0,271	2.48%
octadecanoic acid	0,197	6.97%	0,179	5.89%	0,153	4.37%	0,233	0,183	0,216	6.37%	0,204	5.70%
Tom33.63	0,166	3.21%	0,161	3.12%	0,134	3.27%	0,166	0,127	0,105	5.25%	0,115	34.29%
pyroglutamate	0,090	4.73%	0,240	6.50%	0,064	173.21%	0,773	0,086	0,281	3.81%	0,001	173.21%
Un_240 (Tom31.07) sugar	0,145	8.48%	0,066	2.13%	0,099	8.28%	0,073	0,050	0,032	30.38%	0,047	28.75%
gluconate	0,125	3.74%	0,082	6.20%	0,098	2.16%	0,045	0,032	0,049	5.47%	0,087	10.32%
A_199	0,105	5.06%	0,081	9.12%	0,092	21.11%	0,050	0,204	0,051	17.18%	0,043	11.21%
Un_0017	0,070	7.62%	0,092	5.63%	0,115	8.92%	0,097	0,066	0,086	3.37%	0,070	3.83%
succinate	0,074	1.29%	0,090	1.62%	0,088	6.53%	0,101	0,066	0,076	3.91%	0,062	2.45%
b-alanine	0,060	4.16%	0,089	3.51%	0,071	6.22%	0,086	0,049	0,084	1.56%	0,061	8.11%
Un_0238 (Tom36.93) galacturonic/gluconic acid	0,062	37.87%	0,046	55.85%	0,065	7.17%	0,030	1,011	0,036	1.54%	0,040	74.90%
Un_0243 (Tom30.19)	0,081	6.51%	0,045	5.98%	0,044	36.55%	0,082	0,080	0,035	0.97%	0,054	8.14%
fumarate	0,064	15.14%	0,081	8.22%	0,018	34.80%	0,009	0,258	0,046	27.59%	0,071	13.03%
glycine	0,046	13.53%	0,037	3.40%	0,077	16.16%	0,035	0,036	0,016	10.26%	0,069	11.66%
citric acid	0,008	11.39%	0,026	7.51%	0,126	2.83%	0,016	0,033	0,020	5.59%	0,028	6.99%
	0,037	8.45%	0,052	10.14%	0,053	4.27%	0,053	0,021	0,035	4.45%	0,067	6.97%

P 3030 (b_20 / A142)	0,050	14.61%	0,051	7.32%	0,031	10.83%	0,038	0,042	0,013	10.58%	0,019	3.64%
myo-Inositol-1 or 2-Phosphate	0,025	33.81%	0,065	16.18%	0,031	27.00%	0,032	0,226	0,084	22.78%	0,028	18.13%
Un_0248	0,039	7.99%	0,047	3.58%	0,031	9.25%	0,038	0,050	0,035	3.63%	0,035	9.66%
a-linolenic acid	0,026	28.72%	0,045	22.00%	0,046	21.23%	0,017	0,194	0,023	4.58%	0,024	30.20%
Lactate	0,033	9.36%	0,056	15.17%	0,025	2.94%	0,033	0,114	0,025	15.00%	0,026	8.66%

Στον πίνακα 3 παρουσιάζονται οι 14 μεταβολίτες με την μεγαλύτερη αφθονία και στα control και στα infected με φθίνουσα σειρά οι οποίοι είναι η σουκρόζη, η γλυκόζη, η μυοινοσιτόλη, ένας άγνωστος μεταβολίτης, η φρουκτόζη, το μηλικό οξύ, η σορβιτόλη, ένας άγνωστος μεταβολίτης το γλουταμινικό, ένας επίσης άγνωστος Μεταβολίτης ,το φωσφορικό, το σακχαρικό οξύ, το θρεονικό οξύ και το καφεϊκό οξύ.

Πίνακας 3. Μέσος όρος σε 14 μεταβολίτες με την μεγαλύτερη επιφάνεια κορυφής σε φθίνουσα σειρά.

