ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
«Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας Φυτών»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *hopX1* (*avrPstE*) ΣΕ ΦΥΤΑ *N. benthamiana*

ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ ΑΝΤΙΓΟΝΗ

Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών
Υπεύθυνος Καθηγητής: ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΠΑΝΟΠΟΥΛΟΣ

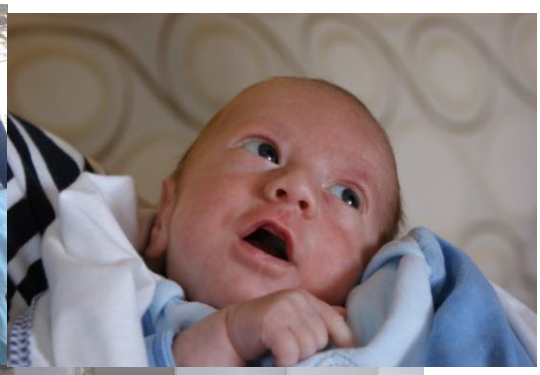
Ηράκλειο, 2010

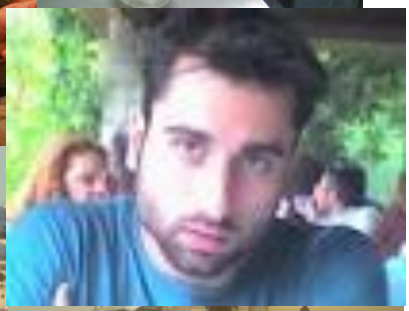
Στο όνειρο...

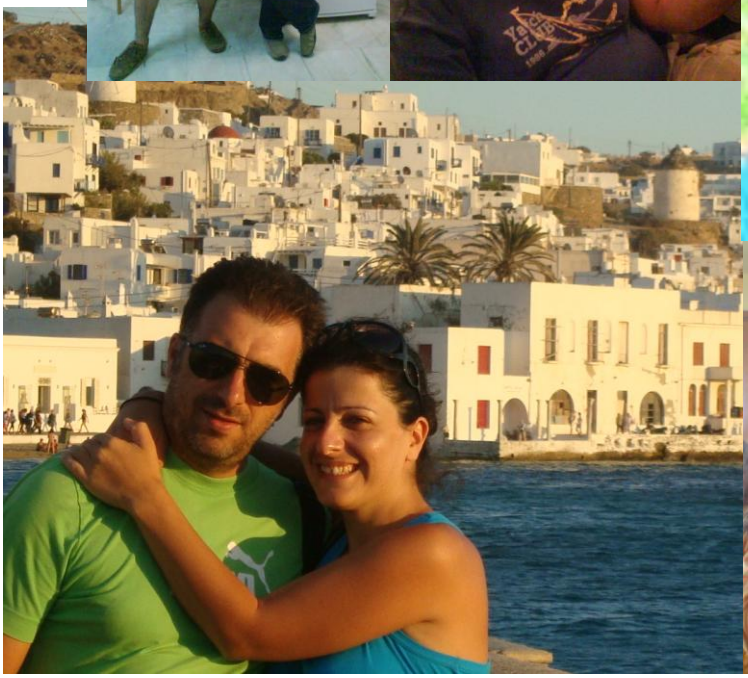
ήρθε πλέον ο καιρός να πάρω πια το master
με θέμα των φυτών τους παθογόνους gangster

τελειώνοντας το έργο μου θα σας ευχαριστήσω
είναι το λιγότερο να σας το αναγνωρίσω
δίπλα μου σταθήκατε στην προσπάθειά μου
βοήθεια μου δώσατε και στα πειράματά μου

έναν έναν σας τιμώ λέω ευχαριστίες
όχι τυπικότητες αλλά καρδιάς ουσίες







ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ..... - 3 -

ABSTRACT ..... - 4 -

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ..... - 5 -

1. ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΦΥΤΑ ΩΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ-ΜΟΝΤΕΛΑ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ: ΤΟ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΤΗΣ *N. BENTHAMIANA* ..... - 5 -

2. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ ΣΕ ΦΥΤΑ ..... - 7 -

2.1. Περιγραφή του εκκριτικού συστήματος TTSS ..... - 10 -

2.2. Καθορισμός της δράσης και των προϊόντων των avr γονιδίων ..... - 16 -

3. ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΜΕ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* ΩΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΑΛΕΙΟ ..... - 18 -

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ..... - 20 -

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ..... - 22 -

1) ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *HOPX1* ΑΠΟ ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV.*TOMATO* $_{DC3001}$ ..... - 22 -

1.1) Θρεπτικά μέσα για καλλιέργεια των βακτηρίων ..... - 22 -

1.2) Απομόνωση βακτηριακού γενωμικού DNA ..... - 23 -

1.3) Σχεδιασμός εκκινητών για την εξόρυξη του γονιδίου hopX1 με τη μέθοδο της PCR ..... - 24 -

1.4) Απομόνωση του γονιδίου hopX1 από εκχύλισμα DNA του βακτηρίου Pseudomonas syringae pv. tomato $_{DC3001}$ ..... - 25 -

1.5) Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR σε πηκτή αγαρόζης 1.2% (w/v) ..... - 26 -

1.6) Αλληλούχιση του ενθέματος του πλασμιδίου pGEM-T easy + hopX1 ..... - 30 -

2) ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΚΑΣΕΤΑΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ *HOPX1* ΣΕ ΦΥΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ..... - 31 -

2.1) Αντίδραση πέψης του πλασμιδίου pGEM-T easy + hopX1 με τα ένζυμα XhoI και XbaI. ... - 33 -

2.2) Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης σε πηκτή αγαρόζης 0.8% (w/v) ..... - 34 -

2.3) Ανάκτηση και καθαρισμός της ζώνης του γονιδίου hopX1. ..... - 34 -

2.4) Μέτρηση της συγκέντρωσης σε νανοφωτόμετρο ..... - 35 -

2.5) Αντίδραση σύνδεσης του φορέα pART7 με το γονίδιο hopX1 ..... - 35 -

2.6) Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων E. coli (DH10B) με το διάλυμα σύνδεσης του pART7-hopX1 ..... - 35 -

2.7) Απομόνωση πλασμιδιακού DNA του pART7-hopX1 από αποικία βακτηρίων ..... - 35 -

3) ΥΠΟΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΚΑΣΕΤΑΣ *CAMV35S-HOPX1-TOCS* ΣΤΟΝ ΔΥΑΔΙΚΟ ΦΟΡΕΑ ΑΓΡΟΒΑΚΤΗΡΙΟΥ PART27 .. - 36 -

3.1) Διαγνωστική πέψη του φορέα pART7-hopX1 με τα ένζυμα XhoI και XbaI ..... - 37 -

3.2) Ηλεκτροφόρηση του παραπάνω προϊόντος της πέψης σε πηκτή αγαρόζης 0.8% (w/v) ... - 37 -

3.3) Πέψη του φορέα pART7-hopX1 με το ένζυμο NotI (με σκοπό την λήψη της κασέτας CaMV35S -hopX1-Tocs) ..... - 38 -

3.4) Ηλεκτροφόρηση του παραπάνω προϊόντος της πέψης σε πηκτή αγαρόζης 0.8% (w/v) ... - 38 -

3.5) Αποκοπή και καθαρισμός DNA της ζώνης της κασέτας CaMV35S-hopX1-Tocs ..... - 38 -

3.6) Μέτρηση της συγκέντρωσης σε νανοφωτόμετρο (nanodrop, ND 1000) και ηλεκτροφόρηση μικροποσότητας του καθαρισμένου εκχυλίσματος CaMV35S-hopX1-Tocs (3μl) ..... - 38 -

3.7) Αντίδραση σύνδεσης του φορέα pART27 με την κασέτα CaMV35S-hopX1-Tocs ..... - 39 -

3.8) Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων E. coli (DH10B) με το διάλυμα της σύνδεσης του pART27 με την κασέτα CaMV35S-hopX1-Tocs ..... - 39 -

3.9) Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένες αποικίες βακτηρίων ..... - 39 -

3.10) Διαγνωστική πέψη του φορέα pART27- CaMV35S-hopX1-Tocs με τα ένζυμα XhoI και XbaI ..... - 40 -

3.11) Ηλεκτροφόρηση του παραπάνω προϊόντος της πέψης σε πηκτή αγαρόζης 0.8% (w/v). - 40 -

4) Μετασχηματισμός του Agrobacterium tumefaciens C58C1 με το πλασμίδιο pART27-CaMV35S-hopX1-Tocs ..... - 41 -

5) Σάρωση μετασχηματισμένων αποικιών με ανάλυση με PCR τυχαία επιλεγμένων αποικιών από τα τρυβλία επιλογής χωρίς προηγούμενη εκχύλιση DNA (Colony PCR) ..... - 41 -

5.1) Ανάλυση με PCR τυχαία επιλεγμένων αποικιών από τα τρυβλία επιλογής χωρίς προηγούμενη εκχύλιση DNA (Colony PCR) για τον εντοπισμό του γονιδίου hopX1 ..... - 42 -

5.2) Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR σε πηκτή αγαρόζης 0.8% (w/v)..... *- 43 -*
6) ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΛΛΙΚΩΝ ΔΙΣΚΩΝ *NICOTIANA BENTHAMIANA* ..... - 44 -
7) ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ..... - 46 -
7.1) Ανάλυση κατά Northern ..... *- 46 -*
7.1.1) Απομόνωση ολικού RNA από φυτικό ιστό (μέθοδος τριζόλης) ..... - 47 -
7.1.2) Αποτύπωση κατά Northern ..... - 48 -
7.1.3) Προετοιμασία ραδιοσημασμένου ιχνηλάτη *hopX1* ..... - 49 -
7.1.4) Προϋβριδοποίηση, υβριδοποίηση, ξεπλύματα και έκθεση ..... - 49 -
7.2) Ανάλυση κατά Southern..... *- 50 -*
7.2.1) Απομόνωση DNA από φυτικό ιστό (Dellaporta) ..... - 51 -
7.2.2) Αποτύπωση κατά Southern ..... - 51 -
7.2.3) Παρασκευή ραδιενεργού ιχνηλάτη ..... - 52 -
7.2.4) Προϋβριδοποίηση, υβριδοποίηση, ξεπλύματα και έκθεση ..... - 52 -
8) ΣΠΟΡΑ T_0 ΣΠΟΡΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΛΗΨΗ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ *N. BENTHAMIANA* (*35S::HOPX1-TOCS*) T_1 ΓΕΝΙΑΣ. ..... - 53 -
9) ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΣΤΑ T1 ΦΥΤΑ *N.BENTHAMIANA 35S::HOPX1* ..... - 54 -
9.1) Ανάλυση κατά Northern ..... *- 54 -*
9.1.1) Απομόνωση ολικού RNA από φυτικό ιστό (μέθοδος τριζόλης) ..... - 54 -
9.1.2) Στύπωμα κατά Northern ..... - 54 -
9.1.3) Κατασκευή ραδιενεργού ιχνηλάτη ..... - 55 -
9.1.4) Προϋβριδοποίηση, υβριδοποίηση, ξεπλύματα και αυτοραδιογραφία..... - 55 -
9.2) Ανάλυση κατά Southern..... *- 56 -*
9.2.1) Απομόνωση DNA από φυτικό ιστό ..... - 56 -
9.2.2) Στύπωμα κατά Southern ..... - 56 -
9.2.3) Κατασκευή ραδιενεργού ιχνηλάτη ..... - 56 -
9.2.4) Προϋβριδοποίηση, υβριδοποίηση, ξεπλύματα και έκθεση ..... - 56 -
9.3) Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης με εκκινητές για το γονίδιο hopX1 ..... *- 57 -*
9.4) Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης με εκκινητές για τα γονίδια hopX1 και virG..... *- 58 -*
9.5) Αλυσιδωτή αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφάσης (RT-PCR) ..... *- 61 -*
9.5.1) Απομόνωση ολικού RNA από το φυτικό ιστό ..... - 61 -
9.5.2) Προσθήκη DNAάσης ..... - 61 -
9.5.3) Αλυσιδωτή αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφάσης (RT-PCR) ..... - 62 -
10) ΜΟΛΥΝΣΗ ΦΥΤΩΝ *N. BENTHAMIANA 35S::HOPX1* T1 ΓΕΝΙΑΣ ΜΕ ΑΓΡΟΒΑΚΤΗΡΙΟ (*A. TUMEFACIENS*) ..... - 63 -

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... - 64 -

1) ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *HOPX1* ΑΠΟ ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ *P. SYRINGAE* PV. *TOMATO* DC3001..... - 64 -
2) ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΔΥΑΔΙΚΟΥ ΦΟΡΕΑ ΜΕ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΚΑΣΕΤΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ $HOPX1_{DC3001}$ ΣΕ ΦΥΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (PART27-*CAMV35S-HOPX1-TOCS*)..... - 67 -
3) ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ *N. BENTHAMIANA (35S::HOPX1)* ..... - 70 -
4) ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ T_0 *N. BENTHAMIANA* (*35S::HOPX1*) ..... - 77 -
4.1) Ανάλυση κατά Northern ..... *- 77 -*
4.2) Ανάλυση κατά Southern..... *- 79 -*
5) ΒΛΑΣΤΗΣΗ T_0 ΣΠΟΡΩΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΚΑΝΑΜΥΚΙΝΗΣ ΓΙΑ ΤΗ ΛΗΨΗ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ *N. BENTHAMIANA* (*35S::HOPX1*) T_1 ΓΕΝΙΑΣ. ..... - 81 -
6) ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΣΤΑ T1 ΦΥΤΑ *N. BENTHAMIANA 35S::HOPX1* ..... - 82 -
6.1) Ανάλυση κατά Northern ..... *- 82 -*
6.2) Ανάλυση κατά Southern..... *- 84 -*
6.3) Χαρακτηρισμός των γενετικών σειρών N. benthamiana 35S::hopX1 με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) ..... *- 85 -*
6.4) Αλυσιδωτή αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφάσης (RT-PCR) ..... *- 86 -*
7) ΜΟΛΥΝΣΕΙΣ T1 ΦΥΤΩΝ *N. BENTHAMIANA* 35S::*HOPX1* ΜΕ ΠΑΘΟΓΟΝΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΤΟΥ *A. TUMEFACIENS* ..... - 87 -

ΣΥΜΠΕΡΑΜΑΤΑ-ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ..... - 91 -

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... - 95 -

ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ..... - 102 -

Περίληψη

Μια σειρά προηγούμενων μελετών εδραιώνουν την άποψη οτι φυτοπαθογόνα βακτήρια και μύκητες, όπως και οι φυτοπαθογόνοι ιοί, διαθέτουν την ικανότητα να εμπλέκουν την RNA σίγηση κατά την αλληλεπίδρασή τους με φυτά για να προκαλέσουν ασθένειες. Σε προηγούμενα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο μας δείχθηκε οτι ορισμένες πρωτείνες-τελεστές Τύπου ΙΙΙ από παθότυπους του βακτηρίου *P. syringae* δρουν ως ενισχυτές της RNA-διαμεσολαβούμενης σίγησης. Μεταξύ των πρωτείνών αυτών συγκαταλέγεται και η πρωτεΐνη-τελεστής HopX1 του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* $_{DC3001}$. Για να μελετηθεί λεπτομερέστερα ο μηχανισμός και οι συνέπειες της εμπλοκής του μηχανισμού σίγησης στην αλληλεπίδραση παθογόνων-ξενιστή σε διάφορα παθοσυστήματα κρίθηκε απαραίτητη η κατασκευή γενετικά τροποιημένων φυτών που εκφράζουν το εν λόγω γονίδιο. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε γονιδιακή κασσέτα συστατικής έκφρασης σε δυαδικό φορέα αγροβακτηρίου για γενετικό μετασχηματισμό φυλλικών δίσκων του φυτού *Nicotiana benthamiana*. Στη συνέχεια έγινε μοριακός έλεγχος και χαρακτηρισμός των φυτών T_0/T_1 γενειάς με αναλύσεις Northern, Southern και PCR. Ο μοριακός χαρακτηρισμός επιβεβαίωσε την ενσωμάτωση και μεταγραφική έκφραση του γονιδίου *hopX1* σε τρεις τουλάχιστον σειρές. Πειραματικές μολύνσεις σε δύο γενετικά τροποιημένες σειρές έδειξαν ότι αυτές ήταν ανθεκτικές σε ογκογόνο στέλεχος του *Agrobacterium tumefaciens*, επιβεβαιώνοτας προηγούμενες παρατηρήσεις για την εμπλοκή του μηχανισμού της σίγησης στην βακτηριακή ογκογένεση. Οι γενετικά τροποποιημένες σειρές προσφέρονται για περαιτέρω πειράματα με διάφορα φυτοπαθογόνα που προσβάλλουν την *N. benthamiana* προκειμένου να διερευνηθεί η εμπλοκή του μηχανισμού της σίγησης στην παθογένεια σε άλλα παθοσυστήματα.

Abstract

Previous studies established that phypathogenic bacteria and fungi engage the mechanism of RNA silencing during their interaction with plants and this is thought to be essential for disease development in some pathosystems. Previous experiments carried out in our lab showed that certain Type III effector proteins from *P.syringae* pathovars act as enhancers of the RNA mediated silencing mechanism. HopX1 from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* $_{DC3001}$ is one such effector. To further examine the involvement of RNA silencing and its consequences in the host-pathogen interaction a 35S::hopX1 expression cassette was introduced into *Nicotiana benthamiana* by Agrobacterium-mediated transformation of leaf discs. Transgenic plants of the T_0/T_1 generation were characterized by Northern and Southern blotting and PCR analysis. This molecular characterization confirmed the incorporation and transcriptional expression of hopX1 gene in at least three lines. Experimental infection in two genetically transformed lines showed that they were resistant to a tumor-inducing *Agrobacterium tumefaciens* strain, as expected from previous findings showing that RNA-mediated silencing of T-DNA oncogenes is required for crown call tumorigenesis.The genetically transformed lines offer a useful resource for further experiments with various plant pathogens which infect *N. benthamiana* in order to investigate the role of RNA silencing mechanism in the pathogenicity of other pathosystems.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Γενετικά τροποποιημένα φυτά ως συστήματα-μοντέλα επιστημονικής έρευνας: Το παράδειγμα της *N. benthamiana*

Τις τελευταίες δεκαετίες η χρήση της γενετικής τροποποίησης (genetic modification, transgenic technology) έχει εξελιχθεί σε ένα ισχυρό εργαλείο στη γενικότερη έρευνα και μελέτη διαφόρων σημαντικών βιολογικών διεργασιών σε πολλούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων και των φυτών. Πιο συγκεκριμένα, τα γενετικά τροποποιημένα φυτικά συστήματα, πέρα από τη δυνατότητα κατασκευής γενετικά τροποποιημένων ποικιλιών σε φυτικά είδη οικονομικής σημασίας, καθιστούν δυνατή μια διαφορετική προσέγγιση στη διαλεύκανση των μηχανισμών γονιδιακής ρύθμισης, κυταρικής βιολογίας, οργανισμικής ανάπτυξης, ιστολογικής διαφοροποίησης, οργανογένεσης και αναπαραγωγής, όπως και στη μελέτη των διοργανισμικών σχέσεων φυτών με μικροργανισμούς. Τα γενετικά τροποποιημένα φυτά και οι *in vitro* κυτταροκαλλιέργειες προσφέρουν εναλλακτικές λύσεις στη μελέτη των παραπάνω θεμάτων υπό σχεδιασμένες, ελεγχόμενες συνθήκες εργαστηριακού θερμοκηπιακού περιβάλλοντος καθώς και σε συνθήκες αγρού. Επίσης, θεωρούνται λιγότερο χρονοβόρες διαδικασίες συγκριτικά με άλλες μεθόδους παραγωγής και αξιοποίησης γενετικής παραλακτικότητας για το σχεδιασμό, την ανάλυση και την ερμηνεία αποτελεσμάτων (Hellwig et al., 2004). Στην περίπτωση της μελέτης διοργανισμικών σχέσεων, όπως είναι οι σχέσεις παθογόνου-ξενιστή στη φυτοπαθολογία και άλλα παθοσυστήματα, η γενετική τροποποίηση του ξενιστή (όπως και του παθογόνου) είναι αναπόσπαστο εργαλείο στην ανάλυση των μηχανισμών «αντίληψης» της παρουσίας του παθογόνου και του ξενιστή, όπως και της εκατέρωθεν αντίδρασης του ενός οργανισμού στην παρουσία του άλλου.

Το γένος *Nicotiana* είναι ένα από τα πέντε κύρια γένη της οικογένειας *Solanaceae*. Από τα 64 είδη που ανήκουν στο γένος *Nicotiana*, τα 44 είναι ενδογενή της Βόρειας ή Νότιας Αμερικής και 20 είναι αυτόχθονα είδη της Αυστραλίας. Το γένος *Nicotiana*, διαιρείται σε τρία υπο-γένη (*Rustica*, *Tabacum*, *Petunioides*) με βάση κυρίως τη μορφολογία, την ικανότητα διασταύρωσης μεταξύ τους, τη συμπεριφορά των ενδοειδικών υβριδίων (Christoff, 1928) και τον αριθμό των χρωμοσωμάτων τους. Τα διάφορα είδη του γένους *Nicotiana* εμφανίζουν μεταξύ τους κοντινές γενετικές συγγένειες με τα γένη *Cestrum* και *Petunia*. Στην περιγραφή της καταγωγής και της εξέλιξης του γένους ο Goodspeed (Goodspeed, 1954) διατύπωσε την άποψη ότι τα τρία γένη (*Nicotiana*, *Cestrum*, *Petunia*) προήλθαν από μια γενετική «δεξαμενή» η οποία έφερε κοινά στοιχεία και από τα τρία πρόδρομα γένη (pre-C*estrum,* pre-*Petunia*, pre-*Nicotiana*). Τελικά, η εμφάνιση των κεστροϊδών (cestroid) και πετουνοειδών (petunioide) γενετικών συμπλεγμάτων, οδήγησε εξελικτικά στην σύνθεση του υπο-γένους *Tabacum*, *Rustica* και του *Petunioides,* αντίστοιχα (Khan and Narayan, 2007). Το γένος *Nicotiana* έχει αποτελέσει τη βάση για πολλές μελέτες κλασικής γενετικής τόσο στο παρελθόν (ενδεικτικά αναφέρονται οι Christoff, 1928 και Goodspeed, 1954) όσο και σήμερα (Assem et al., 2009), που αφορούν την αμφιπλοειδία (amphiploid) στην εξέλιξη, τη μονοσωμική ανάλυση (monosomic analysis) καθώς και την ενδοειδική μεταφορά γονιδίων.

Μέλη του γένους *Nicotiana* χρησιμοποιούνται ευρέως ως οργανισμοί μοντέλα στη μελέτη γενετικών, μοριακών, αναπτυξιακών και οικολογικών παραμέτρων που ελέγχουν τη διαφοροποίηση των ειδών κατά την βιολογική τους εξέλιξη (Narayan, 1987, 1988; Japan Tabacco Inc., 1994; Volkove et al., 1999; Lim et al., 2000; Chase et al., 2003). Γενικά η γενετική πολυπλοειδία (polyploidy) μέσω διπλασιασμού του γονιδιώματος είναι ένα συνηθισμένο φαινόμενο στα φυτά (Wendel, 2000) και αποτελεί έναν από τους παράγοντες διεύρυνσης της γενετικής ποικιλότητας που επιφέρουν οι διαφόρων ειδών μεταλλάξεις και γενετικές μεταθέσεις (Soltis, 2005). Από τα 64 είδη του γένους *Nicotiana*, τα 11 είναι αμφιδιπλοειδή (2n=4x=48). Τα υπο-γένη *Rustica* και *Tabacum* έχουν είδη με απλοειδή (haploid) αριθμό χρωμοσωμάτων (n=12 ή n=24). Τα είδη του υπο-γένους *Petunioides* εμφανίζουν επιπλέον ανευπλοειδείς καταστάσεις (aneuploid) λόγω άνισου διαχωρισμού χρωμοσωμάτων (n = 9, 10, 16, 18, 19, 20 και 22). Έχει υπολογιστεί ότι ο βασικός αριθμός χρωμοσωμάτων του γένους είναι έξι (n = 6). Η ενδοειδική ανταλλαγή γονιδίων κατά τη διάρκεια της βιολογικής εξέλιξης των ειδών, η αμφιδιπλοειδία μεταξύ των ενδοειδικών υβριδίων και η τυχαία γενετική παρέκλιση λόγω της γεωγραφικής απομόνωσης, έχουν παίξει κυρίαρχο λόγο στην εξέλιξη του είδους (Khan and Narayan, 2007). Σύμφωνα με αναλύσεις που έχουν γίνει στον καρυώτυπο αλλά και με μελέτη της συγγένειας των χρωμοσωμάτων σε ενδοειδικές διασταυρώσεις (Goodspeed, 1954), παρουσιάζονται σημαντικές φυλογενετικές διαφοροποιήσεις οι οποίες συνοδεύονται από σημαντικές αλλαγές στην οργάνωση του καρυώτυπου στο γένος. Αυτό αντανακλάται στις μεγάλες διαφορές και διαφοροποιήσεις του μεγέθους του γονιδιώματος μεταξύ των ειδών.

Το είδος *N. benthamiana* (Εικόνα 1), χρησιμοποιείται ευρέως ως ερευνητικό μοντέλο στη βιολογία φυτών και ειδικότερα στη μελέτη του μηχανισμού της γονιδιακής σίγησης. Η μεγάλη χρηστικότητα του συγκεκριμένου είδους στη διεξαγωγή γενετικών ερευνών οφείλεται εν μέρει στην εύκολη ανάπτυξή του σε συνθήκες θερμοκηπίου καθώς και στην ευχέρεια γενετικών χειρισμών στους οποίους μπορεί εύκολα να υποβληθεί. Η *N. benthamiana* ανήκει στο υπο-γένος *Petunioides* και συγκεκριμένα στο τομέα (section) των *Suavelontes*. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι το είδος *N. tabacum* το οποίο είναι ένα φυσικό αμφιδιπλοειδές φυτό (2n = 48), θεωρείται ότι έχει προέλθει από υβριδισμό άγριων προγονικών ειδών (Gerstel, 1960; 1963) που ανήκουν στο υπο-γένος *Petunioides*, παρέχοντας το μητρικό γονιδίωμα, και στο υπο-γένος *Tabacum* το οποίο παρείχε το πατρικό γονιδίωμα (Ren and Timko, 2001). Το γεγονός αυτό είναι σημαντικό καθώς δίνει ένα πλεονέκτημα στη χρήση της *N. benthamiana* έναντι του *N. tabacum* σε γενετικές/μοριακές μελέτες καθώς εμφανίζει πιο απλό καρυώτυπο επιτρέποντας τον καλύτερο χειρισμό του στο εργαστήριο.

Εικόνα 1. Φωτογραφίες του είδους *N.benthamiana*.

2. Μηχανισμοί βακτηριακής παθογένειας σε φυτά

Στο φυσικό τους περιβάλλον τα φυτά αντιμετωπίζουν μια μεγάλη ποικιλία παθογόνων μικροοργανισμών (μυκήτων, ωομυκήτων, βακτηρίων), ιών, ιοειδών και παρασίτων (έντομα, νηματώδεις) (Bari and Jones, 2009). Παρά την παρουσία μεγάλου αριθμού μικροοργανισμών στη φύση, μόνο ελάχιστοι είναι αυτοί οι οποίοι μπορούν να επιτεθούν σε κάθε είδος φυτού. Όσον αφορά στα μικροβιακά και ιϊκά παθογόνα, είναι γνωστό ότι αυτά διαθέτουν πρωτεϊνικούς παράγοντες παθογένειας (effectors, τελεστές) οι οποίοι καταστέλλουν πρωτογενείς ή παθοεπαγώμενους μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή με τελικό αποτέλεσμα την εκδήλωση ασθένειας.

Οι μηχανισμοί άμυνας των φυτών είναι συνήθως πολύπλοκοι και πολυεπίπεδοι. Συνήθως τα φυτά χρησιμοποιούν φυσικά αλλά και χημικά εμπόδια τα οποία προϋπάρχουν της μόλυνσης, παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του παθογόνου και την εκδήλωση της ασθένειας. Επιπλέον τα φυτά έχουν εξελίξει μια μεγάλη ποικιλία επαγόμενων μηχανισμών άμυνας, οι οποίοι ενεργοποιούνται μετά την αναγνώριση της παρουσίας του παθογόνου από το φυτό. Αυτοί οι επαγόμενοι μηχανισμοί συμπεριλαμβάνουν πολυσχιδείς μορφολογικές, μοριακές, και βιοχημικές αλλαγές όπως π.χ. οξειδωτικό στρες, έκφραση σχετικών γονιδίων άμυνας, παραγωγή αντιμικροβιακών συστατικών (phytoalexins) και συχνά και μια μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (programmed cell death, PCD) την ονομαζόμενη αντιδραση υπερευαισθησίας (hypersensitive response, HR) (van Loon et al., 2006).

Επίσης τα φυτά μπορούν και αντιμετωπίζουν πιθανά παθογόνα μικρόβια μέσα από ένα βασικό μηχανισμό άμυνας, που καλείται ενδογενές αμυντικό σύστημα (innate immune system). Η παρούσα άποψη σχετικά με το αμυντικό σύστημα των φυτών, έχει χαρακτηριστεί με το μοντέλο “zigzag” σύμφωνα με το οποίο μικροβιακά μοριακά πρότυπα (microbe-associated molecular patterns-MAMPs) ή μοριακά πρότυπα σχετικά με την παθογένεια, (pathogen associated molecular patterns-PAMPs) (Medzhitov and Janeway, 1997) γίνονται αντιληπτά από μεμβρανικούς υποδοχείς αναγνώρισης κωδικοποιημένων πρότυπων (pattern recognition receptors-PRRs) (Nicaise et al., 2009), και η αναγνώριση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση επαγόμενης ανοσίας που πυροδοτείται από τα PAMPs (PAMP-triggered immunity, PTI) (Bari and Jones, 2009). Αρκετοί τελεστές εκκρινόμενοι από παθογόνα καταστέλλουν την απόκριση PTI και έτσι επάγουν ευπάθεια που επιβάλλει ο ίδιος ο τελεστής (effector triggered susceptibility-ETS). Ένα βασικό σημείο στην αμυντική στρατηγική των φυτών είναι ότι αναγνωρίζουν έναν δεδομένο τελεστή είτε άμεσα είτε έμμεσα και επάγουν ανοσία η οποία πυροδοτείται από τον τελεστή (effector triggered immunity-ETI), με τελικό αποτέλεσμα την εκδήλωση ανθεκτικότητας στην ασθένεια (Chisholm et al. 2006; Jones and Dangl 2006).

Η επαγωγή της ανοσίας είτε μέσω των PAMPs (PTI), είτε μέσω των τελεστών (ETI), αυξάνει την ανθεκτικότητα των φυτών και παρεμποδίζει την αποίκιση και την ενδοφυτική ανάπτυξη των παθογόνων. Έτσι διαφαίνεται ότι η έγκαιρη αναγνώριση ενός μικροοργανισμού-εισβολέα, σε συνδυασμό με την γρήγορη και αποτελεσματική επαγωγή της αμυντικής απόκρισης, αποτελούν ένα σημαντικό κλειδί μεταξύ της

ανθεκτικότητας και της δεκτικότητας (ευπάθειας σε μικροβιακά παθογόνα). Οι μοριακές δομές των PAMPs είναι συντηρημένες (Nurnberger et al., 2004), με χαρακτηριστικά παραδείγματα βακτηριακών PAMPs τόσο τους λιποπολυσακχαρίτες (Dow et al., 2000), όσο και τη μαστιγίνη (Felix et al., 1999) που συναντώνται τόσο σε φυτικά όσο και ζωικά παθογόνα. Στα φυτικά ωομυκητιακά παθογόνα, η εκκρινόμενη πρωτεΐνη INF1 (Kamoun et al., 1998) και ένα πεπτίδιο ονομαζόμενο pep13 που προέρχεται από τη τρανσγλουταμινάση (Blume et al., 2000) υποκινούν αμυντικές αποκρίσεις. Το φάσμα της απόκρισης διαφόρων φυτών-ξενιστών σε μικροβιακά PAMPs μπορεί να διαφέρει. Έτσι παρατηρείται ότι η βακτηριακή μαστιγίνη επάγει τις αμυντικές αποκρίσεις σε μια μεγάλη ποικιλία φυτών όπως είναι η *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, μέλη της οικογένειας *Solanaceae*, ενώ η αναγνώριση του βακτηριακού παράγοντα επιμήκυνσης της πεπτιδικής αλυσίδας στα ριβοσώματα EF-Tu (elongation factor Tu) φαίνεται περιοριστική σε είδη της οικογένειας *Brassicacae* (Kunze et al., 2004). Συμπερασματικά, τα φυτά φαίνεται ότι έχουν «προικιστεί» με την ικανότητα να αναγνωρίζουν, μέσω ειδικών υποδοχέων, κύρια μόρια-συστατικά των παθογόνων, τα οποία τους παρέχουν ένα μόνιμο δείκτη επικείμενης προσβολής από εν δυνάμει παθογόνα (Bari and Jones, 2009).

Η αναγνώριση των μικροβιακών PAMPs τυπικά συμβαίνει στο εξωτερικό μέρος της κυτοπλασματικής μεμβράνης του φυτού. Διαφορετικά φυτικά είδη είναι πιθανόν να διαθέτουν διαφορετικούς, άγνωστους σε αριθμό υποδοχείς αναγνώρισης των PAMPs, πράγμα που αντικατοπτρίζει την ικανότητα τους να αναγνωρίζουν μια ποικιλία PAMPs. Ένας καλά χαρακτηρισμένος υποδοχέας PAMP είναι η κινάση AtFLS2 που έχει επικράτειες υποδοχέα στην *Arabidopsis thaliana* (Hann and Rathjen, 2007). Η πρωτεϊνη AtFLS2 φαίνεται να είναι ένας άμεσος υποδοχέας του πεπτιδίου Flg22 (22-αμινοξέα από το συντηρημένο αμινοτελικό άκρο της βακτηριακής μαστιγίνης (Chinchilla et al., 2006). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η αναγνώριση διαφορετικών PAMPs οδηγεί σε έκφραση παρόμοιων αμυντικών αποκρίσεων, γεγονός που αφήνει να εννοηθεί ότι τα PAMPs λειτουργούν πολλές φορές εκ του περισσού (Zipfel et al., 2006).

Οι αποκρίσεις φυτών στην παρουσία διάφορων PAMPs συνήθως περιλαμβάνουν την παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου (active oxygen species-AOS), αποκρίσεις ασβεστίου, απόθεση καλλόζης (τύλων) στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτών, ενεργοποίηση MAP κινασών, επαγωγή γονιδίων αποκρινόμενων στην παθογένεση, ενώ σε φυτικές κυτταρικές καλλιέργειες δημιουργία αλκαλικών συνθηκών στο θρεπτικό μέσο (Kunze et al., 2004; Zipfel et al., 2004; Chinchilla et al., 2006). Η ενεργοποίηση ενός ή και περισσοτέρων PAMP υποδοχέων, είναι πιθανό να επαρκεί για την καταστολή κάποιων παθογόνων (Hann and Rathjen, 2007). Αυτή η υπόθεση είναι συμβατή με την έλλειψη παθογένειας βακτηριακών μεταλλαγμάτων τα οποία στερούνται της λειτουργίας των *hrp* γονιδίων, που είναι υπεύθυνα για την έγχυση των πρωτεϊνών τελεστών στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή, μέσω του εκκριτικού συστήματος III (TTSS) (Roine et al., 1997) στις οποίες αποδίδεται ως κύριος ρόλος η καταστολή αμυντικών αποκρίσεων, αν και υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που συμβάλλουν σε αυτό. Αρκετοί ερευνητές παρατήρησαν ότι στη βακτηριακή παθογένεια συμβάλλουν ανεξάρτητοι τελεστές (Espinosa and Alfano, 2004). Τελεστές που παράγονται ενδογενώς σε τρασνγενικά φυτά ή εγχύονται στα φυτικά κύτταρα μέσω του βακτηριακού TTSS, μπορούν να καταστείλουν τον

κυτταρικό θάνατο, την αντίσταση του μη-ξενιστή καθώς και την μεταγραφή αμυντικών γονίδιων που σχετίζονται από την εναπόθεση καλλόζης (Hauck et al., 2003; Kang et al., 2004; Abramovitch and Martin, 2005; Kim et al., 2005; Li et al., 2005). Πολλές φορές μια μόνο πρωτεΐνη τελεστής, είναι αρκετή για να ξεπεράσει την ανθεκτικότητα σε μια ασθένεια που απορρέει από πολλαπλά και διαφορετικά PAMPs. Για παράδειγμα, η πρωτεΐνη AvrPto έχει προταθεί ότι δρα σαν καταστολέας της άμυνας η οποία βασίζεται στο κυτταρικό τοίχωμα (Hauck et al., 2003), ενώ η AvrPtoB καταστέλλει τον κυτταρικό θάνατο μέσω της δράσης της στους ευκαριωτικούς οργανισμούς ως E3 λιγάση της ουμπικουϊτίνης (ubiquitin ligase; Janjusevic et al., 2006). Επίσης πολλές πρωτεΐνες τελεστές, μεταξύ αυτών η AvrRpt2, είναι πρωτεάσες με αποτέλεσμα να αποικοδομούν έναν ή περισσότερους πρωτεϊνικούς στόχους (Hotson and Mudgett, 2004). Στο φυτό *Arabidopsis* η πρωτεΐνη RIN4 είναι στόχος της AvrRpt2 πρωτεάσης αλλά ολόκληρο το μονοπάτι της παθογένειας δεν είναι ακόμη γνωστό γιατί σε αυτή την περίπτωση, η RIN4 ρυθμίζει αρνητικά την ανθεκτικότητα σε πολλά επίπεδα (Mackey et al., 2003; Kim et al., 2005). Σε γενικές γραμμές, ο μηχανισμός πάνω στον οποίο στηρίζονται όλα αυτά τα φαινόμενα δεν είναι ακόμη κατανοητός (Hann and Rathjen, 2007).

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η στρατηγική επιβίωσης των φυτών σε περιβάλλον με παθογόνους οργανισμούς βασίζεται στην επαρκή αντίληψη των παθογόνων, καθώς και στη γρήγορη αμυντική απόκριση των φυτών. Αντίθετα με τα λεμφοκύτταρα ή τους άλλους τύπους κυττάρων που διαμεσολαβούν στις ανοσοαπόκρισεις στα θηλαστικά, η απόκριση των φυτών εξαρτάται αποκλειστικά από την αναγνώριση των παθογόνων. Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι η επιτυχής αντιμετώπιση της επαγόμενης από το PAMP ανοσοαπόκρισης από τα παθογόνα (PTI), βασίζεται στην έκκριση πρωτεϊνών τελεστών (effectors), οι οποίοι στοχεύουν σε σημεία-κλειδιά της PTI, ώστε να παρεμποδιστεί η έκφρασή της (Nicaise et al., 2009). Σε αντιδιαστολή με αυτό, πολλές ποικιλίες φυτών έχουν εξελικτικά αποκτήσει «πρωτεΐνες ανθεκτικότητας», οι οποίες άμεσα ή έμμεσα μπορούν και ανιχνεύουν συγκεκριμένους τελεστές (avirulence proteins-Avr proteins) σύμφωνα με τη θεωρία “gene-to-gene”, η οποία οδηγεί σε ισχυρή ανοσοαπόκριση που συχνά συνοδεύεται με αντίδραση υπερευαισθησίας[1]. Το μοντέλο αυτό ενσωματώνει μια δυναμική, παράλληλη εξέλιξη μεταξύ φυτών και παθογόνων (Chisholm et al., 2006; Jones and Dangl, 2006). Γενικά η περαιτέρω γνώση σχετικά με την αναγνώριση και τη σηματοδότηση της PTI αποτελεί μια σημαντική πρόκληση στη φυτοπαθολογία καθώς, πολλοί από τους εμπλεκόμενους μηχανισμούς παραμένουν άγνωστοι. Στα περισσότερα φυτά, οι μεμβρανικοί υποδοχείς αναγνώρισης προτύπου (PRRs) παραμένουν δομικά άγνωστοι και για το λόγο αυτό θα πρέπει να αναγνωριστούν πολλά ακόμα βακτηριακά PAMPs όπως επίσης και PRRs όχι μόνο σε κλασικά μοντέλα (π.χ. *Arabidopsis* sp. και *P. syringae* pv. *tomato* DC3000). Επίσης, θα πρέπει συμπληρωματικά να εντοπιστούν και να χαρακτηριστούν τα συμπλέγματα PRRs και PAMPs ώστε να αναγνωριστούν οι θέσεις πρόσδεσης των PAMPs, προτού γίνει κατανοητή η ενεργοποίηση των μεμβρανικών υποδοχέων σε μοριακό και λειτουργικό επίπεδο. Τέλος, η ταυτότητα των διαμεσολαβούντων μορίων μέσω των διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών που ξεκινούν από την αναγνώριση των PAMPs, αλλα και η σειρά με την οποία πραγματοποιείται η σηματοδότηση θα πρέπει να αποκρυπτογραφηθούν.

[1] Η αντίδραση υπερευαισθησίας αποτελεί ένα τύπο προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (programmed cell death, PCD).

2.1. Περιγραφή του εκκριτικού συστήματος TTSS

Η ικανότητα των φυτικών παθογόνων βακτηρίων να μεταφέρουν στα φυτικά κύτταρα πρωτεΐνες που προκαλούν κυτταρικό θάνατο εμφανίστηκε στο προσκήνιο το 1996, με την δημοσίευση σειράς μελετών οι οποίες έχουν συμβάλλει σημαντικά στις υπάρχουσες γνώσεις για την βακτηριακή παθογένεια στα φυτά (Alfano and Collmer, 1997). Οι καινοτόμες γνώσεις στον τομέα αυτό, προέκυψαν από παράλληλες έρευνες που έγιναν σε φυτοπαθογόνα και ζωοπαθογόνα βακτηριακά μοντέλα αρχίζοντας από τα μεσα της δεκαετίας του 1980 (Tampakaki et al., 2010). Όσον αφορά στα φυτοπαθογόνα βακτήρια, η ανακάλυψη των γονιδίων *hrp/hrc* και *avr* οδήγησε στην κατανόηση της θεμελιώδους σημασίας του εκκριτικού μονοπατιού Hrp/Hrc και στη διοργανισμική μεταφορά των πρωτεϊνών Avr. Τα παραπάνω, σε συνδυασμό με την κλωνοποίηση και το χαρακτηρισμό γονιδίων και πρωτεϊνών R στα φυτά, έκαναν κατανοητό τον «παράδοξο» φαινότυπο των γονιδίων *avr* και το ρόλο τους στο γενετικό καθορισμό της φυλετικής εξειδίκευσης παθογόνου-ξενιστή.

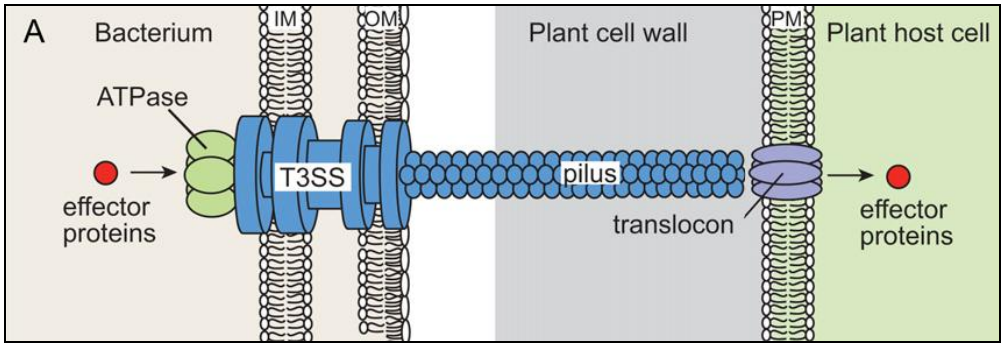
Είναι γνωστό ότι πολλά φυτικά βακτηριακά παθογόνα (μέλη των γενών *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* και *Ralstonia*) προκαλούν ποικίλες και μερικές φορές καταστρεπτικές ασθένειες σε καλλιεργούμενα φυτά, έχοντας ως κοινό τρία βασικά χαρακτηριστικά: α) πολλαπλασιάζονται σε διακυττάριους χώρους των φυτικών ιστών που προσβάλλουν, β) δεν προκαλούν νέκρωση των φυτικών ιστών σε ευπαθείς ξενιστές παρά μόνο σε προχωρημένα στάδια της μόλυνσης (συμπεριφέρονται ως «βιότροφα» παθογόνα) και γ) διαθέτουν *hrp/hrc* γονίδια και *avr.* Σε ευπαθή φυτά-ξενιστές η φάση του λογαριθμικού πολλαπλασιασμού διαρκεί μερικές μέρες και ακολουθείται από την εκδήλωση ποικίλων συμπτωμάτων που διαφέρουν ανάλογα με το παθοσύστημα. Κατ' αντίθεση, σε φυτά μη-ξενιστές ή σε ανθεκτικές ποικιλίες του προσβαλλόμενου είδους τα φυτοπαθογόνα βακτήρια προκαλούν την αντίδραση υπερευαισθησίας (HR) που όπως αναφέρθηκε αποτελεί μια γρήγορη αμυντική αντίδραση (Klement, 1982; Dangl et al., 1996), η οποία αφήνει διάσπαρτα νεκρά φυτικά κύτταρα σε υγιή ιστό (Turner and Novacky, 1974). Ένα σημαντικό κομμάτι στην κατανόηση αυτής της διαδικασίας είναι ότι η HR μπορεί να εκδηλωθεί εάν το παθογόνο φέρει ένα η περισσότερα γονίδια *avr* (avirulence) τα οποία «αναγνωρίζονται» και αλληλεπιδρούν με γονίδια ανθεκτικότητας (R) του φυτού. Αυτή η λειτουργική αλληλεπίδραση «γονιδίου-προς-γονίδιο» ("gene-for-gene" interaction) έχει ως αποτέλεσμα όπως αναφέρθηκε την αναγνώριση του βακτηρίου και την επαγωγή των αμυντικών μηχανισμών των φυτών πέραν της PTI.

Τα γονίδια *hrp/hrc* είχαν ταυτοποιηθεί αρχικά με βάση τους φαινότυπους ενθετικών μεταλλαγμάτων όταν τα βακτήρια αλληλεπιδρούσαν με ανθεκτικά η ευπαθή στο παθογόνο φυτά, ενώ τα γονίδια *avr* ταυτοποιήθηκαν αρχικά με βάση την μετατροπή του «συμβατού» φαινότυπο παθογόνου-ξενιστή σε «ασύμβατο» (Staskawicz et al., 1984). Μετέπειτα μοριακές μελέτες κατέδειξαν μια λειτουργική σχέση μεταξύ των προϊόντων αυτών των δύο γονιδιακών ομάδων καθώς και μια σημαντική ομοιότητα με ένα ανάλογο σύστημα-κλειδί της παθογένειας πολλών βακτηριακών ζωικών παθογόνων ανώτερων θηλαστικών. Ειδικότερα, καταδείχθηκε ότι βακτήρια όπως η *Yersinia*, η *Salmonella*, και η *Shigella* spp. μεταφέρουν πρωτεΐνικούς παράγοντες παθογένειας απευθείας στο εσωτερικό των ζωικών κυττάρων μέσω ενός ειδικού μονοπατιού έκκρισης που στη συνέχεια ονομάστηκε Type III Secretion System (TTSS) (Rosqvist et al., 1994; Sory and Cornelis, 1994 Chen et al., 1996; Wood et al., 1996; Collazo et al., 1997). Κατά

ανάλογο τρόπο τα φυτικά παθογόνα χρησιμοποιούν το μονοπάτι Hrp/Hrc για να μεταφέρουν πρωτεϊνες Avr (τελεστές, effectors) στα φυτικά κύτταρα. Η γενικότερη λειτουργία του TTSS δεν είναι πλήρως εξακριβωμένη, ενώ περιορισμένη είναι και η γνώση γύρω από το μηχανισμό της μετακίνησης των πρωτεϊνών μέσω του εκκριτικού αγωγού.

Όπως ήδη αναφέρθηκε πολλά Gram-αρνητικά φυτικά και ζωικά παθογόνα χρησιμοποιούν το εκκριτικό μονοπάτι Τύπου III για να μπορέσουν είτε να εισέλθουν στα κύτταρα του ξενιστή (π.χ. *Salmonella*) είτε να διεχετεύσουν πρωτεΐνες τελεστές (effectors) κατευθείαν στο κυτταρόπλασμα των ευκαρυωτικών κυττάρων και με τον τρόπο να επηρεάσουν τις κυτταρικές λειτουργίες των ξενιστών. Στα φυτικά παθογόνα τα εκκριτικά συστήματα τύπου III κωδικοποιούνται από τις γονιδιακές νησίδες *hrp/hrc* (Bogdanove et al., 1995; Lindgren et al., 1996). Όλα τα γένη φυτοπαθογόνων βακτηρίων που αναφέρθηκαν παραπάνω (*Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* και *Ralstonia* sp.), διαθέτουν γονίδια *hrp/hrc* γεγονός που τονίζει τον κεντρικό ρόλο του TTSS στη μεσολάβηση ποικίλων αλληλεπιδράσεων μεταξύ φυτών και βακτηρίων (Alfano and Collmer, 2004; He et al., 2004; Bütner and Bonas, 2006; Tampakaki et al., 2010).

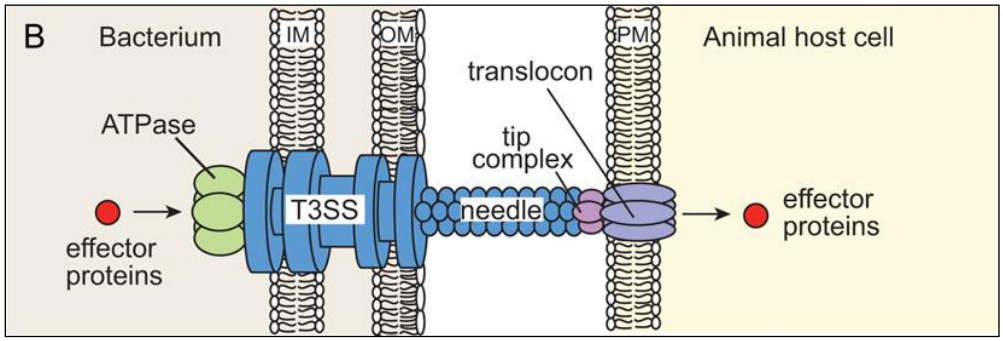
Η μεταφορά των πρωτεϊνών-τελεστών από το βακτηριακό κυτταρόπλασμα στο εσωτερικό των φυτικών κυττάρων μέσω του TTSS παρακάμπτει πολλά φυσικά εμπόδια: α) τις δύο βακτηριακές μεμβράνες, β) το μεταξύ τους στρώμα της βακτηριακής πεπτιδογλυκάνης και γ) το παχύ κυτταρικό τοίχωμα και την κυτοπλασματική μεμβράνη (Σχήμα 1).



Σχήμα 1. Σχηματική παράσταση του TTSS σε φυτικά κύτταρα. Το σύστημα εκτείνεται από το βακτηριακό κυτταρόπλασμα στη μεμβράνη του φυτικού κυττάρου διαπερνώντας τις δυο βακτηριακές μεμβράνες, τη βακτηριακή πετιδογλυκάνη και το φυτικό κυτταρικό τοίχωμα, ενώ φέρει μια κυτταροπλασματική ATPαση και ένα εξωκυτταρικό αγωγό μήκους έως και 2 μm δια μέσου του οποίου διοχετεύονται οι πρωτεϊνες-τελεστές από το βακτηριακό στο φυτικό κυτταρόπλασμα (από Büttner and He, 2009).

Σύμφωνα με σχήμα 1, το TTSS παρέχει ένα συνεχές κανάλι μέσω του οποίου διοχετεύονται οι πρωτεΐνες-τελεστές από το βακτηριακό κυτταρόπλασμα απευθείας (χωρίς περιπλασμικό ή εξωκυτταρικό ενδιάμεσο στάδιο) στα φυτικά κύτταρα. Σημαντική ήταν η παρατήρηση ότι τα εκκριτικά συστήματα TTSS σε διαφορετικά βακτήρια οργανώνονται σε νηματοειδείς υπερ-μοριακές δομές (He et al., 2004) οι οποίες παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά από τους Roine et al., (1997) στο φυτοπαθογόνο βακτήριο *P. syringae,* ενώ λεπτομερής χαρακτηρισμός της δομής τους έγινε ένα χρόνο αργότερα από τους Kubori et al., (1998) στο ζωοπαθογόνο βακτήριο *Salmonella enterica*. Πιο συγκεκριμένα οι Kubori et al., (1998) παρατήρησαν ότι το TTSS του *S. enterica* έφερε δύο δακτυλίους που εδράζονταν στην κυτταροπλασματική και την

εξωτερική μεμβράνη αντίστοιχα, ενώ υπήρχε παράλληλα μια νηματοειδής δομή διαμέτρου 8 nm και μήκους 80 nm η οποία έμοιαζε με βελόνα (σχήμα 2). Σήμερα είναι γνωστό ότι οι συντηρημένες πρωτεΐνες του TTSS τόσο στα ζωοπαθογόνα όσο και στα φυτοπαθογόνα βακτήρια σχηματίζουν μια κυλινδρική βάση (basal body) ενσωματωμένη στις δύο βακτηριακές μεμβράνες και οργανωμένη σε δυο η περισσότερες δακτυλιακές δομές με διάφορες συμμετρίες ανάλογες αυτών του βακτηριακού μαστιγίου (Hodgkinson et al., 2009; Spreter et al., 2009).



Σχήμα 2. Σχηματική απεικόνιση του εκκριτικού συστήματος TTSS του ζωικού παθογόνου *S. enterica (*από Büttner and He, 2009).

Σε άλλες μελέτες επί του TTSS βακτηριακών παθογόνων σε θηλαστικά (π.χ. *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*) παρατηρήθηκε ότι η νηματοειδής δομή του TTSS ενώνεται με μια άλλη επιπλέον αντίστοιχη δομή η οποία φτάνει σε μήκος τα 600 nm και της αποδίδει μια περισσότερο εξειδικευμένη δράση (Daniell et al., 2001; Sekiya et al., 2001; Chakravortty et al., 2005).

Μέχρι τώρα το υπερ-μοριακό σύμπλοκο του TTSS δεν έχει απομονωθεί από τα φυτοπαθογόνα βακτήρια (Büttner and He, 2009). Όμως όπως αναφέρθηκε οι νηματοειδείς μορφές, οι οποίες καλούνται **Hrp pili** (ινίδια Hrp), έχουν χαρακτηριστεί σε πολλά κύρια φυτικά παθογόνα τα οποία περιέχουν ένα ενεργό TTSS (Weber et al., 2005). Σύμφωνα με μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, το ινίδιο Hrp των φυτοπαθογόνων βακτηρίων είναι η αντίστοιχη δομή με τη νηματοειδή μορφή της «βελόνας» που περιγράφηκε στα ζωικά βακτηριακά παθογόνα. Με τον τρόπο αυτό γίνεται κατανοητό ότι το ινίδιο Hrp λειτουργεί ως ένα κανάλι μεταφοράς των πρωτεϊνών-τελεστών κατά την αλληλεπίδραση ξενιστή-παθογόνου (Li et al., 2002). Οι αμινοξικές αλληλουχίες της δομικής υπομονάδας του ινιδίου Hrp (πρωτεΐνη HrpA) διαφέρουν πολύ μεταξύ των διαφορετικών βακτηριακών παθογόνων, έχοντας όμως τις δευτεροταγείς δομές να ομοιάζουν πολύ μεταξύ τους και να έχουν τη μορφή α-έλικας. Το γεγονός αυτό συνέβαλε στην ιδέα ότι τα Hrp pili στα φυτικά παθογόνα μπορούν και εξελίσσονται γρήγορα ώστε να αποφεύγεται η αναγνώρισή τους από το αμυντικό σύστημα των φυτών (Guttman et al., 2006; Weber and Koebnik, 2006).

Η αναγνώριση των υποστρωμάτων έκκρισης από το σύστημα TTSS έχει προταθεί ότι στηρίζεται στην ύπαρξη εκκριτικών σημάτων στις αμινοτελικές περιοχές των πρωτεϊνών τελεστών (Samudrala et al., 2009). Επίσης έχει υπάρξει συζήτηση για το εάν το εκκριτικό σύστημα αναγνωρίζει αμινοξική αλληλουχία ή αλληλουχία mRNA. Κάποια κύρια βιοφυσικά χαρακτηριστικά που φέρουν οι πρωτεΐνες-τελεστές σε συγκεκριμένα σημεία της αλληλουχίας τους, αφορούν την έλλειψη των αμινοξέων Asp και Glu, την αμφιπαθητικότα αλλά και την παρουσία πολλών πολικών καταλοίπων. Η παρουσία των

αμινοξέων Ser και Leu σε συνδυασμό με όλα τα παραπάνω, συμβάλλει χαρακτηριστικά στο να μπορούν οι πρωτεΐνες-τελεστές να είναι δομικά ευέλικτες και πιθανόν να μπορούν να παραμένουν μη-διπλωμένες (unfolded) όταν μεταφέρονται μέσω του εκκριτικού αγωγού. Αυτό είναι σημαντικό καθώς η διάμετρος του αγωγού Hrp pilus είναι μικρή (~ 8 nm) γεγονός που καθιστά τη μεταφορά των τελεστών σε διπλωμένη μορφή δύσκολη τουλάχιστον για σφαιρικού σχήματος πρωτεΐνες (Galán and Wolf-Watz, 2006).

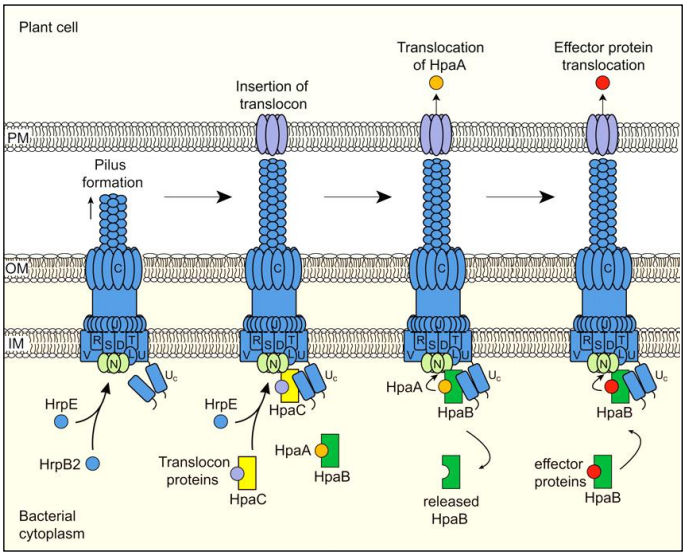
Επίσης έχει αναφερθεί ότι πέρα από την εκκριτική σηματοδότηση υπάρχουν πρωτεΐνες-συνοδοί (chaperones) οι οποίες μπορεί να έχουν εξειδικευμένη δράση με συγκεκριμένους τελεστές ή μπορούν να λειτουργούν ως συνοδοί για πολλά πρωτεϊνικά υποστρώματα. Σημαντικό θεωρείται το γεγονός ότι, τα γονίδια που κωδικοποιούν τις σαπερόνες βρίσκονται κοντά με τα γονίδια τα οποία κωδικοποιούν τους τελεστές κάτι που τονίζει έντονα την κοινή εξελικτική πορεία.

Η μεταφορά των τελεστών στο κύτταρο-ξενιστή παραμένει ακόμα ένα ανοικτό θέμα συζήτησης. Υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι η δομή της «βελόνας» στα ζωικά παθογόνα ή το ινίδιο Hrp στα φυτικά παθογόνα, διαπερνά τη μεμβράνη ή το κυτταρικό τοίχωμα αντίστοιχα (περίπτωση *Yersinia* sp.; Hoiczyk and Blobel, 2001). Υπάρχουν όμως και ενδείξεις ότι η βελόνα/ινίδιο (pilus) μπορεί να συνδέεται με επιπλέον πρωτεϊνικά συμπλέγματα του TTSS στο απώτερο άκρο του (translocon proteins), σχηματίζοντας ένα μεγάλο και συνεχόμενο σωλήνα που μεταφέρει διαρκώς τελεστές στο εσωτερικό του κυττάρου ξεπερνώντας έτσι το φυσικό «εμπόδιο», είτε αυτό είναι κυτταρική μεμβράνη είτε κυτταρικό τοίχωμα. Στα φυτοπαθογόνα βακτήρια έχουν αναγνωριστεί πολλές πιθανές πρωτεΐνες που έχουν αυτό το ρόλο, όπως για παράδειγμα η HrpF (*X. campestris* pv *vesicatoria*), η PopF1 και PopF2 (*R. solanacearum*) αλλά και οι HrpK πρωτεΐνες (*P. syringae*, *E. amylovora*).

Άλλες πρωτεΐνες TTSS σε φυτοπαθογόνα οι οποίες ενδέχεται να σχετίζονται με τη διαδικασία αυτή, είναι οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες χαρπίνες (harpins) (Wei et al., 1992; He et al., 1993; Arlat et al., 1994). Οι πρωτεΐνες αυτές, είναι πλούσιες σε Gly, είναι θερμικά σταθερές και επίσης μπορούν και επάγουν μια σειρά από αμυντικές αποκρίσεις στα φυτά (He et al., 2004). Γενικά δεν είναι ξεκάθαρο πως οι χαρπίνες μπορούν και διευκολύνουν τη μεταφορά των πρωτεϊνών τελεστών. Σε προηγούμενα πειράματα τα οποία έγιναν από τους Kvitko et al., (1997), φάνηκε ότι σε ορισμένες χαρπίνες υπάρχει ένα καρβοξυ-τελικό άκρο το οποίο προσδένεται σε πηκτινικό ασβέστιο (calcium pectate), που είναι κύριο συστατικό του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος. Με τον τρόπο αυτό φαίνεται ότι οι χαρπίνες εμπλέκονται σε τροποποίηση (loosening) του κυτταρικού τοιχώματος η οποία επιτρέπει την διείσδυση του ινιδίου Hrp.

Σχετικά με το εκκριτικό σύστημα TTSS παραμένουν αναπάντητα, μεταξύ άλλων, δύο εξ ίσου σημαντικά ερωτήματα τα οποία αφορούν τη δράση και τη λειτουργία του. Το ένα ερώτημα αφορά την ενέργεια που χρησιμοποιεί το TTSS προκειμένου να είναι λειτουργικό και πιο συγκεκριμένα την πηγή από όπου προέρχεται η ενέργεια αυτή, ενώ το δεύτερο ερώτημα αφορά στο συντονισμό ανάμεσα στη συγκρότηση του συστήματος TTSS και τη μεταφορά των πρωτεϊνών-τελεστών στο εσωτερικό των φυτικών κυττάρων. Όσον αφορά στην ενέργεια, όλα τα εκκριτικά συστήματα TTSS που έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι στιγμής φέρουν στο κυτταρόπλασμα/εσωτερικές μεμβράνες μια ATPάση (HrcN στα φυτικά παθογόνα), η οποία αν και φέρει πιθανή αλληλουχική ομολογία με την μιτοχονδριακή F1 ATPάση, παρόλα αυτά δεν φέρει αντίστοιχες χαρακτηριστικές

υπομονάδες με αυτή. Σύμφωνα με τους Pozidis et al., (2003), η HrcN ATPάση στο *P. syringae* ενεργοποιείται με ομο-ολιγομερισμό, συνδέεται περιφερειακά με την πλασματική μεμβράνη και εμφανίζεται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ως ένα στρογγυλό μόριο. Αντίστοιχη μελέτη της HrcN ATPάσης στην *X. campestris* pv *vesicatoria* έδειξε επίσης πολλές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της συγκεκριμένης ATPάσης και πρωτεϊνών του κυτταροπλασμάσματος / εσωτερικής μεβράνης όπως η πρωτεΐνη HpaC (T3S4) και η σαπερόνη HpaB (Akeda and Galán, 2005; σχήμα 3). επίσης, σύμφωνα με τους Lorenz and Büttner (2009), η HrcN ATPάση χρησιμεύει και ως έδρανο πρόσδεσης για τα TTSS υποστρωμάτα που δε συνοδεύονται από πρωτεΐνες-συνοδούς (σαπερόνες). Μια άλλη πιθανή πηγή ενέργειας αποτελεί η πρωτονιακή δύναμη (proton motive force), όπως συμβαίνει στη λειτουργία των βακτηριακών μαστιγίων (Paul et al., 2008). Παρόλα αυτά, μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν πειραματικά δεδομένα που να δείχνουν ότι το εκκριτικό σύστημα TTSS των φυτικών παθογόνων μπορεί να λειτουργήσει με κάποια άλλη πηγή ενέργειας απουσία ενεργής ATPάσης (Lorenz and Büttner, 2009).



Σχήμα 3. Μοντέλο του εκκριτικού συστήματος TTSS στο φυτικό βακτηριακό παθογόνο *X. campestris* vs *vesicatoria*.

Το δεύτερο ερώτημα αναφορικά με τη λειτουργία των εκκριτικών συστημάτων TTSS, αφορά στο συντονισμό για τη δημιουργία της λειτουργικής δομής του συστήματος και το ρόλο του στη μεταφορά των πρωτεϊνών τελεστών. Μια υπόθεση που έχει διατυπωθεί θεωρεί ότι το εκκριτικό σύστημα TTSS είναι πλήρως δομικά ενεργό πριν ξεκινήσει η μεταφορά των τελεστών. Εάν ισχύει αυτή η διατύπωση, τότε ενδιαφέρον παρουσιάζει ο υποτιθέμενος μηχανισμός τον οποίο χρησιμοποιεί το TTSS προκειμένου να αποφεύγει την έκκριση των πρωτεϊνών-τελεστών πριν πρώτα ολοκληρωθεί η συγκρότηση των εξωβακτηριακών του τμημάτων. Μελέτες σε TTSS ζωικών παθογόνων έδειξαν ότι υπάρχει ένας μηχανισμός ο οποίος στηρίζεται σε μια διαδικασία αλλαγής της εξειδίκευσης πρόσδεσης σε υποστρώματα, προκαλώντας αλλαγή από την έκκριση των δομικών στοιχείων για το σχηματισμό της «βελόνας» στην έκκριση των πρωτεϊνών-τελεστών (Ferris and Minamino, 2006). Αυτή η αλλαγή στην εξειδίκευση πρόσδεσης μεταξύ των υποστρωμάτων είναι πιθανόν να προκαλείται από τις πρωτεΐνες TTS4, οι οποίες εκκρίνονται από το TTSS και αλληλεπιδρούν με τη καρβοξυ-τελική κυτταροπλασματική επικράτεια μιας οικογένειας συντηρημένων πρωτεϊνών που

ονομάζονται YscU/FlhB. Αυτή η ομάδα πρωτεϊνών, καθώς και οι ομόλογές τους, είναι συστατικά της εσωτερικής μεμβράνης του TTSS και κατέχουν μια κυτταροπλασματική επικράτεια η οποία θεωρείται ότι συμμετέχει στην αναγνώριση των υποστρωμάτων από το TTSS (Cornelis et al., 2006). Έτσι, για τα ζωικά παθογόνα πιστεύεται ότι, οι TTS4 πρωτεΐνες επάγουν μια δομική αλλαγή στην κυτταροπλασματική επικράτεια των YscU πρωτεϊνών με αποτέλεσμα να αλλάζει η εξειδίκευση πρόσδεσης του υποστρώματος από το TTSS. Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή, οι TTS4 πρωτεΐνες φαίνεται να παίζουν ρόλο μοριακού «επιστάτη» στον καθορισμό του μεγέθους της «βελόνας», αν και πρόσφατα έχει αποδειχθεί ότι οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες ελέγχουν το σχηματισμό μιας εσωτερικής ραβδόμορφης δομής μέσα στη βάση του TTSS, η οποία επάγει την αλλαγή στην εξειδίκευση των υποστρωμάτων (Wood et al., 2008).

Ακόμη δεν είναι εξακριβωμένο εάν τα φυτικά βακτηριακά παθογόνα ακολουθούν τους ίδιους μηχανισμούς δράσης με τα ζωικά (Büttner and He, 2009). Για παράδειγμα, στα φυτικά βακτηριακά παθογόνα δεν είναι ακόμη γνωστό εάν το ινίδιο Hrp έχει καθορισμένο μήκος *in vivo*. Σε *in vitro* πειράματα, το Hrp pilus βρίσκεται κομμένο σε πολλά μικρά τμήματα κάτι το οποίο κάνει πρακτικά αδύνατο την ολοκληρωτική μέτρηση του. Παρόλα αυτά οι TTS4 πρωτεΐνες αναγνωρίστηκαν σε φυτικά παθογόνα βακτήρια με χαρακτηριστικό παράδειγμα το *X. campestris* pv *vesicatoria* όπου η HpaC (TTS4 πρωτεΐνη) βρέθηκε ότι αλλάζει την εξειδίκευση πρόσδεσης του TTSS από την έκκριση της HrpB2 (πρωτεΐνης που σχετίζεται με το σχηματισμό της ραβδόμορφης δομής στη βάση του TTSS) στην έκκριση πρωτεϊνών-τελεστών. Πιο συγκεκριμένα όπως φαίνεται από το προηγούμενο σχήμα πιστεύεται ότι η HpaC αλληλεπιδρά με την καρβοξυ-τελική επικράτεια της HrcU, μιας πρωτεΐνης η οποία ανήκει στην πρωτεϊνική οικογένεια YscU/FlhB (Lorenz et al., 2008b). Σε αντίθεση με τις TTS4 πρωτεΐνες των ζωικών βακτηριακών παθογόνων, η HpaC των φυτοπαθογόνων ξανθομονάδων δεν εκκρίνεται από το TTSS. Επίσης η HpaC δεν ελέγχει την έκκριση της HrpE πρωτεΐνης η οποία είναι υπεύθυνη για το ινίδιο, γεγονός που υποδηλώνει ότι δε σχετίζεται με τον καθορισμό του μήκους του pilus (Lorenz et al.,2008b).

Πέρα από τη διαφοροποίηση του ρόλου των TTS4 πρωτεϊνών, η δράση του εκκριτικού συστήματος TTSS των φυτικών παθογόνων ελέγχεται και από άλλες πρωτεΐνες οι οποίες εκκρίνονται από το βακτηριακό κυτταρόπλασμα ή από το ίδιο το TTSS. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι πρωτεΐνες HrpJ των ειδών *E. amylovora* και *P. syringae* οι οποίες συμβάλλουν στην έκκριση των χαρπινών και πιθανώς να συντελούν έμμεσα στη μεταφορά των πρωτεϊνών-τελεστών (Fu et al., 2006; Nissinen et al., 2007; Bocsanczy et al., 2008). Τέλος, όπως ήδη αναφέρθηκε, ενεργό ρόλο στη μεταφορά των πρωτεϊνών-τελεστών φαίνεται να παίζουν οι σαπερόνες, όπως π.χ. η σαπερόνη HpaB της *X. campestris* pv*. vesicatoria*, της οποίας η δράση πιθανώς να ελέγχεται μέσω ενός ρυθμιστή HpaA, κυτταροπλασματική πρωτεΐνη στην οποία προσδένεται επιτρέποντας την έκκριση των εξωκυττάριων συστατικών του TTSS. Μετά τη δομική και λειτουργική οργάνωση του εκκριτικού συστήματος, ο ρυθμιστής απελευθερώνει την HpaB με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται η έκκριση και η μεταφορά των τελεστών. Επίσης, έχει βρεθεί ότι η μεταφορά συγκεκριμένων τελεστών του είδους *X. campestris* pv *vesicatoria* και *P. syringae* απαιτεί και μια ακόμη πρωτεΐνη - πιθανή λυτική τρανσγλυκοσυλάση - η οποία θεωρείται ότι διευκολύνει τη συναρμολόγηση του TTSS. Γενικά όμως η ακριβής δράση της τρανσγλυκοσυλάσης των φυτικών βακτηριακών παθογόνων δεν είναι πλήρως κατανοητός.

2.2. Καθορισμός της δράσης και των προϊόντων των avr γονιδίων

Τα *avr*, σε αντίθεση με τα *hrp* γονίδια, έχουν διασκορπισμένη κατανομή στα στελέχη των φυτικών βακτηριακών παθογόνων (Dangl, 1994; Leach and White, 1996). Παρόλο που έχουν κλωνοποιηθεί πάνω από 30 *avr* γονίδια από βακτηριακά είδη όπως είναι το *P .syringae* και το *X. campestris*, ο χαρακτηρισμός και η δράση των πρωτεϊνών που προκύπτουν δεν είναι ακόμη πλήρως διευκρινισμένος. Πιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι οι Avr πρωτεΐνες δεν προκαλούν καμία απόκριση όταν φιλτράρωνται μέσα σε φύλλα, ενώ δεν φαίνεται να εκκρίνονται σε καλλιέργειες με παρουσία θρεπτικού μέσου (Alfano and Collmer, 1997). Επίσης, εμφανίζουν υδρόφιλο χαρακτήρα ενώ δε φέρουν κλασικά αμινοτελικά πεπτίδια-σήματα (classical signal peptides) έκκρισης μέσω του βακτηριακού εκκριτικού συστήματος Sec.

Γενικά τα *avr* γονίδια δεν είναι αναγκαία για την παρασιτική ανάπτυξη του παθογόνου σε ευπαθή φυτά-ξενιστές (συμβατές σχέσεις παθογόνου – φυτού), όταν τα παρασιτούμενα φυτά δε φέρουν λειτουργικά αντίστοιχα γονίδια ανθεκτικότητας. Όμως, σειρά μελετών (Dangl, 1994; Leach and White, 1996), τεκμηριώνουν ότι οι τα γονίδια αυτά συμβάλλουν στη παρασιτική ανάπτυξη αθροιστικά παρόλο που η αντίδραση υπερευαισθησίας που προκύπτει από τις αλληλεπιδράσεις τους με τα γονίδια ανθεκτικότητας είναι επιστατικά φαινόμενα. Γενικά είναι αξιοσημείωτος ο τρόπος με τον οποίο οι Avr πρωτεΐνες και εμπλέκουν το σύστημα Hrp/Hrc για να προάγουν τον παρασιτισμό, καθώς δρούν στο εσωτερικό του κυττάρου-ξενιστή (Alfano and Collmer, 1997).

Η βακτηριακή μεταφορά των Avr πρωτεϊνών σε φυτικά κύτταρα δεν έχει διαπιστωθεί με απευθείας παρατήρηση. Παρόλα αυτά υπάρχουν στοιχεία τα οποία δείχνουν ότι οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες είναι βιολογικά ενεργές όταν παράγονται ενδογενώς σε φυτικά κύτταρα. Η δράση τους μπορεί να επάγει είτε την αντίδραση υπερευαισθησίας, εάν υπάρχει το αντίστοιχο γονίδιο ανθεκτικότητας, είτε να εκδηλωθεί μέσω κατάλληλης σηματοδότησης στον πυρήνα του φυτικού κυττάρου. Ειδικότερα, ορισμένες πρωτεΐνες Avr φέρουν χαρακτηριστικά σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) στην καρβοξυ-τελική τους περιοχή για τη μεταφορά τους στον πυρήνα (περίπτωση οικογένειας AvrBs3 στο είδος *Xanthomonas sp.*) (Van den Ackerveken, et al., 1996) και ορισμένες δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες σε ειδικούς υποκινητές στο φυτικό γένωμα (Boch et al., 2009).

Η πλειοψηφία των αλληλεπιδράσεων μεταξύ φυτών και παθογόνων δεν οδηγεί σε ασθένεια, εξαιτίας του καλά δομημένου αμυντικού φυτικού συστήματος το οποίο μπορεί και επάγει ένα πολυεπίπεδο σύστημα ενδογενούς άμυνας. Παρόλα αυτά, πολλές φορές τα παθογόνα μπορούν και παρακάμπτουν το σύστημα αυτό, μέσω της δράσης πρωτεϊνών-τελεστών οι οποίοι, όπως έχει ήδη αναφερθεί, μπορούν και εισέρχονται στο φυτικό κύτταρο μέσω του εκκριτικού συστήματος III (TTSS) (Mudgett, 2005; Grant et al., 2006). Οι Avr πρωτεΐνες αποτελούν μεμονωμένους τελεστές, οι οποίοι μέσω του TTSS μπορούν σε συγκεκριμένους γονότυπους κυττάρων-ξενιστών, να επάγουν μηχανισμούς άμυνας των φυτών μέσω φυσικής ή λειτουργικής αλληλεπίδρασης με τα γονίδια ανθεκτικότητας R (Nimchuk et al., 2003). Η πλειοψηφία των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τα γονίδια R ανήκουν στην υπερ-οικογένεια NB-LRP και περιέχουν ένα κεντρικό μοτίβο προσδεσης νουκλεοτιδίων (NB; Nucleotide Binding site), ένα

καρβοξυ-τελικό άκρο το οποίο είναι πλούσιο σε επαναλήψεις λευκίνης (LRR; Leucine Rich Repeats) και είτε ένα αμινο-τελικό κατάλοιπο, είτε επικράτειες οι οποίες ομοιάζουν με την ενδοκυτταρική σηματοδοτική επικράτεια του toll υποδοχέα της ιντερλευκίνης 1 (Nimchuk et al., 2007).

Η ενεργοποίηση των NB-LRR πρωτεϊνών επάγει ένα περίπλοκο αμυντικό μονοπάτι που όπως αναφέρθηκε αποτελεί ένα τύπο προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, την αντίδραση υπερευαισθησίας. Οι NB-LRR πρωτεΐνες θεωρούνται ότι δρουν ως άμεσοι υποδοχείς για τις Avr πρωτεΐνες, έχοντας τις LRR επικράτειες να αναγνωρίζουν και να καθορίζουν την ειδικότητα πρόσδεσης των Avr. Πέρα όμως από αυτόν τον τρόπο δράσης, άλλες NB-LRR πρωτεΐνες ανιχνεύουν έμμεσα τις Avr πρωτεΐνες (Dodds et al., 2006). Το προτεινόμενο μοντέλο που αφορά την έμμεση ανίχνευση των Avr πρωτεϊνών ονομάζεται “guard hypothesis” και στηρίζεται στην υπόθεση ότι, οι NB-LRR πρωτεΐνες αναγνωρίζουν φυτικές πρωτεΐνες που αποτελούν στόχο πρωτεϊνών-τελεστών που εκκρίνονται από το TTSS (Chisholm et al., 2006; Dangl and Jones, 2001). Πιο συγκεκριμένα, η αλληλεπίδραση του εκκρινόμενου από τον TTSS τελεστή με την πρωτεΐνη-στόχο του φυτικού κυττάρου, ενεργοποιεί τις NB-LRR πρωτεϊνες με έναν τρόπο ο οποίος ακόμη δεν έχει διευκρινιστεί (Nimchuk et al., 2007). Παρόλα αυτά φαίνεται ότι οι NB-LRR πρωτεΐνες «προστατεύουν» συγκεκριμένες πρωτεΐνες-στόχους, ενώ παράλληλα φαίνεται ότι αποκρίνονται σε συγκεκριμένη σηματοδότηση (Belkhadir et al.,2004b). Επίσης η υπόθεση που έχει προταθεί εξηγεί ότι η απουσία αλληλεπίδρασης συγκεκριμένης NB-LRR με την πρωτεΐνη-στόχο, παρέχει ένα παραπάνω πλεονέκτημα στο παθογόνο. Άλλωστε είναι ήδη γνωστό ότι οι περισσότερες πρωτεΐνες-τελεστές στοχεύουν σε πολλαπλούς στόχους μέσα στο φυτικό κύτταρο-ξενιστή (Dangl and Jones, 2001; Belkhadir et al., 2004a; Chisholm et al., 2006).

3. Γενετικός μετασχηματισμός με *Agrobacterium tumefaciens* ως ερευνητικό εργαλείο

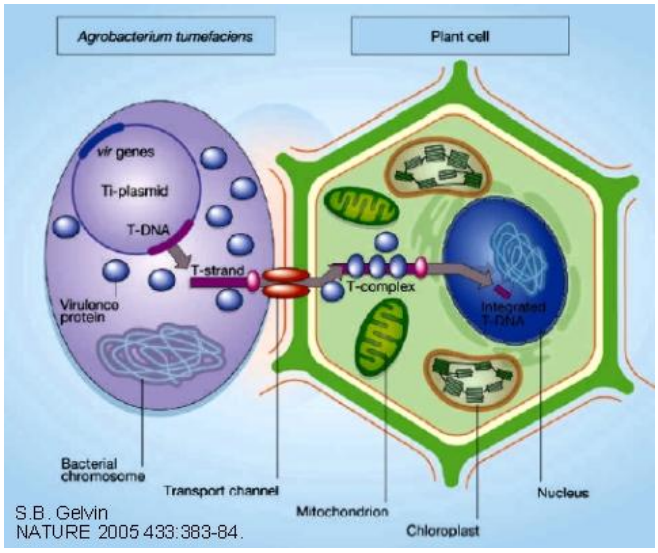
Το *Agrobacterium tumefaciens* είναι ένα Gram-αρνητικό ραβδόμορφο βακτήριο, το οποίο προκαλεί ογκογένεση σε μια μεγάλη ποικιλία ανώτερων φυτών. Πιο συγκεκριμένα, οι όγκοι προκαλούνται από τη μεταφορά τμημάτων DNA (T-DNA) από το ογκογόνο πλασμίδιο του βακτηρίου (tumor-inducing; Ti-plasmid) τα οποία ενσωματώνονται σχεδόν τυχαία στο πυρηνικό γονιδίωμα του κυττάρου-δέκτη (Francis and Spiker, 2005). Το T-DNA κωδικεύει βιοσυνθετικά ένζυμα ορισμένα από τα οποία παράγουν ασυνήθιστους μεταβολίτες (σύμπλοκα αμινοξέων και σακχάρων), όπως για παράδειγμα οκτοπίνη (octopine) και νοπαλίνη (nopaline), ενώ άλλα παρεμβαίνουν στη βιοσύνθεση ορμονών που ρυθμίζουν την ανάπτυξη των φυτών, όπως είναι η αυξίνη (ayxin) και η κυτοκίνη (cytokinin). Με την αλλαγή των επιπέδων, και άρα της ισορροπίας των ορμονών, τα αναπτυξιακά μονοπάτια των φυτών υφίστανται τροποποιήσεις με αποτέλεσμα να μεταβάλλονται ανεξέλεγκτα το αναπτυξιακό πρόγραμμα και η διαφοροποίηση των φυτικών κυττάρων, οδηγώντας τελικά στη δημιουργία όγκων.