Μεταβολίτης	Control		Infected	
	Relative peak area average	COV	Relative peak area average	COV
sucrose	26,294	7.52%	34,939	7.52%
glucose	24,368	0.80%	22,547	0.80%
myo-inositol	18,466	0.81%	17,953	0.81%
Un_0231 (P3677/Tom36.92)	6,084	8.09%	1,131	8.09%
fructose	3,093	1.73%	2,122	1.73%
malate	1,868	0.41%	1,161	0.41%
sorbitol	1,579	29.50%	1,286	29.50%
Un_0050	1,574	9.44%	1,503	9.44%
glutamate derivative	1,542	1.26%	1,203	1.26%
P3705	1,320	1.94%	0,984	1.94%
phosphate	1,304	29.94%	1,517	29.94%
saccharic acid	0,886	1.79%	1,112	1.79%
threonate	0,500	1.20%	0,467	1.20%
caffeic acid	0,453	3.13%	0,407	3.13%

Στη συνέχεια για την εύρεση μεταβολιτών που διαφοροποιούνται σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών καταστάσεων φυσιολογίας και συμβάλλουν στον διαχωρισμό των προτύπων υπολογίζεται ο λόγος αλλαγής (fold change). Ο λόγος αλλαγής υπολογίζεται ως ο λόγος των σχετικών επιφανειών κορυφής κάθε μεταβολίτη μεταξύ δύο καταστάσεων. Σημειώνονται μεταβολίτες που οι αλλαγές τους συνοδεύονται από μικρή σταθερή απόκλιση ή διακύμανση. Οι τιμές μεγαλύτερες από 1,3 υποδηλώνουν αλλαγή μεγάλη στο ποσό και είναι η αλλαγή που φαίνεται από το πόσο μεγάλη είναι η τιμή του fold change. Για τον υπολογισμό του λόγου αλλαγής χρησιμοποιήθηκαν οι σχετικές επιφάνειες κορυφής όλων των μεταβολιτών για τις δύο καταστάσεις φυσιολογίας infected/control φυσιολογίας προς τις σχετικές επιφάνειες κορυφών όλων των μεταβολιτών. Οι μεταβολίτες που

εμφανίζουν σημαντική μείωση (<0,7) και σημαντική αύξηση (>1,3) φαίνονται στον Πίνακα 4. Με κόκκινο χρώμα συμβολίζεται η αύξηση και με πράσινο η μείωση.

Πίνακας 4. Μεταβολίτες με την μεγαλύτερη αλλαγή FC σε infected/control

Μεταβολίτες	FC Infected 1 to control 1	FC Infected 2 to control 2	FC Infected 3 to control 3
sucrose	1.275	1.225	1.530
sucrose	1.568	1.190	1.303
glucose	1.141	0.652	0.953
myo-inositol	1.235	0.730	1.119
Un 0231 (P3677/Tom36.92)	0.076	0.989	0.816
fructose	0.751	0.552	0.731
malate	0.812	0.430	0.622
sorbitol	0.779	0.709	0.983
Un 0050	1.050	0.749	1.100
glutamate derivative	1.599	0.709	0.553
P3705	0.718	0.689	0.824
phosphate	0.637	1.127	0.373
saccharic acid	0.866	0.974	2.037
threonate	1.078	0.699	1.007
caffeic acid	1.103	0.638	0.961
Tom35.28	0.851	0.905	1.407
glycerol	1.506	0.920	0.867
Tom30.24	0.670	0.585	0.462
ethanolamine	1.523	1.174	0.925
trehalose	1.146	2.718	3.175
Unrev 478 (Tom33.79)	1.361	0.888	0.672
Un 0096	0.950	1.167	1.063
octadecanoic acid	1.185	1.206	1.334
Tom33.63	0.997	0.652	0.860
glutamate	8.553	1.171	0.023
Unrev 479 (Tom31.03)	0.000	0.002	0.000
Un 240 (Tom31.07) sugar	0.505	0.492	0.472
gluconic acid	0.361	0.601	0.889
A 199	0.471	0.634	0.465
Un 0017	1.394	0.934	0.604
succinate	1.363	0.848	0.710
b-alanine	1.444	0.946	0.857
Un 0238 (Tom36.93)	0.490	0.780	0.617
galacturonic acid	1.020	0.790	1.235
Un 0243 (Tom30.19)	0.146	0.564	3.876
fumarate	0.752	0.442	0.903
glycine	1.995	0.779	0.225
citrate	1.423	0.678	1.273
un 225	0.765	0.262	0.613
myo-inositol phoshate	1.248	1.286	0.908
Un 0248 (organic acid)	0.958	0.731	1.137

alpha linolenic acid	0.659	0.519	0.518
lactate	0.982	0.453	1.018

Από τον παραπάνω πίνακα προκύπτει να έχουμε αύξηση και μείωση σε κάποιους μεταβολίτες. Αύξηση παρατηρείται στη σουκρόζη στην τρεχαλόζη, στη λυσίνη και στην ασπαρτίνη. Σημαντική μείωση υπάρχει σε γλυκίνη και ασπαραγίνη, στο αλινολενικό οξύ, στη θρεονίνη, το γλυκονικό, το μηλικό, την φρουκτόζη και σε ανώνυμους μεταβολίτες όπως un\_225, Un\_0238, A\_199, Un\_240, Tom30.24 και Un\_0231 (Πίνακας 4.)



## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα κυριότερα συμπεράσματα της παρούσας πτυχιακής εργασίας συνοψίζονται στα εξής:

- Η επίδραση της βιοτικής καταπόνησης από το έντομο είναι εμφανής και στο μεταβολικό προφίλ των φύλλων
- Οι μεταβολίτες που αυξάνονται στα προσβεβλημένα (πχ σακχαρόζη, τρεχαλόζη) ίσως δείχνουν κινητοποίηση αποθηκών αμύλου για την αντιμετώπιση της καταπόνησης (ενεργοποίηση δευτερογενούς μεταβολισμού)
- Οι μεταβολίτες που μειώνονται είναι περισσότεροι στα προσβεβλημένα φύλλα από ότι στα φύλλα μάρτυρες. Σε αυτούς περιλαμβάνονται και μεταβολίτες όπως το α-λινολενικό οξύ το μηλικό οξύ. Η μείωση των μεταβολιτών του κεντρικού μεταβολισμού του άνθρακα αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των καταπονήσεων.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα φυτά αντιμετωπίζουν διάφορους παράγοντες καταπόνησης κατά τη διάρκεια του βιολογικού τους κύκλου είτε αβιοτικούς, όπως ξηρασία, αλατούχα εδάφη, ακραίες θερμοκρασίες είτε βιοτικούς όπως έντομα, παθογόνα, ακάρεα οι οποίοι επηρεάζουν αρνητικά την ανάπτυξη τους και την παραγωγή (Duque, A.S., et al., 2013). Σε συνθήκες αγρού οι αποκλίσεις από τις ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης έχουν ως αποτέλεσμα το καθαρό προϊόν να αντιπροσωπεύει το 20-30 % αυτού που μπορεί να παραχθεί από τα φυτά, λαμβάνοντας υπόψιν τη γενετικά καθοριζόμενη μέγιστη απόδοση κάθε καλλιεργούμενου φυτού.

Το αμπέλι αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερης οικονομικής σημασίας φυτά παγκοσμίως και για την παραγωγή του σταφυλιού αλλά κυρίως για την παραγωγή οίνων, και ιδιαίτερα οίνων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Οι καλλιέργειες αμπελιού, προσβάλλονται από διάφορα παθογόνα και εχθρούς, που σε αυτά συμπεριλαμβάνονται και ένας σημαντικός αριθμός εντόμων και ιών. Παρά το ευρύ φάσμα των εντόμων και των ιών που προσβάλλουν τους ιούς, η γνώση γύρω από την επίδραση τους σε μοριακό επίπεδο στην ποιότητα των σταφυλιών και του κρασιού παραμένει περιορισμένη (Meng et al., 2017). Η βιομηχανία του κρασιού εστίασε περισσότερο στη μελέτη παθογόνων όπως μύκητες και ωομύκητες. Στις μέρες μας η καλλιέργεια του αμπελιού, δείχνει μεγαλύτερο ενδιαφέρον για βελτίωση της ποιότητας και των χαρακτηριστικών του κρασιού και κατά συνέπεια εστιάζει και στην επίδραση που έχουν προσβολές από έντομα και ιούς.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία διερευνήθηκαν οι αλλαγές μεταβολικού προφίλ των φύλλων του αμπελιού σε δύο διαφορετικές καταστάσεις φυσιολογίας που οφείλονται στην προσβολή του βλαστού του αμπελιού πιθανόν από το έντομο *Spissistilus festinus* (Hemiptera: Membracidae). Το έντομο έχει αναφερθεί ότι προσβάλλει καλλιέργειες αμπέλου στην Αμερική, αλλά στην Ελλάδα πιθανόν αποτελεί πρώτη καταγραφή. Η προσβολή καλλιεργειών αμπελιού από το έντομο δεν αποτελούσε αντικείμενο έρευνας της αμπελουργίας γιατί δεν είχαν καταδειχθεί σοβαρές επιπτώσεις στην παραγωγή και την οινοποίηση (Smith, 2013). Το