Η ικανότητα του *Agrobacterium* να μεταφέρει γονίδια στα φυτά χρησιμοποιείται ευρέως στη μοριακή βιολογία και βιοτεχνολογία ως ερευνητικό εργαλείο για τη γενετική τροποποίηση φυτών (Curtis, 1995; Hiei, 1997; Tzfira et al., 2002). Πιο συγκεκριμένα στις περιπτώσεις της βιοτεχνολογίας, η μόλυνση με *Agrobacterium* θεωρείται ένα εύχρηστο σύστημα εισαγωγής νέων γονιδίων στο φυτικό γένωμα (γενετική/γονιδιακή μηχανική). Ένας από τους λόγους για τους οποίους έχει επιτυχία ως delivery system, είναι ότι αντίθετα με τα υπόλοιπα μεταθετά γενετικά στοιχεία, όπως για παράδειγμα είναι τα μεταθετόνια, το T-DNA δεν κωδικοποιεί λειτουργίες που απαιτούνται για μετακίνηση ή ενσωμάτωση στο DNA. Για το λόγο αυτό η περιοχή του T-DNA μπορεί να αντικατασταθεί από οποιοδήποτε επιθυμητό γονίδιο το οποίο εισάγεται αυτόματα στον πυρήνα του φυτικού κυττάρου-ξενιστή με υψηλό ποσοστό επιτυχίας (Gheysen et al., 1998), και με μικρό βαθμό ανθρώπινης παρέμβασης. Το γεγονός αυτό ανάγει το μετασχηματισμό φυτικών ιστών με *Agrobacterium*, ως μια επαρκή και λιγότερο απαιτητική μέθοδο γενετικής τροποποίησης σε μια πλειάδα φυτικών ειδών.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η αρχή πάνω στην οποία βασίζεται η γονιδιακή μεταφορά μέσω *Agrobacterium* στηρίζεται στη χρήση μη ογκογόνων στελεχών στα οποία έχει απαλειφθεί η ογκογόνος περιοχή (T-DNA) (Schell and van Montagu, 1977) και στα οποία έχει εισαχθεί κατάλληλα σχεδιασμένη γονιδιακή κασέτα ικανή να διασφαλίζει την έκφραση στα φυτικά κύτταρα ενός γονιδίου που επιλέγει ο ερευνητής. Η προοπτική της χρήσης του *Agrobacterium* ως φορέα γενετικής τροποποίησης φυτών καταδείχτηκε αρχικά από τους Chilton et al., (1983), τα πειράματα των οποίων απέδειξαν ότι τα γονίδια που εδράζουν στο T-DNA και είναι υπεύθυνα για την ογκογένεση στα φυτά μπορούσαν να απομακρυνθούν από το Ti-πλασμίδιο, χωρίς όμως να χάνεται η ικανότητα του βακτηρίου να μεταφέρει «παρένθετο» DNA τοποθετημένο μεταξύ των συνοριακών άκρων (25 bp T-DNA borders) στο γονιδίωμα των φυτών.

Στη διαδικασία γενετικής τροποποίησης μέσω αγροβακτηρίου, τα γονίδια τα οποία πρόκειται να εισαχθούν στο φυτό, κλωνοποιούνται ως «γονιδιακές κασέτες» (με κατάλληλο υποκινητή και τερματιστή της μεταγραφής) σε ένα φυτικό φορέα μετασχηματισμού ο οποίος περιέχει τα συνοριακά άκρα μαζί με μια άλλη κασέτα που

περιέχει ένα γονίδιο επιλογής ή αναφοράς (marker gene)[2] το οποίο επιτρέπει την επιλογή ή εντοπισμό των φυτικών κυττάρων που μετασχηματίστηκαν επιτυχώς (Εικόνα 2). Ο μετασχηματισμός με *Agrobacterium* μπορεί να επιτευχθεί με συνεπώαση φυλλικών δίσκων ή ιστοκαλιέργειες με *Agrobacterium* παρουσία ακετοσυριγκόνης για την επαγωγή των γονιδίων Vir. Τα γονίδια αυτά κωδικεύουν τις πρωτεϊνες που δομούν τον αγωγό μεταφοράς του DNA (εκκριτικό σύστημα Τύπου IV, T4SS).



Εικόνα 2. Μεταφορά του T-DNA του *A. tumefaciens* σε φυτικό κύτταρο.

Ο γενετικός μετασχηματισμός φυτών μέσω του αγροβακτηρίου είναι εφικτός σε πολλά φυτικά είδη, κυρίως δικοτυλήδονα. Η δυνατότητα και η ευχέρεια του μετασχηματισμού ποικίλει ανάλογα με το γονότυπο του φυτού. Επίσης επηρεάζεται και από άλλες παραμέτρους, ενώ σε ορισμένα δικοτυλήδονα αλλά, κυρίως σε μονοκοτυλήδονα είδη, είναι ενίοτε δυσχερής ή ανέφικτος στην πράξη. Οι Ke et *al.* (2001) αναζήτησαν μεταλάξεις σε γονίδια *vir* του πλασμιδίου Ti που βελτιώνουν την μεδολογική χρηστικότητα του αγροβακτηριακού συστήματος. Στην έρευνα αυτή βρέθηκε ότι ορισμένες μεταλλάξεις στο γονιδιακό ρυθμιστή VirG των Vir οπερονίων (π.χ. VirGN54D) προάγουν τη σύνθεση μονόκλωνων αλυσίδων του T-DNA στα αρχικά στάδια της διαδικασίας μεταφοράς του και έχουν θετικό αποτέλεσμα στο μετασχηματισμό φυτικών ιστών. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε στέλεχος αγροβακτηρίου που είχε την παραπάνω μεταλλαγή.

[2] Ένας χαρακτηριστικός marker είναι η ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικό.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Τα τελευταία χρόνια διάφορες μελέτες έχουν εστιαστεί στη διαλεύκανση των μηχανισμών φυσικής άμυνας των φυτών σε προσβολές από παθογόνους μικροοργανισμούς και ιδιαίτερα στην αποσαφήνιση του ρόλου των πρωτεϊνών-τελεστών και των PAMPs. Ο ρόλος και η αποσαφήνιση των εμπλεκόμενων μονοπατιών σηματοδότησης και επαγωγής των μηχανισμών αυτοπροστασίας των φυτών από παθογόνους οργανισμούς, αποτέλεσε κρίσιμο σημείο στον προσδιορισμό των παραπάνω μηχανισμών. Επίσης, επισταμένες μελέτες σχετικά με το ρόλο, τη δομή και τη λειτουργία του εκκριτικού συστήματος ΙΙΙ, έχουν αρχίσει να παρέχουν πληροφορίες οι οποίες είναι χρήσιμες στη μελέτη της μεταφοράς πρωτεϊνών-τελεστών στο εσωτερικό των φυτικών κυττάρων. Γονίδια τα οποία ανήκουν στις οικογένειες *hrp* και *avr* καθώς και τα προϊόντα τα οποία κωδικοποιούν, φαίνεται ότι συμμετέχουν ενεργά τόσο στη μεταφορά όσο και στην αλλαγή των πρότυπων έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τη φυτική άμυνα.

Πιο συγκεκριμένα, διαφαίνεται ότι Avr πρωτεΐνες, μέλη ορισμένων *avr* οικογενειών, παίζουν καθοριστικό ρόλο στις αμυντικές αποκρίσεις αλλά και στη γενικότερη στρατηγική που εφαρμόζουν τα φυτά ενάντια σε παθογόνα μέσω της εμπλοκής τους στο μηχανισμό της γονιδιακής σίγησης. Αναλυτικότερα, πρόσφατες μελέτες τεκμηρίωσαν την εμπλοκή μιας σειράς πρωτεινών τελεστών τύπου ΙΙΙ στις αλληλεπιδράσεις βακτηρίων-φυτών (Donoyer et al., 2006; Katiyar-Agarual et al., 2006;2007; Navarro et al., 2008; Pruss et al., 2008). Σε συνέχεια των παραπάνω εργασιών, Sarris (2009) μελέτησαν μια καινούρια λειτουργία συγκεκριμένων φυτικών βακτηριακών πρωτεινών-τελεστών τύπου ΙΙΙ, οι οποίες ενισχύουν τη γονιδιακή σίγηση, όταν αυτή πυροδοτείται από την παροδική υπερ-έκφραση του γονιδίου της GFP μέσω αγροεμποτισμού σε γενετικά τροποποιημένη σειρά του φυτού *N. benthamiana* 16C. Οι μελέτες αυτές, απέδειξαν ότι οι εν λόγω τελεστές του *P. syringae*, μεταξύ αυτών και ο HopX1, εμπλέκονται σε μονοπάτια γονιδιακής σίγησης.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν αρχικά ο σχεδιασμός και η κατασκευή διαγονιδιακών φυτών *N. benthamiana*, τα οποία εκφράζουν σταθερά τη βακτηριακή πρωτεΐνη-τελεστή HopX1 (AvrPstE). Η πρωτεΐνη AvrPphE (ή αλλιώς HopX) (Lindeberg et al., 2005) είναι ένας τελεστής που εκκρίνεται μέσω του TTSS, και το αντίστοιχο γονίδιο avr, που απομονώθηκε αρχικά από στελέχη του είδους *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola,* καθορίζει την ασυμβατότητα στελεχών του παθογόνου με ποικιλίες φασολιάς που έχουν το γονίδιο *R2* (Mansfield et al., 1994). Σύμφωνα με μεταγενέστερες γονιδιωματικές μελέτες, γονίδια της οικογένειας *hopX* υπάρχουν σε διαφορετικά στελέχη *P. syringae* καθώς και σε άλλα φυτοπαθογόνα βακτήρια που διαθέτουν TTSS όπως τα *Ralstonia solanacerum* και *Xanthomonas campestris*) (Salanoubat et al., 2002; Buell et al., 2003; Charity et al., 2003; Deng et al., 2003; Rohmer et al., 2003). Η ευρεία παρουσία των γονιδίων της οικογένειας *hopX* σε διαφορετικά παθογόνα βακτήρια υποδηλώνει ένα συντηρημένο ρόλο στην εκδήλωση της παθογόνου ικανότητας ή παθογόνου ισχύος σε ένα μεγάλο εύρος φυτικών ξενιστών.

Όπως ήδη αναφέρθηκε η χρήση διαγονιδιακών φυτών αποτελεί ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο στη βιοτεχνολογία το οποίο μπορεί και δίνει τη δυνατότητα εφαρμογής πολλαπλών μοριακών χειρισμών. Για το σκοπό της παρούσης εργασίας, η κατασκευή και

ο αρχικός χαρακτηρισμός διαγονιδιακών φυτών *N. benthamiana* που έχουν ενσωματωμένο το γονίδιο *hopX1* στο φυτικό γονιδίωμα. Επίσης, πέρα από την κατασκευή και χαρακτηρισμό, εξετάστηκε η αλληλεπίδραση των διαγονιδιακών φυτών με επιλεγμένα φυτικά παθογόνα, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν η ενδογενής έκφραση του βακτηριακού γονιδίου επηρεάζει τη συμπεριφορά των φυτών ως προς επιλεγμένους οργανισμούς φυτοπαθολογικού ενδιαφέροντος.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1) Κλωνοποίηση του γονιδίου *hopX1* από το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv.*tomato* DC3001

Προκειμένου να κλωνοποιηθεί το παραπάνω γονίδιο ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

- ✓ **Ανάπτυξη** καλλιέργειας του στελέχους ***P. syringae* pv. *tomato*** **DC3001** **και απομόνωση γενωμικού DNA.**
- ✓ **Σχεδιασμός εκκινητών** και απομόνωση του γονιδίου ***hopX1*** από το **γενωμικό DNA** με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (**P**olymerase **C**hain **R**eaction - **PCR**).
- ✓ **Απομόνωση** και **καθαρισμός** του προϊόντος της **PCR** από την **πηκτή αγαρόζης 1.2% (w/v)** μετά από ηλεκτροφόρηση.
- ✓ **Κλωνοποίηση** του προϊόντος της **PCR** στον πλασμιδιακό φορέα **pGEM-T easy** (πλασμίδιο **pGEM-*hopX1***).
- ✓ **Αλληλούχιση** του ενθέματος στο πλασμίδιο **pGEM-*hopX1.***

1.1) Θρεπτικά μέσα για καλλιέργεια των βακτηρίων

Μόλυσμα ***P. syringae* pv. *tomato*** **DC3001** (στέλεχος ανθεκτικό στο αντιβιοτικό ριφαμπικίνη [**Rif**ampicin]) αναπτύχθηκε υπό ανάδευση σε υγρό θρεπτικό μέσο Luria-Bertani (**LB**) με pH ρυθμισμένο στο 7.0 και εμπλουτισμένο με ριφαμπικίνη 80 μg/ml) στους 28°C για 48 h. Το θρεπτικό μέσο παρασκευάστηκε σύμφωνα με τους Sambrook et al., (1989) και αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο κλίβανο αποστείρωσης. Η σύσταση του υγρού θρεπτικού μέσου LB παρατίθεται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Συνταγή παρασκευής 1 lt υγρού θρεπτικού μέσου (LB) σύμφωνα με τους Sambrook et al., (1989).

ΣΥΝΤΑΓΗ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΥΓΡΟΥ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ (LB) Sambrook et al., (1989)	Χημικά – Συστατικά	Ποσότητα
	Bacto-yeast extract	5 g
	Bacto-Tryptone	10 g
	NaCl	5 g
	ddH_2O	< 1 lt
	Τελικός Όγκος	1 lt

1.2) Απομόνωση βακτηριακού γενωμικού DNA

Η **απομόνωση** του **γενωμικού DNA** από τη βακτηριακή καλλιέργεια του στελέχους ***P. syringae* pv. *tomato*** $_{DC3001}$ πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο.

- Φυγοκέντρηση βακτηριακού αιωρήματος όγκου 10 ml στις 3200 rpm, για 15 min στους 4^{o}C.
- Απόρριψη του υπερκειμένου και επαναδιαλυτοποίηση του βακτηριακού ιζήματος σε 9.5 ml TE (TE: 25 mM Tris-HCl με pH 8.0 και 10 mM EDTA με pH 8.0).
- Ελαφριά ανάδευση, και προσθήκη του διαλύματος λύσης (0.5 ml από 10% SDS [w/v], και 50 μl από 20 mg/ml Proteinase K).
- Ελαφριά ανάδευση και επώαση στους 55^{o}C για 60 min.
- Προσθήκη 1.8 ml από 5 M NaCl και 1.5 ml από 10% CTAB.
- Ελαφριά ανάδευση και επώαση στους 65^{o}C για 20 min.
- Προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (chloroform/isoamyl alcohol) (24/1 v/v).
- Ελαφριά ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 10000 rpm για 15 min στους 4^{o}C.
- Συλλογή του υπερκειμένου (αποφεύγοντας τη λήψη υγρού από την ενδιάμεση διαχωριστική φάση που σχηματίζεται).
- Προσθήκη ίσου όγκου ουδέτερης φαινόλης (pH 7.0).
- Ελαφριά ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 3700 rpm για 15 min στους 4^{o}C.
- Συλλογή του υπερκειμένου.
- Προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου.
- Ελαφριά ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 3700 rpm για 15 min στους 4^{o}C.
- Συλλογή του υπερκειμένου και προσθήκη απόλυτης ισοπροπανόλης (0.6x του όγκου του υπερκειμένου).
- Ελαφριά ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min (στα μισά του χρόνου περίπου το DNA γίνεται εμφανές).
- Συλλογή του γενωμικού DNA με κατάλληλα διαμορφωμένη (με τη βοήθεια φλογίστρου) πιπέτα Pasteur.
- Προσθήκη 1 ml ddH_2O και αποθήκευση στους -20^{o}C.

1.3) Σχεδιασμός εκκινητών για την εξόρυξη του γονιδίου *hopX1* με τη μέθοδο της PCR

Ο σχεδιασμός των εκκινητών πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος ***DNAman*** (Lynnon BioSoft)***.***

Ο **εμπρόσθιος εκκινητής** (**upper primer**) σχεδιάστηκε με τρόπο ώστε να ταυτίζεται με την αλληλουχία του γονιδίου αρχίζοντας από το εναρκτήριο κωδικόνιο μετάφρασης ATG 5΄άκρο, προκειμένου να είναι συμπληρωματικός προς τη μη-κωδική αλυσίδα, μια θέση πέψης ενός περιοριστικού ενζύμου καθώς και μια αλληλουχία μήκους το πολύ 30 νουκλεοτιδίων περίπου.

Ο **οπίσθιος εκκινητής** (**lower primer**) σχεδιάστηκε ώστε να εμφανίζει συμπληρωματικότητα προς το 3΄άκρο της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου, μια θέση πέψης ενός περιοριστικού ενζύμου καθώς και μια αλληλουχία μήκους το πολύ 30 νουκλεοτιδίων περίπου.

Θα πρέπει να σημειωθεί οτι κατά τον σχεδιασμό των εκκινητών έγινε έλεγχος των εκκινητών αναφορικά με τον ποσοστό της συμπληρωματικότητας τόσο μεταξύ τους όσο και πιθανότατα με κάποια άλλη περιοχή του DNA.

Με βάση τα παραπάνω, ο **εμπρόσθιος** εκκινητής για την απομόνωση του γονιδίου ***hopX1*** της ***P. syringae* pv. *tomato*** $_{DC3001}$ είχε την εξής αλληλουχία (27 νουκλεοτίδια):

5'-GACATAGCTAGCTCGAGGAAAGTATTT-3'

Η περιοριστική θέση κοπής αντιστοιχεί στο ένζυμο **XhoI** του οποίου η δράση στην αντίστοιχη περιοχή του γενετικού υλικού αναπαρίσταται σχηματικά ως εξής:

5΄...C▼TCGAG...3΄
3΄...GAGCT▲C...5΄

Ακολούθως, ως **οπίσθιος** εκκινητής για το ανωτέρω γονίδιο σχεδιάστηκε το 25-νουκλεοτίδιο:

5'-GGCGCTTATTCTAGACGTACGTACT-3'

Η περιοριστική θέση κοπής αντιστοιχεί στο ένζυμο **XbaI** του οποίου η δράση στην αντίστοιχη περιοχή του γενετικού υλικού αναπαρίσταται ως εξής:

5΄...T▼CTAGA...3΄
3΄...AGATC▲T...5΄

1.4) Απομόνωση του γονιδίου *hopX1* από εκχύλισμα DNA του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* $_{DC3001}$

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού πραγματοποιήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή PTC-200 (MJ Research, Minessota, USA) υπό τις συνθήκες που περιγράφονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 2. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης για την ενίσχυση του γονιδίου *hopX1* από εκχύλισμα ολικού DNA του βακτηρίου *P. syringae* pv. *tomato* $_{DC3001}$.

Συστατικά αντίδρασης	Ποσότητα στο διάλυμα της αντίδρασης (μl)	Συγκεντρώσεις των αρχικών διαλυμάτων	Ποσότητες συστατικών στο τελικό διάλυμα της αντίδρασης
DNA- μήτρα (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* $_{DC3001}$)	2	15 ng/μl	0.3 ng/μl
Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer Taq DNA polymerase)	10	10x	1x
Εμπρόσθιος εκκινητής (Upper primer)	1	50 pmol/μl	0.50 pmol/μl
Οπίσθιος εκκινητής (Lower primer)	1	50 pmol/μl	0.50 pmol/μl
Διάλυμα δεσοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs)	4	10 mM	400 μM
Ένζυμο (Taq DNA polymerase)	1	5 units/μl	0.05 units/μl
$MgCl_2$	10	25mM	2.5mM
ddH_2O	71		
Total volume	100		

Πίνακας 3. Συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για την απομόνωση του γονιδίου *hopX1* από το γενωμικό DNA του στελέχους *P. syringae* pv. *tomato* DC3001.

	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ (^{O}C)	ΧΡΟΝΟΣ
Αρχική Αποδιάταξη	94	5’
Αποδιάταξη	94	30’’
Υβριδισμός εκκινητών	51	40’’
Επέκταση	72	2’
Κύκλοι αντίδρασης:30		
Τελική επέκταση	72	10’

1.5) Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR σε πηκτή αγαρόζης 1.2% (w/v)

Μέρος από το προϊόν της **PCR** υποβλήθηκε σε ηλεκτροφόρηση (**100 V**) σε **πήκτωμα αγαρόζης 1.2% (w/v)** το οποίο περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο (**EtBr**) με τελική συγκέντρωση 0.5 μg mL^{-1}, ενώ παράλληλα ηλεκτροφορήθηκε μάρτυρας μοριακού μεγέθους λ-DNA που είχε υποστεί πέψη με το ένζυμο **PstI** (λ-PstI, Minotech). Ως πηγή ιόντων και ρυθμιστικό διάλυμα, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα **TBE** [Tris-Borate-EDTA] σε τελική συγκέντρωση 0.5x προπαρασκευασμένου διάλυματος TBE 5x (54 g Tris base, 27.4 g Boric acid, 20 ml EDTA pH 8.0, διαλυμένα σε ddH_2O τελικού όγκου 1 lt). Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης η πηκτή αγαρόζης φωτογραφήθηκε με film Polaroid σε οθόνη εκπομπής υπεριώδους φωτός.

Πρόσφορα χαρακτηριστικά του φορέα pGEM-T easy:

- Φέρει, πλευρικά της τοποθεσίας εισαγωγής ενθέματος (**insertion site**), 3’-τελικές θυμιδίνες (ως προεκτάσεις των τυφλών άκρων), που εμποδίζουν την επανακυκλοποίηση του φορέα ενώ παράλληλα τον καθιστούν κατάλληλο για “TA cloning”, επειδή η Taq πολυμεράση προσθέτει μονόκλωνες προεκτάσεις αδενοσίνης (non-templated A residues) στα 3΄-άκρα και των δύο αλυσίδων DNA κατά τη σύνθεσή τους.

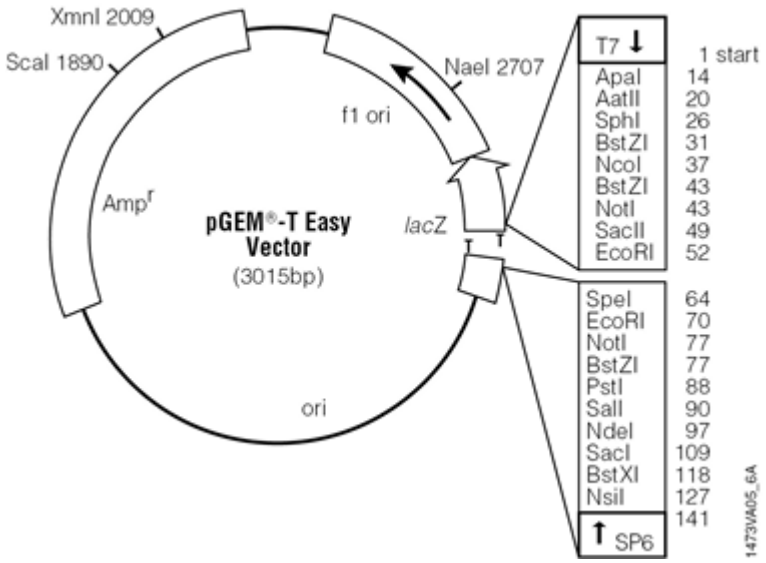
- Η πολλαπλή θέση κλωνοποίησης (multiple cloning site- **MCS**) πλαισιώνεται από θέσεις αναγνώρισης/πέψης για τα ένζυμα **EcoRI, NotI** και **BstZI** που δεν έχουν θέσεις αναγνώρισης μέσα στο ένθετο και παρέχουν τη δυνατότητα υποκλωνοποίησης σε διάφορους άλλους φορείς.

- Έχει παράγοντα επιλογής το γονίδιο που κωδικοποιεί για τη β-λακταμάση, ένζυμο που υδρολύει το αντιβιοτικό αμπικιλλίνη (***amp*^{R} marker**).

- Το όχημα κλωνοποίησης φέρει την αλληλουχία του **χειριστή (promoter) του οπερονίου της λακτόζης** και το **5’-τμήμα του γονιδίου *lacZ* (lacZα)** που κωδικοποιεί το α-πεπτίδο της β-γαλακτοσιδάσης καθώς και πολλαπλές θέσεις κλωνοποίησης ενθέματος μέσα σε αυτό ώστε να αδρανοποιείται η παραγωγή του α-πεπτιδίου, πράγμα

που επιτρέπει τον οπτικό εντοπισμό αποικιών *Escherichia coli* με κλώνους σε στέλεχος που εκφράζει το ω-τμήμα της β-γαλακτοσιδάσης. Έτσι :

- αν **δεν εισαχθεί** το ένθεμα συνδυάζεται το καταλυτικά ανενεργό α-πεπτίδιο της LacZ που κωδικεύεται στο πλασμίδιο με το επίσης ανενεργό ω-πεπτίδιο της LacZ που κωδικεύεται στο βακτηριακό χρωμόσωμα και προκύπτει λειτουργική β-γαλακτοσιδάση (φαινόμενο α-ω συμπλήρωσης), η οποία υδρολύει το χρωμογόνο υπόστρωμα X-gal και παράγει έγχρωμο προϊόν γαλάζιου χρώματος (**μπλε αποικίες)** ενώ,
- αν **εισαχθεί** το ένθεμα, παύει να συντίθεται το α-πεπτίδιο και η αποικία **δεν χρωματίζεται μπλέ**.



http://www.promega.com/catalog/catalogproducts.aspx?categoryname=productleaf_1039

Εικόνα 3. Κυκλικός χάρτης του γραμμοποιημένου πλασμιδίου pGEM-T easy με τα σημεία αναφοράς στην αλληλουχία του.

Η σύνδεση του οχήματος κλωνοποίησης με το ένθετο ***hopX1*-DNA** επιτεύχθηκε με το **ένζυμο DNA λιγάση του βακτηριοφάγου T_4,** μετά από βελτιστοποίηση των συνθηκών (μοριακής αναλογίας ενθέματος-φορέα ενθέματος **3[insert]:1[vector])**.

Για τον υπολογισμό της μοριακής αναλογίας ενθέματος-φορέα εφαρμόστηκε η ακόλουθη εξίσωση :

$$\frac{\text{ng of vector} \times \text{kb size of insert}}{\text{kb size of vector}} \times \text{insert:vector molar ratio} = \text{ng of insert}$$

Η σύνθεση του μίγματος της **αντίδρασης σύνδεσης (ligation mix)** δίδεται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Τα συστατικά του μίγματος της αντίδρασης σύνδεσης του φορέα pGEM-T easy με το προϊόν της PCR (*hopX1)*

Συστατικά αντίδρασης σύνδεσης	Ποσότητες στο διάλυμα της αντίδρασης	Συγκεντρώσεις των αρχικών διαλυμάτων	Ποσότητες συστατικών στο τελικό διάλυμα
Φορέας: **pGEM-T easy**	1 μl	50 ng/μl	5 ng/μl
Ένθεμα: PCR product (***hopX1***)	3 μl	20 ng/μl $\frac{50\text{ ng vector} \times 1.2\text{ kb insert}}{3.015\text{ kb vector}} \times \frac{3}{1}$	6 ng/μl
Ρυθμιστικό διάλυμα: T4 DNA Ligase Buffer	1 μl	10x	1x
Ένζυμο: T4 DNA Ligase	0.8 μl	3 units/μl	0.24 units/μl
ddH_2O	4.2 μl		
Total volume	10 μl		

Η αντίδραση **σύνδεσης** παρέμεινε για 12-14 h σε επωαστήρα ρυθμισμένο στους 16°C. Ακολούθησε **μετασχηματισμός** δεκτικών κυττάρων ***E. coli*** (στέλεχος **DH10B,** *F⁻ endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL ΔlacX74 Φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) λ⁻)* με το διάλυμα της σύνδεσης σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο:

- Προσθήκη – υπό ασηπτικές συνθήκες (πχ. φλόγα) - του μίγματος σύνδεσης στα δεκτικά κύτταρα ***E. coli* DH10B**.
- Παραμονή στον πάγο για 30-45 min.
- Μεταφορά για 1.5 min στο υδατόλουτρο στους 42°C.
- Παραμονή στον πάγο για 5 min.
- Προσθήκη 1 ml αποστειρωμένου LB υπό ασηπτικές συνθήκες (εστία οριζόντιας ροής).
- Επώαση για 1.5 h σε αναδευόμενο επωαστήρα στους 37°C.
- Φυγοκέντρηση στις 2.800 στροφές ανά λεπτό (rpm) για 8 min σε θερμοκρασία δωματίου.

- Απόρριψη μέρους του υπερκειμένου (~750 μl), επαναδιαλυτοποίηση του βακτηριακού ιζήματος και επίστρωση του σε τρυβλίο LB με αμπικιλλίνη (**Amp**icillin, 100 μg/ml) ως αντιβιοτικό επιλογής και χρωμογόνο υπόστρωμα X-gal (50 μl/τρυβλίο από διάλυμα στοκ 20 mg/ml) υπό ασηπτικές συνθήκες (απαγωγός οριζόντιας ροής).
- Επώαση των τρυβλίων στους 37^{o}C για 12-14 h.

Στη συνέχεια, **απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA** από τυχαία επιλεγμένες λευκές αποικίες από το τρυβλίο επιλογής. Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

- Ανάπτυξη μικροκαλλιεργειών με μεταφορά βακτηριακής μάζας μεμονομένων αποικιών με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα σε γυάλινο σωληνάκι με πλαστικό πώμα που περιείχε 5 ml θρεπτικού διαλύματος LB_{Amp}.
- Επώαση σε αναδευόμενο επωαστήρα στους 37^{0}C για 12-16 h.
- Λήψη 2 ml καλλιέργειας κάτω από ασηπτικές συνθήκες π.χ. φλόγα και μεταφορά σε σωλήνα τύπου eppendorf χωρητικότητας 2 ml.
- Φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές το λεπτό για 4 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απόρριψη του υπερκειμένου.
- Επαναραίωση του βακτηριακού ιζήματος σε 100 μl κρύου διαλύματος I με ισχυρή ανάδευση (vortex).
- Προσθήκη 200 μl διαλύματος II. Απαλή ανακίνηση 5-6 φορές.
- Παραμονή στον πάγο για 5 min.
- Προσθήκη 150 μl διαλύματος III. Απαλή ανακίνηση 5-6 φορές.
- Παραμονή στον πάγο για 5 min.
- Φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές το λεπτό για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε καθαρό σωλήνα τύπου eppendorf χωρητικότητας 1.5 ml.
- Προσθήκη ίσου όγκου (~500 μl) διαλύματος ουδέτερης φαινόλης / χλωροφορμίου (1:1).
- Ανακίνηση.
- Φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές το λεπτό για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μεταφορά της υπερκείμενης υγρής φάσης σε καθαρό σωλήνα τύπου eppendorf χωρητικότητας 1.5 ml.
- Κατακρήμνιση του DNA με προσθήκη 2.5x όγκων απόλυτης αιθανόλης (~900 μl).
- Ανακίνηση.
- Παραμονή για 2 min σε θερμοκρασία δωματίου.

- Φυγοκέντρηση στις 13.500 στροφές το λεπτό για 20 min στους 4°C.
- Απόρριψη του υπερκειμένου.
- Στέγνωμα του ιζήματος (τοποθέτηση του eppendorf ανάποδα σε όρθια θέση πάνω σε απορροφητικό χαρτί ή τοποθέτηση στο θάλαμο κενού για 10 min).
- Επαναδιαλυτοποίηση σε 50 μl TE ή ddH_2O.
- Αποθήκευση στους -20°C.

Η ανάκτηση DNA αγγίζει τα 3-5 μg γενετικού υλικού/ml βακτηριακής καλλιέργειας.

Πίνακας 5. Τα συστατικά των διαλυμάτων I, II και III που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA

Διάλυμα I	Διάλυμα II	Διάλυμα III
50 mM Glucose	0.2 N NaOH	60 ml Potassium acetate 5M
25 mM TrisCl pH 8.0	1% SDS	11.5 ml Glacial acetic acid
10 mM EDTA pH 8.0		28.5 ml ddH_2O

1.6) Αλληλούχιση του ενθέματος του πλασμιδίου pGEM-T easy + *hopX1*

Στη συνέχεια προκειμένου να επαληθευτεί η ταυτότητα του ένθετου απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA του **pGEM-T easy + *hopX1*** από μια λευκή οποικία και υποβλήθηκε σε πέψη με RNάση ως εξής:

Σε 5 μl DNA προστέθηκαν 5 μl αποστειρωμένου ddH_2O και 1 μl RNase A (10 mg/ml). Το παραπάνω διάλυμα παρέμεινε για 15 min σε υδατόλουτρο στους 37°C.

2) Κατασκευή γονιδιακής κασέτας έκφρασης του *hopX1* σε φυτικά κύτταρα

Προκειμένου να εισαχθεί και εκφραστεί το γονίδιο ***hopX1*** στη ***N.benthamiana*** μέσω του αγροβακτηρίου χρειάζεται να ενσωματωθεί σε γονιδιακή κασέτα μεταφοράς και έκφρασης σε φυτικά κύτταρα. Για το σκοπό αυτό το γονίδιο μεταφέρθηκε αρχικά στον πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης **pART7** (Εικόνα 4).

Ο φορέας αυτός φέρει δύο θέσεις κοπής για το ένζυμο **NotI** ένθεν και ένθεν ενός τμήματος που περιλαμβάνει τον ευκαριωτικό υποκινητή **35SCaMV** (προερχόμενο από το στέλεχος Cabb B-JI του ιού του μωσαϊκού του κουνουπιδιού – **Ca**uliflower **m**osaic **v**irus [**CaMV**]), έναν πολυσυνδέτη (**M**ulti **C**loning **S**ite , **MCS**) με θέσεις αναγνώρισης/πέψης για τα ένζυμα **XhoI, EcoRI, KpnI, SmaI, ClaI, HindIII, BamHI, XbaI** και τέλος την περιοχή τερματισμού της μεταγραφής του γονιδίου της συνθάσης της οκτοπίνης (**T*ocs 3'***).

Η υποκλωνοποίηση του ***hopX1*** στο φορέα **pART7** έγινε μετά από ταυτόχρονη πέψη του πλασμιδιακού DNA του **pGEM-T easy +** ***hopX1***, με τα ένζυμα **XhoI** και **XbaI** (Πίνακας 6), ηλεκτροφόρηση του DNA, απομόνωση και καθαρισμό της ζώνης που αντιπροσώπευε το ***hopX1*** και σύνδεση με DNA του **pART7** που επίσης είχε υποβληθεί σε πέψη με τα ίδια ένζυμα, ακολουθώντας τα πρωτόκολλα που περιγράφηκαν σε προηγούμενα εδάφια. Η στρατηγική αυτή εξασφαλίζει την ίδια κατεύθυνση μεταγραφής από το χειριστή **CaMV-35S** και εκείνης του μεταφραστικού πλαισίου του ***hopX1***.

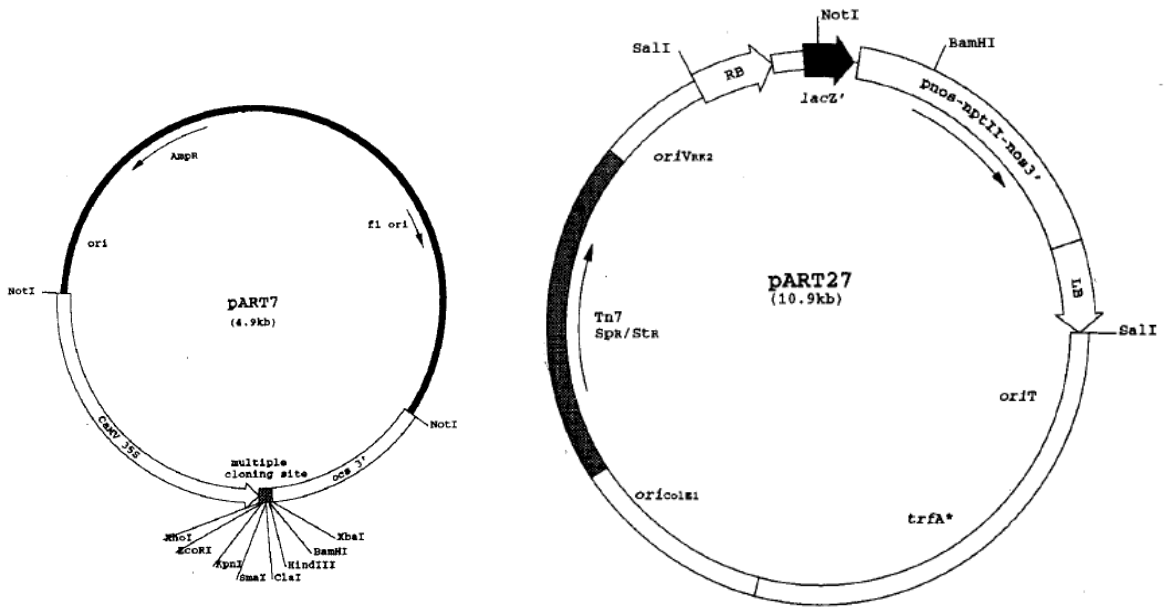
Από το πλασμίδιο που προέκυψε (**pART7-*hopX1***, Εικόνα 9) απομονώθηκε στη συνέχεια ολόκληρη η κασέτα έκφρασης σε φυτικά κύτταρα (***Pnos-hopX1-Tocs***) με πέψη του πλασμιδιακού DNA με **NotI** και εισήχθει στον δυαδικό φορέα αγροβακτηρίου **pART27 (Εικόνα 4)**. Ο φορέας αυτός (10.9 kb) φέρει ανάμεσα στο δεξί και αριστερό συνοριακό άκρο του T-DNA (**RB**-Right Border, **LB**-Left Border) τα εξής στοιχεία:

α) την αλληλουχία-χειριστή και την 5΄ περιοχή του οπερονίου ***lacZ*** που κωδικοποιεί το α-πεπτίδιο της β-γαλακτοσιδάσης για την οπτική αναγνώριση μετασχηματισμένων κυττάρων του στελέχους ***E. coli*** **DH10B** καθώς και θέση κλωνοποίησης ενθεμάτων με άκρα **NotI.**

β) το χιμαιρικό γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη (***Pnos-nptII-Tnos3*'**, nopaline synthase promoter - neomycin phosphotransferase - nopaline synthase terminator).

Το υπόλοιπο τμήμα του σκελετού του φορέα **pART27** (**backbone**) περιέχει το στοιχειώδες ρεπλικόνιο του πλασμιδίου RK2 (**RK2 minimal replicon**) για διπλασιασμό του σε κύτταρα ***E.coli*** και ***Agrobacterium***

.



Εικόνα 4. Κυκλικοί χάρτες των φορέων pART7 και pART27 και τα σημεία αναφοράς στην αλληλουχία τους.

Ο τελικός στόχος σχεδιασμού του **T-DNA** στο δυαδικό φορέα **pART27** ήταν η κατασκευή μιας οργανωτικής δομής που περιλαμβάνει τη γονιδιακή κασέτα ***P35S-hopX1-Tocs*** (προκειμένου να εξασφαλιστεί η συστατική μεταγραφή και να ελαχιστοποιηθεί η συχνότητα του τυχαίου τερματισμού της μεταγραφής του ***hopX1-*mRNA** στα φυτικά κύτταρα που παρατηρείται όταν τα εισαγόμενα γονίδια στερούνται αυτού του στοιχείου) αμέσως μετά το **3'-άκρο** του δεξιού συνοριακού άκρου (**RB**-Right T-DNA Border) και το στοιχείο '**overdrive**' (ενισχυτής της μεταφοράς T-DNA) του δυαδικού φορέα και την κασέτα επιλογής ***Pnos-nptII-Tnos*** σε φυτικά κύτταρα αμέσως πριν το αριστερό συνοριακό άκρο (**LB**-Left T-DNA Border).

Καθώς η μεταφερόμενη αλυσίδα του **T-DNA** θεωρείται οτι αντιγράφεται από το δεξί συνοριακό άκρο προς το αριστερό (κατεύθυνση **RB** ⟹**LB**), η συναρμολογούμενη κασέτα που εντίθεται στην περιοχή του ***lacZa'*** του **pART27** πρέπει να μεταφέρεται στο φυτικό γονιδίωμα πριν από την κασέτα επιλογής. Επομένως, θεωρητικά όλα ή μεγάλο ποσοστό των φυτών που θα επιλεγούν ως ανθεκτικά στην καναμυκίνη αναμένεται να περιέχουν το γονίδιο του ενδιαφέροντος.

Το δεξιό και αριστερό συνοριακό άκρο του **T-DNA**, η αλληλουχία «**overdrive»**, και η κασέτα επιλογής μετασχηματισμένων φυτικών κυττάρων έχουν προέλθει από τον φορέα **pGA643.** Μία τροποποιημένη περιοχή ***lacZ'*** ανάμεσα στο δεξί συνοριακό άκρο και το χιμαιρικό γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη (με απαλοιφή των θέσεων SalI-NdeI) προήλθε από τον **pGEM5Zf'** περιέχοντας τόσο μια μοναδική περιοριστική θέση **NotI** προκειμένου να διευκολύνει την κλωνοποίηση γονιδιακών κασετών που συναρμολογούνται στο πλασμίδιο **pART7**, όσο και τη δυνατότητα επιλογής των μετασχηματισμένων κυττάρων ***E. coli*** βάσει της μπλέ/λευκής χρώσης τους σε θρεπτικό μέσω με X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside). Τα παραπάνω στοιχεία του **T-DNA** εισήχθηκαν στον φορέα **pMON530** οδηγώντας στην κατασκευή του φορέα **pART27**.

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η **κλωνοποίηση** του αλληλουχημένου προϊόντος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (**P**olymerase **C**hain **R**eaction product – **PCR** product) –***hopX1***- στον φορέα **pART7** ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

- ✓ **Αντίδραση πέψης** του φορέα **pGEM-T easy** με το προϊόν της **PCR** (***hopX1)*** με τα ένζυμα **XhoI** και **XbaI**.
- ✓ **Ηλεκτροφόρηση** του παραπάνω προϊόντος της πέψης σε **πηκτή αγαρόζης 0.8% (w/v)**.
- ✓ Αποκοπή και καθαρισμός της ζώνης του γονιδίου ***hopX1.***
- ✓ Μέτρηση της συγκέντρωσης σε νανοφωτόμετρο.
- ✓ **Αντίδραση σύνδεσης** του φορέα **pART7** με το γονίδιο ***hopX1.***
- ✓ **Μετασχηματισμός** δεκτικών κυττάρων ***Escherichia coli*** (**DH10B**) με το **διάλυμα σύνδεσης** του **pART7-*hopX1.***
- ✓ Απομόνωση **πλασμιδιακού DNA** από αποικία βακτηρίων.

2.1) Αντίδραση πέψης του πλασμιδίου pGEM-T easy + *hopX1* με τα ένζυμα XhoI και XbaI.

Το διάλυμα της **πέψης** του πλασμιδίου **pGEM-T easy** + ***hopX1*** παρουσιάζεται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6. Πέψη του φορέα pGEM-T easy και του ενθέματος *hopX1* με τα ένζυμα XbaI και XhoI.

Συστατικά διαλύματος πέψης	Ποσότητες στο διάλυμα της πέψης (μl)	Συγκεντρώσεις των αρχικών διαλυμάτων	Ποσότητες συστατικών στο τελικό διάλυμα
Γενετικό υλικό pGEM-T easy + *hopX1*	5 μl		
Ρυθμιστικό διάλυμα: (XbaI Buffer)	3 μl	10x	1x
Αλβουμίνη ορού βοοειδών (BSA)	3 μl	10x	1x
Ένζυμο I: XbaI	1.5 μl	12 units/μl	0.6 units/μl
Ένζυμο II: XhoI	1.5 μl	12 units/μl	0.6 units/μl
RNase A	1 μl	10 mg/ml	0.3 μg/μl
ddH_2O	15 μl		
Total volume	30 μl		

Το παραπάνω διάλυμα πέψης με τα ένζυμα **XbaI** και **XhoI** παρέμεινε στους 37^{o}C για 1.5 h περίπου.

2.2) Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης σε πηκτή αγαρόζης 0.8% (w/v)

Όπως περιγράφεται στην παράγραφο **1.5**

2.3) Ανάκτηση και καθαρισμός της ζώνης του γονιδίου *hopX1.*

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή αγαρόζης φωτογραφήθηκε με Polaroid film σε οθόνη εκπομπής υπεριώδους φωτός πριν την αποκοπή και μεταφορά των ζωνών που αντιστοιχούν στο γονίδιο ***hopX1*** σε προσημειωμένους σωλήνες τύπου eppendorf. Ακολούθησε ο καθαρισμός του ***hopX1-DNA*** με χρήση του QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο.

Καθαρισμός του *hopX1*-DNA:

- Ζύγιση του τεμαχίου της πηκτής αγαρόζης που περιείχε το DNA.
- Προσθήκη τριπλάσιας ποσότητας Buffer QC σε σχέση με το καθαρό βάρος του (100 mg = 100 μl).
- Τοποθέτηση των δειγμάτων σε υδατόλουτρο στους 50^{o}C για 10 min.
- Προσθήκη ισοπροπανόλης ίσου όγκου με το καθαρό βάρος του κάθε μετρημένου δείγματος της ηλεκτροφόρησης (ml ισοπροπανόλης = mg δείγματος).
- Μεταφορά του περιεχομένου των δειγμάτων σε προσημειωμένα eppendorfs (δύο θαλάμων) του DNA Extraction Kit.
- Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 1 min και απόρριψη του περιεχομένου του κάτω θαλάμου που έχει φυγοκεντρηθεί.
- Προσθήκη 0.75 ml Buffer PE – αναμονή 2 min.
- Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min και απόρριψη του περιεχομένου του κάτω θαλάμου που έχει φυγοκεντρηθεί.
- Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min.
- Τοποθέτηση του πάνω θαλάμου των eppendorfs της QIAquick Gel Extraction Kit σε κλασικά προσημειωμένα eppendorfs των 1.5 ml.
- Προσθήκη 20 μl Buffer EB.
- Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min.
- Λήψη του περιεχομένου που έχει φυγοκεντρηθεί.

2.4) Μέτρηση της συγκέντρωσης σε νανοφωτόμετρο

Η ποσότητα (συγκέντρωση) του καθαρισμένου DNA εκτιμήθηκε σε νανοφωτόμετρο (Nanodrop, ND 1000).

2.5) Αντίδραση σύνδεσης του φορέα pART7 με το γονίδιο *hopX1*

Τα συστατικά του διαλύματος της αντίδρασης σύνδεσης του φορέα **pART7** με το γονίδιο ***hopX1*** παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα**.**

Πίνακας 7. Αντίδραση σύνδεσης του φορέα pART7 με το γονίδιο *hopX1*

Συστατικά αντίδρασης σύνδεσης	Ποσότητες στο διάλυμα της σύνδεσης	Συγκεντρώσεις των αρχικών διαλυμάτων	Ποσότητες συστατικών στο τελικό διάλυμα
Φορέας: **pART7**	1.5 μl	33.3 ng/μl	5 ng/μl
Ένθεμα: ***hopX1***	4 μl	9.2 ng/μl $\frac{50 \text{ ng vector} \times 1.2 \text{ kb insert}}{4.9 \text{ kb vector}} \times \frac{3}{1}$	3.6 ng/μl
Ρυθμιστικό διάλυμα: T4 DNA Ligase Buffer	1 μl	10x	1x
Ένζυμο: T4 DNA Ligase	0.8 μl	3 units/μl	0.24 units/μl
ddH_2O	2.7 μl		
Total volume	10 μl		

Το παραπάνω **διάλυμα σύνδεσης** παρέμεινε για 12-14 h σε επωαστήρα στους 16^{o}C.

2.6) Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* (DH10B) με το διάλυμα σύνδεσης του pART7- *hopX1*

Όπως περιγράφεται στην παράγραφο **1.6**

Ο φορέας **pART7** προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμπικιλλίνη, η οποία χρησιμοποιήθηκε στη συγκέντρωση των 100 μg/ml.

2.7) Απομόνωση πλασμιδιακού DNA του pART7-*hopX1* από αποικία βακτηρίων

Έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο **1.6**

3) Υποκλωνοποίηση της κασέτας *CaMV35S-hopX1-Tocs* στον δυαδικό φορέα αγροβακτηρίου pART27

- ✓ Ελεγκτική **πέψη** του φορέα **pART7** με το γονιδιακό ένθεμα ***hopX1*** με τα ένζυμα **XbaI** και **XhoI.**
- ✓ **Ηλεκτροφόρηση** των προϊόντων της πέψης σε **πηκτή αγαρόζης 0.8% (w/v).**
- ✓ **Πέψη** του φορέα **pART7-*hopX1*** με το ένζυμο **NotI** με σκοπό τη λήψη της ***hopX1*$_{\text{cassette}}$.**
- ✓ **Ηλεκτροφόρηση** του παραπάνω προϊόντος της πέψης σε **πηκτή αγαρόζης 0.8% (w/v)**.
- ✓ Αποκοπή και καθαρισμός της ζώνης της κασετας που φέρει το ***hopX1***.
- ✓ Μέτρηση της συγκέντρωσης σε νανοφωτόμετρο και ηλεκτροφόρηση μικροποσότητας του ***hopX1*** (3μl).
- ✓ **Αντίδραση σύνδεσης** του γραμοποιημένου φορέα **pART27** με την κασέτα ***CaMV35S -hopX1-Tocs***.
- ✓ **Μετασχηματισμός** δεκτικών κυττάρων ***E. coli*** (**DH10B**) με το **διάλυμα της σύνδεσης** του **pART27+*hopX1*$_{\text{cassette.}}$**
- ✓ Απομόνωση **πλασμιδιακού DNA** από αποικία βακτηρίων.
- ✓ Ελεγκτική **πέψη** του φορέα **pART27** με το γονιδιακό ένθεμα ***hopX1*** με τα ένζυμα **XhoI** και **XbaI.**
- ✓ **Ηλεκτροφόρηση** του παραπάνω προϊόντος της πέψης σε **πηκτή αγαρόζης 0.8% (w/v).**

3.1) Διαγνωστική πέψη του φορέα pART7-*hopX1* με τα ένζυμα XhoI και XbaI

Το διάλυμα της πέψης του φορέα **pART7-*hopX1*** με τα ένζυμα **XhoI** και **XbaI** παρουσιάζεται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8. Πέψη του φορέα pART7 - *hopX1* με τα ένζυμα XbaI και XhoI.

Συστατικά διαλύματος πέψης	Ποσότητες στο διάλυμα της πέψης (μl)	Συγκεντρώσεις των αρχικών διαλυμάτων	Ποσότητες συστατικών στο τελικό διάλυμα
Γενετικό υλικό: **pART7 - *hopX1***	2 μl		
Ρυθμιστικό διάλυμα: XbaI Buffer	2 μl	10x	1x
Αλβουμίνη ορού βοοειδών (BSA)	2μl	10x	1x
Ένζυμο I: **Xba I**	0.5 μl	12 units/μl	0.3 units/μl
Ένζυμο II: **Xho I**	0.5 μl	12 units/μl	0.3 units/μl
RNase A	1 μl	10 mg/ml	0.5 μg/μl
ddH_2O	12 μl		
Total volume	20 μl		

Το παραπάνω διάλυμα πέψης με τα ένζυμα **XbaI** και **XhoI** παρέμεινε σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 37 ^oC για 1.5 h περίπου.

3.2) Ηλεκτροφόρηση του παραπάνω προϊόντος της πέψης σε πηκτή αγαρόζης 0.8% (w/v)

Η προετοιμασία της πηκτής αγαρόζης και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε με τον τρόπο που περιγράφεται στην παράγραφο **A5.**

3.3) Πέψη του φορέα pART7-*hopX1* με το ένζυμο NotI (με σκοπό την λήψη της κασέτας *CaMV35S -hopX1-Tocs*)

Πίνακας 9. Πέψη του φορέα pART7-*hopX1* με το ένζυμο NotI.

Συστατικά διαλύματος πέψης	Ποσότητες στο διάλυμα της πέψης (μl)	Συγκεντρώσεις των αρχικών διαλυμάτων	Ποσότητες συστατικών στο τελικό διάλυμα
Γενετικό υλικό (DNA): **pART7-*hopX1***	5 μl		
Ρυθμιστικό διάλυμα: (NotI Buffer)	3 μl	10x	1x
Αλβουμίνη ορού βοοειδών (BSA)	3 μl	10x	1x
Ένζυμο: **NotI**	2.5 μl	12 units/μl	1 unit/μl
RNAse A	2 μl	10 mg/ml	0.7 μg/μl
ddH_2O	13.5 μl		
Total volume	30 μl		

Το παραπάνω διάλυμα πέψης με το ένζυμο **NotI** παρέμεινε σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 37 ^oC για 2 h περίπου.

3.4) Ηλεκτροφόρηση του παραπάνω προϊόντος της πέψης σε πηκτή αγαρόζης 0.8% (w/v)

Η προετοιμασία της πηκτής αγαρόζης και η ηλεκτροφόρηση έγιναν όπως περιγράφεται στην παράγραφο **1.5**

3.5) Αποκοπή και καθαρισμός DNA της ζώνης της κασέτας *CaMV35S-hopX1-Tocs*

Έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο **2.3**

3.6) Μέτρηση της συγκέντρωσης σε νανοφωτόμετρο (nanodrop, ND 1000) και ηλεκτροφόρηση μικροποσότητας του καθαρισμένου εκχυλίσματος *CaMV35S-hopX1-Tocs* (3μl)

Έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο **1.5**

3.7) Αντίδραση σύνδεσης του φορέα pART27 με την κασέτα *CaMV35S-hopX1-Tocs*

Τα συστατικά της **αντίδρασης της σύνδεσης** του φορέα **pART27** με την **κασέτα *CaMV35S-hopX1-Tocs*** παρουσιάζονται στον Πίνακα 10 που ακολουθεί.

Πίνακας 10. Αντίδραση σύνδεσης του φορέα pART27 με την κασέτα *CaMV35S-hopX1-Tocs*

Συστατικά αντίδρασης λιγοποίησης	Ποσότητες στο διάλυμα της σύνδεσης (μl)	Συγκεντρώσεις των αρχικών διαλυμάτων	Ποσότητες συστατικών στο τελικό διάλυμα
Φορέας: **pART27**	4 μl	20 ng/μl	8 ng/μl
Ένθεμα: ***hopX1*** ***pART7 cassette***	1 μl	30 ng/μl $\frac{\text{80ng vector x 1.4 kb insert}}{\text{10.9kb vector}} \times \frac{3}{1}$	3 ng/μl
Ρυθμιστικό διάλυμα: T4 DNA Ligase Buffer	1 μl	10x	1x
Ένζυμο: **T4 DNA Ligase**	0.8 μl	3 units/μl	0.24 units/μl
ddH_2O	3.2 μl		
Total volume	10 μl		

Το παραπάνω διάλυμα **σύνδεσης** παρέμεινε για 12-14 h σε επωαστήρα ρυθμισμένο στους 16^{o}C.

3.8) Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* (DH10B) με το διάλυμα της σύνδεσης του pART27 με την κασέτα *CaMV35S-hopX1-Tocs*

Έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο **1.6**. Ο φορέας ***pART27*** παρέχει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό **Spec**tinomycin η οποία χρησιμοποιήθηκε στη συγκέντρωση των 40 μg/ml για την επιλογή μετασχηματισμένων αποικιών.

3.9) Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένες αποικίες βακτηρίων

Όπως περιγράφεται στην παράγραφο **1.6**

3.10) Διαγνωστική πέψη του φορέα pART27- *CaMV35S-hopX1-Tocs* με τα ένζυμα XhoI και XbaI

Πίνακας 11. Διάλυμα πέψης του φορέα pART27-*CaMV35S-hopX1-Tocs* με τα ένζυμα XbaI και XhoI.

Συστατικά διαλύματος πέψης	Ποσότητες στο διάλυμα της πέψης (μl)	Συγκεντρώσεις των αρχικών διαλυμάτων	Ποσότητες συστατικών στο τελικό διάλυμα
Γενετικό υλικό: **pART27- *CaMV35S-hopX1-Tocs***	2 μl		
Ρυθμιστικό διάλυμα: (XbaI Buffer)	2 μl	10x	1x
Αλβουμίνη ορού βοοειδών (BSA)	2 μl	10x	1x
Ένζυμο I: **XbaI**	0.5 μl	12 units/μl	0.3 units/μl
Ένζυμο II: **XhoI**	0.5 μl	12 units/μl	0.3 units/μl
RNAse A	1 μl	10 mg/ml	0.3 μg/μl
ddH_2O	12 μl		
Total volume	20 μl		

Το παραπάνω διάλυμα πέψης με τα ένζυμα XhoI και XbaI παρέμεινε σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 37 ^{o}C για 1.5 h περίπου.

3.11) Ηλεκτροφόρηση του παραπάνω προϊόντος της πέψης σε πηκτή αγαρόζης 0.8% (w/v)

Με τον τρόπο που περιγράφεται στην παράγραφο **1.5**

4) Μετασχηματισμός του *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 με το πλασμίδιο pART27-*CaMV35S-hopX1-Tocs*

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- Ανάμειξη δεκτικών κυττάρων του εργαστηριακού στελέχους ***Agrobacterium tumefaciens* C58C1** διατηρημένων στους -80^{o}C με 8 μl εκχυλίσματος DNA του πλασμιδίου **pART27-*hopX1.***
- Επώαση σε υδατόλουτρο στους 37 ^{o}C για 25 min.
- Επώαση σε αναδευτήρα στους 28 ^{o}C για 3 h.
- Φυγοκέντρηση για 8 min στις 2800 rpm.
- Απόρριψη ~ 850 ml υπερκείμενου και επαναιώρηση του ιζήματος (ασηπτικές συνθήκες).
- Επίστρωση τρυβλίου LB άγαρ που περιείχε **Rif**ampicin (80 μg/ml) και **Spec**tinomycin (40 μg/ml).
- Επωαση τρυβλιών για 48 h στους 28 ^{o}C.

5) Σάρωση μετασχηματισμένων αποικιών με ανάλυση με PCR τυχαία επιλεγμένων αποικιών από τα τρυβλία επιλογής χωρίς προηγούμενη εκχύλιση DNA (Colony PCR)

Ο εντοπισμός αποικιών μετασχηματισμένων με το φορέα **pART27-*CaMV35S-hopX1-Tocs*** έγινε ως εξής:

- ✓ Ανάλυση με PCR τυχαία επιλεγμένων αποικιών από τα τρυβλία επιλογής χωρίς προηγούμενη εκχύλιση DNA (**Colony PCR**).
- ✓ **Ηλεκτροφόρηση** του προϊόντος της διπλής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε **πηκτή αγαρόζης 0.8% (w/v).**

5.1) Ανάλυση με PCR τυχαία επιλεγμένων αποικιών από τα τρυβλία επιλογής χωρίς προηγούμενη εκχύλιση DNA (Colony PCR) για τον εντοπισμό του γονιδίου *hopX1*

Προκειμένου να ελεγθεί η επιτυχής εισαγωγή της κασέτας ***CaMV35S-hopX1-Tocs*** πραγματοποιήθηκε Colony PCR υπό τις συνθήκες που παρατίθενται στον Πίνακα 12.

Πίνακας 12. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης τυχαία επιλεγμένων αποικιών από τα τρυβλία επιλογής χωρίς προηγούμενη εκχύλιση DNA (Colony PCR) για τον έλεγχο του γονιδίου *hopX1.*

Συστατικά αντίδρασης	Ποσότητα στο διάλυμα της αντίδρασης (μl)	Συγκεντρώσεις των αρχικών διαλυμάτων	Ποσότητες στο τελικό διάλυμα της αντίδρασης
DNA- μήτρα (*A.tumefaciens* C58C1 + pART27-*hopX1-κασέτα*	2	15 ng/μl	0.3 ng/μl
Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer Taq DNA polymerase)	10	10x	1x
Εμπρόσθιος εκκινητής (Upper primer)	0.5	50 pmol/μl	0.25 pmol/μl
Οπίσθιος εκκινητής (Lower primer)	0.5	50 pmol/μl	0.25 pmol/μl
Διάλυμα δεσοξυριβο-νουκλεοτιδίων (dNTPs)	4	2.5 mM	400 μM
Ένζυμο (Taq DNA polymerase)	1	5 units/μl	0.05 units/μl
$MgCl_2$	10	25 mM	2.5 mM
ddH_2O	72		
Total volume	100		

Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν τα ολιγονουκλεοτίδια:
35s Forward: 5'-AATCCCACTATCCTTCGCAAG-3' (21 bases, Thermo Tm = 60.5°C **Hybridization Tm = 50.9°C** GC+AT Tm = 62.0°C) και
ocs Reverse: 5'-CGTGCACAACAGAATTGAAAGC-3' (22 bases, Thermo Tm = 63.0°C **Hybridization Tm = 51.3°C** GC+AT Tm = 64.0°C).

Η αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή PTC-200 (MJ Research, Minessota, USA) υπό συνθήκες που περιγράφονται στον Πίνακα 13.

Πίνακας 13. Συνθήκες της PCR για τον εντοπισμό αποικιών του *A. tumefaciens* μετασχηματισμένων με το πλασμίδιο pART27-*CaMV35S-hopX1-Tocs*.

	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ (^{O}C)	ΧΡΟΝΟΣ
Αρχική Αποδιάταξη	94	5’
Αποδιάταξη	94	30’’
Υβριδισμός εκκινητών	51	40’’
Επέκταση	72	2’
Κύκλοι αντίδρασης:30		
Τελική επέκταση	72	10’

5.2) Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR σε πηκτή αγαρόζης 0.8% (w/v).

Έγινε με τον τρόπο που περιγράφεται στην παράγραφο **1.5**

6) Γενετική τροποποίηση φυλλικών δίσκων *Nicotiana benthamiana*

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί ο μετασχηματισμός των φυλλικών δίσκων των φυτών ***N.benthamiana*** ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

1. Προετοιμασία καλλιέργειας 50 ml μετασχηματισμένου αγροβακτηρίου σε θρεπτικό μέσο $LB_{\textbf{Rif}ampicin/\textbf{Spec}tinomycin}$ (80/40 μg/ml). Ολονύκτια παραμονή σε αναδευόμενο επωαστήρα στους 28°C.

2. Προετοιμασία και αποστείρωση υγρού και στερεού θρεπτικού μέσου (MS_0). Το θρεπτικό μέσο αποστειρώθηκε 4-5 ημέρες νωρίτερα, ώστε να φανεί η τυχόν ελλειπής αποστείρωση.

3. Αποστείρωση των εργαλείων/υλικών (φυλλοτρυπητήρας, λαβίδες, κ.α.).

4. Επιλογή φυτών ***N. benthamiana*** αγρίου τύπου μέτριας ανάπτυξης.

5. Επιλογή 12-15 νεαρών φύλλων.

6. Απολύμανση του φυτικού ιστού σε διάλυμα χλωρίνης 10% και TritonX100 (ή Tween 20) 0.05% για 10 min.

- Τα παρακάτω βήματα πραγματοποιήθηκαν σε στείρες συνθήκες σε εστία νηματικής ροής.

7. Έκπλυση του φυτικού ιστού (4-5 επαναλήψεις) με απιονισμένο – αποστειρωμένο νερό-. Παραμονή μετά την τελευταία πλύση σε απιονισμένο – αποστειρωμένο νερό.

8. Μοίρασμα της βακτηριακής καλλιέργειας σε δύο αποστειρωμένους σωλήνες τύπου falcon των 50 ml (25 ml ανά falcon).

9. Φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 10 min στους 4°C

10. Απόρριψη του υπερκειμένου.

11. Προσθήκη 30 ml υγρού θρεπτικού MSo

    (+ NH_3 / - σουκρόζη / - άγαρ / + βιταμίνες / + ορμόνες / - αντιβιοτικά) με pH 5.7 για επαναιώρηση του βακτηριακού ιζήματος.

12. Μεταφορά του κάθε φύλλου ξεχωριστά με λαβίδα σε τρυβλίο Petri με μικρή ποσότητα υγρού θρεπτικού MSo και κοπή 10-12 φυλικών δίσκων με τη βοήθεια φυλλοτρυπητήρα (διαμέτρου 8 mm).

13. Διαχωρισμός των φυλλικών 10-12 φυλικών δίσκων ανά τρυβλίο που θα χρησιμοποιηθούν ως μάρτυρες.

14. Επώαση των φυλλικών δίσκων (εκτός αυτών που προορίζονταν ως μάρτυρες) στο υγρού θρεπτικού MS_0 με την επαναιωρημένη βακτηριακή πελλέτα (όπως περιγράφηκε στο βήμα 11) για 20 min.

15. Απομάκρυνση του υγρού θρεπτικού μέσου με τα αγροβακτήρια.

16. Πλύσιμο των φυλλικών δίσκων με υγρό θρεπτικό MS_0.

17. Τοποθέτηση των φυλλικών δίσκων σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό MS_0 (με την άνω επιφάνεια του δίσκου να ακουμπά στο θρεπτικό MSo).

18. Σφράγισμα των τρυβλίων με πλαστική ταινία (parafilm), κάλυψη με αλουμινόχαρτο και επώαση για 1-2 μέρες στους 27^{o}C (κατά το στάδιο αυτό ολοκληρώνεται η μεταφορά του T-DNA από το αγροβακτηριο στον πυρήνα των φυτικών κυττάρων).

19. Μεταφορά των φυλλικών δίσκων σε τρυβλία επιλογής μετασχηματισμένων κυττάρων. Τα τρυβλία περιείχαν στερεό θρεπτικό MS pH 5.7 (- NH_3 / + σουκρόζη / + άγαρ / + βιταμίνες / + ορμόνες / + αντιβιοτικά).

20. Επανάληψη του παραπάνω βήματος ανά 3 ημέρες μέχρι την εμφάνιση κάλλων στους φυλλικούς δίσκους.

✓ Οι φυλλικοί δίσκοι παρέμειναν καθ' όλη τη διάρκεια σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 27^{0}C και φωτοπερίοδο 18 h φώς / 6 h σκοτάδι.

21. Μεταφορά των αναπτυσσόμενων κάλλων με τμήμα του φυλλικού δίσκου σε ειδικά βαζάκια ιστοκαλλιέργειας με ειδικό στερεό θρεπτικό MS καλλογένεσης (- NH_3 / + σουκρόζη / + άγαρ / + βιταμίνες / + ορμόνες / + αντιβιοτικά) με pH 5.7.

22. Περιοδική μεταφορά κάλων σε νέα βαζάκια με φρέσκο θρεπτικό μέσο, ανάλογα με την ανάπτυξη των κάλλων.

23. Με την έκπτυξη βλαστού οι κάλλοι μεταφέρονται σε MS στερεό θρεπτικό ριζοβολίας (-NH_3/+σουκρόζη [μειωμένη ποσότητα]/+άγαρ/+βιταμίνες/+ορμόνες [+ IAA 10μl, -6-BAP] /+αντιβιοτικά) με pH 5.7.

24. Με την εμφάνιση βλαστού γίνεται μεταφορά των φυταρίων σε ειδικό εδαφικό υπόστρωμα (κομπόστα,+περλλίτης,+τύρφη σε αναλογία 3:1:1).

25. Εργασίες συντήρησης των φυτών (μεταφυτεύσεις, ποτίσματα, κ.ά) έως ότου φτάσουν το επιθυμητό ανάπτυξιακό στάδιο για λήψη δειγμάτων για μοριακή ανάλυση και συλλογή σπόρου.

7) Μοριακές αναλύσεις

Στη συνέχεια σε τυχαία επιλεγμένο φυτικό ιστό από κάθε φυτάριο πραγματοποιήθηκαν οι εξής μοριακές αναλύσεις:

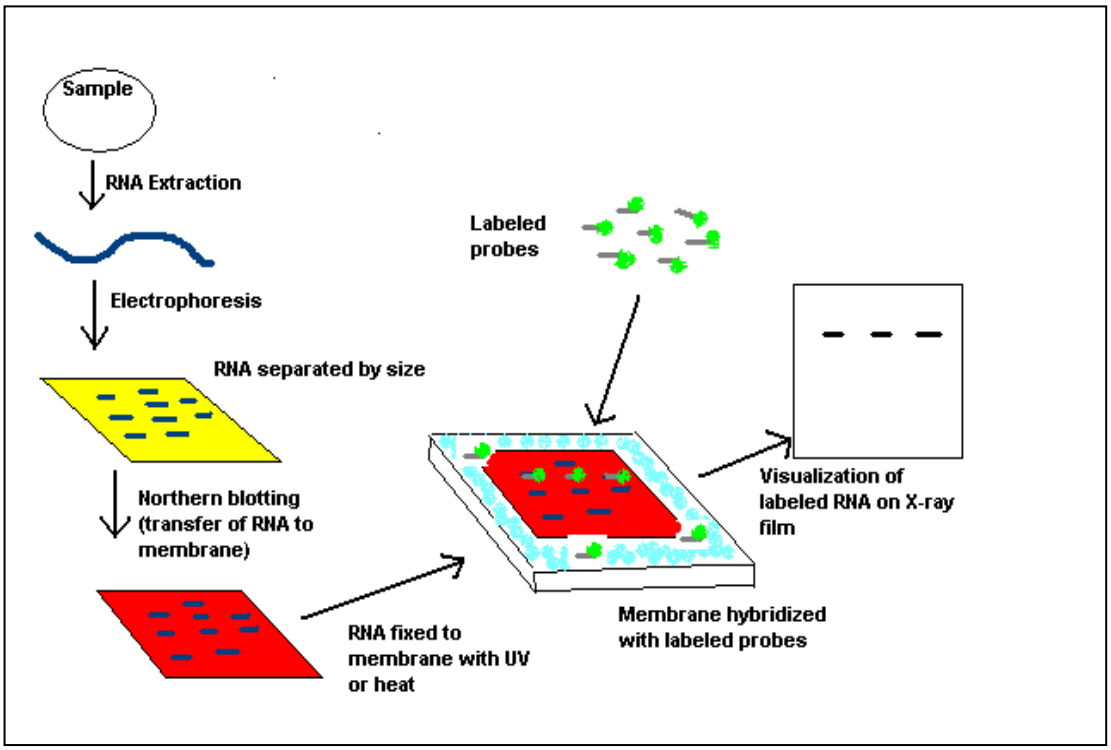
7.1) Ανάλυση κατά **Northern**

7.2) Ανάλυση κατά **Southern**

7.1) Ανάλυση κατά Northern

Ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

- ✓ Απομόνωση ολικού RNA από το φυτικό ιστό.
- ✓ Αποτύπωση κατά Northern.
- ✓ Παρασκευή ραδιοσημασμένου ιχνηλάτη.
- ✓ Προϋβριδοποίηση, υβριδοποίηση, ξεπλύματα και έκθεση.



Εικόνα 5. Αποτύπωση κατα Northern και υβριδοποίηση.

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Northern_Blot_Scheme.PNG

7.1.1) Απομόνωση ολικού RNA από φυτικό ιστό (μέθοδος τριζόλης)

Περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- **Ομογενοποίηση**
    1. Προσθήκη 1 ml trizol / 0.1 gr λειοτριβημένου ιστού.
    2. Έντονη ανάδευση (vortex).
    3. Επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
    4. Φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές (rpm) το λεπτό για 10 min στους 4^{o}C.

- **Εκχύλιση RNA**
    5. Προσθήκη 200 μl χλωροφορμίου / ml trizol σε καθαρό σωλήνα τύπου eppendorf.
    6. Μεταφορά της υπερκείμενης φάσης του βήματος 4 στο eppendorf που περιγράφεται στο βήμα 5.
    7. Ισχυρή ανάδευση (vortex).
    8. Επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
    9. Φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές το λεπτό για 20 min στους 4^{o}C.

- **Κατακρήμνιση RNA και πλύσεις**
    10. Προσθήκη σε καθαρό σωλήνα τύπου eppendorf 250 μl 1.2 M NaCl και O.8 M Sodium citrate / ml trizol. Προσθήκη του υπερκείμενου που σχηματίστηκε από το βήμα 9. Τέλος, προσθήκη 250 μl ισοπροπανόλης / ml trizol.
    11. Ισχυρή ανάδευση (vortex).
    12. Επώαση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
    13. Φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές το λεπτό για 10 min στους 4^{o}C.
    14. Μεταφορά υπερκειμένου σε καθαρό σωλήνα τύπου eppendorf.
    15. Προσθήκη 1 ml αιθανόλης 70% ανά ml trizol.
    16. Φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές το λεπτό για 15 min στους 4^{o}C.
    17. Απομάκρυνση αιθανόλης και στέγνωμα πελλέτας.

- **Διαλυτοποίηση RNA**
    18. Διαλυτοποίηση σε διπλά απιονισμένο νερό (dd H_2O).
    19. Μέρος του απομονωμένου ολικού mRNA υποβλήθηκε σε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1.2% (w/v) το οποίο περιείχε EtBr σε τελική συγκέντρωση 0.5 μg ml^{-1} και η συγκέντρωσή του εκτιμήθηκε σε νανοφωτόμετρο (Nanodrop, ND 1000).

Όλα τα πλαστικά και γυάλινα υλικά είχαν αποστειρωθεί πριν τη χρήση, όπως επίσης και όλα τα χημικά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν, εκτός της φαινόλης και του χλωροφορμίου.

7.1.2) Αποτύπωση κατά Northern

Η ανάλυση κατά Northern του ολικού mRNA πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Sambrook et al. (1989). Συγκεκριμένα, τουλάχιστον 20 μg ολικού RNA υποβλήθηκαν σε ηλέκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα αγαρόζης 1.5% (w/v), το οποίο περιείχε φορμαλδεΰδη.

Για την παρασκευή του πηκτώματος διαλύθηκαν με τη βοήθεια βρασμού σε 74 ml ddH_2O 1,5 gr αγαρόζης [για πήκτωμα 1.5% (w/v)]. Όταν το διάλυμα κρύωσε αρκετά, προστέθηκαν 10 ml διαλύματος 10x MOPS και 16 ml 37% (v/v) διαλύματος φορμαλδεΰδης. Η πηκτή προ-ηλεκτροφορήθηκε για 5 min στα 5 V/cm σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης όμοιας σύστασης με εκείνη της πηκτής (dH_2O/ formaldehyde/ 10x MOPS).

Τα δείγματα ετοιμάστηκαν με την προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος φόρτωσης, σύστασης 10x MOPS, φορμαλδεΰδης και φορμαμίδης ώστε πάντα ο συνολικός όγκος να είναι < 50 μL και τοποθετήθηκαν για 15 min στους 65^oC και αμέσως μετά σε πάγο. Ακολούθησε η προσθήκη διαλύματος χρωστικής, η οποία περιείχε μπλε της βρωμοφαινόλης 0,1% και γλυκερόλη 30% (v/v). Αφού τοποθετήθηκαν τα δείγματα στα βοθρία του πηκτώματος, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση για περίπου 3,5 h στα 4 V/cm.

Στη συνέχεια, το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε dH_2O υπό συνεχή ανακίνηση για περίπου 2 h, με αλλαγή του dH_2O κάθε 15 min ώστε να απομακρυνθεί η φορμαλδεΰδη. Ακολούθως, το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε διάλυμα χρώσης 0,5 μg mL^{-1} EtBr για 20 min και στη συνέχεια σε ddH_2O για 5 min και φωτογραφήθηκε με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή και το λογισμικό Kodak Digital Science v1.9 με την παράλληλη προσθήκη κανόνα (υποδεκάμετρου) ώστε το μηδέν της κλίμακας να αντιστοιχεί στα βοθρία.

Το πήκτωμα ξεπλύθηκε με ddH_2O και τοποθετήθηκε ανάποδα για μεταφορά πάνω σε διηθητικό στυπόχαρτο Whatman του οποίου τα άκρα διαβρεχόταν συνεχώς με διάλυμα 10x SSC (sodium citrate and sodium chloride). Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε πάνω στο πήκτωμα εξισορροπημένη μεμβράνη υβριδοποίησης σε 2x SSC τύπου NY Plus porablot (Macherey-Nagel, Germany) ίδιων διαστάσεων με το πήκτωμα. Πάνω από τη μεμβράνη τοποθετήθηκαν 2 φύλλα στυπόχαρτου Whatman κορρεσμένα σε 2x SSC και 2 φύλλα Whatman στεγνά. Πάνω από τα φύλλα Whatman, τοποθετήθηκε πακέτο από χαρτοπετσέτες ύψους περίπου 5 εκατοστών, ίσες σε μέγεθος με τα φύλλα Whatman και τέλος ένα βιβλίο βάρους περίπου 1 kg και η μεταφορά των νουκλεικών οξέων από την αγαρόζη στη μεμβράνη υβριδοποίησης διήρκεσε 16-24 h.

Η πρόσδεση του RNA (RNA cross-linking), πραγματοποιήθηκε στη στεγνωμένη μεμβράνη υβριδοποίησης με τοποθέτηση σε συσκευή UV ακτινοβολία (Stratalinker, Stratagene, USA) η επιφάνεια της οποίας βρισκόταν σε επαφή με το πήκτωμα, συνολικής ενέργειακής δόσης 1200 μJ cm^{-2}. Η μεμβράνη διατηρήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι τη χρησιμοποίηση της.

7.1.3) Προετοιμασία ραδιοσημασμένου ιχνηλάτη *hopX1*

Η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε γυάλινο σωλήνα που περιείχε 10 ml διαλύματος υβριδοποίησης (1% BSA, 1Mm EDTA, 0.5 M NaH2PO4, 7% SDS) και επωάστηκε στους 65 ^{o}C υπό ήπια, συνεχή ανάδευση για 60 λεπτά. Ως ιχνηλάτης υβριδοποίησης χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο hopX1 (1155 nt). Διάλυμα του $DNA_{-hopX1-}$ (75 ng σε 15 μl υδατικό διάλυμα) χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα ραδιοσήμανσης αφού αποδιατάχθηκε με βρασμό και τοποθετήθηκε άμεσα στον πάγο. Προστέθηκαν TTP 0.5 M (1 μl), GTP 0.5 M (1 μl), διάλυμα πολυμεράσης Klenow 2.5x (20 μl), τυχαίοι εκκινητές (1 μl), πολυμεράση Klenow (4 μl), ραδιενεργό ATP (3 μl) και ραδιενεργό CTP (3 μl). Ο τελικός όγκος των 50 μl επωάστηκε στους 37^{o} C για 30-45 λεπτά. Κατόπιν, διαχωρίστηκε ο ραδιενεργός ανιχνευτής από τα μη πολυμερισμένα ραδιενεργά νουκλεοτίδια με στήλη Amersham, σύμφωνα με τις υποδείξεις του κατασκευαστή. Ακολούθησε βρασμός του διαλύματος που περιείχε τον ραδιοσημασμένο ιχνηλάτη με σκοπό την αποδιάταξή του και άμεση τοποθέτηση του στο πάγο. Τέλος, προστέθηκε στο διάλυμα υβριδοποίησης σε τελική συγκέντρωση 10^{6} cpm/ml αντίδρασης.

7.1.4) Προϋβριδοποίηση, υβριδοποίηση, ξεπλύματα και έκθεση

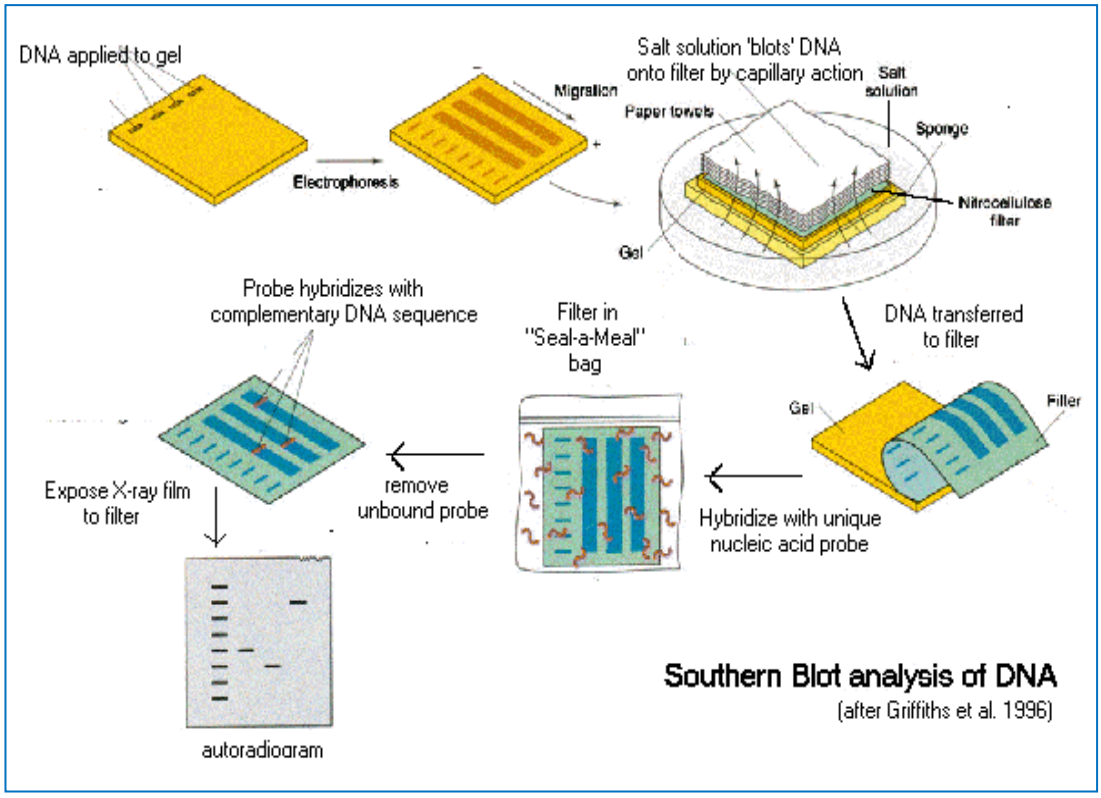
Η μεμβράνη υβριδοποίησης εξισορροπήθηκε σε διάλυμα αλάτων 2x SSC και στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε διάλυμα προϋβριδοποίησης κατά Church μέσα σε περιστρεφόμενο κύλινδρο. Το διάλυμα Church περιείχε 100 mM Na_2HPO_4/$NaHPO_4$, pH 7.2, 7% (w/v) SDS, 1 gr 100 ml^{-1} BSA και 1 mM EDTA pH 8.0. Η προϋβριδοποίηση πραγματοποιήθηκε στους 60^{o}C για 2 h. Στη συνέχεια προστέθηκε ο ραδιενεργός ιχνηλάτης και η υβριδοποίηση πραγματοποιήθηκε στους 60^{o}C για 16 h.

Μετά την παρέλευση των 16 h, πραγματοποιήθηκαν τα ακόλουθα ξεπλύματα της μεμβράνης: 2x SSC για 10 min, 2x SSC 0.1% SDS για 10 min, 1x SSC 0.2% SDS για 2 x 5 min, στους 60^{o}C. Στη συνέχεια, η μεμβράνη αφέθηκε για έκθεση σε Kodak X-Ray film (Kodak Scientific Imaging Film: X-OMAT/AR 35x40 cm), για 3-5 d για τα ΓΤΦ που υπερέκφραζαν το *hopX1* ή περισσότερο για φυτά που εδειξαν χαμηλά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου.

7.2) Ανάλυση κατά Southern

Ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα (βλ. παρατειθέμενη Εικόνα ??:

- ✓ Απομόνωση DNA από φυτικό ιστό.
- ✓ Αποτύπωση κατά Southern.
- ✓ Ραδιοσήμανση ιχνηλάτη.
- ✓ Προϋβριδοποίηση, υβριδοποίηση, ξεπλύματα και έκθεση σε φιλμ αυτοραδιογραφίας.