ενδιαφέρον γύρω από το έντομο αυξήθηκε, όταν μια μελέτη σε θερμοκήπιο έδειξε ότι είναι υπεύθυνο για τη μετάδοση του ιού της ερυθράς κηλίδωσης της αμπέλου (GRBV). Ο ιός αυτός αποτελεί πολύ σημαντικό παθογόνο για τις αμπελοκαλλιέργειες γιατί υποβαθμίζει το παραγόμενο προϊόν, αρχικά το σταφύλι και στη συνέχεια το κρασί. Έχει καταδειχθεί ότι μετά από προσβολή από τον ιό επηρεάζονται διάφορα στάδια της ωρίμανσης του καρπού και προκαλούνται ορμονικές διαταραχές σε ορμόνες που έχουν σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση όπως το αμπισικό οξύ (ABA) και το αιθυλένιο καθώς και οι αυξίνες οι οποίες έχουν σημαντικό ρόλο στην αύξηση (Barbara Blanco-Ulate et al., 2017). Ταυτόχρονα μετά από προσβολή από τον ιό της ερυθράς κηλίδωσης της αμπέλου (GRBV), παρατηρείται μείωση των σακχάρων, παρεμποδίζεται η παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών όπως φαινυλπροπανοϊδή και τα παράγωγά τους. Αυτοί οι δευτερογενείς μεταβολίτες έχουν ρόλο αντιοξειδωτικών και φυτοαλεξινών έναντι παραγόντων καταπονήσεις και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε χαρακτηριστικά του σταφυλιού όπως το χρώμα, τη γεύση και το άρωμα (Vogt, 2010). Η γνώση γύρω από την επίδραση των βιοτικών καταπονήσεων στην έκφραση των γονιδίων και στην μοριακή φυσιολογία των φυτών αμπέλου παραμένει ελλιπής.

Στο σημείο αυτό αξιοποιήσαμε μια ραγδαία αναπτυσσόμενη μεθοδολογία υψηλής απόδοσης, τη μεταβολομική, ως εργαλείο προσέγγισης των μεταβολικών αλλαγών οι οποίες επέρχονται σε συνθήκες προσβολής. Το μεταβολικό πρότυπο παρέχει ένα μεταβολικό αποτύπωμα της φυσιολογίας σε δεδομένο χρόνο και συνθήκες, και αποτελεί το μεταβολικό ισοδύναμο των μεταγραφικών και μεταφραστικών προτύπων (Kanani and Klara, 2007; Kanani et al., 2008). Η ανάλυση του μεταβολικού προτύπου μας παρέχει μία ολιστική εικόνα της μεταβολικής κατάστασης των φύλλων μετά την προσβολή του βλαστού από το έντομο, δίνοντας τη δυνατότητα να προσδιοριστούν έγκυρα και έγκαιρα διαγνωστικά πρότυπα αλλαγής της φυσιολογίας των φύλλων.

Η εφαρμογή της μεταβολομικής ανάλυσης στη φυτική παραγωγή αποτελεί δυναμικά αναπτυσσόμενο τομέα με έμφαση σε εμπορικά φυτά (κριθάρι, ντομάτα, φράουλα, αμπέλι) λόγω των αυξανόμενων απαιτήσεων για βελτιωμένες και αποδοτικότερες ποικιλίες καθώς και συγκεκριμένα για το αμπέλι λόγω της σημασίας των αμπελοκομικών προϊόντων στην οινοποίηση (Tong Li, 2019; Sousa Silva, 2019). Αρκετές εργασίες τα τελευταία χρόνια έχουν δείξει τον σημαντικό ρόλο διαφόρων