Εικόνα 6 . Αποτύπωση και υβριδοποίηση κατά Southern.

http://www.koreanbio.org/Biocourse/images/1/1b/Southern.gif

7.2.1) Απομόνωση DNA από φυτικό ιστό (Dellaporta)

1. Ζύγιση 0.5-1 gr τυχαίου φυτικού ιστού σε ζυγό ακριβείας και λειοτρίβηση αυτού σε υγρό άζωτο.
2. Μεταφορά του λειοτριβημένου φυτικού ιστού σε γυάλινους σωλήνες τύπου corex των 30 ml, διηθώντας το με γάζα (miracloth)
3. Προσθήκη 15 ml DNA extraction buffer (100 mM Tris-Cl pH 8.0, 50 mM EDTA και 500 mM NaCl).
4. Προσθήκη 10 mM β-μερκαπτοαιθανόλης.
5. Απαλή ανακίνηση.
6. Προσθήκη 2 ml SDS 10% (προθερμασμένο στους 65^{o}C).
7. Επώαση για 10 min στους 65^{o}C.
8. Προσθήκη 5 ml οξικού καλίου (potassium acetate) 5 M.
9. Ανακίνηση.
10. Επώαση στον πάγο για 30 min.
11. Φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές το λεπτό (rpm) για 15min στους 4^{o}C.
12. Μεταφορά του υπερκείμενου σε σωλήνες τύπου falcon των 50 ml διηθώντας το με γάζα (miracloth).
13. Προσθήκη 10 μl RNase A (10 mg/ml).
14. Επώαση για 10 min στους 37^{o}C.
15. Προσθήκη 400 μl CTAB buffer.
16. Επώαση στους 65^{o}C για 15min.
17. Προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος χλωροφορμίου / ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1).
18. Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 10 min στους 4^{o}C.
19. Απομάκρυνση υπερκείμενου.
20. Προσθήκη στο ίζημα 800 μl κρύας απόλυτης αιθανόλης.
21. Παραμονή στους -20^{o}C για 30 min.
22. Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 10 min στους 4^{o}C.
23. Επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος με 1 ml αιθανόλης 70%.
24. Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 7 min στους 4^{o}C.
25. Απόρριψη του υπερκειμένου και παραμονή για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου για να στεγνώσει η πελλέτα.
26. Επαναδιαλυτοποίηση σε 200 μl ddH_2O.

7.2.2) Αποτύπωση κατά Southern

Εκχυλίσματα 5, 10 και 20 μg γενωμικού DNA υποβλήθηκαν σε πέψη (37^{o}C, 4.5 h) με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI (Minotech, 10 u/μl). Το ένζυμο χρησιμοποιήθηκε στις αντιδράσεις πέψης σε τελική ποσότητα 5 u/μg στα δύο πρώτα εκχυλίσματα DNA και 2.5 u/μg στο τελευταίο. Στη συνέχεια, ηλεκτροφορήθηκαν για περίπου 3.5 h σε πήκτωμα αγαρόζης (0.8% w/v) τοποθετημένο εντός ηλεκτροφορετικού πεδίου σταθερής τάσης 5 V/cm (80 V). Ως πηγή ιόντων και ρυθμιστικό διάλυμα, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα TEA [Tris-EDTA (ethylene-diamine-tetracetate) - (οξικό οξύ)] τελικής συγκέντρωσης 1x παρασκευασμένο από διάλυμα TEA 50x (242 gr Tris, 57.1 ml παγόμορφου οξικού οξέος και 100 ml 0.5 M EDTA pH 8.0). Η χρώση των νουκλεϊνικών οξέων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση βρωμιούχου αιθιδίου, προστιθέμενου απευθείας στο πήκτωμα αγαρόζης με τελική συγκέντρωση 0.5 μg/ml. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή αγαρόζης φωτογραφήθηκε με υποδεκάμετρο στο UV.

Ακολούθησαν οι εξής χειρισμοί προκειμένου να επιτευχθεί η τριχοειδής μεταφορά των μορίων DNA στη μεμβράνη:

- Τοποθέτηση της μεμβράνης υπο ανάδευση σε διάλυμα 0.25 N HCl για 10 min.
- Τοποθέτηση υπό ανάδευση σε διάλυμα 1.5 M NaCl και 0.5 N NaOH για 40 min.
- Ρύθμιση του pH με τοποθέτηση της πηκτής σε διάλυμα 1 M Tris pH 7.4 και 1.5 M NaCl για 30 min υπό ανάδευση.
- Προσθήκη φρέσκου διαλύματος 1 M Tris pH 7.4 και 1.5 M NaCl και ανάδευση για άλλα 15 min.
- Τοποθέτηση σε διάλυμα 10x SSC για 10 min.

Πριν από κάθε πλύση πραγματοποιείται ξέπλυμα της πηκτής για ~15 sec με ddH20.

Κατόπιν, η πηκτή τοποθετήθηκε σε κατάλληλη συσκευή για τριχοειδή μεταφορά (capillary transfer) των μορίων DNA σε νάϋλον μεμβράνη (Nytran-N). Η διαδικασία ήταν η εξής:

Το πήκτωμα τοποθετήθηκε ανάποδα στην γέφυρα μεταφοράς και διαδοχικά τοποθετήθηκαν πάνω του διαβρεχόμενα με SSC 2x και προσέχοντας να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες η μεμβράνη μεταφοράς και 3 χαρτιά χρωματογραφίας (Whatman, England).

Προστέθηκαν χαρτοπετσέτες για την απορρόφηση του υγρού και τριχοειδή μεταφορά και τέλος κάποιο βαρύ αντικείμενο. Το διάλυμα μεταφοράς ήταν 10x SSC. Η διαδικασία μεταφοράς πραγματοποιήθηκε για ~12-18 h. Με την ολοκλήρωση της μεταφοράς η μεμβράνη πλύθηκε σε διάλυμα 2x SSC για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα αγαρόζης και τοποθετήθηκε πάνω σε διηθητικό χαρτί σε απαγωγό εστία να στεγνώσει.

Η στερέωση του DNA (DNA cross-linking), πραγματοποιήθηκε σε στεγνή μεμβράνη, με έκθεση σε UV ακτινοβολία (Stratalinker, Stratagene, USA) η επιφάνεια της οποίας βρισκόταν σε επαφή με το πήκτωμα, συνολικής ενέργειας 600 μJ cm^{-2}. Η μεμβράνη διατηρήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι τη χρησιμοποίηση της.

Επίσης, μετά το τέλος της διαδικασίας μεταφοράς το πήκτωμα υποβλήθηκε σε χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο και φωτογραφήθηκε στο υπεριώδες για να εκτιμηθεί η επιτυχία ή μη της μεταφοράς.

Την επόμενη μέρα η μεμβράνη πλύθηκε διαδοχικά με εξής προθερμασμένα διαλύματα – από 2 φορές το καθένα: α) SSC 2x, SDS 0.1% 10 ml, 15 min, β) SSC 1x, SDS 0.1%, 10 ml, 10 min, γ) SSC 0.5x, SDS 0.1%, 10 ml, 5 min. Κατόπιν η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε διαφανή μεμβράνη ζελατίνης και εν συνεχεία σε κασέτα ακτινογραφίας με φιλμ για έκθεση στους -80 ^{o}C. Το διάστημα έκθεσης κυμάνθηκε ανάλογα με το ραδιενεργό σήμα που είχε η μεμβράνη μετά την υβριδοποίηση.

7.2.3) Παρασκευή ραδιενεργού ιχνηλάτη

Όπως περιγράφεται στην παράγραφο **7.1.3**

7.2.4) Προϋβριδοποίηση, υβριδοποίηση, ξεπλύματα και έκθεση

Όπως περιγράφεται στην παράγραφο **7.1.4**

8) Σπορά T_0 σπόρων για τη λήψη γενετικά τροποποιημένων φυτών *N. benthamiana* (*35S::hopX1-Tocs*) T_1 γενιάς.

Απο τυχαίες σειρές γενετικά τροποποιημένων φυτών ***N. benthamiana*** λήφθηκε ικανοποιητική ποσότητα σπόρου, ο οποίος αποστειρώθηκε για 15 λεπτά σε 10% διάλυμα ενεργού χλωρίου (εμπορικό σκεύασμα συγκέντρωσης χλωρίου 2%). Ακολούθησαν 3 πλύσεις με απεσταγμένο νερό υπό στείρες συνθήκες. Οι σπόροι τοποθετήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα MS με αντιβιοτικό επιλογής (καναμυκίνη 200 μg/ml) και διατηρήθηκαν στο σκοτάδι μέχρι να βλαστήσουν (~3 ημέρες). Στη συνέχεια, μεταφέρθηκαν σε συνθήκες υψηλού φωτισμού σε θάλαμο ανάπτυξης (18 h φώς – 6 h σκοτάδι – 25^{o}C σταθερή θερμοκρασία). Στο στάδιο των 4 φύλλων (θεωρούμενο ενδεικτικό της ανθεκτικότητας των φυτών σε καναμυκίνη), μεταφυτεύθηκαν σε τύρφη και καλύφθηκαν με διαφανή ζελατίνη (διατήρηση υγρασίας). Τέλος, όταν τα φυτάρια ανέπτυξαν ικανοποιητικό μέγεθος μεταφυτεύθηκαν σε γλάστρες με εδαφικό μέσο ριζοβολίας (3 κομπόστα: 1 τύρφη: 1 περλίτη).

9) Μοριακές αναλύσεις στα T1 φυτά *N.benthamiana 35S::hopX1*

Σε τυχαίο φυτικό ιστό από φυτά της T1 γενιάς πραγματοποιήθηκαν οι εξής μοριακές αναλύσεις :

9.1) Ανάλυση κατά **Northern**

9.2) Ανάλυση κατά **Southern**

9.3) Αλυσιδωτή αντίδραση της **πολυμεράσης** (**PCR**)

9.4) Αλυσιδωτή αντίδραση της **αντίστροφης μεταγραφάσης** (**RT-PCR**)

9.1) Ανάλυση κατά Northern

Ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

- ✓ Απομόνωση ολικού RNA από το φυτικό ιστό.
- ✓ Στύπωμα κατά Northern.
- ✓ Κατασκευή ραδιενεργού ιχνηλάτη.
- ✓ Προϋβριδοποίηση, υβριδοποίηση, ξεπλύματα και έκθεση.

9.1.1) Απομόνωση ολικού RNA από φυτικό ιστό (μέθοδος τριζόλης)

Όπως περιγράφεται στην παράγραφο **7.1.1**

9.1.2) Στύπωμα κατά Northern

Ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

1. Πλύσιμο της συσκευής ηλεκτροφόρησης με σαπούνι – ξέπλυμα με dH_2O.
2. Προετοιμασία πηκτής αγαρόζης–φορμαλδεΰδης. Προσθήκη 1.2 g αγαρόζης σε 88 ml ddH_2O. Ομογενοποίηση του διαλύματος μέσω βρασμού. Τέλος, προσθήκη (στον απαγωγό κάθετης ροής και αφού κατέλθει η θερμοκρασία του παραπάνω διαλύματος) 10 ml MOPS 10x και 1.8ml φορμαλδεΰδης (37%=12.3 M) και 7 μl διαλύματος στοκ βρωμιούχου αιθιδίου αραιωμένου 1:10 (τελική συγκέντρωση 0.5 μg/ml).

3. Πλήρωση της συσκευής ηλεκτροφόρησης με διάλυμα MOPS 1x.
4. Προσθήκη ίσου όγκου RNA χρωστικής στα δείγματα.
5. Βρασμός τους για 5 min.
6. Άμεση τοποθέτηση σε πάγο.
7. Ηλεκτροφόρηση στα 100 V για 2 h περίπου.
8. Λήψη φωτογραφίας του πηκτώματος με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή και το λογισμικό Kodak Digital Science v1.9 με την παράλληλη προσθήκη κανόνα ώστε το μηδέν της κλίμακας να αντιστοιχεί στα βοθρία.
9. Τοποθέτηση του πηκτώματος σε dH_2O υπο συνεχή ανάδευση για 2min.
10. Τοποθέτηση του πηκτώματος σε SSC 10x υπο συνεχή ανάδευση για 20min.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η μεταφορά σε μεμβράνη όπως ακριβώς περιγράφεται στην παράγραφο **7.1.2**

9.1.3) Κατασκευή ραδιενεργού ιχνηλάτη

Όπως περιγράφεται στην παράγραφο **7.1.3**

9.1.4) Προϋβριδοποίηση, υβριδοποίηση, ξεπλύματα και αυτοραδιογραφία.

Με τον τρόπο που περιγράφεται στην παράγραφο **7.1.4** με τη μόνη διαφορά οτι το διάλυμα προυβριδοποίησης τελικού όγκου 40 ml περιείχε τα εξής συστατικά: 10 ml SSC 20x, 4 ml SDS 10%, 1 ml tRNA, 800 ml Denhard's και ddH_2O.

9.2) Ανάλυση κατά Southern

Ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

- ✓ Απομόνωση DNA από φυτικό ιστό.
- ✓ Στύπωμα κατά Southern.
- ✓ Κατασκευή ραδιενεργού ιχνηλάτη.
- ✓ Προϋβριδοποίηση, υβριδοποίηση, ξεπλύματα και έκθεση.

9.2.1) Απομόνωση DNA από φυτικό ιστό

Η **απομόνωση του DNA** πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο:

1. Ζύγιση 0.5 gr τυχαίου φυτικού ιστού σε ζυγό ακριβείας και λειοτρίβηση αυτού σε υγρό άζωτο.
2. Μεταφορά του λειοτριβημένου φυτικού ιστού σε σωλήνες τύπου falcon των 15 ml.
3. Προσθήκη 1-2 ml DNA extraction buffer (2% CTAB, 100 mM Tris-Cl pH 8.0, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl και 1% PVP –polyvinylpyrrolodone-).
4. Ισχυρή ανάδευση (vortex).
5. Επώαση σε υδατόλουτρο στους 65^{o}C για 5-15 min. Συχνή ισχυρή ανάδευση (vortex).
6. Προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου.
7. Ισχυρή ανάδευση.
8. Φυγοκέντρηση στις 13500 στροφές το λεπτό, στους 4^{o}C για 30-60 min.
9. Μεταφορά του υπερκειμένου σε καθαρά eppendorfs ή σωλήνες τύπου falcon.
10. Προσθήκη 0.7-1x του όγκου του υπερκειμένου ισοπροπανόλης και οξικού νατρίου (sodium acetate - CH_3COONa).
11. Φυγοκέντρηση στις 13500 στροφές το λεπτό, στους 4^{o}C για 1.5 h.
12. Απόρριψη του υπερκειμένου.
13. Προσθήκη ~1 ml 70% αιθανόλης.
14. Φυγοκέντρηση στις 13500 στροφές το λεπτό (rpm), στους 4^{o}C για 10-15 min.
15. Προσθήκη ~1 ml 70% αιθανόλης (2^{η} πλύση).
16. Φυγοκέντρηση στις 13500 στροφές το λεπτό (rpm), στους 4^{o}C για 10-15 min.
17. Απόρριψη του υπερκειμένου και παραμονή για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου για να στεγνώσει η πελλέτα.
18. Επαναδιαλυτοποίηση σε 200 μl ddH_2O.

9.2.2) Στύπωμα κατά Southern

Όπως περιγράφεται στην παράγραφο **7.2.2.** Το ένζυμο χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση πέψης σε τελική ποσότητα 2.5 u/μg.

9.2.3) Κατασκευή ραδιενεργού ιχνηλάτη (Όπως περιγράφεται στην παράγραφο **7.1.3**)

9.2.4) Προϋβριδοποίηση, υβριδοποίηση, ξεπλύματα και έκθεση (Όπως περιγράφεται στην παράγραφο **9.1.4**)

9.3) Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης με εκκινητές για το γονίδιο *hopX1*

Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης ως μήτρα DNA χρησιμοποιήθηκε γενωμικό DNA από τα φυτά της **T1** γενιάς ***N. benthamiana 35S::hopX1*** το οποίο είχε πρώτα υποβληθεί σε πέψη (37^{o}C, 4.5 h) με το περιοριστικό ένζυμο **EcoRI** (Minotech, 10 u/μl).

Πίνακας 14. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

Συστατικά αντίδρασης	Ποσότητα στο διάλυμα της αντίδρασης (μl)	Συγκεντρώσεις των αρχικών διαλυμάτων	Ποσότητες συστατικών στο τελικό διάλυμα της αντίδρασης
DNA- μήτρα: ***N. benthamiana 35s::hopX1*** **(T1)**	1		
Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer Taq DNA polymerase)	5	10x	1x
Εμπρόσθιος εκκινητής (Upper primer)	0.8	50 pmol/μl	0.8 pmol/μl
Οπίσθιος εκκινητής (Lower primer)	0.8	50 pmol/μl	0.8 pmol/μl
Διάλυμα δεσοξυριβο-νουκλεοτιδίων (dNTPs)	2.4	10 mM	400 μM
Ένζυμο (Taq DNA polymerase)	0.5	5 units/μl	0.05 units/μl
$MgCl_2$	4	25 mM	2 mM
ddH_2O	35.5		
Total volume	50		

Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν τα ολιγονουκλεοτίδια: ***35s*** Forward: 5'-AATCCCACTATCCTTCGCAAG-3' (21 bases, Thermo Tm = 60.5°C **Hybridization Tm = 50.9°C** GC+AT Tm = 62.0°C) και ***ocs*** Reverse: 5'-CGTGCACAACAGAATTGAAAGC-3' (22 bases, Thermo Tm = 63.0°C **Hybridization Tm = 51.3°C** GC+AT Tm = 64.0°C)

Η παραπάνω αλυσιδωτή αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή PTC-200 (MJ Research, Minessota, USA) κάτω από τις συνθήκες, οι οποίες περιγράφονται στον Πίνακα 15.

Πίνακας 15. Συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ (^{O}C)	ΧΡΟΝΟΣ
Αρχική Αποδιάταξη	94	5’
Αποδιάταξη	94	30’’
Υβριδισμός εκκινητών	53	40’’
Επέκταση	72	2’
Κύκλοι αντίδρασης: 35		
Τελική επέκταση	72	10’

9.4) Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης με εκκινητές για τα γονίδια *hopX1* και *virG*

Για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων ως μήτρα DNA χρησιμοποιήθηκε γενωμικό DNA από τα φυτά της **T1** γενιάς ***N. benthamiana 35S::hopX1*** το οποίο είχε πρώτα υποβληθεί σε πέψη (37^{o}C, 4.5 h) με το περιοριστικό ένζυμο **EcoRI** (Minotech, 10 u/μl) αραιωμένο 1:10.

Πίνακας 16. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης με εκκινητές για το γονίδιο *hopX1*

Συστατικά αντίδρασης	Ποσότητα στο διάλυμα της αντίδρασης (μl)	Συγκεντρώσεις των αρχικών διαλυμάτων	Ποσότητες συστατικών στο τελικό διάλυμα της αντίδρασης
DNA- μήτρα: ***N. benthamiana 35s::hopX1* (T1)**	1		
Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer Taq DNA polymerase)	5	10x	1x
Εμπρόσθιος εκκινητής (Upper *hopX1* primer)	0.8	50 pmol/μl	0.8 pmol/μl
Οπίσθιος εκκινητής (Lower *hopX1* primer)	0.8	50 pmol/μl	0.8 pmol/μl
Διάλυμα δεσοξυριβο-νουκλεοτιδίων (dNTPs)	2.4	10 mM	400 μM
Ένζυμο (Taq DNA polymerase)	0.5	5 units/μl	0.05 units/μl
$MgCl_2$	4	25 mM	2 mM
ddH_2O	35.5		
Total volume	50		

Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν τα ολιγονουκλεοτίδια που περιγράφονται στην παράγραφο **9.3**

Η παραπάνω αλυσιδωτή αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή PTC-200 (MJ Research, Minessota, USA) κάτω από τις συνθήκες, οι οποίες περιγράφονται στον Πίνακα 16.

Πίνακας 17. Συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για το γονίδιο *hopX1*

	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ (^{O}C)	ΧΡΟΝΟΣ
Αρχική Αποδιάταξη	94	5’
Αποδιάταξη	94	30’’
Υβριδισμός εκκινητών	58	40’’
Επέκταση	72	2’
Κύκλοι αντίδρασης: 33		
Τελική επέκταση	72	10’

Οι συνθήκες της **PCR** για την ανίχνευση της παρουσίας ή απουσία του γονιδίου ***virG*** παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα.

Πίνακας 18. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης με εκκινητές για το γονίδιο *virG*

Συστατικά αντίδρασης	Ποσότητα στο διάλυμα της αντίδρασης (μl)	Συγκεντρώσεις των αρχικών διαλυμάτων	Ποσότητες συστατικών στο τελικό διάλυμα της αντίδρασης
DNA- μήτρα: ***N. benthamiana 35s::hopX1*** **(T1)**	1		
Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer Taq DNA polymerase)	5	10x	1x
Εμπρόσθιος εκκινητής (Upper *virG* primer)	0.8	50 pmol/μl	0.8 pmol/μl
Οπίσθιος εκκινητής (Lower *virG* primer)	0.8	50 pmol/μl	0.8 pmol/μl
Διάλυμα δεσοξυριβο-νουκλεοτιδίων (dNTPs)	2.4	10 mM	400 μM
Ένζυμο (Taq DNA polymerase)	0.5	5 units/μl	0.05 units/μl
$MgCl_2$	4	25 mM	2 mM
ddH_2O	35.5		
Total volume	50		

Ως **εμπρόσθιος *virG* εκκινητής** χρησιμοποιήθηκε το ολιγονουκλεοτίδιο: 5'-GCCGGGGCGAGACCATAGG-3', ενώ ως **οπίσθιος *virG* εκκινητής** το ολιγονουκλεοτίδιο: 5'-CGCACGCGCAAGGCAACC-3'.

Η παραπάνω αλυσιδωτή αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή PTC-200 (MJ Research, Minessota, USA) κάτω από τις συνθήκες, οι οποίες περιγράφονται στον Πίνακα 16.

Πίνακας 19. Συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για το γονίδιο *virG*

	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ (^{O}C)	ΧΡΟΝΟΣ
Αρχική Αποδιάταξη	94	5'
Αποδιάταξη	94	30''
Υβριδισμός εκκινητών	68	40''
Επέκταση	72	2'
Κύκλοι αντίδρασης: 33		
Τελική επέκταση	72	10'

9.5) Αλυσιδωτή αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφάσης (RT-PCR)

Ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

- ✓ Απομόνωση ολικού RNA από το φυτικό ιστό.
- ✓ Απομάκρυνση DNA με προσθήκη DNAάσης.
- ✓ Αλυσιδωτή αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφάσης (RT-PCR).

9.5.1) Απομόνωση ολικού RNA από το φυτικό ιστό

Όπως περιγράφεται στην παράγραφο **7.1.1**

9.5.2) Προσθήκη DNAάσης

Η όλη διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

1. Υπολογισμός του όγκου του εκχυλίσματος RNA από κάθε ένα εξεταζόμενο φυτικό δείγμα Τ1 ιστού στον οποίο περιέχονται 10 μg RNA.
2. Προσθήκη αποστειρωμένου ddH_2O έως ότου ο όγκος των παραπάνω δειγμάτων λάβει την τιμή των 25 μl.
3. Προσθήκη 3 μl DNAase buffer 10x (Ambion) και 2 μl DNAase enzyme (Ambion - 2 u/μl) σε κάθε ένα δείγμα (25+3+2=30 μl τελικός όγκος αντίδρασης).
4. Απαλή ανάδευση δειγμάτων.
5. Παραμονή στους 37^{o}C για 30min.
6. Προσθήκη 170 μl RNAase free water.
7. Προσθήκη 200 μl διαλύματος φαινόλης / χλωροφορμίου (1:1).
8. Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 10 min.
9. Συλλογή του υπερκειμένου και μεταφορά του σε καθαρούς σωλήνες τύπου eppendorf.
10. Προσθήκη 200 μl χλωροφορμίου.
11. Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 10 min.
12. Προσθήκη 20 μl CH_3COONa και 200 μl ισοπροπανόλης.
13. Ισχυρή ανάδευση.
14. Παραμονή στους -20^{o}C για 30 min.
15. Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 15 min.
16. Προσθήκη 1 ml 70 % αιθανόλης.
17. Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 10 min.
18. Στέγνωμα του ιζήματος (τοποθέτηση του eppendorf ανάποδα σε όρθια θέση πάνω σε απορροφητικό χαρτί ή τοποθέτηση στο θάλαμο κενού για 10 min).
19. Επαναδιαλυτοποίηση σε 20 μl RNAase free water.
20. Αποθήκευση στους -20^{o}C.

9.5.3) Αλυσιδωτή αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφάσης (RT-PCR)

Πίνακας 20. Συστατικά και συνθήκες της αλυσιδωτής αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφάσης.

Συστατικά αντίδρασης I	**Μήτρα RNA** ***N. benthamiana 35S::hopX1*** **(T1)**		**Εμπρόσθιος εκκινητής (Upper primer)**		**Οπίσθιος εκκινητής (Lower primer)**	
Ποσότητα **(μl)**	**8**		**1**		**1**	
Συνθήκες αντίδρασης: 70°C – 10 min						
Συστατικά αντίδρασης II	Συστατικά αντίδρασης I	10x buffer	dNTP's	RNase out	Super RT enzyme	ddH_2O
Ποσότητα **(μl)**	**10**	**2**	**2**	**1**	**1**	**4**
Συνθήκες αντίδρασης: i) 42°C – 1 h και ii) 85°C – 5 min						

Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν τα ολιγονουκλεοτίδια: **35s** Forward: 5'-AATCCCACTATCCTTCGCAAG-3' (21 bases, Thermo Tm = 60.5°C **Hybridization Tm = 50.9°C** GC+AT Tm = 62.0°C) και **OCS** Reverse: 5'-CGTGCACAACAGAATTGAAAGC-3' (22 bases, Thermo Tm = 63.0°C **Hybridization Tm = 51.3°C** GC+AT Tm = 64.0°C). Η αρχική συγκέντρωσή τους ήταν 50 pmol/μl.

Στη συνέχεια 1 μl του προϊόντος της RT-PCR που υποβλήθηκε σε PCR με εκκινητές για το γονίδιο ***hopX1***, ενώ άλλο 1μl χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα σε αντίδραση PCR με εκκινητές για το γονίδιο της **ακτίνης**. Οι δύο αντιδράσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν με τα συστατικά και τις συνθήκες που περιγράφονται στους Πίνακες 14 και 15. Ο εμπρόσθιος εκκινητής του γονιδίου της ακτίνης έχει την αλληλουχία 5'-TTAACTCTTAAATACCCAATTGAGCAT-3', ενώ ο οπίσθιος την αλληλουχία 5'-GACAGCCTGAATAGCAACATACATAG-3' με βάση τη γνωστή αλληλουία του γονιδίου (πηγή: Χρήστος Κοτάκης).

10) Μολύνση φυτών *N. benthamiana 35S::hopX1* T1 γενιάς με αγροβακτήριο (*A. tumefaciens*)

Αποικίες των στελεχών A208 και A281 του *A. tumefaciens* (τοπικές απομονώσεις διαθέσιμες στο εργαστήριο) επιστρώθηκαν σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο στους 28^{o}C για 16-18 h περίπου. Κατόπιν με τη βοήθεια αποστειρωμένου αιχμηρού ξύλινου αντικειμένου (π.χ. οδοντογλυφίδας) ποσότητα μολύσματος μεταφέρθηκε σε προσημειωμένους μίσχους φύλλων με την πρόκληση δύο εγκάρσιων οπών σε απόσταση 1 cm περίπου στον κάθε εξεταζόμενο μίσχο (Εικόνα 7).

Εικόνα 7. Μόλυνση με *A. tumefaciens* σε μίσχο φύλλου *N. benthamiana 35S::hopX1* (T1).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1) Κλωνοποίηση του γονιδίου *hopX1* από το βακτήριο *P. syringae* pv. *tomato* DC3001.

Για την κλωνοποίηση του γονιδίου ***hopX1***$_{\mathbf{DC3001}}$ εκχύλισμα ολικού DNA από το βακτήριο ***P. syringae*** **pv.** ***tomato*** **DC3001** χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα σε αντίδραση PCR με τους εκκινητές και σε συνθήκες που περιγράφονται στα Υλικά και Μέθοδοι. Η αντίδραση έδωσε μια ζώνη μεγέθους περίπου των 1200 bp. Η ζώνη αυτή καθαρίστηκε από την πηκτή αγαρόζης και κλωνοποιήθηκε αρχικά στο φορέα **pGEM-T easy**.

Εικόνα 8. A. Αλληλούχιση της περιοχής του γονιδίου ***hopX1***$_{\mathbf{DC3001}}$ μετά την κλωνοποίησή του στην κασέτα έκφρασης ***CaMV35S-hopX1-ocs***. και σύγκρισή της με την αλληλουχία του γονιδίου ***hopX1***$_{DC3000}$***. 35S_ hopX1***$_{\mathbf{DC3001}}$***_ocs***: Πειραματικά καθορισθείσα αλληλουχία από την κατεύθυνση του υποκινητή ***35S*** και του τερματιστή ***ocs***. Τα τμήματα με αναγνώσιμες αλληλουχίες προς την κάθε κατεύθυνση και η περιοχή επικάλυψης τους επισημαίνονται με διαφορετικά χρώματα. ***35S_hopX1***$_{DC3001}$***_ocs*****_IC**: Η αντίστροφη συμπληρωματική αλληλουχία της παραπάνω (inverse complement) για σύγκρισή της με την αυθεντική αλληλουχία του γονιδίου *hopX1*$_{\mathrm{DC3000}}$ που έχει κατατεθεί στη βάση δεδομένων pseudomonas-syringae.org – effector database) **B.** Στοίχιση των αλληλουχιών **35S_hopX1**$_{\mathbf{DC3001}}$**_ocs_IC** και ***hopX1***$_{\mathbf{DC3000}}$ με το πρόγραμμα CLUSTAL W.

A.

>35S_ hopX1$_{\mathbf{DC3001}}$***_ocs***

TCTAGACGTACGTACTTTAAAATGCGAGTTCAGGTTTCAGACATCTCGTCTCGCCAAGCCTTGAGGAGAGGCGACCTTCAC
TGCAAGCTCAACCAAAGGTCGGGCTTGTCGAGTAGCGTCCTTGACGCCCTTGGTGCCGAGCGACATTGCGACTCCGACCGC
TTCAATATCTACCTGTAGTGCACGCCGCAAATCAGGGGAGGTCAACTTGTCGCTCACTCTGCGGACAAATGCATCATCAAG
TACCGATTTTTCTGGTCGATAGCGACCACTTTTGATGGGCGAGACTTGCTCCTGCTGATCCGCCAGGCGTTTCTGCAATCG
GGTTGTGACCTGCGTCAAAGCCTTCTCGGCTGTCTCACGCGTAATTTTGCCCGCTTCGGCTGCGGTTGAAAGATTAAACGT
ATCCGTACGCTCTACAGCATTTCGATTTTTCGCAAACCTACTGTCCTCCGCAAATATGGCTGAACCATTTGACCACGGATC
CATGACAATCGTTGAGGTGCCAGACTGGGATTCGTCGGTTTCAGCCCACACATGATCTTCCTCAGTCGATGCAGCCAAGTA
GATGTTTTCATATTCAGATCGTCCGTTTTCCTGGGCCAAAGCTCCATAGGCGAAGCTCGCTATACGAGCATGTTCGCCACA
GTTGCCCGCGCCGAACACCTGGCCTGACATCGCAACAAGAACATGCCAGTTCATCGGCTCATTCGCAGGCATAGGCTCATG
ACCGGCGGCCTCGGCATCTTTTCTCAAGCACCTTGCTGCAAGGGTGCGGGCTCCACTTTCCAGATTGGAAAGTTGCGCATC
CACATCAATATTGCCTCTTCCAAAGGGCAATGCACGGCGCGCTTCAGCCACAGCCTTGTCTGCCGGGATCAGACTTTTGGT
ACCTTCCTGATCCACAGGGCGATGGTCCAGCCTTCGCAACAGTAAGTAGCCGGGCAAAGAAGATGGTGTATCAGGCAGCGG
TTTCCCAGCAGACGCAACGGGCGGCAACCGTGTTTGTACTGATGAATATGGATAGTTCGCACGCGCCCTATCAGGGCGAGT
CTCAGAGCTTTCTGGTGGCAAGCCATAAGAGCCTTGCTGGCTCTGCGGTTGAGTTATTGATGATTGCGCCGCCTTTCCAAC
GTTTCCATTCGAAATGCCCGGCAAAGGTGGGGTTAGGCCAGCGTTATGTATTTTCATTTTATCTCAACGAATTAAATACTT
TCCTCGAGCGTGT

>35S_hopX1$_{DC3001}$***_ocs*****_IC**

ACACGCTCGAGGAAAGTATTTAATTCGTTGAGATAAAATGAAAATACATAACGCTGGCCTAACCCCACCTTTGCCGGGCA
TTTCGAATGGAAACGTTGGAAAGGCGGCGCAATCATCAATAACTCAACCGCAGAGCCAGCAAGGCTCTTATGGCTTGCCA
CCAGAAAGCTCTGAGACTCGCCCTGATAGGGCGCGTGCGAACTATCCATATTCATCAGTACAAACACGGTTGCCGCCCGT
TGCGTCTGCTGGGAAACCGCTGCCTGATACACCATCTTCTTTGCCCGGCTACTTACTGTTGCGAAGGCTGGACCATCGCC
CTGTGGATCAGGAAGGTACCAAAAGTCTGATCCCGGCAGACAAGGCTGTGGCTGAAGCGCGCCGTGCATTGCCCTTTGGA
AGAGGCAATATTGATGTGGATGCGCAACTTTCCAATCTGGAAAGTGGAGCCCGCACCCTTGCAGCAAGGTGCTTGAGAAA
AGATGCCGAGGCCGCCGGTCATGAGCCTATGCCTGCGAATGAGCCGATGAACTGGCATGTTCTTGTTGCGATGTCAGGCC
AGGTGTTCGGCGCGGGCAACTGTGGCGAACATGCTCGTATAGCGAGCTTCGCCTATGGAGCTTTGGCCCAGGAAAACGGA
CGATCTGAATATGAAAACATCTACTTGGCTGCATCGACTGAGGAAGATCATGTGTGGGCTGAAACCGACGAATCCCAGTC
TGGCACCTCAACGATTGTCATGGATCCGTGGTCAAATGGTTCAGCCATATTTGCGGAGGACAGTAGGTTTGCGAAAAATC
GAAATGCTGTAGAGCGTACGGATACGTTTAATCTTTCAACCGCAGCCGAAGCGGGCAAAATTACGCGTGAGACAGCCGAG
AAGGCTTTGACGCAGGTCACAACCCGATTGCAGAAACGCCTGGCGGATCAGCAGGAGCAAGTCTCGCCCATCAAAAGTGG
TCGCTATCGACCAGAAAAATCGGTACTTGATGATGCATTTGTCCGCAGAGTGAGCGACAAGTTGACCTCCCCTGATTTGC

GGCGTGCACTACAGGTAGATATTGAAGCGGTCGGAGTCGCAATGTCGCTCGGCACCAAGGGCGTCAAGGACGCTACTCGA
CAAGCCCGACCTTTGGTTGAGCTTGCAGTGAAGGTCGCCTCTCCTCAAGGCTTGGCGAGACGAGATGTCTGAAACCTGAA
CTCGCATTTTAAAGTACGTACGTCTAGA

>*hopX1*_DC3000_PPI

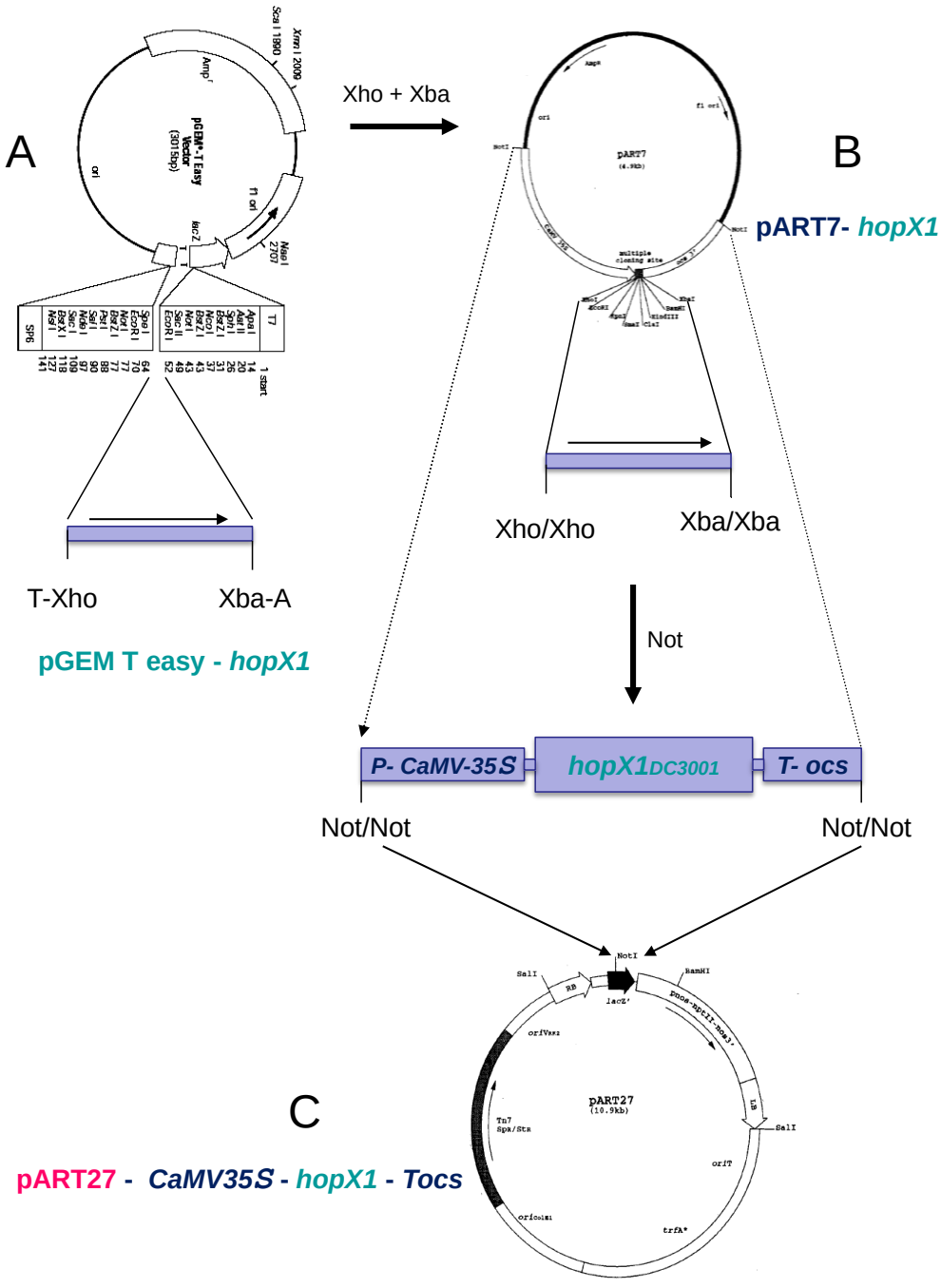
ATGAAAATACATAACGCTGGCCTAACCCCACCTTTGCCGGGCATTTCGAATGGAAACGTTGGAAAGGCGGCGCAATCATC
AATAACTCAACCGCAGAGCCAGCAAGGCTCTTATGGCTTGCCACCAGAAAGCTCTGAGACTCGCCCTGATAGGGCGCGTG
CGAACTATCCATATTCATCAGTACAAACACGGTTGCCGCCCGTTGCGTCTGCTGGGAAACCGCTGCCTGATACACCATCT
TCTTTGCCCGGCTACTTACTGTTGCGAAGGCTGGACCATCGCCCTGTGGATCAGGAAGGTACCAAAAGTCTGATCCCGGC
AGACAAGGCTGTGGCTGAAGCGCGCCGTGCATTGCCCTTTGGAAGAGGCAATATTGATGTGGATGCGCAACTTTCCAATC
TGGAAAGTGGAGCCCGCACCCTTGCAGCAAGGTGCTTGAGAAAAGATGCCGAGGCCGCCGGTCATGAGCCTATGCCTGCG
AATGAGCCGATGAACTGGCATGTTCTTGTTGCGATGTCAGGCCAGGTGTTCGGCGCGGGCAACTGTGGCGAACATGCTCG
TATAGCGAGCTTCGCCTATGGAGCTTTGGCCCAGGAAAACGGACGATCTGAATATGAAAACATCTACTTGGCTGCATCGA
CTGAGGAAGATCATGTGTGGGCTGAAACCGACGAATCCCAGTCTGGCACCTCAACGATTGTCATGGATCCGTGGTCAAAT
GGTTCAGCCATATTTGCGGAGGACAGTAGGTTTGCGAAAAATCGAAATGCTGTAGAGCGTACGGATACGTTTAATCTTTC
AACCGCAGCCGAAGCGGGCAAAATTACGCGTGAGACAGCCGAGAAGGCTTTGACGCAGGTCACAACCCGATTGCAGAAAC
GCCTGGCGGATCAGCAGGAGCAAGTCTCGCCCATCAAAAGTGGTCGCTATCGACCAGAAAAATCGGTACTTGATGATGCA
TTTGTCCGCAGAGTGAGCGACAAGTTGACCTCCCCTGATTTGCGGCGTGCACTACAGGTAGATATTGAAGCGGTCGGAGT
CGCAATGTCGCTCGGCACCAAGGGCGTCAAGGACGCTACTCGACAAGCCCGACCTTTGGTTGAGCTTGCAGTGAAGGTCG
CCTCTCCTCAAGGCTTGGCGAGACGAGATGTCTGA

B.

```
35S_ocs_IC          ACACGCTCGAGGAAAGTATTTAATTCGTTGAGATAAAATGAAAATACATAACGCTGGCCT 60
hopX1_DC3000_PPI    ------------------------------------ATGAAAATACATAACGCTGGCCT 23
                                                         **********************

35S_ocs_IC          AACCCCACCTTTGCCGGGCATTTCGAATGGAAACGTTGGAAAGGCGGCGCAATCATCAAT 120
hopX1_DC3000_PPI    AACCCCACCTTTGCCGGGCATTTCGAATGGAAACGTTGGAAAGGCGGCGCAATCATCAAT 83
                    ************************************************************

35S_ocs_IC          AACTCAACCGCAGAGCCAGCAAGGCTCTTATGGCTTGCCACCAGAAAGCTCTGAGACTCG 180
hopX1_DC3000_PPI    AACTCAACCGCAGAGCCAGCAAGGCTCTTATGGCTTGCCACCAGAAAGCTCTGAGACTCG 143
                    ************************************************************

35S_ocs_IC          CCCTGATAGGGCGCGTGCGAACTATCCATATTCATCAGTACAAACACGGTTGCCGCCCGT 240
hopX1_DC3000_PPI    CCCTGATAGGGCGCGTGCGAACTATCCATATTCATCAGTACAAACACGGTTGCCGCCCGT 203
                    ************************************************************

35S_ocs_IC          TGCGTCTGCTGGGAAACCGCTGCCTGATACACCATCTTCTTTGCCCGGCTACTTACTGTT 300
hopX1_DC3000_PPI    TGCGTCTGCTGGGAAACCGCTGCCTGATACACCATCTTCTTTGCCCGGCTACTTACTGTT 263
                    ************************************************************

35S_ocs_IC          GCGAAGGCTGGACCATCGCCCTGTGGATCAGGAAGGTACCAAAAGTCTGATCCCGGCAGA 360
hopX1_DC3000_PPI    GCGAAGGCTGGACCATCGCCCTGTGGATCAGGAAGGTACCAAAAGTCTGATCCCGGCAGA 323
                    ************************************************************

35S_ocs_IC          CAAGGCTGTGGCTGAAGCGCGCCGTGCATTGCCCTTTGGAAGAGGCAATATTGATGTGGA 420
hopX1_DC3000_PPI    CAAGGCTGTGGCTGAAGCGCGCCGTGCATTGCCCTTTGGAAGAGGCAATATTGATGTGGA 383
                    ************************************************************

35S_ocs_IC          TGCGCAACTTTCCAATCTGGAAAGTGGAGCCCGCACCCTTGCAGCAAGGTGCTTGAGAAA 480
hopX1_DC3000_PPI    TGCGCAACTTTCCAATCTGGAAAGTGGAGCCCGCACCCTTGCAGCAAGGTGCTTGAGAAA 443
                    ************************************************************

35S_ocs_IC          AGATGCCGAGGCCGCCGGTCATGAGCCTATGCCTGCGAATGAGCCGATGAACTGGCATGT 540
hopX1_DC3000_PPI    AGATGCCGAGGCCGCCGGTCATGAGCCTATGCCTGCGAATGAGCCGATGAACTGGCATGT 503
                    ************************************************************

35S_ocs_IC          TCTTGTTGCGATGTCAGGCCAGGTGTTCGGCGCGGGCAACTGTGGCGAACATGCTCGTAT 600
hopX1_DC3000_PPI    TCTTGTTGCGATGTCAGGCCAGGTGTTCGGCGCGGGCAACTGTGGCGAACATGCTCGTAT 563
                    ************************************************************

35S_ocs_IC          AGCGAGCTTCGCCTATGGAGCTTTGGCCCAGGAAAACGGACGATCTGAATATGAAAACAT 660
hopX1_DC3000_PPI    AGCGAGCTTCGCCTATGGAGCTTTGGCCCAGGAAAACGGACGATCTGAATATGAAAACAT 623
```

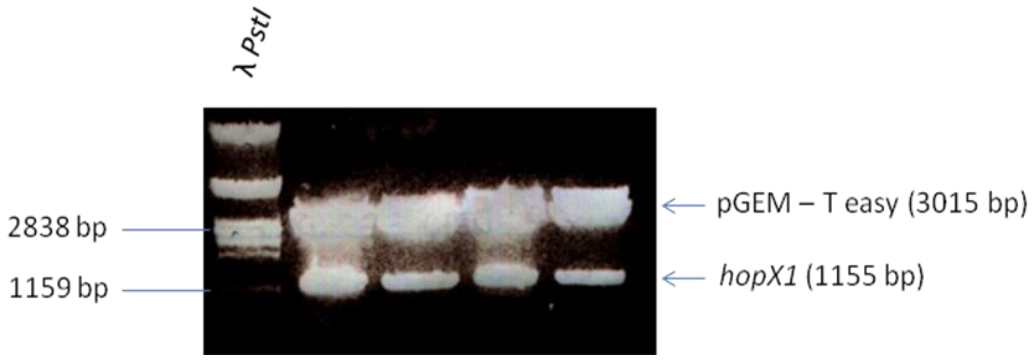
```
                    ************************************************************

35S_ocs_IC          CTACTTGGCTGCATCGACTGAGGAAGATCATGTGTGGGCTGAAACCGACGAATCCCAGTC 720
hopX1_DC3000_PPI    CTACTTGGCTGCATCGACTGAGGAAGATCATGTGTGGGCTGAAACCGACGAATCCCAGTC 683
                    ************************************************************

35S_ocs_IC          TGGCACCTCAACGATTGTCATGGATCCGTGGTCAAATGGTTCAGCCATATTTGCGGAGGA 780
hopX1_DC3000_PPI    TGGCACCTCAACGATTGTCATGGATCCGTGGTCAAATGGTTCAGCCATATTTGCGGAGGA 743
                    ************************************************************

35S_ocs_IC          CAGTAGGTTTGCGAAAAATCGAAATGCTGTAGAGCGTACGGATACGTTTAATCTTTCAAC 840
hopX1_DC3000_PPI    CAGTAGGTTTGCGAAAAATCGAAATGCTGTAGAGCGTACGGATACGTTTAATCTTTCAAC 803
                    ************************************************************

35S_ocs_IC          CGCAGCCGAAGCGGGCAAAATTACGCGTGAGACAGCCGAGAAGGCTTTGACGCAGGTCAC 900
hopX1_DC3000_PPI    CGCAGCCGAAGCGGGCAAAATTACGCGTGAGACAGCCGAGAAGGCTTTGACGCAGGTCAC 863
                    ************************************************************

35S_ocs_IC          AACCCGATTGCAGAAACGCCTGGCGGATCAGCAGGAGCAAGTCTCGCCCATCAAAAGTGG 960
hopX1_DC3000_PPI    AACCCGATTGCAGAAACGCCTGGCGGATCAGCAGGAGCAAGTCTCGCCCATCAAAAGTGG 923
                    ************************************************************

35S_ocs_IC          TCGCTATCGACCAGAAAAATCGGTACTTGATGATGCATTTGTCCGCAGAGTGAGCGACAA 1020
hopX1_DC3000_PPI    TCGCTATCGACCAGAAAAATCGGTACTTGATGATGCATTTGTCCGCAGAGTGAGCGACAA 983
                    ************************************************************

35S_ocs_IC          GTTGACCTCCCCTGATTTGCGGCGTGCACTACAGGTAGATATTGAAGCGGTCGGAGTCGC 1080
hopX1_DC3000_PPI    GTTGACCTCCCCTGATTTGCGGCGTGCACTACAGGTAGATATTGAAGCGGTCGGAGTCGC 1043
                    ************************************************************

35S_ocs_IC          AATGTCGCTCGGCACCAAGGGCGTCAAGGACGCTACTCGACAAGCCCGACCTTTGGTTGA 1140
hopX1_DC3000_PPI    AATGTCGCTCGGCACCAAGGGCGTCAAGGACGCTACTCGACAAGCCCGACCTTTGGTTGA 1103
                    ************************************************************

35S_ocs_IC          GCTTGCAGTGAAGGTCGCCTCTCCTCAAGGCTTGGCGAGACGAGATGTCTGAAACCTGAA 1200
hopX1_DC3000_PPI    GCTTGCAGTGAAGGTCGCCTCTCCTCAAGGCTTGGCGAGACGAGATGTCTGA-------- 1155
                    ************************************************

35S_ocs_IC          CTCGCATTTTAAAGTACGTACGTCTAGA 1228
hopX1_DC3000_PPI    ----------------------------
```

2) Κατασκευή δυαδικού φορέα με γονιδιακή κασέτα έκφρασης του *hopX1*$_{DC3001}$ σε φυτικά κύτταρα (pART27-*CaMV35S-hopX1-Tocs*).



Εικόνα 9. Κατασκευή του πλασμιδίου pART27-*CaMV35S-hopX1-Tocs*.

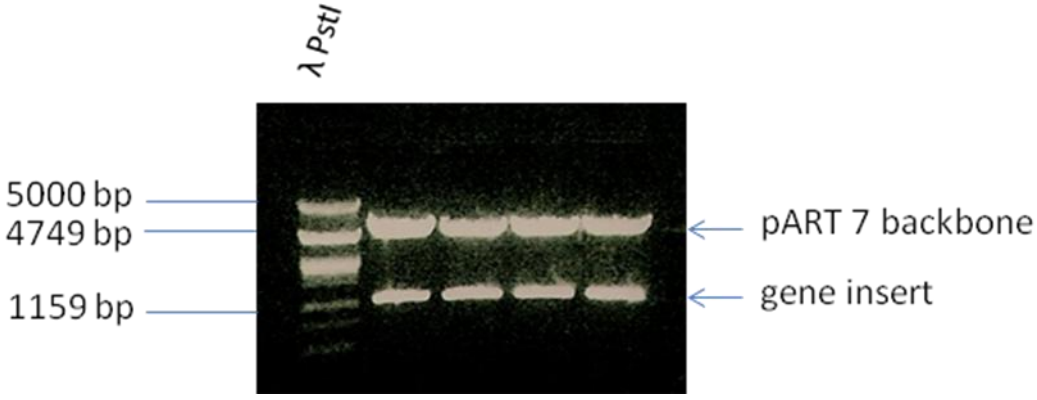
Το πλασμίδιο **pGEM-T easy-*hopX1*** υποβλήθηκε σε πέψη με τα ένζυμα Xho I και Xba I και τα προϊόντα πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε **πηκτή αγαρόζης**, όπου εμφανίστηκαν δύο ζώνες. Η μεγαλύτερη ζώνη εμφανίζεται στο ύψος περίπου των 3000 bp και αντιστοιχεί στον φορέα **pGEM-T easy** (3015 bp), ενώ η μικρότερη ζώνη στο ύψος των 1200 bp περίπου και αντιστοιχεί στο γονιδιακό ένθεμα ***hopX1*** (1155 bp) (Εικόνα 10). Η δεύτερη ζώνη απομονώθηκε από την πηκτή αγαρόζης και χρησιμοποιήθηκε σε αντίδραση λιγάσης με DNA του πλασμιδίου pART7 που είχε επίσης υποβληθεί σε πέψη με τα ένζυμα Xho I και Xba I, παρουσία λιγάσης. Το μείγμα χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων *E. coli* DH10B. Μετασχηματισμένες αποικίες επιλέχθηκαν σε τρυβλία LB άγαρ με αμπικιλλίνη.



Εικόνα 10. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης πέψης του πλασμιδίου pGEM-T easy + *hopX1* με τα ένζυμα XhoI και XbaI σε πηκτή αγαρόζης 0.8% (w/v) (100 V).

<u>Διαγνωστική πέψη και ηλεκτροφόρηση του πλασμιδίου pART7-*hopX1*:</u>

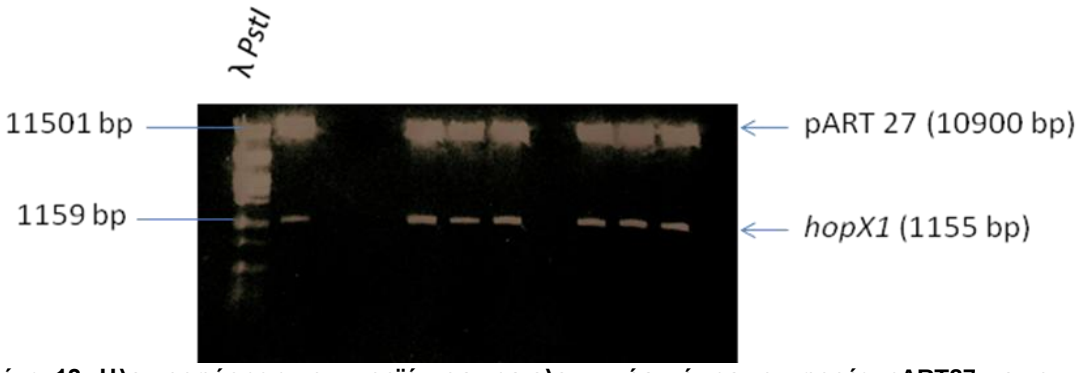
Η διαγνωστική πέψη του πλασμιδίου **pART7- *hopX1*** που πραγματοποιήθηκε με τα ένζυμα **XhoI** και **XbaI** ηλεκτροφορήθηκε σε **πηκτή αγαρόζης** έδωσε τα αναμενόμενα προϊόντα, τον φορέα pART7 **4.9 kb (pART7 backbone)** και το γονιδιακό ένθεμα **1155 bp (*hopX1*)** (Εικόνα 11).



Εικόνα 11. Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της ελεγκτικής πέψης του φορέα pART7 με το γονιδιακό ένθεμα *hopX1* που πραγματοποιήθηκε με τα ένζυμα XhoI και XbaI σε πηκτή αγαρόζης 0.8% (w/v) (100V).

Ελεγκτική πέψη του φορέα pART27 με το γονιδιακό ένθεμα *CaMV35S-hopX1-Tocs* με τα ένζυμα XhoI και XbaI:

Τα προϊόντα της ελεγκτικής αντίδραση πέψης του φορέα **pART27** με το γονιδιακό ένθεμα ***CaMV35S-hopX1-Tocs*** ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης**.** (Εικόνα 12). Οι δύο ζώνες που εμφανίστηκαν αντιστοιχούν στο ελεγχόμενο γονιδιακό ένθεμα ***hopX1*** (**1155 bp**) και στον φορέα **pART27** ο οποίος επιπλέον περιέχει την αλληλουχία του ***CaMV35S*** και του ***Tocs*** (>**10900 bp**).



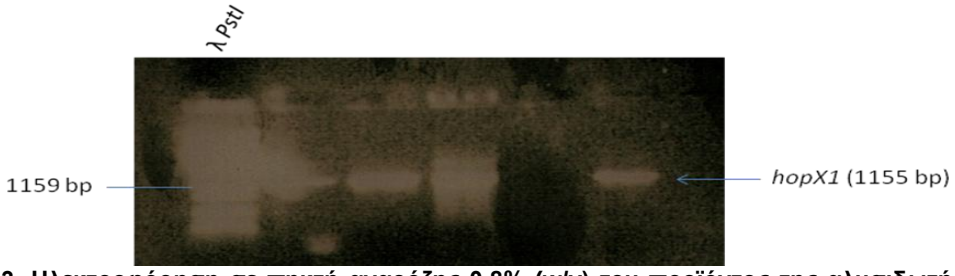
Εικόνα 12. Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της ελεγκτικής πέψης του φορέα pART27 με το γονιδιακό ένθεμα *hopX1* που πραγματοποιήθηκε με τα ένζυμα XhoI και XbaI σε πηκτή αγαρόζης 0.8% (w/v) (100V).

Εισαγωγή του πλασμιδίου **pART27-*CaMV35s-hopX1-Tocs*** σε κύτταρα εργαστηριακού στελέχους ***Agrobacterium tumefaciens* C58C1**:

Ικανοποιητικός αριθμός αποικιών αναπτύχθηκαν σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό μέσο (LB agar) με την προσθήκη των αντιβιοτικών επιλογής ριφαμπικίνη (**Rif**ampicin) και σπεκτινομυκίνη (**Spec**tinomycin) τελικής συγκέντρωσης 80 και 40 μg/ml αντίστοιχα.

Σάρωση μετασχηματισμένων αποικιών με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Colony PCR).

Τα προϊόντα της **PCR αποικιών** ηλεκτροφορήθηκαν σε **πηκτή αγαρόζης 0.8% (w/v)** όπου εμφανίστηκε μια ζώνη στο ύψος περίπου των **1159 bp** του μοριακού μάρτυρα **λ *PstI*** η οποία και αντιστοιχεί στο γονίδιο ***hopX1*** (**1155 bp**) (Εικόνα 13).



Εικόνα 13. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 0.8% (w/v) του προϊόντος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης που πραγματοποιήθηκε για τον έλεγχο της εισαγωγής του γονιδίου *hopX1* στο *A. tumefaciens* C58C1.

3) Κατασκευή γενετικά τροποποιημένων φυτών *N. benthamiana (35S::hopX1)*

Πίνακας 17. Γενετικά τροποποιημένα φυτά *Nicotiana benthamiana (35S::hopX1)* Το γενιάς.

α/α	Μεταφορά σε άσπρο γλαστράκι	Μεταφορά σε μαύρη γλάστρα	Παρατηρήσεις	Ημερομηνίες συλλογής σπόρου απο Το φυτά				
1α	3/3/2009	28/4/2009		19/5/09	25/5/09	9/6/09	17/6/09	10/7/09
1β	3/3/2009	28/4/2009		19/5/09	25/5/09	9/6/09	17/6/09	10/7/09
1γ i	15/6/2009	22/6/2009		2/11/09		30/11/09		
1γ ii	15/6/2009	22/6/2009		10/9/09				
1γ iii	15/6/2009	22/6/2009		10/9/09				
1γ iv	15/6/2009	22/6/2009		10/9/09				
2α	3/3/2009	28/4/2009	**Νέκρωση φύλλων**	19/5/09	25/5/09	9/6/09		
2 β	16/3/2009	28/4/2009		9/6/09		10/7/09		
2γ i	28/4/2009	26/5/2009		23/7/09		10/9/09		
2γ ii	28/4/2009	26/5/2009		23/7/09		10/9/09		
2δ	3/3/2009	28/4/2009		19/5/09	25/5/09	9/6/09	17/6/09	10/7/09
3α i	2/6/2009		Νέκρωση ιστού					
3α ii	2/6/2009	18/6/2009		10/9/09				
3α iii	28/4/2009	26/5/2009		23/7/09		10/9/09		
3α iv	2/6/2009		Νέκρωση ιστού					
3β i	2/6/2009		Νέκρωση ιστού					
3β ii	2/6/2009		Νέκρωση ιστού					
3β iii	7/7/2009	20/7/2009		10/9/09				
3β iv	21/7/2009			2/11/09		30/11/09		

α/α	Μεταφορά σε άσπρο γλαστράκι	Μεταφορά σε μαύρη γλάστρα	Παρατηρήσεις	Ημερομηνίες συλλογής σπόρου απο Το φυτά			
3β v	20/7/2009			2/11/09		30/11/09	
3β vi	21/7/2009			2/11/09		30/11/09	
3β vii			Νέκρωση ιστού				
3β viii	2/6/2009		Νέκρωση ιστού				
3β ix	2/6/2009		Νέκρωση ιστού				
3β x	2/6/2009		Νέκρωση ιστού				
3β xi	2/6/2009		Νέκρωση ιστού				
3β xii	20/7/2009		Νέκρωση ιστού				
3β xiii	20/7/2009			2/11/09			
3β xiv	20/7/2009		Νέκρωση ιστού				
3β xv	20/7/2009			2/11/09		30/11/09	
3β xvi	20/7/2009			2/11/09		30/11/09	
4α	28/4/2009	26/5/2009		23/7/09		10/9/09	
4β i	21/7/2009		Νέκρωση ιστού				
4β ii			Νέκρωση ιστού				
4β iii			Νέκρωση ιστού				
4β iv			Νέκρωση ιστού				
4β v	2/6/2009	18/6/2009		10/9/09	5/10/09	2/11/09	30/11/09
4γ i	21/7/2009			2/11/09		30/11/09	
4γ ii	2/7/2009	20/7/2009		10/9/09	5/10/09	2/11/09	30/11/09
4γ iii	28/4/2009	26/5/2009		23/7/09		10/9/09	
4γ iv	28/4/2009	26/5/2009		10/9/09			
4γ v	2/7/2009	20/7/2009		2/11/09		30/11/09	
4γ vi				10/9/09	2/11/09	30/11/09	

α/α	Μεταφορά σε άσπρο γλαστράκι	Μεταφορά σε μαύρη γλάστρα	Παρατηρήσεις	Ημερομηνίες συλλογής σπόρου απο Το φυτά			
4γ vii	21/7/2009			2/11/09		30/11/09	
4γ viii	21/7/2009			2/11/09		30/11/09	
5α	21/7/2009		Νέκρωση ιστού				
6α	16/3/2009	28/4/2009	**Καρούλιασμα φύλλων**	9/6/09		10/7/09	
6β i	2/6/2009		Νέκρωση ιστού				
6β ii				2/11/09			
6β iii	21/7/2009		Νέκρωση ιστού				
6β iv	2/6/2009		Νέκρωση ιστού				
7α i	3/3/2009	28/4/2009		25/5/09	9/6/09	17/6/09	23/7/09
7α ii	3/3/2009	28/4/2009		25/5/09	9/6/09	17/6/09	10/7/09
7α iii	3/3/2009	28/4/2009		19/5/09	9/6/09	17/6/09	10/7/09
7β i	25/2/2009	28/4/2009		25/5/09	1/6/09	9/6/09	10/7/09
7β ii	25/2/2009	28/4/2009		25/5/09	1/6/09	9/6/09	10/7/09
8α	10/3/2009		Νέκρωση ιστού				
8β i	20/3/2009	28/4/2009		25/5/09	1/6/09	9/6/09	10/7/09
8β ii	20/3/2009	28/4/2009		10/7/09			
8β iii	20/3/2009	28/4/2009		25/5/09	1/6/09	9/6/09	10/7/09
8β iv	28/4/2009	26/5/2009		23/7/09		10/9/09	
8β v			Νέκρωση ιστού				
8β vi	2/6/2009		Νέκρωση ιστού				
8β vii			Νέκρωση ιστού				
8β viii	28/4/2009	26/5/2009	Νέκρωση ιστού				
8β ix	2/6/2009		Νέκρωση ιστού				
8β x	2/6/2009		Νέκρωση ιστού				

α/α	Μεταφορά σε άσπρο γλαστράκι	Μεταφορά σε μαύρη γλάστρα	Παρατηρήσεις	Ημερομηνίες συλλογής σπόρου απο Το φυτά	
8β xi	2/6/2009			10/9/09	
8β xii	20/7/2009			2/11/09	30/11/09
8β xiii	20/7/2009		Νέκρωση ιστού		
8β xiv	20/7/2009		Νέκρωση ιστού		
8β xv	20/7/2009			2/11/09	30/11/09
8β xvi	21/7/2009			2/11/09	30/11/09
8β xvii	21/7/2009		Νέκρωση ιστού		
8β xviii	21/7/2009		Νέκρωση ιστού		
8β xix	21/7/2009		Νέκρωση ιστού		
8β xx	21/7/2009			2/11/09	30/11/09
9α			Νέκρωση ιστού		
9β			Νέκρωση ιστού		
10α i			Νέκρωση ιστού		
10α ii			Νέκρωση ιστού		
10α iii			Νέκρωση ιστού		
10α iv			Νέκρωση ιστού		
10α v	21/7/2009		Νέκρωση ιστού		
10β i			Νέκρωση ιστού		
10β ii			Νέκρωση ιστού		
10β iii			Νέκρωση ιστού		
11α i	21/7/2009		Νέκρωση ιστού		
11α ii	20/7/2009		Νέκρωση ιστού		
11α iii			Νέκρωση ιστού		
11α iv			Νέκρωση ιστού		

α/α	Μεταφορά σε άσπρο γλαστράκι	Μεταφορά σε μαύρη γλάστρα	Παρατηρήσεις	Ημερομηνίες συλλογής σπόρου απο Το φυτά		
11α v	21/7/2009			30/11/09		
11α vi			Νέκρωση ιστού			
11α vii	20/7/2009		Νέκρωση ιστού			
11β i	20/7/2009		Νέκρωση ιστού			
11β ii			Νέκρωση ιστού			
11β iii	20/7/2009		Νέκρωση ιστού			
11β iv	2/7/2009	20/7/2009		2/11/09	30/11/09	
11β v	2/7/2009	20/7/2009		10/9/09	2/11/09	30/11/09
11β vi	20/7/2009		Νέκρωση ιστού			
11β vii	20/7/2009		Νέκρωση ιστού			
11β viii	20/7/2009		Νέκρωση ιστού			
11γ i	12/3/2009	28/4/2009	**Μικροφυλλία/νανισμός**	10/7/09		
11γ ii			Νέκρωση ιστού			
11γ iii			Νέκρωση ιστού			
11γ iv			Νέκρωση ιστού			
11γ v	28/4/2009		Νέκρωση ιστού			
11γ vi			Νέκρωση ιστού			
11γ vii			Νέκρωση ιστού			
11δ i	21/7/2009		Νέκρωση ιστού			
11δ ii	28/4/2009		Νέκρωση ιστού			
11δ iii			Νέκρωση ιστού			
11δ iv	28/4/2009	26/5/2009	**Μικροφυλλία/νανισμός**	30/11/09	5/3/10	3/10
11δ v	2/6/2009	16/6/2009	**Μικροφυλλία/νανισμός**	10/9/09	30/11/09	5/3/10
11δ vi			Νέκρωση ιστού			

α/α	Μεταφορά σε άσπρο γλαστράκι	Μεταφορά σε μαύρη γλάστρα	Παρατηρήσεις	Ημερομηνίες συλλογής σπόρου απο Το φυτά	
11δ vii			Νέκρωση ιστού		
11δ viii	2/6/2009		Νέκρωση ιστού		
11δ ix	2/6/2009		Νέκρωση ιστού		
11δ x	21/7/2009		Νέκρωση ιστού		
12α i	2/6/2009		Νέκρωση ιστού		
12α ii	2/6/2009	18/6/2009		10/9/09	
12β	28/5/2009			10/9/09	
12γ i	2/6/2009		Νέκρωση ιστού		
12γ ii	2/6/2009	18/6/2009		10/9/09	
12γ iii	20/7/2009			2/11/09	30/11/09
12γ iv	2/6/2009		Νέκρωση ιστού		
12γ v			Νέκρωση ιστού		
12γ vi	2/6/2009	18/6/2009		10/9/09	
12γ vii	2/6/2009		Νέκρωση ιστού		
12γ viii	2/6/2009		Νέκρωση ιστού		
12γ ix	2/6/2009	16/6/2009		10/9/09	
12γ x	2/6/2009	18/6/2009		10/9/09	
12γ xi	2/6/2009		Νέκρωση ιστού		
12γ xii	2/6/2009			30/11/09	
12γ xiii	20/7/2009			2/11/09	30/11/09
12γ xiv	20/7/2009		Νέκρωση ιστού	2/11/09	
12γ xv	20/7/2009		Νέκρωση ιστού	2/11/09	
12γ xvi	20/7/2009		Νέκρωση ιστού		
12γ xvii	20/7/2009			2/11/09	30/11/09

α/α	Μεταφορά σε άσπρο γλαστράκι	Μεταφορά σε μαύρη γλάστρα	Παρατηρήσεις	Ημερομηνίες συλλογής σπόρου απο Το φυτά			
12γ xviii	20/7/2009		Νέκρωση ιστού				
12γ xix	20/7/2009		Νέκρωση ιστού				
13α			Νέκρωση ιστού				
13β i	28/5/2009		Νέκρωση ιστού				
13β ii			Νέκρωση ιστού				
13γ			Νέκρωση ιστού				
14	20/3/2009	28/4/2009		10/7/09			
15α i	20/7/2009			2/11/09		30/11/09	
15α ii	20/7/2009		Νέκρωση ιστού				
15α iii	20/7/2009		Νέκρωση ιστού				
15α iv	20/7/2009		Νέκρωση ιστού				
15β	21/7/2009			2/11/09		30/11/09	
15γ			Νέκρωση ιστού				
15δ i	20/7/2009		Νέκρωση ιστού				
15δ ii	20/7/2009		Νέκρωση ιστού				
16α	2/7/2009	20/7/2009		10/9/09	5/10/09	2/11/09	30/11/09
16β i	21/7/2009		Νέκρωση ιστού				
16β ii	21/7/2009		Νέκρωση ιστού				
16β iii	21/7/2009			2/11/09		30/11/09	
16γ	21/7/2009		Νέκρωση ιστού				
16δ	21/7/2009		Νέκρωση ιστού				

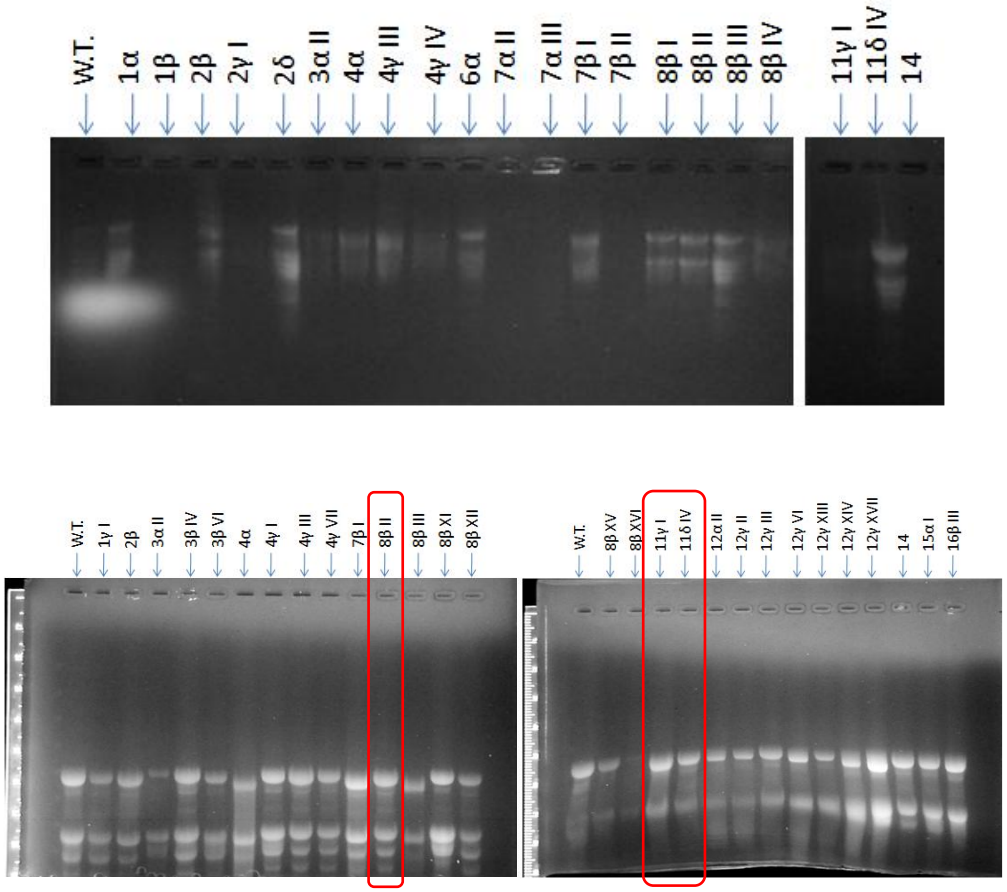
4) Μοριακός χαρακτηρισμός των φυτών T_0 *N. benthamiana* (*35S::hopX1*)

4.1) Ανάλυση κατά Northern

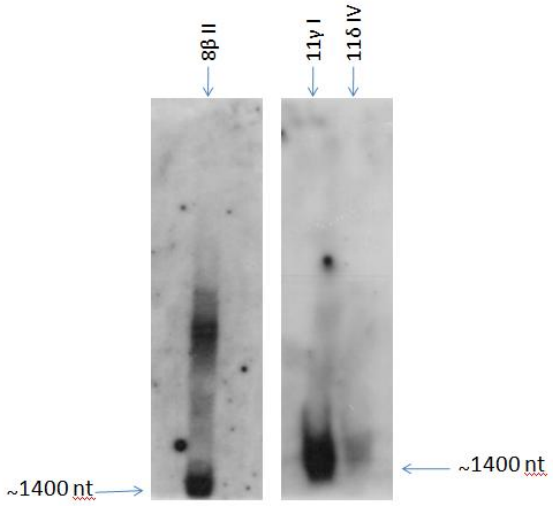
Απο τυχαία επιλεγμένες σειρές της T_0 γενιάς των γενετικά τροποποιημένων φυτών ***N. benthamiana (35S::hopX1)*** απομονώθηκαν **20 μg** ολικού RNA τα οποία στη συνέχεια διαχωρίστηκαν σε τρία διαφορετικά αποδιατακτικά πηκτώματα. Οι σειρές που φορτώθηκαν ανα πήκτωμα παρουσιάζονται στον Πίνακα 10, ενώ το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης στην Εικόνα 12. Τέλος, οι μεμβράνες υβριδοποιήθηκαν με ραδιοσημασμένο ιχνηλάτη την αλληλουχία του γονιδίου ***hopX1*** (Εικόνα 13) .

Πίνακας 10. Σειρές T_0 φυτών *N. benthamiana (35S::hopX1)* που ηλεκτροφορήθηκαν ανα πήκτωμα αγαρόζης.

Πήκτωμα αγαρόζης / Θέση Φόρτωσης	1ο	2ο	3ο
1	W.T.	W.T.	W.T.
2	1α	1γ I	8β XV
3	1β	2β	8β XVI
4	2β	3α II	11γ I
5	2γ I	3β IV	11δ IV
6	2δ	3β VI	12α II
7	3α II	4α	12γ II
8	4α	4γ I	12γ III
9	4γ III	4γ III	12γ VI
10	4γ IV	4γ VII	12γ XIII
11	6α	7β I	12γ XIV
12	7α II	8β II	12γ XVII
13	7α III	8β III	14
14	7β I	8β XI	15α I
15	7β II	8β XII	16β III
16	8β I		
17	8β II		
18	8β III		
19	8β IV		
20	11γ I		
21	11δ IV		
22	14		



Εικόνα 12. Ηλεκτροφόρηση 20 μg ολικού RNA τυχαίου φυτικού ιστού (T_0) σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5% (w/v) με φορμαλδεΰδη (85 V).



Εικόνα 13 . Υβριδοποίηση μεμβρανών Northern από τυχαίες σειρές T_0 γενετικά τροποποιημένων φυτών *N. benthamiana* (*35S::hopX1*).

Από τις σειρές **T_0** γενιάς γενετικά τροποποιημένων φυτών ***N. benthamiana (35S::hopX1)*** που ελέγχθησαν με ανάλυση κατά **Northern** θετικό σήμα έδωσαν οι: **8β II, 11γ I** και **11δ IV** (επισημαίνονται με κόκκινο πλαίσιο στην Εικόνα 12). Το ασθενέστερο σήμα της σειράς **11δ IV** υποδηλώνει χαμηλότερο επίπεδο μεταγραφικής έκφρασης.

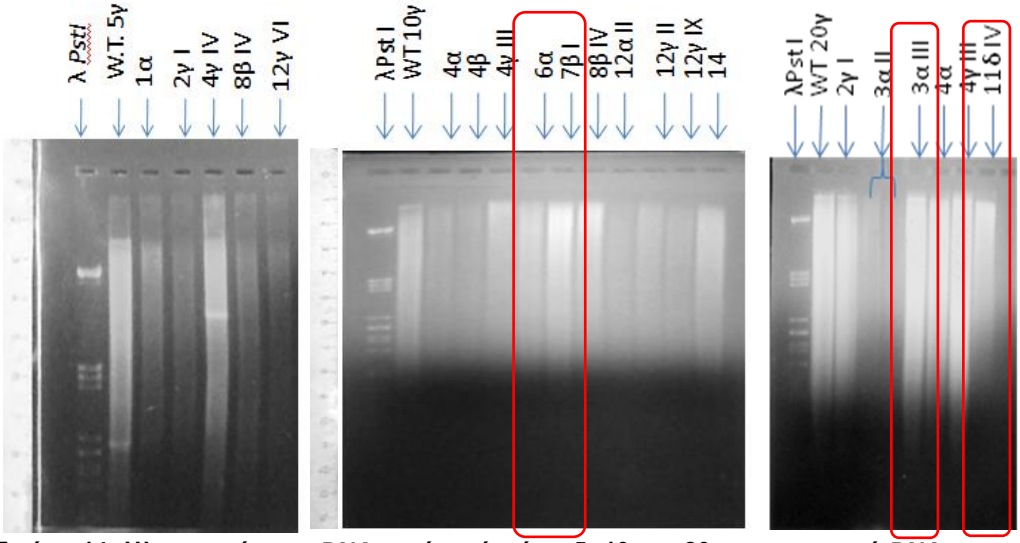
4.2) Ανάλυση κατά Southern

Απο τυχαία επιλεγμένες σειρές γενετικά τροποποιημένων φυτών **T_0** γενιάς ***N. benthamiana*** **(*35S::hopX1*)** απομονώθηκαν 5, 10 και 20 μg ολικού DNA όπως φαίνεται στον Πίνακα 11.

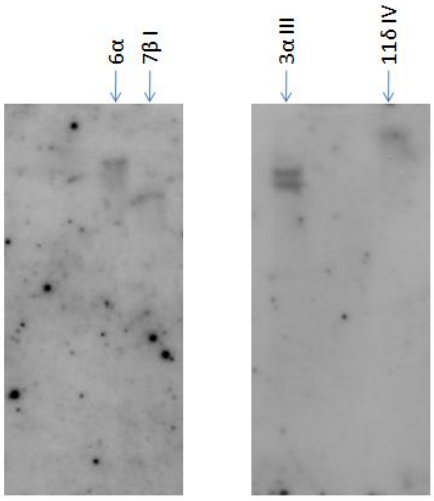
Πίνακας 11. Σειρές T_0 φυτών *N. benthamiana (35S::hopX1)* από τις οποίες απομονώθηκε DNA.

Ποσότητα DNA που χρησιμοποιήθηκε	Φυτά **T_0** γενιάς ***N. benthamiana*** **(*35S::hopX1*)**
5 μg	1α
	2γ I
	4γ IV
	8β IV
	12γ VI
10 μg	4α
	4β
	4γ III
	6α
	7β I
	8β IV
	12α II
	12γ II
	12γ IX
	14
20 μg	2γ I
	3α II
	3α III
	4α
	4γ III
	11δ IV

Όλη η ποσότητα του εκχυλίσματος του DNA από τις παραπάνω σειρές υποβλήθηκε σε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο **EcoRI** (βλ. Υλικά και Μέθοδοι 7.2) και ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8 % (w/v) (Εικόνα 14). Το κάθε πήκτωμα υποβλήθηκε σε αποτύπωση κατά Southern και στη συνέχεια η κάθε μεμβράνη υβριδοποιήθηκε με ραδιενεργό ιχνηλάτη την αλληλουχία του γονιδίου ***hopX1*** (Εικόνα 15).



Εικόνα 14. Ηλεκτροφόρηση DNA μετά από πέψη 5, 10 και 20 μg γενωμικού DNA των γενετικά τροποποιημένων σειρών *N. benthamiana* (*35S::hopX1*) με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI και λ-DNA μετά από πέψη με το ένζυμο PstI ως δείκτη μοριακού βάρους.



Εικόνα 15. Υβριδοποίηση μεμβρανών Southern από σειρές T_0 γενετικά τροποποιημένων φυτών *N. benthamiana (35S::hopX1).*

Από τις παραπάνω σειρές **T_0** γενιάς γενετικά τροποποιημένων φυτών ***N. benthamiana (35S::hopX1)*** που ελέγχθησαν με ανάλυση κατά **Southern** θετικό σήμα έδωσαν οι: **3α III, 6α, 7β I** και **11δ IV**. Οι ζώνες εμφανίζονται σε διαφορετικό ύψος γεγονός που φανερώνει οτι οι ενθέσεις έχουν πραγματοποιηθεί σε διαφορετικούς γενετικούς τόπους. Στην περίπτωση του **3α III** φαίνονται δύο διακριτές ζώνες, πράγμα που υποδηλώνει την παρουσία δύο κασετών σε δύο διαφορετικούς γενετικούς τόπους.

5) Βλάστηση T_0 σπόρων παρουσία καναμυκίνης για τη λήψη γενετικά τροποποιημένων φυτών *N. benthamiana* (*35S::hopX1*) T_1 γενιάς.

Σπόροι απο τυχαία επιλεγμένα γενετικά τροποποιημένα T_0 φυτά ***N. benthamiana (35S::hopX1)*** τοποθετήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα MS με αντιβιοτικό επιλογής (καναμυκίνη 200 μg/ml). Σπόροι από μια σειρά T_0 δεν έδωσαν φυτάρια ανθεκτικά στην καναμυκίνη και η σειρά αυτή δεν χρησιμοποιήθηκε σε επόμενα πειράματα. Οι πλειονότητα των άλλων σειρών έδειξαν αναλογίες ανθεκτικών/ευαίσθητων στην καναμυκίνη σπόρων από 54 – 84%. Οι αναλογίες αυτές δεν είναι εύκολα ερμηνεύσιμες στις περισσότερες περιπτώσεις λόγω του σχετικά μικρού συνολικού αριθμού σπόρων. Στην περίπτωση της σειράς **3α III**, η οποία έδωσε δύο διακριτές ζώνες υβριδοποίησης στην ανάλυση κατά Southern (Εικόνα 15) συνιστούν ένδειξη ότι τα δυο ενθέματα της κασέτας μετασχηματισμού βρίσκονται σε στενά συνδεδεμένους γενετικούς τόπους.