μεταβολιτών και της αλλαγής της συγκέντρωσής τους ως απόκριση στις καταπονήσεις. Πιο συγκεκριμένα στο κριθάρι σε προσβεβλημένα από το μύκητα *Fusarium* sp. έχουν βρεθεί μειωμένες συγκεντρώσεις μεταβολιτών που ανήκουν σε μονοπάτια όπως της βιοσύνθεσης φλαβονοειδών, φαινυλπροπανοειδών, λιπαρών οξέων και τερπενοειδών (Choo et al., 2006). Επίσης έχουν βρεθεί υψηλές συγκεντρώσεις αμινοξέων όπως προλίνη, γλουταμινικό, αργινίνη και αλανίνη μετά από προσβολή αμπελιού με βοτρυτή. Κάποιοι άλλοι μεταβολίτες όπως η σουκρόζη η οποία αυξάνεται και στην περίπτωση που μελετάται στην παρούσα πτυχιακή, η γλυκερόλη, το γλουκονικό και το ηλεκτρικό έχουν συσχετιστεί με την προσβολή από βοτρυτή στο αμπέλι. Στα φύλλα της παρούσας μελέτης που βρίσκονται μετά το σημείο προσβολής (Infected) αυξάνεται και η συγκέντρωση της τρεχαλόζης η οποία συσχετίζεται με τις καταπονήσεις (Phan L.C.H.B.T., Van Dijck P., 2019) Ταυτόχρονα μελέτες έχουν δείξει τον ρόλο του μηλικού, που είναι ενδιάμεσο του κύκλου του Krebs ως μεταβολίτη που σχετίζεται βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις και έχει βρεθεί ότι μειώνεται, όπως και στο παρόν πείραμα (Τουολάκου, 2013; Manolaki et al., 2020). Στα μόρια που μειώνονται στα προσβεβλημένα περιλαμβάνονται και μεταβολίτες όπως το α-λινολενικό οξύ, ένα ακόρεστο λιπαρό οξύ που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις βιοτικές καταπονήσεις στα φυτά και είναι ρυθμίζει διεργασίες που σχετίζονται με την αντιμετώπισή τους (He et al., 2020).

Ανάλογα με το είδος φυτού και την καταπόνηση, διαφορετικοί μεταβολίτες μπορούν να δράσουν με διαφορετικό τρόπο είτε ως μόρια σήματα, είτε ως πρόδρομα μόρια για την παραγωγή άλλων μορίων που σχετίζονται με την καταπόνηση, είτε ως συμβατοί οσμωλύτες (Vega, 2011; Manolaki, et al. 2020; Castro-Moretti, et al., 2020). Στο πλαίσιο αυτό η μεταβολομική ανάλυση δύναται να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο παρακολούθησης των καλλιεργειών βρίσκοντας εφαρμογή τα τελευταία χρόνια σε μελέτες απόκρισης των φυτών σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις (Τουολάκου et al., 2016, Manolaki et al., 2020).

Συνοψίζοντας, η επίδραση των βιοτικών καταπονήσεων στο μεταβολισμό των φυτών είναι καταλυτική και πρέπει να μελετηθεί με συστημικό και συστηματικό τρόπο καθώς επηρεάζει σε αρχικό στάδιο το φυτό και κατ' επέκταση την καλλιέργεια και την παραγωγή. Οι σύγχρονες μέθοδοι υψηλής απόδοσης θα μπορούσαν να βοηθήσουν στην έγκαιρη διάγνωση παρεκκλίσεων από την αναμενόμενη κατάσταση ανάπτυξης, ώστε να υπάρχει επαρκής χρόνος για την αντιμετώπισή τους πριν να

επηρεαστεί η ποσότητα και η ποιότητα της παραγωγής. Επιπρόσθετα θα αποτελέσει και βάση για την ανάπτυξη πρωτοκόλλων για την προτυποποίηση και πιστοποίηση της παραγωγής και της ποιότητας προϊόντων αγροδιατροφής, βάσει σύγχρονων μεθόδων υψηλής ακρίβειας και ευαισθησίας.

# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

## Ξένη Βιβλιογραφία

1. Ana Sofia Duque, André Martinho de Almeida, Anabela Bernardes da Silva, Jorge Marques da Silva, Ana Paula Farinha, Dulce Santos, Pedro Fevereiro and Susana de Sousa Araújo (2013). Abiotic Stress Responses in plants: Unraveling the Complexity of Genes and Networks to Survive. InTech. p. 49-101 DOI: 10.5772/52779.
2. Al Rwahnih, M., A. Dave, M. M. Anderson, A. Rowhani, J. K. Uyemoto, and M. R. Sudarshana. (2013). Association of a DNA virus with grapevines affected by red blotch disease in California. *Phytopathology*. 103: 1069–1076.
3. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the Cell*. 5th Edition. Garland Science.
4. Beyer B. A., R. Srinivasan, P. M. Roberts, and M. R. Abney, (2017). Biology and management of the three-cornered alfalfa hopper (Hemiptera: Membracidae) in alfalfa, soybean, and peanut. *J. Integr. Pest Manag.* 8: 1–10. <https://doi.org/10.1093/jipm/pmx003>.
5. Barbara Blanco-Ulate, Helene Hopfer, Rosa Figueroa-Balderas, Zirou Ye, Rosa M. Rivero, Alfonso Albacete, Francisco Pérez-Alfocea, Renata Koyama, Michael M. Anderson, Rhonda J. Smith, Susan E. Ebeler, Dario Cantu, Red blotch disease alters grape berry development and metabolism by interfering with the transcriptional and hormonal regulation of ripening, *Journal of Experimental Botany*, Volume 68, Issue 5, (1 February 2017), Pages 1225–1238.
6. Bahder, Bahder, B. W., F. G. Zalom, M. Jayanth, and M. R. Sudarshana. (2016). Phylogeny of geminivirus coat protein sequences and digital PCR aid in identifying *Spissistilus festinus* as a vector of Grapevine red blotch-associated virus. *Phytopathology*. 106: 1223–1230.
7. Blanco-Ulate Blanco-Ulate, B., H. Hopfer, R. Figueroa-Balderas, Z. Ye, R. M. Rivero, A. Albacete, F. Pérez-Alfocea, R. Koyama, M. M. Anderson, R. J. Smith, et al. (2017). Red blotch disease alters grape berry development and metabolism by interfering with the transcriptional and hormonal regulation of ripening. *J. Exp. Bot.* 68: 1225–1238.
8. Castro-Moretti, F. R., Gentzel, I. N., Mackey, D. & Alonso, A. P. (2020). Metabolomics as an Emerging Tool for the Study of Plant-Pathogen Interactions. *Metabolites* 10, doi:10.3390/metabo10020052.
9. Cindy R Preto, Mysore R Sudarshana, Michael L Bollinger, Frank G Zalom (2018) : *Vitis vinifera* as Reproductive host of *Spissistilus festinus* (Hemiptera: Membracidae)

10. Choo, T. M. (2006). Breeding barley for resistance to fusarium head blight and mycotoxin accumulation. *Plant Breed. Rev.* 26, 125–169.
11. Calvi B. L. (2011). Effects of red-leaf disease on Cabernet Sauvignon at the Oakville experimental vineyard and mitigation by harvest delay and crop adjustment. M.S. thesis, University of California, Davis, CA.
12. Fiehn, O. (2002). Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology* 48: 155–171.
13. Griffin, J.L. (2004). Metabolic profiles to define the genome: can we hear the phenotypes? *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* (2004) 359: 857–871.
14. Griffin, J.L. (2006). The Cinderella story of metabolic profiling: does metabolomics get to go to the functional genomics ball? *Phil. Trans. R. Soc. B.* 361: 147–161.
15. Godoy, C., Miranda, X. Nishida K., (2006) reehoppers of Tropical America. Instituto Nacional de Biodiversidad (INBIO).
16. Goodacre, R., Vaidyanathan, S., Dunn, W.B., Harrigan, G.G. and Douglas, B. (2004). Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data *TRENDS in Biotechnology* Vol.22 No.5.
17. He, M., Qin, C.-X., Wang, X., Ding, N.-Z. (2020). Plant Unsaturated Fatty Acids: Biosynthesis and Regulation. *Frontiers in Plant Science*, 11, art. no. 390. doi: 10.3389/fpls.2020.00390
18. Kanani et al., Kanani H, Klapa MI. (2007). Data correction strategy for metabolomics analysis using gas chromatography-mass spectrometry. *Metabolic Engineering* 9:39 – 51.
19. Kanani H, Chrysanthopoulos PK, Klapa MI. (2008). Standardizing GC-MS metabolomics. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications* 871(2):191- 201.
20. Kallithraka, S., Arvanitogiannis, I.S., Kefalas, P., El-Zagouli, A., Soufleros, E. and Psarra, E. (2001), Instrumental and sensory analysis of Greek wines; implementation of principal component analysis (PCA) for classification according to geographical origin, *Food Chemistry*, 73, 501-514.
21. Kell DB. Theodor Bucher Lecture (2006). Metabolomics, modelling and machine learning in systems biology - towards an understanding of the languages of cells. Delivered on 3 July 2005 at the 30th FEBS Congress and the 9th IUBMB conference in Budapest. *The FEBS journal.* ;273(5):873-94.
22. Kell, D.B. (2004). Metabolomics and system biology: making sense of the soup. *Curr Opin Microbiol.* 7: 296-307.
23. Lawlor, D.W. 2001. Photosynthesis. Oxford: BIOS Scientific Publishers.
24. Lee DW, (2002). Anthocyanins in leaves: distribution, phylogeny and development. *Advances in Botanical Research*: 37-53.