Πίνακας 12. T_0 σειρές φυτών *N. benthamiana* (*35S::hopX1*) απο τις οποίες χρησιμοποιήθηκε σπόρος για τη λήψη φυτών T1 γενιάς.

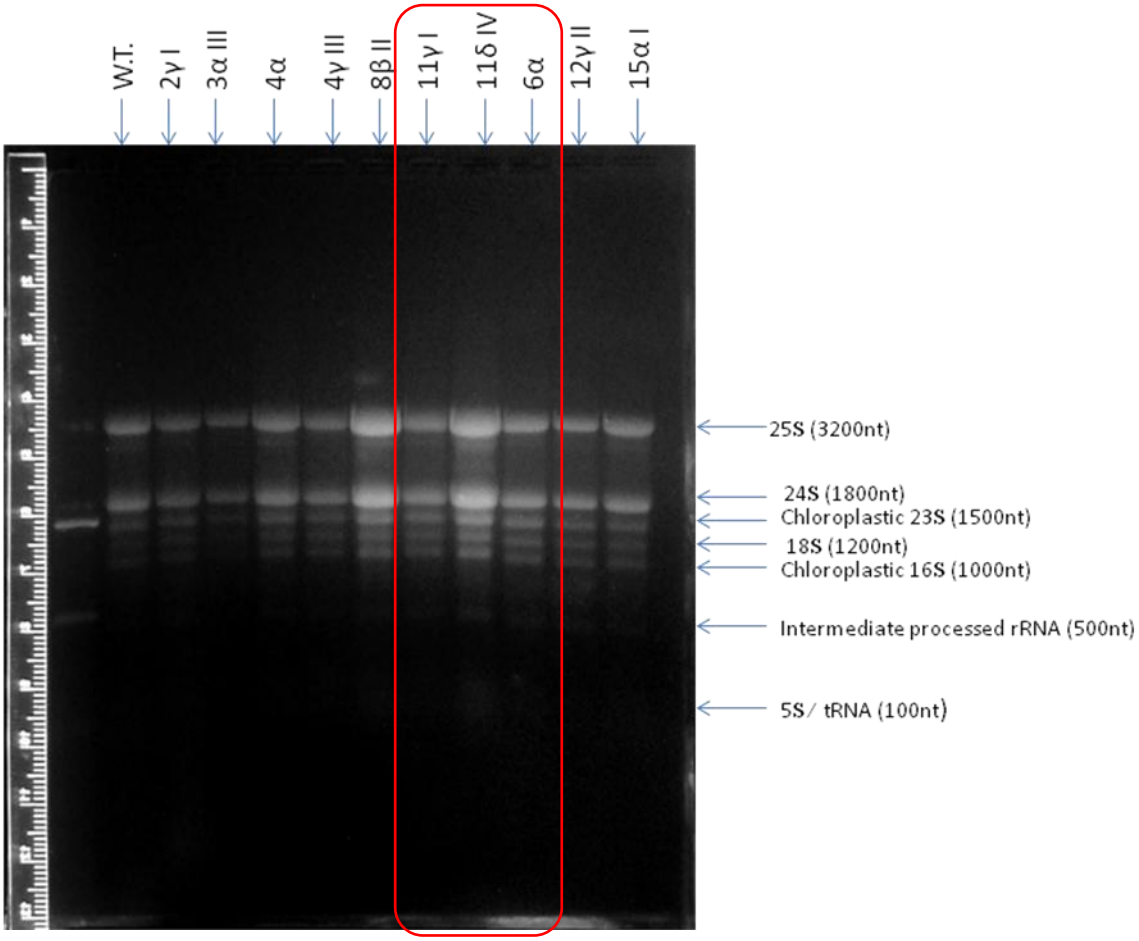
α/α	Αριθμός σπόρων που φύτρωσαν και βλάστησαν	Αριθμός σπόρων που δεν φύτρωσαν	Αριθμός σπόρων που φύτρωσαν και δε βλάστησαν	Ποσοστό % σπόρων που φύτρωσαν και βλάστησαν
W.T. (θετικός μάρτυρας)	35	1	3	(92%)
W.T.[3] (αρνητικός μάρτυρας)	0	0	35	(0%)
2γ I	32	1	5	(84%)
3α III	23	2	3	(82%)
4α	17	3	10	(57%)
4γ III	23	0	5	(82%)
6α	6	2	3	(54%)
8β II	10	2	4	(62%)
11γ I	5	0	3	(62.5%)
11δ IV	10	0	2	(83%)
12γ II	26	4	5	(74%)
14	0	0	7	(0%)
15α I	22	5	10	(59%)

[3] Σπόροι αγρίου τύπου σε θρεπτικό μέσο (MS) χωρίς καναμυκίνη.

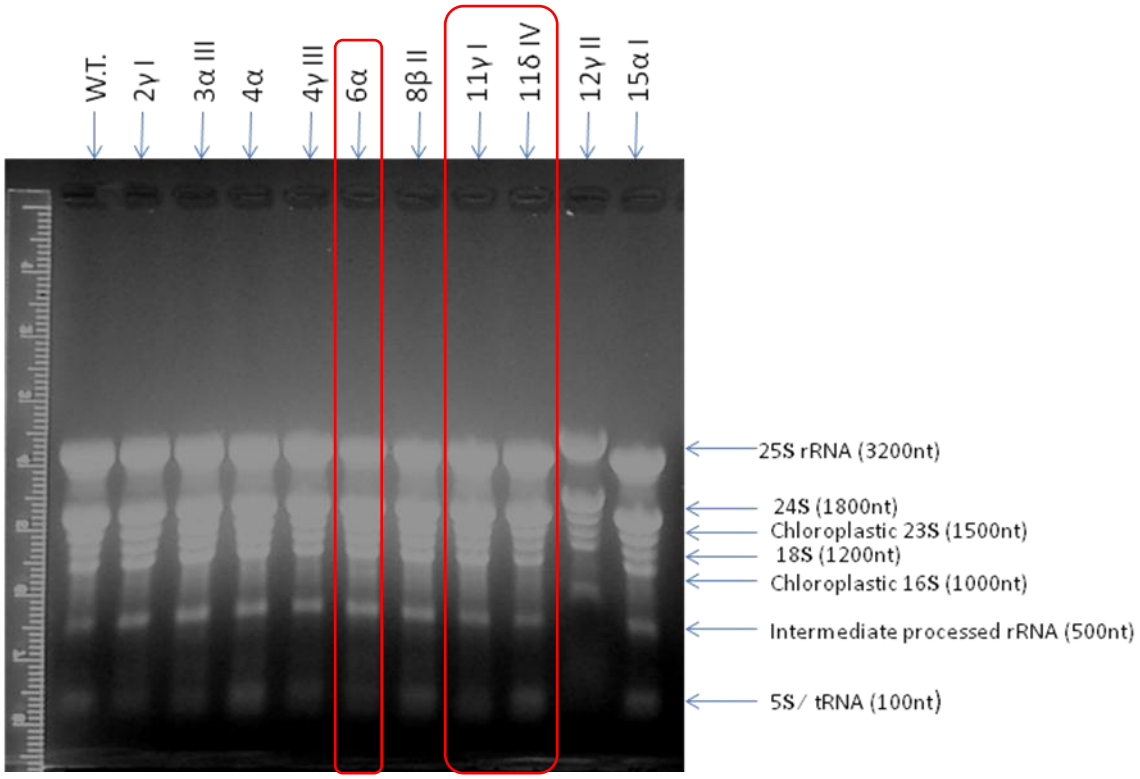
6) Μοριακές αναλύσεις στα T1 φυτά *N. benthamiana 35S::hopX1*

6.1) Ανάλυση κατά Northern

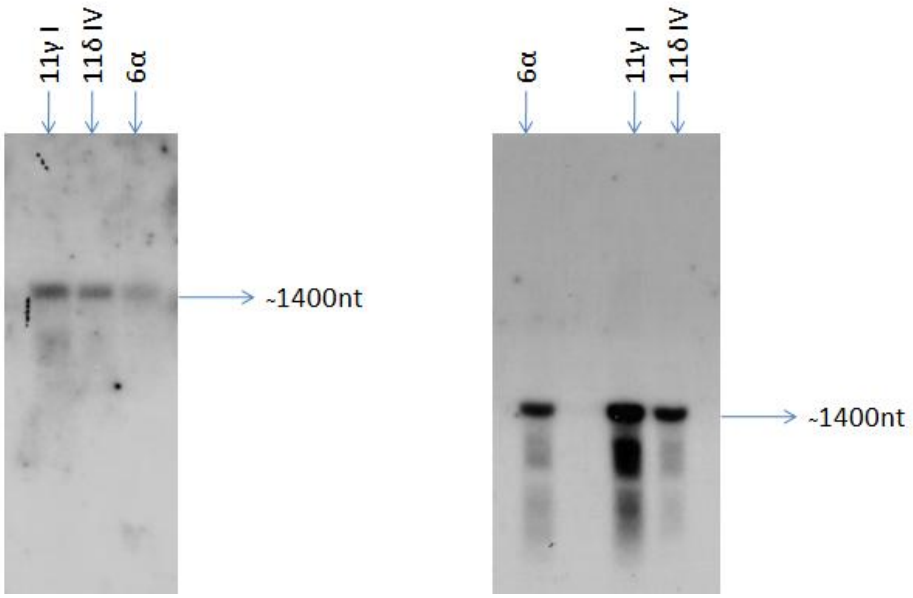
Τα εκχυλίσματα RNA (20μg) των **T1** φυτών ***N. benthamiana (35S::hopX1)*** **2γ I, 3α III, 4α, 4γ III, 6α, 8β II, 11γ I, 11δ IV, 12γ II** και **15α I** υποβλήθηκαν σε δύο αναλύσεις κατά Northern (αρχική και επαναληπτική). Όπως και στην περίπτωση των T_0 φυτών οι μεμβράνες υβριδοποιήθηκαν με ραδιενεργό ιχνηλάτη το γονίδιο ***hopX1***.



Εικόνα 16. Ηλεκτροφόρηση 20 μg ολικού RNA T1 φυτικού ιστού *N. benthamiana* (*35S::hopX1*) σε πήκτωμα αγαρόζης 1.2% (w/v) με φορμαλδεΰδη (85 V).



Εικόνα 17. Ηλεκτροφόρηση 30 μg ολικού RNA από τυχαία επιλεγμένα φύλλα T_1 φυτών σε πήκτωμα αγαρόζης 1.2% (w/v) με φορμαλδεΰδη (85 V).

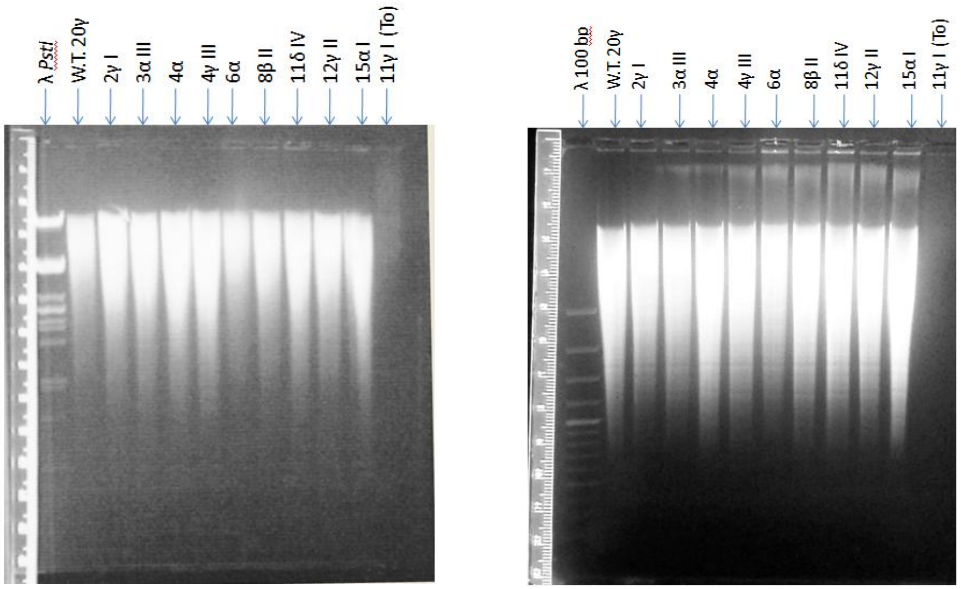


Εικόνα 18. Υβριδοποίηση μεμβρανών Northern από σειρές T1 γενετικά τροποποιημένων φυτών *N. benthamiana (35S::hopX1).*

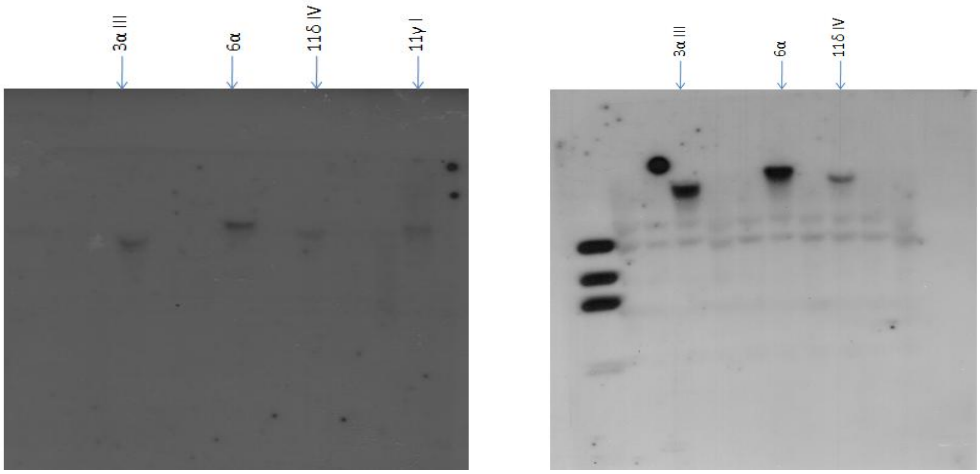
Τόσο στην αρχική όσο και στην επαναληπτική ανάλυση κατά Northern, θετικό σήμα στο ύψος περίπου των 1400 nt έδωσαν οι T1 σειρές **6α**, **11γ I** και **11δ IV**. Η ένταση του σήματος και στις δύο περιπτώσεις εμφανίζεται κατά φθίνουσα σειρά **11γI>11δIV>6α**. Πιθανώς η διαβάθμιση της έντασης να οφείλεται στα διαφορετικά σημεία ένθεσης του διαγονιδίου (position effect).

6.2) Ανάλυση κατά Southern

Από τυχαία επιλεγμένο φυτικό ιστό των **T1** φυτών ***N. benthamiana* (35S*::hopX1*) 2γ I, 3α III, 4α, 4γ III, 6α, 8β II, 11γ I, 11δ IV, 12γ II** και **15α I** πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA. Εξ' αυτών 20 μg ολικού DNA υποβλήθηκαν σε δύο αναλύσεις κατά Northern (αρχική και επαναληπτική). Και σε αυτή την περίπτωση οι μεμβράνες υβριδοποιήθηκαν με ραδιενεργό ιχνηλάτη το γονίδιο ***hopX1***.



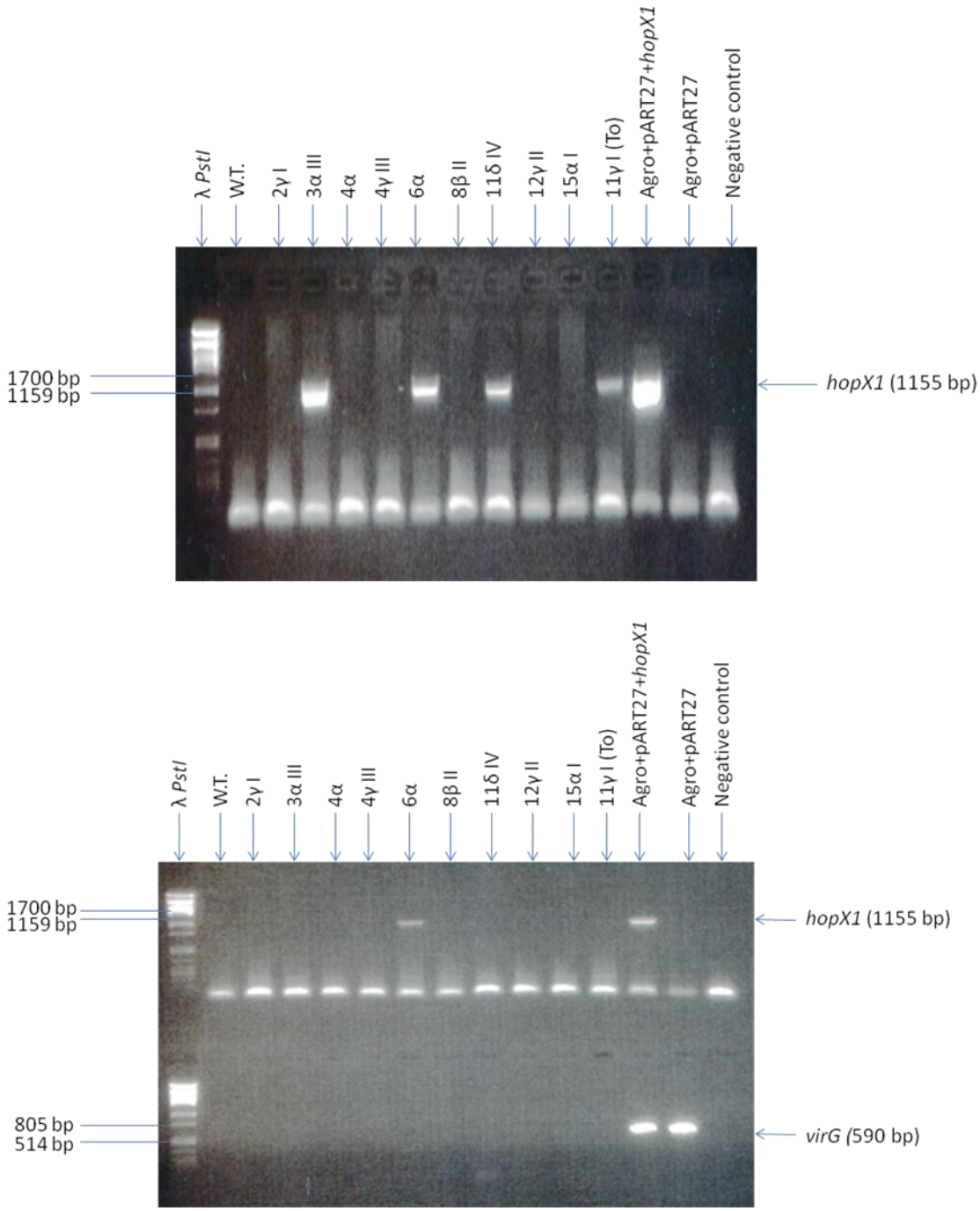
Εικόνα 19. Ηλεκτροφόρηση 20μg DNA τυχαία επιλεγμένου φυτικού ιστού (T1) σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8% (w/v) (85V). Για τη σειρά 11γ I χρησιμοποιήθηκε DNA από T_0 φυτό.



Εικόνα 20. Υβριδοποίηση μεμβρανών Southern από σειρές T1 γενετικά τροποποιημένων φυτών *N. benthamiana (35S::hopX1).* Για τη σειρά 11γ I χρησιμοποιήθηκε DNA από T_0 φυτό.

Θετικό σήμα κατά Southern έδωσαν οι T1 σειρές **3α III**, **6α**, **11δ IV** και η T_0 σειρά **11γ I**. Και σε αυτήν την περίπτωση οι ζώνες εμφανίζονται σε διαφορετικό ύψος για κάθε δείγμα, γεγονός που υποδηλώνει οτι οι ενθέσεις έχουν πραγματοποιηθεί σε διαφορετικούς γενετικούς τόπους. Η διαφορά στην ένταση του σήματος της ζώνης που αντιστοιχεί στην T1 σειρά **11δ IV** συνιστά ένδειξη ετερόζυγης κατάστασης ως προς το ***hopX1***.

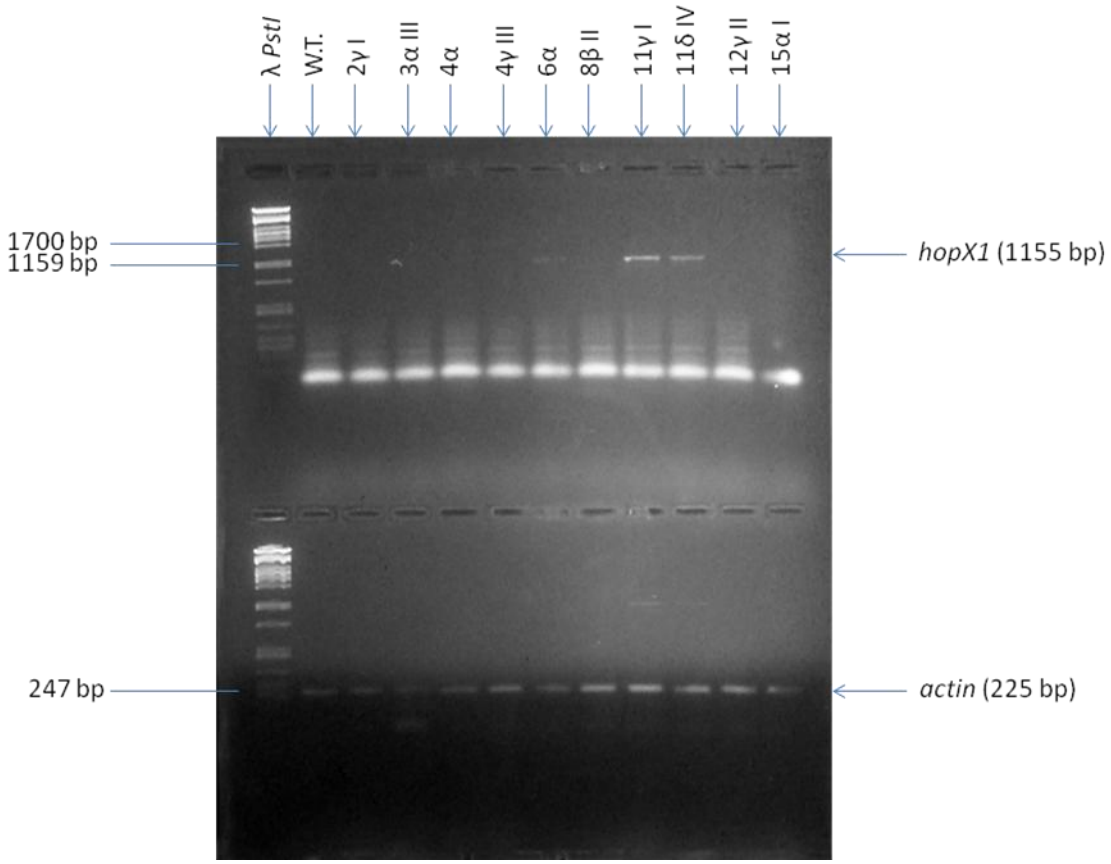
6.3) Χαρακτηρισμός των γενετικών σειρών *N. benthamiana 35S::hopX1* με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)



Εικόνα 21. Ηλεκτροφόρηση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης των T1 φυτών *N. benthamiana* 35S::*hopX1*.

Οι **T1** σειρές **3α III**, **6α, 11δ IV** και η **T_0** σειρά **11γ I** έδωσαν θετικό σήμα με την εμφάνιση μίας ζώνης στο ύψος περίπου των 1159 bp. Η εν λόγω ζώνη αντιστοιχεί στο γονίδιο ***hopX1*** (**1155 bp**) καθώς ως εκκινητές για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές του αντίστοιχου γονιδίου. Οι ίδιες σειρές ελέγθηκαν και για την παρουσία/απουσία αγροβακτηρίου χρησιμοποιώντας εκκινητές για το γονίδιο ***virG***, χρησιμοποιώντας ως θετικούς μάρτυρες αποικίες στελεχών του αγροβακτηρίου που περιείχαν το Ti πλασμίδιο.

6.4) Αλυσιδωτή αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφάσης (RT-PCR)



Εικόνα 22. Ηλεκτροφόρηση της αλυσιδωτής αντίδρασης της αντίστροφης μεταγραφάσης των T1 φυτών *N. benthamiana 35S::hopX1*.

Όσον αφορά την αντίδραση της RT-PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές του γονιδίου ***hopX1*** εμφανίστηκαν 3 ζώνες στο ύψος περίπου των 1159 bp στις **T1** σειρές **6α**, **11γ I** και **11δ IV**. Οι ζώνες αυτές αντιστοιχούν στο γονίδιο ***hopX1*** (**1155 bp**) και η έντασή τους προσομοιάζει εκείνη του σήματος Northern (**11γI>11δIV>6α)**.

Η αντίστοιχη αντίδραση με εκκινητές του γονιδίου της ακτίνης έδωσε μία ζώνη στο ύψος περίπου των **247 bp** σε όλα τα φυτά (αγρίου τύπου και διαγονιδιακά) η οποία και αντιστοιχεί στο αναμενόμενο σήμα του γονιδίου της ακτίνης (**225 bp**). Η σχετική ένταση πολυμερισμού της ακτίνης υποδηλώνει οτι η έλλειψη σήματος *hopX1* σε ορισμένες σειρές δεν οφείλεται σε πειραματικό σφάλμα. Η αδυναμία ενίσχυση του εν λόγω γονιδίου ***hopX1***, ενδεχομένως οφείλεται είτε στην ελλειπή ενίσχυση της αλληλουχίας στόχου, είτε στην απουσία της μιας ή και των δύο περιοχών πρόσδεσης των εκκινητών του.

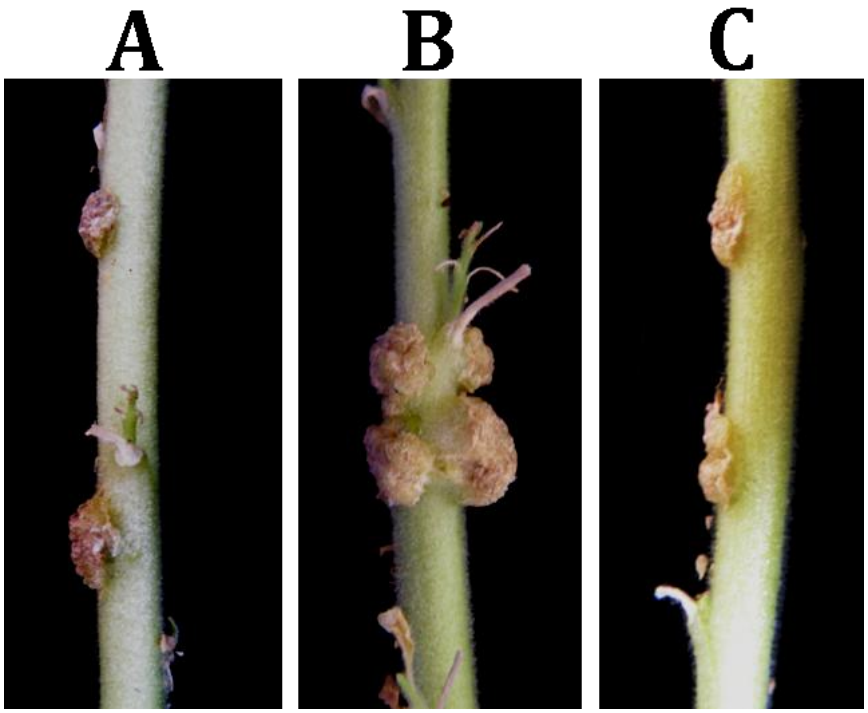
7) Μολύνσεις Τ1 φυτών *N. benthamiana* 35S::*hopX1* με παθογόνα στελέχη του *A. tumefaciens*

Οι μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν σε υγιείς μίσχους φυτών ***N. benthamiana*** (αγρίου τύπου) και ***N. benthamiana* 35S::*hopX1*** με τον τρόπο που περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι (κεφ. 10). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Πίνακα 13 που ακολουθεί, ενώ ενδεικτικές φωτογραφίες των μίσχων που χρησιμοποιήθηκαν στην Εικόνα 23.

Πίνακας 13. Αποτελέσματα μόλυνσης των Τ1 φυτών *N. benthamiana* 35S::*hopX1* με στελέχη του *A. tumefaciens*.

Τ1 φυτό	***Agrobacterium tumefaciens***	
	Στέλεχος A208	Στέλεχος A281
W.T. I	-	+
W.T. II	-	+
2γ I	-	+
4α	-	+
4α	-	+
4γ III	-	+
6α	-	+
8β II	-	+
12γ II	-	+
12γ II	-	+
15α I	-	-

Εικόνα 23. Μολύνσεις μίσχων με *A. tumefaciens*. Δεξιά σε κάθε περίπτωση εμφανίζεται το αποτέλεσμα της μόλυνσης με το στέλεχος A208, ενώ αριστερά με το A281.



Εικόνα 24. Παρεμπόδιση της αγροβακτηριακής ογκογένεσης σε σειρές γενετικά τροποποιημένων φυτών *N. benthamiana* (*35S::hopX1*) που υπερεκφράζουν το γονίδιο *hopX1*. Α. Γενετικά τροποποιημένη σειρά 8β ΙΙ, Β. Μάρτυρας: αγρίου τύπου φυτό *N. benthamiana*, C. Γενετικά τροποποιημένη σειρά 11δ ΙV.

Πίνακας 14. Συγκεντρωτικός πίνακας θετικών φυτών T_0 και T1 φυτών *N. benthamiana* (*35S::hopX1*) στις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν.

	Θετικά κατά Northern blot	**Θετικά κατά Southern blot**	**Θετικά κατά PCR (*hopX1* primers)**	**Θετικά κατά PCR (*virG* primers)**	**Θετικά κατά RT-PCR (*hopX1* primers)**
T_0 φυτά *N. benthamiana* (*35S::hopX1*)	8β II	3α III (2 ενθέματα)	11γ I		
	11γ I	6α (1 ένθεμα)			
	11δ IV	7β I (1 ένθεμα)			
		11γ I (1 ένθεμα)			
		11δ IV (1 ένθεμα)			
T1 φυτά *N. benthamiana* (*35S::hopX1*)	6α	3α III (2 ενθέματα)	3α III		6α
	11γ I	6α (1 ένθεμα)	6α		11γ I
	11δ IV	11δ IV (1 ένθεμα)	11δ IV		11δ IV

ΣΥΜΠΕΡΑΜΑΤΑ-ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μεταφορά και έκφραση του γονιδίου ***hopX1*** σε φυτά ***N. benthamiana*** και ο προκαταρκτικός μοριακός χαρακτηρισμός τους με απώτερο σκοπό την περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου του ως **ενισχυτή της σίγησης** σε πρόσφορο μοντέλο παθοσύστημα. Η εμπλοκή του ***hopX1*** στη σίγηση διαπιστώθηκε σε προηγούμενες εργασίες της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου μας μέσω παροδικής έκφρασης του γονιδίου σε φύλλα με τη μέθοδο του αγροεμποτισμού. Η μέθοδος αυτή κατά κανόνα οδηγεί σε υπερσυσσώρευση της πρωτεΐνης στα φυτικά κύτταρα, πράγμα που ενδεχομένως οδηγεί σε καταστάσεις μη αντιπροσωπευτικές της βακτηριακής μόλυνσης όσον αφορά στις ποσοτικές και άλλες παραμέτρους που επηρεάζουν την εκδήλωση των συμπτωμάτων. Η χρήση διαγενετικών γονοτύπων στην περαιτέρω διερεύνηση του μηχανισμού/σταδίου εμπλοκής του ***hopX1*** στη σίγηση θεωρήθηκε επιθυμητή επειδή δίνει τη δυνατότητα να σχεδιαστούν ή να επιλεγούν γενετικές σειρές με διαφοροποιημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου, αξιοποιώντας τόσο το συστατικό υποκινητή ***CaMV35S*** όσο και έναν χημικά επαγόμενο υποκινητή (dexamethasone-inducible) στο σχεδιασμό των γονιδιακών κασετών καθώς και το φαινόμενο του "**position effect**".

Στην παρούσα περίπτωση επιδιώχθηκε παράλληλα γενετικός μετασχηματισμός με αγροβακτήρια που έφεραν δυαδικό πλασμιδιακό φορέα τόσο με κασέτα **συστατικής έκφρασης** του ***hopX1*** και κασέτα επιλογής σε καναμυκίνη όσο και φορέα με κασέτα **επαγόμενης έκφρασης** (**Dex-inducible**) του ***hopX1*** (που μας παρείχε το εργαστήριο του **Δρ. Jeffrey Dangl**). Στην πρώτη περίπτωση κατέστη δυνατή η απομόνωση ανθεκτικών στην καναμυκίνη φυταρίων σε ικανό αριθμό. Αντίθετα, στη δεύτερη περίπτωση, και παρά τις πολλές προσπάθειες που καταβλήθηκαν, δεν κατέστη δυνατή η απόκτηση μετασχηματισμένων φυτών ανθεκτικών στην υγρομυκίνη (το αντιβιοτικό επιλογής στην προκειμένη περίπτωση) για άγνωστους λόγους, παρ΄ ότι χρησιμοποιήθηκε συμβατικό πρωτόκολλο επιλογής (ίδιες συνθήκες συγκαλλιέργειας αγροβακτηρίου-φυλικών δισκίων, μεταφορά των δισκίων φύλλου σε φρέσκο υπόστρωμα επιλογής κάθε $2^{η}$ μέρα και διαβάθμιση των συγκεντρώσεων του αντιβιοτικού σε διάφορα επίπεδα που αναφέρει η σχετική βιβλιογραφία).

'Ενας αριθμός **T_0** και **T1** φυτών ανθεκτικών στην καναμυκίνη χαρακτηρίστηκαν μοριακά ως προς την παρουσία/απουσία του γονιδίου *hopX1*, τη μεταγραφική έκφραση του και το γενετικό τόπο του ενθέματος. Έξι συνολικά σειρές (**3α III, 6α, 7β I, 8β II, 11γ I,** και **11δ IV**) **T_0** ή/και **T1** γενιάς καταδείχθηκαν θετικές ως προς την παρουσία ή/και έκφραση του ***hopX1*** με μία ή περισσότερες από τις μεθόδους που εφαρμόστηκαν (υβριδοποίηση κατά **Southern**, **Northern**, **RT-PCR** σε εκχυλίσματα ολικού RNA και συμβατική **PCR** σε εκχυλίσματα γενωμικού DNA). Με εξαίρεση τη σειρά 3α III η οποία παρουσίασε δυο διακριτές σε μέγεθος ζώνες υβριδισμού κατά Southern με το ραδιενεργά σημασμένο ιχνηλάτη (*hopX1* DNA) σε εκχύλισμα γενωμικού DNA που είχε υποβληθεί σε πέψη με το ένζυμο EcoRI, οι άλλες σειρές έδειξαν μοναδιαίες ζώνες υβριδισμού διαφορετικού μοριακού μεγέθους η κάθε μια, υποδηλώνοντας διαφορετικούς τόπους ένθεσης της γονιδιακής κασέτας.

Ορισμένες από τις γενετικές σειρές εμφάνισαν **φαινοτυπικές ιδιαιτερότητες** σε σύγκριση με τα φυσικού τύπου φυτά στην T_0 ή/και την T1 γενιά. Χαρακτηριστικό παραδείγματα φυτών της T_0 γενιάς αποτελούν οι εξής σειρές: α) **11γ I, 11δ IV, 11δ V**

(**μικροφυλλία/νανισμό**) και β) **6α** (**έντονο καρούλιασμα των φύλλων**). Τα εν λόγω χαρακτηριστικά των φυτών αυτών διατηρήθηκαν και στην T1 γενιά. Επί πλέον, τα φυτά της T1 γενιάς έδειξαν, στις περισσότερες περιπτώσεις σειρών, βραχεία ανάπτυξη και βραχέα μεσογονάτια διαστήματα όσο και μεγάλα φύλλα σε συνάρτηση με το συνολικό τους μέγεθος. Οι μορφολογικές αυτές αλλαγές δεν μπορούν με σαφήνεια να αποδοθούν στο γενετικό ένθεμα, στο επίπεδο έκφρασής του ή σε επιγενετικές αλλαγές των φυταρίων στο στάδιο της ιστοκαλλιέργειας.

Πρόσφατες δημοσιεύσεις ανέδειξαν το **ρόλο του μηχανισμού σίγησης στη βακτηριακή ογκογένεση**. Οι Dunoyer και συνεργάτες (Dunoyer et al., 2006) έδειξαν ότι *siRNAs* που αντιστοιχούν στο μεταφερόμενο *T-DNA* των ογκογόνων αγροβακτηρίων συσσωρεύονται κατά τη μόλυνση φυτών *Arabidopsis* με *A. tumefaciens* και οι ρίζες και τα στελέχη φυτών με σιγητική ανεπάρκεια (miRNA-deficient mutants *dcl1* and *hen1)* είναι υπερβολικά ευπαθή στο αγροβακτήριο. Οι Pruss et al. (2008) έδειξαν, σε πειράματα αγροεμποτισμού, ότι ογκογόνο στέλεχος αγροβακτηρίου προκαλεί την επαγωγή του μικρο-RNA miR393 στη ζώνη εμποτισμού, ενώ αφοπλισμένο στέλεχος (στερούμενο ογκογόνου ικανότητας) δεν προκαλεί αυτό το φαινόμενο. Τα επίπεδα των μικρο-RNA miR393 και miR167 ρυθμίζουν κατασταλτικά το μονοπάτι της ορμονικής σηματοδότησης (που ελέγχει την ανάπτυξη των καρκινικών όγκων) μέσω σίγησης. Με βάση τα παραπάνω θεωρήθηκε πιθανό η ενδογενής έκφραση του γονιδίου *hopX1* στις τρανσγενικές σειρές της *N. benthamiana* να ενισχύει την σιγητική κατάσταση που εγκαθίσταται κατά την αγροβακτηριακή μόλυνση, με αποτέλεσμα να επηρεάζει την ευπάθεια τους στην αγροβακτηριακή ογκογένεση. Οι πειραματικές μολύνσεις που έγιναν σε θάλαμο ανάπτυξης με σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας και φωτοπεριόδου, δεν κατέστη δυνατό να εξαχθούν συμπεράσματα πιθανότατα λόγω τόσο της χαμηλής σχετικής υγρασίας και της σταδιακής απώλειας φυτών αγρίου τύπου κατά τη διάρκεια του πειράματος (Εικόνα 23). Αντιθέτως, μολύνσεις που πραγματοποιήθηκαν στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο (**Δρ. Ν. Σκανδάλης**) σε δύο απο τις T1 γενετικά τροποποιημένες σειρές *N. benthamiana* (*35S:hopX1*) που εμφάνισαν θετικό σήμα στην υβριδοποίηση Northern (στην T_0 γενιά) υπο κατάλληλες συνθήκες υγρασίας έδωσαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα (μειωμένη ευπάθεια στην αγροβακτηριακή ογκογένεση) (Εικόνα 24).

Η εμπλοκή μιας σειράς άλλων τελεστών Τυπου ΙΙΙ από φυτοπαθογόνες Ψευδομονάδες στο μηχανισμό της RNA-διαμεσολαβούμενης σίγησης περιγράφηκε σχετικά πρόσφατα στη βιβλιογραφία και ο μηχανισμός/οί δράσης αυτών των πρωτεϊνών δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί σε μοριακό επίπεδο. Στις μέχρι τώρα έρευνες περιγράφεται η δράση ορισμένων τελεστών Τύπου ΙΙΙ ως καταστολείς της σίγησης μέσω επαγωγής μιας σειράς μικρών RNAs που εμπλέκονται στην RNA-διαμεσολαβούμενη σίγηση. Μεταξύ αυτών συγκαταλέγονται τα miRNAs miR393, miR167 και miR160 τα οποία ρυθμίζουν αρνητικά το μονοπάτι μεταγωγής σήματος της αυξίνης (auxin signaling) είτε στοχεύοντας τα γονίδια των υποδοχέων της αυξίνης είτε των παραγόντων απόκρισης στην αυξίνη, και επάγονται μετά τη μόλυνση στο παθοσύστημα *P. syringae – A. thaliana* (Navarro et al., 2006). Οι Katiyar-Agarwal, et. al. (2006) ανακάλυψαν ένα ενδογενές siRNA, (*nat-siRNAATGB2*), το οποίο φαίνεται να επάγεται ειδικά στην ασύμβατη αλληλεπίδραση που καθορίζεται από τα γονίδια *RPS2-avrRpt2* στο παθοσύστημα *A. thaliana - P. syringae (avrRpt2)* και πρότειναν ότι το εν λόγω siRNA συμβάλλει στην επαγωγή ανθεκτικότητας σε επίπεδο φυλετικής εξειδίκευσης του παθογόνου (*Race specific resistance*) μέσω της καταστολής του γονιδίου PPRL, υποθετικού αρνητικού ρυθμιστή της επαγωγής του RPS2. Η ίδια ομάδα (Katiyar-Agarwal et al. 2007) διερεύνησαν

το ρόλο μιας νέας κατηγορίας σιγητικών RNAs (*long siRNAs-lsiRNAs*) που έχουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά με τα *γνωστά siRNAs* και συσσωρεύονται σε υψηλά επίπεδα κατά τις «ασύμβατες» αλληλεπιδράσεις παθογόνου-ξενιστή στο ίδιο παθοσύστημα. Τέλος, ο Navarro και οι συνεργάτες του (Navarro, et. al. 2008), δημοσίευσαν πρόσφατα την ικανότητα ορισμένων πρωτεϊνών-τελεστών Τύπου ΙΙΙ του βακτηρίου *P. syringae* είτε να καταστέλλουν τη μεταγραφική ενεργοποίηση κάποιων miRNAs που επάγονται από ορισμένα PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns βλ. προηγούμενο κεφάλαιο) είτε να καταστέλλουν τη βιογένεση, σταθερότητα και δράση των παραπάνω miRNAs.