25. Manetas Y. (2006). Why some leaves are anthocyanic and why most anthocyanic leaves are red? *Flora* 201: 163-177
26. Manolaki P., Tooulakou G., Byberg C.U., Eller F., Sorrell B.K., Klapa M.I. and Riis T. (2020) Probing the Response of the Amphibious Plant *Butomus umbellatus* to Nutrient Enrichment and Shading by Integrating Eco-Physiological With Metabolomic Analyses. *Front. Plant Sci.* 11:581787. doi: 10.3389/fpls.2020.581787.
27. Mantell, C., Rodriguez, M. and de la Ossa, M. (2002), Semi-batch extraction of anthocyanins from red grape pomace in packed beds: experimental results and process modeling, *Chemical Engineering Science*, 57, 3831-3838.
28. Meng, B., Martelli, G.P., Golino, D.A., Fuchs, M. *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*, Springer International Publishing, 2017.
29. Nunez, V., Monagas, M., Gomez-Cordoves, M.C. and Bartolome, B. (2004), *Vitis vinifera* L. cv. Graciano grapes characterized by its anthocyanin profile, *Postharvest Biology and Technology*, 31, 69-79.
30. Papadimitropoulos, M. E. P., Vasilopoulou, C. G., Maga-Nteve, C., and Klapa, M. I. (2018). Untargeted GC—MS metabolomics. *Methods Mol. Biol.* 1738, 133–147. doi: 10.1007/978-1-4939-7643-0\_9.
31. Phan L.C.H.B.T., Van Dijck P. (2019) Biosynthesis and Degradation of Trehalose and Its Potential to Control Plant Growth, Development, and (A)biotic Stress Tolerance. In: Hossain M., Kumar V., Burritt D., Fujita M., Mäkelä P. (eds) *Osmoprotectant-Mediated Abiotic Stress Tolerance in Plants*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-27423-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-030-27423-8_8).
32. Purves, W.K., Sadava, D., Orians, H. and Heller, H.C. (2003). *Life: The science of Biology*. 7th Edition. Freeman & Company, W.H.
33. Ribereau - Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. and Dubourdieu, D. (2006), *Handbook of Enology, 2, The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*, John Wiley & Sons Ltd.
34. Sudarshana, M. R., K. L. Perry, and M. F. Fuchs. (2015). Grapevine red blotch-associated virus, an emerging threat to the grapevine industry. *Phytopathology*. 105: 1026–1032.
35. Sakamoto, Y., Katsuhiko, N., Kawana, S., Lingga, N., Chin H, Miyagawa H. and Ogura T. (2010). Profiling of Japanese Green Tea Metabolites by GC-MS. Shimadzu Corporation International Marketing Division.
36. Seger, C., & Sturm, S. (2007). Analytical aspects of plant metabolite profiling platforms: Current standings and future aims. *Journal of Proteome Research*, 6(2), 480–497.
37. Sousa Silva M., Cordeiro C., Roessner U., Figueiredo A. (2019) Editorial: Metabolomics in crop research—Current and emerging methodologies. *Front. Plant. Sci.* 10:1–3. doi: 10.3389/fpls.2019.01013.



38. Smith, R. (2013). Three-cornered alfalfa hopper,. InL. J. Bettiga (ed.), Grape pest management, 3rd ed. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources Publication 3343, Oakland, CA pp. 286-287.
39. Stern, K.R., Bidlack, J.E. and Jansky, S.H. (2008). Introductory Plant Biology. 11th Edition. McGraw-Hill, New York.
40. Taiz, L. and Zeiger, E. (2010). Plant Physiology. 5th edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company.
41. Thomas Vogt, (2010), Phenylpropanoid Biosynthesis,Molecular Plant,Volume 3, Issue 1,Pages 2-20,ISSN 1674-2052.
42. Tong Li, Ya-Hui Wang, Jie-Xia Liu, Kai Feng, Zhi-Sheng Xu & Ai-Sheng Xiong (2019) Advances in genomic, transcriptomic, proteomic, and metabolomic approaches to study biotic stress in fruit crops, Critical Reviews in Biotechnology, 39:5, 680-692, DOI: 10.1080/07388551.2019.1608153.
43. Vega, A., Gutierrez, R. A., Pena-Neira, A., Cramer, G. R. & Arce-Johnson, P. (2011) Compatible GLRaV-3 viral infections affect berry ripening decreasing sugar accumulation and anthocyanin biosynthesis in Vitis vinifera. doi: 10.1007/s11103-011-9807-8.
44. Wallis and Sudarshana Wallis, C. M., and M. R. Sudarshana. (2016). Effects of grapevine red blotch-associated virus (GRBaV) infection on foliar metabolism of grapevines. Can. J. Plant Pathol. 38: 358–366.
45. Wildermuth, (1915) Three-cornered alfalfa hopper. J. Agric, Res. 3: 343–364.

### **Ελληνική Βιβλιογραφία**

46. Αϊβαλάκης, Γ., Καραμπουρνιώτης, Γ. και Φασσέας, Κ. (2005). Γενική Βοτανική. Εκδόσεις Έμβρυο. Αθήνα.
47. Ασημακοπούλου Α., Αλεξόπουλος Α.,(2013) Αμπελουργία (Σημειώσεις θεωρητικού μέρους μαθήματος) Καλαμάτα.
48. Αρβανιτίδης Α., (1991), Ειδική δένδροκομία 1.
49. Γανωτάκης Δ., Κοτζαμπασής Κ., (2003). Φωτοσύνθεση Ι: μετατροπή της ηλιακής ενέργειας σε χημική. Φυσιολογία φυτών. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, Κ.Α. (επ.). Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 145-18.
50. Καραμπουρνιώτης Γ., Αϊβαλάκης, Γ, Λιακόπουλος Γ. (2016) βιβλ « Φυσιολογία Φυτών» εκδ. Έμβρυο.
51. Καραμπουρνιώτης Γ., Λιακόπουλος Γ., Νικολόπουλος Δ. (2012) βιβλ «Φυσιολογία καταπονήσεων των φυτών» Εκδόσεις Έμβρυο.
52. Καραγιαννοπούλου Σ., Π., (2018). Σημειώσεις Αμπελουργίας ΤΕΙ Πελοποννήσου Καλαμάτα.

53. Κουράκου-Δραγώνα Σ., (2006), «Ο πολιτισμός του οίνου στις αρχαιοελληνικές κοινωνίες» στο: Γραμματικοπούλου Ε., (επιμ.), Οίνος: πολιτισμός και κοινωνία.
54. Καρατάγλης Σ., (1999). Βιβλ «Φυσιολογίας Φυτών» εκδ. Χαρις.
55. Λαζαρίδου-Αθανασιάδου Μ., (2009). Σημειώσεις Μορφολογίας και Φυσιολογίας ΤΕΙ Καβάλας.
56. Λεβίζου Ε., (2019). Σημειώσεις Φυσιολογίας Φυτών Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
57. Μαραγκού, Α., (1992), «Το εμπόριο του κρασιού στην αρχαιότητα» στο: «Ιστορία του ελληνικού κρασιού», Αθήνα.
59. Μανέτας, Γ. (2005). Φυσιολογία Φυτών. Εκδόσεις Ίων.Μαραγκού,1992.
60. Πίκουλας, Γ., Α., (2004), «Οίνον ιστορώ ΙΙΙ. Τ' αμπελανθίσματα», Αθήνα.
61. Ρουμπελάκη- Αγγελάκη Κ, Α., Γαλάτης Β., Γανωτάκης Δ., Γκανή-Σπυροπούλου Κ., Καραμπουρνιώτης Γ., Κοτζαμπάσης Κ., Κωνσταντινίδου Ε, Ι., Μανέτας Ι., (2003) βιβλ «Φυσιολογία Φυτών από το Μόριο στο Περιβάλλον» παν. Εκδ Κρήτης.
62. Σταυρακάκης Ν.,Μ., (2013) «Αμπελουργία» εκδ. Τροπή.
63. Τοουλάκου Γ., (2013): Η επίδραση της πενίας άνθρακα στους κρυστάλλους οξαλικού ασβεστίου και στο μεταβολικό πρότυπο του *Amaranthus* sp. (κν. βλήτο): μεταβολομική ανάλυση. Διδακτορική διατριβή. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
64. Τσετούρα Λ., Π., (2014) βιβλ «Τα μυστικά του καλού κρασιού».