Σε πρόσφατη δημοσίευση των Ellendorff, et. al. (2009) έδειξαν οτι η RNA-εξαρτώμενη γονιδιακή σίγηση διαδραματίζει ενεργό ρόλο στην άμυνα των φυτών έναντι σε πολυκύτταρα μικροβιακά παθογόνα όπως το παθογόνο *Verticillium dahliae*,που προσβάλλει τα αγγεία του ριζικού συστήματος, υποδηλώνοντας οτι το *V. dahliae* χρειάζεται ενεργό το μηχανισμό του *PTGS* για να μπορέσει να μολύνει επιτυχώς τον ξενιστή του. Αντίθετα, στην ίδια μελέτη δεν παρατηρήθηκε εμπλοκή του σιγητικού μηχανισμού στην παθογένεια μιας σειράς άλλων φυτοπαθογόνων μυκήτων όπως οι *Alternaria brassicicola*, *Botrytis cinerea*, και *Plectosphaerella cucumerina*, αλλά ούτε και στο παθογόνο των αδρομυκώσεων *Fusarium oxysporum*. Στην παρούσα μελέτη, δεν έγιναν πειραματικές μολύνσεις με άλλα παθογόνα. Διαπιστώθηκε όμως οτι οι γενετικά τροποποιημένες σειρές *N. benthamiana* (*35S:hopX1*) ήταν ευπαθείς στο ωϊδιο υπό συνθήκες θερμοκηπίου. Εν όψει της παραπάνω δημοσίευσης, αποκτά ιδαίτερο ενδιαφέρον η διερεύνηση ευρύτερου φάσματος παθογόνων μυκήτων που προσβάλλουν τη *N. benthamiana*.

Συμπερασματικά οι παραπάνω μελέτες εδραιώνουν την άποψη οτι όπως και στην περίπτωση των φυτοπαθογόνων ιών, τόσο φυτοπαθογόνα βακτήρια όσο και μύκητες διαθέτουν την ικανότητα να καταστέλλουν την RNA σίγηση για να προκαλέσουν ασθένειες.

Οι γενετικά τροποποιημένες σειρές που μελετήθηκαν εμφάνισαν ισχυρή ένδειξη ανεκτικότητας/ανθεκτικότητας σε τυχαία προσβολή απο το έντομο *Trialeurodes vaporariorum* (είδος αλευρώδη). Για το λόγο αυτό ελέγχθηκε η συμπεριφορά και ενός άλλου είδους αλευρώδη (*Bemisia tabaci*) στις διαθέσιμες γενετικά τροποιημένες σειρές. Και σε αυτή την περίπτωση παρατηρήθηκε αδυναμία του εντόμου να αποικίσει τα φυτά. Οι παρατηρήσεις αυτές είναι άκρως ενδιαφέρουσες και συνιστούν ισχυρό κίνητρο για την περαιτέρω διερεύνηση του φαινομένου και του αιτιατού μηχανισμού για τους λόγους που αναφέρονται στη συνέχεια.

Ο αλευρώδης (*Bemisia tabaci* Gennadius) κατατάσσεται στις μέρες μας ανάμεσα στους οικονομικά πιο επιβλαβείς εντομολογικούς εχθρούς των αγροτικών καλλιεργειών, έχοντας την ικανότητα να προσβάλλει περισσότερα απο 500 φυτικά είδη (Brown 1994; 2007). Οι διάφοροι βιότυποι του αλευρώδη μεταφέρουν έναν μεγάλο αριθμό ιών του γένος *Begomovirus* (Geminiviridae) και έναν περιορισμένο αριθμό ιών που ανήκουν στα γένη *Carlavirus*, *Ipomovirus* (Potyviridae), and *Crinivirus* (Closteroviridae). Ο τριαλευρώδης (*Trialeurodes vaporariorum*) μεταφέρει μικρό αριθμό ιών του γένους *Crinivirus*, ένα παγκοσμίως αναδυόμενο γένος, πολλά είδη του οποίου έχουν ταυτοποιηθεί τα τελευταία χρόνια. Το έντομο και οι φυτοπαθογόνοι ιοί που μεταφέρει δεν περιορίζονται πλέον μόνο στα φυσικά ενδιαιτήματά τους ή απο φυσικά γεωγραφικά εμπόδια. Η χημική καταπολέμηση του αλευρώδη έχει αποδειχτεί δύσκολη εξαιτίας της ικανότητας του να αναπτύσσει ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα. Για το λόγο αυτό, νέα είδη φυτοπαθογόνων ιών θα συνεχίζουν να αναδύονται, προκαλώντας καταστροφικές ασθένειες στις καλλιέργεις που προσβάλλουν

(Brown 2007). Γενετικές τροποποιήσεις φυτών για ανθεκτικότητα στους ιούς που μεταφέρονται μέσω του αλευρώδη έχουν βασιστεί με έκφραση ιικών πρωτεινών ή RNAs (RNAi) και της ενδοσυμβιωτικής τσαπερόνης GroEL. Εν΄ όψει της οικονομικής σημασίας των προσβολών του εντόμου και του ρόλου του ως φορέα επιβλάβών ιών σε γεωργικές καλλιέργειες οι γενετικά τροποποιημένες σειρές που κατασκευάστηκαν στην παρούσα διατριβή αποτελούν πρόσφορο υλικό για την αξιολόγηση τους ως προς την ανθεκτικότητα σε ιούς που είναι παθογόνοι στην *N. benthamiana* και μεταφέρονται από τον αλευρώδη.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abramovitch, R.B. and G.B., Martin, (2005), AvrPtoB: a bacterial type III effector that both elicits and suppresses programmed cell death associated with plant immunity, *FEMS Microbiol. Lett.*, **245**: 1–8.

Akeda, Y., Galán, J.E., (2005), Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion, *Nature*, **437**: 911–915.

Alfano, J.R. and A., Collmer (1996), Bacterial pathogens in plants: life up against the wall, *Plant Cell*, **8**: 1683–1698.

Alfano, J.R. and A., Collmer, (2004), Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense, *Annu. Rev. Phytopathol.*, **42**: 385–414.

Arlat, M., Gijsegem, F.V., Huet, J.C., Pernollet, J.C., Boucher, C.A., (1994), PopA1, a protein which induces a hypersensitivity-like response on specific Petunia genotypes, is secreted via the Hrp pathway of *Pseudomonas solanacearum*, *EMBO J.*, **13**: 543–553.

Assem, S. K., Hussein, E.H.A., Hussein, H.A., Basry, M., (2009) Genetic transformation of the *Nicotiana* Protein Kinase (NPK1) gene confers osmotic tolerance in Egyptian maize, *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, **3(2)**: 828-835.

Bari, R. and J.D.G. Jones, (2009), Role of plant hormones in plant defence responses, *Plant Mol. Biol.*, **69**: 473–488, DOI 10.1007/s11103-008-9435-0.

Blume, B., Nurnberger, T., Nass, N., Scheel, D., (2000), Receptor- mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. Plant *Cell*, **12**: 1425–1440.

Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A., Bonas, U., (2009), Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors, *Science* **326**: 1509.

Bocsanczy, A.M., Nissinen, R.M., Oh, C.S., Beer, S.V., (2008), HrpN of *Erwinia amylovora* functions in the translocation of DspA/E into plant cells. *Mol. Plant Pathol.*, **9**: 425–434.

Brown, J. K., (1994), A global position paper: The status of *Bemisia tabaci* Genn. as a pest and vector in world agroecosystems, *FAO (Food Agric. Organ U.N.) Plant Prot. Bull.,* **42:** 3-32.

Brown, J. K., (2007), The *Bemisia tabaci* complex: genetic and phenotypic variability drives begomovirus spread and virus diversification, *Plant Disease APSNet Feature Article* December–January 2006–07.

Buell, CR., Joardar, V., Lindeberg, M., et al., (2003), The complete genome sequence of the Arabidopsis and tomato pathogen Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100(18):** 10181-6.

Büttner, D. and S.Y., He, (2009), Type III Protein Secretion in Plant Pathogenic Bacteria, *Plant Physiology*, **150**: 1656–1664.

Büttner, D. and U., Bonas (2006), Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion, *Curr. Opin. Microbiol.*, **9**: 193–200.

Chakravortty, D., Rohde, M., Jäger, L., Deiwick, J., Hensel, M., (2005), Formation of a novel surface strucuture encoded by Salmonella pathogenicity island 2, *EMBO J.*, **24**: 2043–2052.

Charity, JC., Pak, K., Delwiche. CF., Hutcheson, SW., (2003), Novel exchangeable effector loci associated with the Pseudomonas syringae hrp pathogenicity island: evidence for

integron-like assembly from transposed gene cassettes, *Mol. Plant Microbe Interact.*, **16(6)**: 495-507.

Chase, N.W., Knapp, S., Cox, A.V., Clarkson, J.J., Butsko, Y., Joseph, J., Savolainen, V., Parokonny, A.S., (2003), Molecular systematics, GISH and the origion of hybrid taxa in *Nicotiana* (Solanaceae), *Annals of Botany* **92**: 107-127.

Chen, Y., Smith, M. R., Thirumalai, K., Zychlinsky, A., (1996), A bacterial invasion induces macrophage apoptosis by binding directly to ICE, *EMBO J.*, **15:** 3853–3860.

Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T., Felix, G., (2006), The Arabidopsis receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception, *Plant Cell*, **18**: 465–476.

Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B., Staskawicz, B.J., (2006), Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response, *Cell*, **124**: 803–814.

Christoff, M., (1928), Cytological studies in the genus *Nicotiana*, *Genetics*,**13**: 233-267.

Collazo, C. M., and J. E., Galán, (1997),. The invasion-associated type III system of *Salmonella typhimurium* directs the translocation of Sip proteins into the host cell, *Mol. Microbiol.*, **24:** 747–756.

Cornelis, G.R., Agrain, C., Sorg, I., (2006), Length control of extended protein structures in bacteria and bacteriophages, *Curr. Opin. Microbiol.*, **9**: 201–206.

Dangl, J. L., Dietrich, R. A., Richberg, M. H, (1996), Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions, *Plant Cell*, **8:** 1793–1807.

Daniell, S.J., Takhashi, N., Wilson, R., Friedberg, D., Rosenshine, I., Booy, F.P., Shaw, R.K., Knutton, S., Frankel, G., Aizawa, S.I., (2001), The filamentous type III secretion translocon of enteropathogenic *Escherichia coli*, *Cell Microbiol*., **3**: 865–871.

Deng, W., Liou, S.R., Plunkett, G.,3rd, Mayhew,G.F., Rose,D.J., Burland,V., Kodoyianni,V., Schwartz,D.C. and Blattner,F.R., (2003), Comparative genomics of *Salmonella enterica* serovar Typhi strains Ty2 and CT18, *J. Bacteriol*., **185:** 2330–2337.

Dow, M., Newman, M.A., von Roepenack, E., (2000), The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides, *Annu. Rev. Phytopathol.*, **38**: 241–261.

Dunoyer, P., Himber, C., Voinnet, O., (2006), Induction, suppression and requirement of RNA silencing pathways in virulent *Agrobacterium tumefaciens* infections, *Nat. Genet,* **38(2)**: 258–63.

Ellendorff, U., Fradin, E.F., de Jonge, R., Thomma B.P.H., (2009), RNA silencing is required for *Arabidopsis* defence against *Verticillium* wilt disease, *Journal of Experimental Botany*, **60(2):** 591–602.

Espinosa, A. and Alfano, J.R. (2004) Disabling surveillance: bacterial type III secretion system effectors that suppress innate immunity, *Cell Microbiol.*, **6**: 1027–1040.

Felix, G., Duran, J.D., Volko, S., Boller, T., (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin, *Plant J.*, **18**: 265–276.

Fu, Z.Q., Guo, M., Alfano, J.R., (2006), *Pseudomonas syringae* HrpJ is a type III secreted protein that is required for plant pathogenesis, injection of effectors, and secretion of the HrpZ1 harpin, *J. Bacteriol.*, **188**: 6060–6069.

Galán J.E. and H., Wolf-Watz (2006), Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines, *Nature*, **444**: 567–573.

Gerstel, D.U., (1960), Segregation in new allopolyploids of *Nicitiana*. I. Comparison of 6 x (*N. tabacum* x *N. tomentosiformis*) and 6 x (*N. tabucum* x *N. otophora*), *Genetics*, **45**: 1723-1734.

Gerstel, D.U., (1966), Evolutionary problems in some polyploid crop plants, *Hereditas Suppl.*, **2**: 481-604.

Goodspeed, T.H., (1954), The genus *Nicotiana*, Chronica Botanica, Wallham, Massachusetts.

Guttman, D.S., Gropp, S.J., Morgan, R.L., Wang, P.W., (2006), Diversifying selection drives the evolution of the type III secretion system pilus of *Pseudomonas syringae*, *Mol. Biol. Evol.*, **23**: 2342–2354.

Hann, D.R. and J. P., Rathjen, (2007), Early events in the pathogenicity of Pseudomonas syringae on *Nicotiana benthamiana*, The Plant Journal, **49**: 607–618.

Hauck, P., Thilmony, R., He, S.Y., (2003), A Pseudomonas syringae type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible Arabidopsis plants, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**: 8577–8582.

He, S.Y., Huang, H., Collmer, A., (1993), Pseudomonas syringae pv. syringae harpin Pss: a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants, *Cell*, **73**: 1255–1266.

He, S.Y., Nomura, K., Whittam, T.S., (2004), Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens, *Biochim Biophys Acta*, **1694**: 181–206.

Hellwig, S., Drossard, J., Twyman, R.M., Fischer, R., (2004), Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nature Biotechnology*, **22(11):** 1415-1422.

Hodgkinson, J.L., Horsley, A., Stabat, D., Simon, M., Johnson, S., et al., (2009), Three-dimensional reconstruction of the *Shigella* T3SS transmembrane regions reveals 12-fold symmetry and novel features throughout, *Nat. Struct. Molec. Biol,* **16**: 477-85.

Hoiczyk, E. and G., Blobel, (2001), Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needles punctures eukaryotic cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**: 4669–4674.

Hotson, A., and M. B. Mudgett, (2004), Cysteine proteases in phytopathogenic bacteria: identification of plant targets and activation of innate immunity, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **7**: 384–390.

Janjusevic, R., Abramovitch, R.B., Martin, G.B., Stebbins, C.E., (2006), A bacterial inhibitor of host programmed cell death defenses is an E3 ubiquitin ligase, *Science*, **311**: 222–226.

Japan Tobacco In. (1994), The genus *Nicotiana* Illustrated, Tokyo, Japan Tobacco Inc.

Joardar, V., Lindeberg, M., et al., (2005), Whole-genome sequence analysis of Pseudomonas syringae pv. phaseolicola 1448A reveals divergence among pathovars in genes involved in virulence and transposition, *J. Bacteriol.,* **187(18)**: 6488-98.

Jones, J.D. and J.L., Dangl, (2006), The plant immune system, *Nature* **444**: 323–329.

Kamoun, S., van West, P., Vleeshouwers, V., deGroot, K.E., Govers, F., (1998), Resistance of Nicotiana benthamiana to Phytophthora infestans is mediated by the recognition of the elicitor protein INF1, *Plant Cell*, **10**: 1413–1425.

Kang, L., Tang, X., Mysore, K.S., (2004), *Pseudomonas* Type III effector AvrPto suppresses the programmed cell death induced by two nonhost pathogens in *Nicotiana benthamiana* and tomato, *Mol. Plant-Microbe Interact*., **17**: 1328–1336.

Katiyar-Agarwal, S., Morgan, R., Dahlbeck, D., Borsani, O., Villegas, A., et al., (2006), A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity, *PNAs*, **103 (47):** 18002-18007.

Katiyar-Agarwal, S., Gao, S., Vivian-Smith, A., et al., (2007), A novel class of bacteria-induced small RNAs in *Arabidopsis,Genes Dev.,* **21**: 3123-3134.

Khan, M. Q and R. K. J., Narayan, (2007), Phylogenetic diversity and relationships among species of genus *Nicotiana* using RAPDs analysis, *African Journal of Biotechnology*, **6(2)**: 148-162.

Kim, M.G., da Cunha, L., McFall, A.J., Belkhadir, Y., DebRoy, S., Dangl, J.L., Mackey, D., (2005), Two Pseudomonas syringae type III effectors inhibit RIN4-regulated basal defense in *Arabidopsis*, *Cell*, **121**: 749–759.

Klement, Z., (1982), Hypersensitivity, *In* Phytopathogenic prokaryotes vol. **2**, M. S. Mount and G. H. Lacy (eds.), Academic Press, Inc., NewYork, N.Y, pp. 149–177.

Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galán, J.E., Aizawa, S.I., (1998), Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system, *Science*, **280**: 602–605.

Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T., Felix, G., (2004), The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants. *Plant Cell*, **16**: 3496–3507.

Kvitko, B.H., Ramos, A.R., Morello, J.E., Oh, H.S., Collmer, A., (2007), Identification of harpins in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, which are functionally similar to HrpK1 in promoting translocation of type III secretion system effectors. *J. Bacteriol.*, **189**: 8059–8072.

Li, C.M., Brown, I., Mansfield, J., Stevens, C., Boureau, T., Romantschuk, M., Taira, S., (2002), The Hrp pilus of Pseudomonas syringae elongates from its tip and acts as a conduit for translocation of the effector protein HrpZ, *EMBO J*., **21**: 1909–1915.

Li, X.Y., Lin, H.Q., Zhang, W.G., Zou, Y., Zhang, J., Tang, X.Y., Zhou, J.M., (2005), Flagellin induces innate immunity in nonhost interactions that is suppressed by *Pseudomonas syringae* effectors, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **102**: 12990–12995.

Lim, Y.K., Matyáç, R., Lichtenstein, C.P., Leitch, A.R., (2000), Molecular cytogenetic analyses and phylogenetic studies in the *Nicotiana* section *Tomentosae*, *Chromosoma***, 109**: 245-258.

Lindgren, P. B., Peet, R. C., Panopoulos, N. J., (1986), Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. "*phaseolicola*" controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity on nonhost plants, *J. Bacteriol.*, **168:** 512–522.

Lorenz, C. and D., Büttner, (2009), Functional characterization of the type III secretion ATPase HrcN from the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*, *J. Bacteriol.*, **191**: 1414–1428.

Lorenz, C., Schulz, S., Wolsch, T., Rossier, O., Bonas, U., Büttner, D., (2008b), HpaC controls substrate specificity of the *Xanthomonas* type III secretion system, *PLoS Pathog*., **4**: e1000094.

Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Dangl, J.L., (2003), Arabidopsis RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance, *Cell*, **112**: 379–389.

Mansfield, J., Jenner, C., Hockenhull, R., Bennett, MA., Stewart, R., (1994), Characterization of avrPphE, a gene for cultivar-specific avirulence from Pseudomonas syringae pv. phaseolicola which is physically linked to hrpY, a new hrp gene identified in the halo-blight bacterium, *Mol. Plant Microbe Interact.,* **7(6)**: 726-39.

Martinez, C., Petrouccelli, S., Giulietti, A.M., Alvarez, M.A., (2005), Expression of the antibody 14D9 in *Nicotiana tabacum* hairy roots, *Electronic Journal of Biotechnology*, **8**(2): 170-176.

Medzhitov, R. and C.A. Janeway Jr, (1997), Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition, *Cell*, **91**: 295–298.

Narayan, R.K.J., (1987), Nuclear DNA changes, genome differentiation and evolution in *Nicotiana* (Solanaceae), *Plant Syst. Evol.*, **157**: 161-180.

Narayan, R.K.J., (1988), Evolutionary significance of DNA variation in Plants, *Evolutionary Trends in Plants,* **2**: 121-130.

Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O., Jones, JDG., (2006), A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling, *Science*, **312:** 436–439.

Navarro, L., Jay, F., Nomura, K.,Yang He, S., Voinnet, O., (2008), Suppression of the MicroRNA Pathway by Bacterial Effector Proteins, *Science,* **321**: 964-967.

Nicaise, V., Roux, M., Zipfel, C., (2009), Recent Advances in PAMP-Triggered Immunity against Bacteria: Pattern Recognition Receptors Watch over and Raise the Alarm, *Plant Physiol*., **150**: 1638-1647.

Nissinen, R.M., Ytterberg, A.J., Bogdanove, A.J., Van Wijk, K.J., Beer, S.V., (2007), Analyses of the secretomes of *Erwinia amylovora* and selected hrp mutants reveal novel type III secreted proteins and an effect of HrpJ on extracellular harpin levels, *Mol. Plant Pathol.*, **8**: 55–67.

Nurnberger, T., Brunner, F., Kemmerling, B., Piater, L., (2004), Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences, *Immunol. Rev.* **198**: 249–266.

Paul, K., Erhardt, M., Hirano, T., Blair, D., Hughes, K.T., (2008), Energy source of flagellar type III secretion, *Nature*, **451**: 489–492.

Pozidis, C., Chalkiadaki, A., Gomez-Serrano, A., Stahlberg, H., Brown, I., Tampakaki, A.P., Lustig, A., Sianidis, G., Politou, A.S., Engel, A., et al (2003), Type III protein translocase: HrcN is a peripheral ATPase that is activated by oligomerization, *J. Biol. Chem.* **278**: 25816–25824.

Pruss, G.J., Nester, E.W., Vance, V., (2008), Infiltration with *Agrobacterium tumefaciens* induces host defense and development-dependent responses in the infiltrated zone, *Mol. Plant-Microbe Interact,* **21**:1528–38.

Ren, N. and M.P., Timko, (2001), AFLP analysis of genetic polymorphism and evolutionary relationships among cultivated and wild *Nicotiana* species, *Genome*, **44**: 559–571.

Rohmer, L., Kjemtrup, S., Marchesini, P., Dangl, J.L., (2003), Nucleotide sequence, functional characterization and evolution of pFKN, a virulence plasmid in Pseudomonas syringae pathovar maculicola, *Mol. Microbiol.*, **47:** 1545-1562.

Roine, E., Wei, W., Yuan, J., Nurmiaho-Lassila, E.L., Kalkkinen, N., Romantschuk, M., He, S.Y., (1997), Hrp pilus: an hrp-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**: 3459–3464.

Rosqvist, R., Magnusson, K. E., Wolf-Watz, H., (1994), Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells, *EMBO J.*, **13:** 964–972.

Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F., Gouzy, J., et al., (2002), Genome sequence of the plant pathogen Ralstonia solanacearum, *Nature*, **415(6871):** 497-502.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, vol. I. 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, **1989**. ISBN 0-87969-309-6.

Samudrala, R., Heffron, F., McDermott, J.E., (2009), Accurate prediction of secreted substrates and identification of a conserved putative secretion signal for type III secretion systems, *PLoS Pathog.*, **5**: e1000375.

Sekiya, K., Ohishi, M., Ogino, T., Tamano, K., Sasakawa, C., Abe, A., (2001), Supermolecular structure of the enteropathogenic Escherichia coli type III secretion

system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**: 11638–11643.

Soltis, P.S., (2005), Ancient and recent polyploidy in angiosperms, *New Phytol.*, **166**: 5-8.

Sory, M.-P., and G. R., Cornelis, (1994), Translocation of a hybrid YopEadenylate cyclase from *Yersinia enterocolitica* into HeLa cells, *Mol. Microbiol.*, **14:** 583–594.

Spreter, T., Yip, C.K., Sanowar, S., Andre, I., Kimbrough, T.G., et al (2009), A conserved structural motif mediates formation of the periplasmic rings in the type III secretion system, *Nat. Struct. Molec. Bio,* **16**: 468-76.

Staskawicz, B.J., Dahlbeck, D., Keen, N.T., (1984), Cloned avirulence gene of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* determines race specific incompatibility on *Glycine max* (L.) Merr, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **81**: 6024–28

Taguchi, F., Shimizu, R., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T., Ichinose, Y., (2003a), Post-translational modification of flagellin determines the specificity of HR induction, *Plant Cell Physiol.*, **44**: 342–349.

Turner, J. G., and A. Novacky, (1974), The quantitative relation between plant and bacterial cells involved in the hypersensitive reaction, *Phytopathology*, **64:**885–890.

van Loon, L.C., Rep. M., Pieterse, C.M., (2006) Significance of inducible defence-related proteins in infected plants, *Annu. Rev. Phytopathol.*, **44**: 135–162.

Volkove, R.A., Borisjuk, N.V., Panchuk, I.I., Schweizer, D., Hmleben, V., (1999), Elimination and rearrangement of parental DNA in the allotetrapoliod *Nicotiana tabacum*, *Mol. Biol. and Evol.*, **16**: 311-320.

Weber, E. and R., Koebnik, (2006), Positive selection of the Hrp pilin HrpE of the plant pathogen *Xanthomonas*, *J. Bacteriol.*, **188**: 1405–1410.

Weber, E., Ojanen-Reuhs, T., Huguet, E., Hause, G., Romantschuk, M., Korhonen, T.K., Bonas, U., Koebnik, R., (2005), The type III-dependent Hrp pilus is required for productive interaction of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* with pepper host plants, *J. Bacteriol.*, **187**: 2458–2468.

Wei, Z.M., Laby, R.J., Zumoff, C.H., Bauer, D.W., He, S.Y., Collmer, A., Beer, S.V., (1992), Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*, *Science*, **257**: 85–88.

Wendel, J.F., (2000), Genome evolution in polyploids, *Plant Mol. Biol.*, **42**: 225-249.

Wood, M. W., Rosqvist, R., Mullan, P. B., Edwards, M. H., Galyov, E. E., (1996), SopE, a secreted protein of *Salmonella dublin*, is translocated into the target eukaryotic cell via a *sip*-dependent mechanism and promotes bacterial entry, *Mol. Microbiol.*, **22:** 327–338.

Wood, S.E., Jin, J., Lloyd, S.A., (2008), YscP and YscU switch the substrate specificity of the Yersinia type III secretion system by regulating export of the inner rod protein YscI, *J. Bacteriol.*, **190**: 4252–4262.

Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J., Boller, T., Felix, G., (2006), Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-mediated transformation, *Cell*, **125**: 749–760.

Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E.J., Jones, J.D., Felix, G., Boller, T., (2004), Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception, *Nature*, **428**: 764–767.

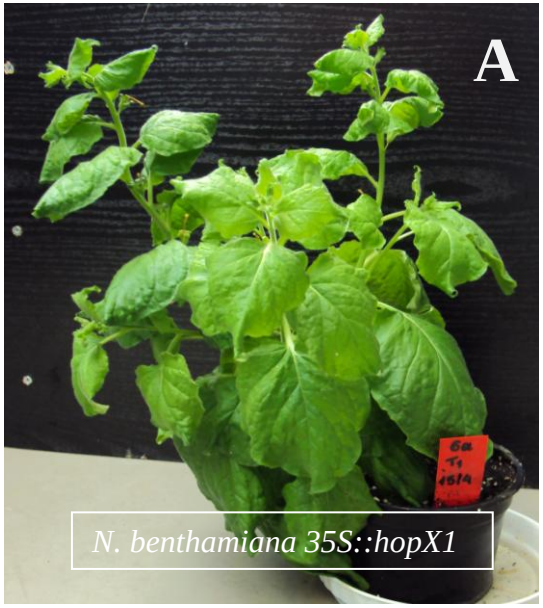
Μόσχου, Π., (2009), Ανάλυση του φυσιολογικού ρόλου των οξειδασών των πολυαμινών σε αγρίου τύπου & γενετικά τροποποιημένα φυτά καπνού (*Nicotiana tabacum L.*) & Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), *Διδακτορική Διατριβή*, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Βιολογίας.

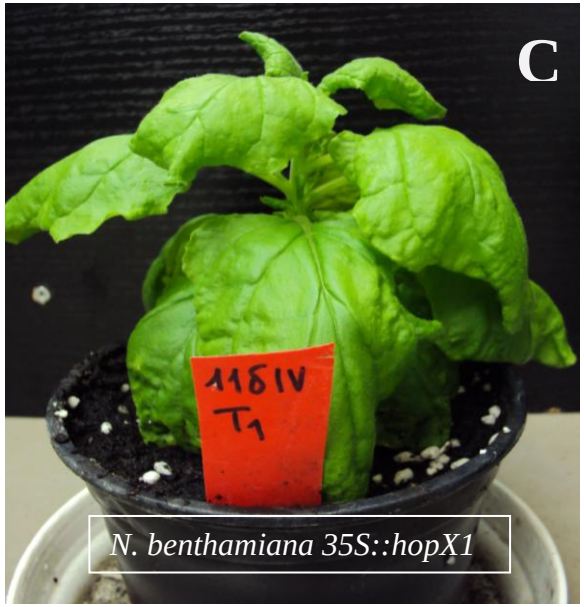
Μπαριάμη, Β., (2004), Ανάλυση της ανθεκτικότητας του ανωφελούς κουνουπιού *Anopheles stephensi* στα εντομοκτόνα με χρήση μικροσυστοιχιών. Επιβεβαίωση αποτελεσμάτων με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου, *Πτυχιακή Εργασία*, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής.

Νταντάμη, Ε., (2007), Ένα miRNA με πλουραλιστική δράση στα φυτά: *miR414*, *Διατριβή μεταπτυχιακού τίτλου ειδίκευσης*, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Βιολογίας.

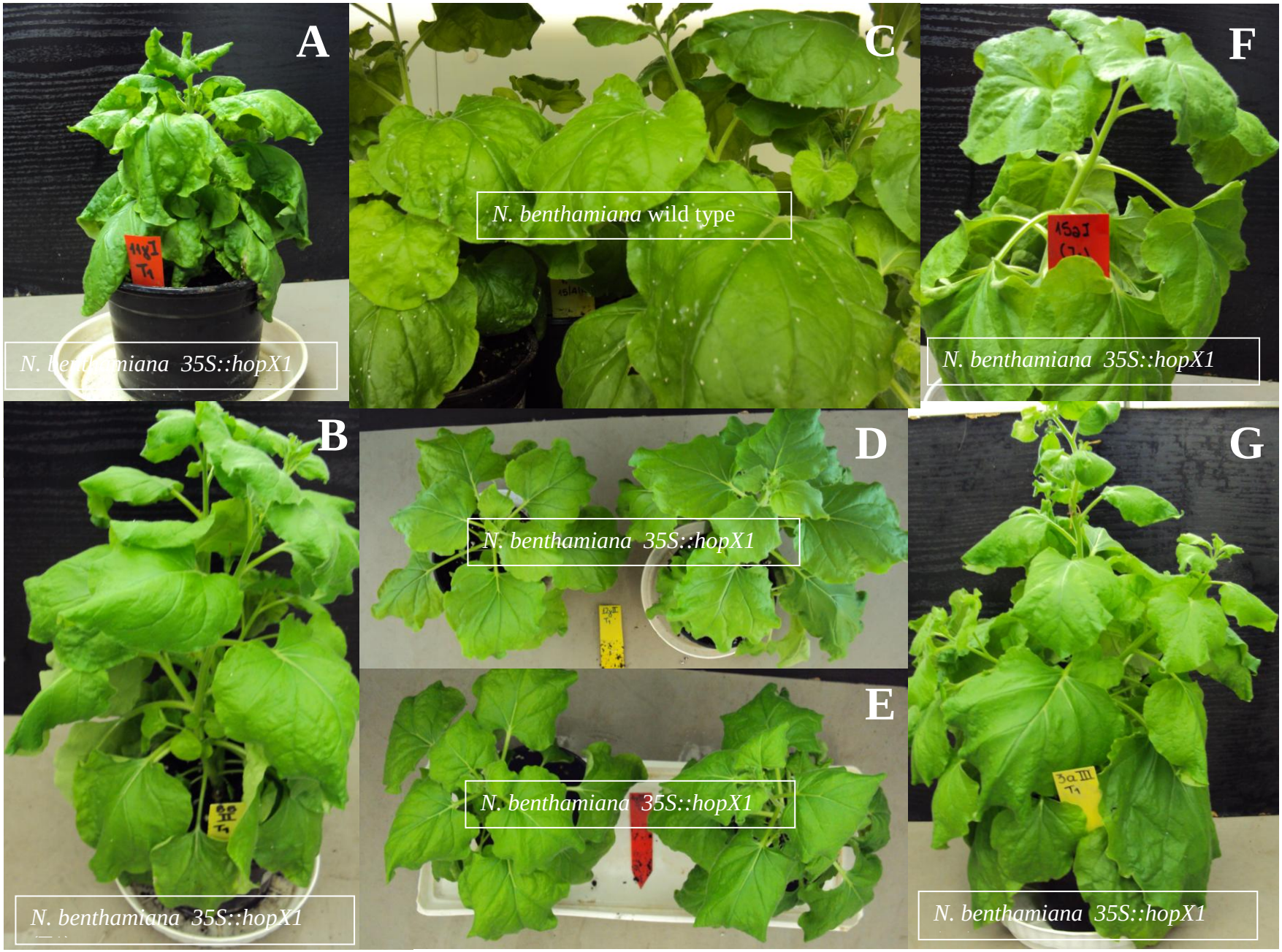
Σαρρής, Π., (2009), Γονιδιωματική εξόρυξη και λειτουργική αξιολόγηση βακτηριακών παραγόντων παθογένειας και μελέτη μηχανισμών αλληλεπίδρασης Παθογόνου-Ξενιστή, *Διδακτορική Διατριβή*, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Βιολογίας.

ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



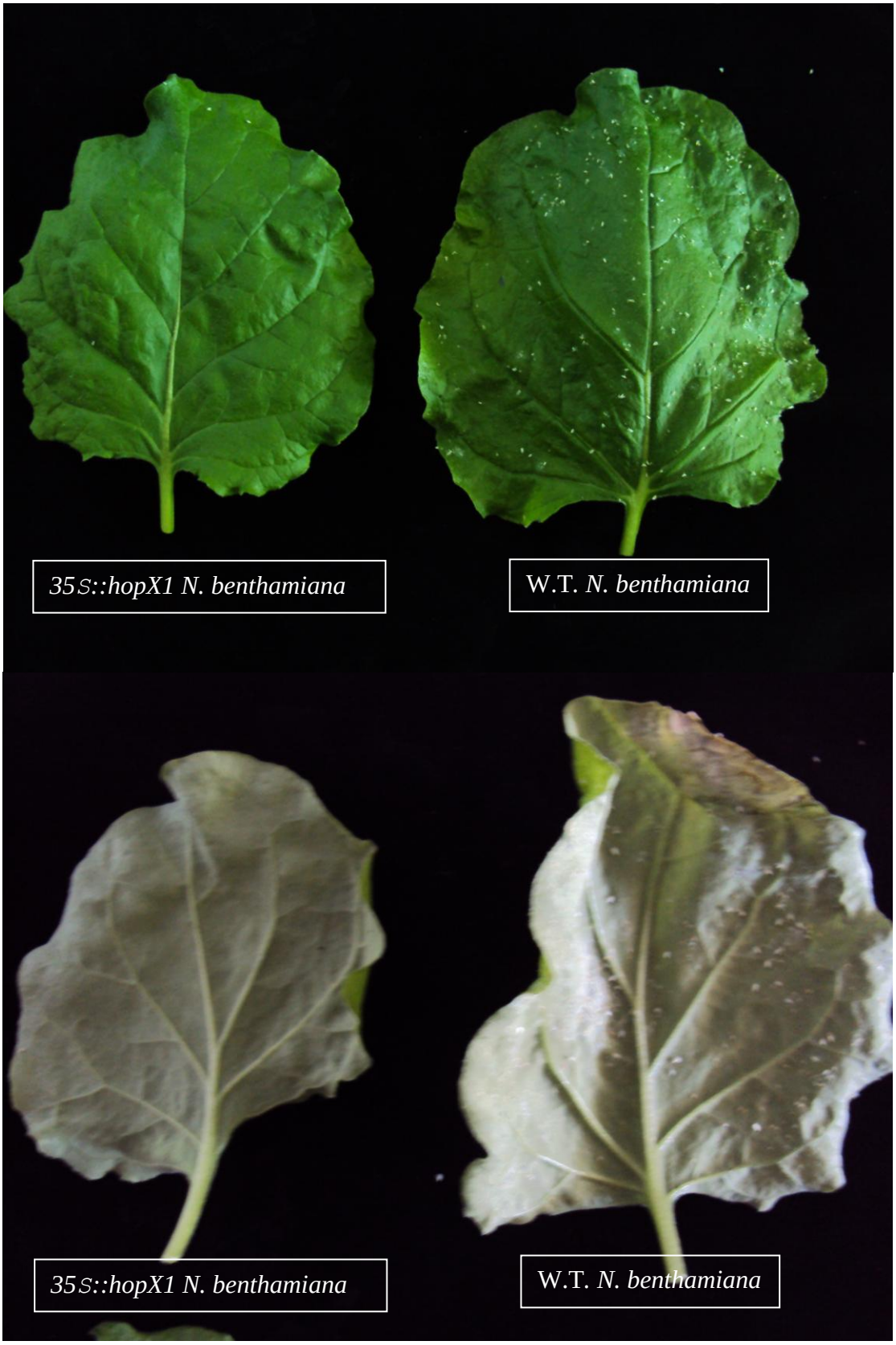


Εικόνα 25. Α, Β, C: Φυτά *N. benthamiana 35S::hopX1* (T1) 48 ημέρες μετά τη μεταφύτευση. D, E: Φυτά *N. benthamiana* αγρίου τύπου (w.t.) 36 ημέρες μετά τη μεταφύτευση. Η μόλυνση από αλευρώδεις είναι σαφώς ορατή αποκλειστικά στα φυτά αγρίου τύπου.

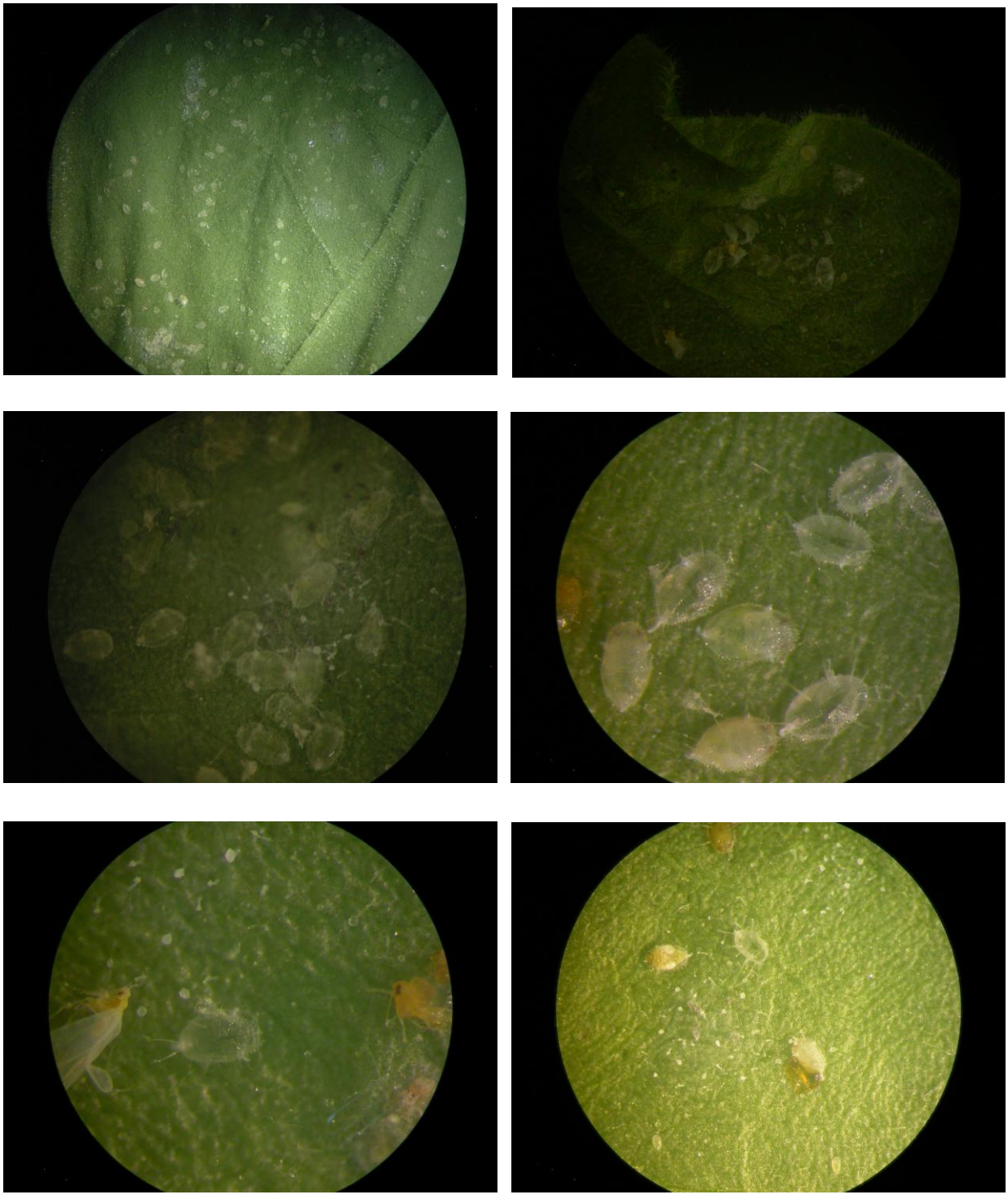


Εικόνα 26. A, B, D, E, F, G: Φυτά *N. benthamiana 35S::hopX1* (T1) 48 ημέρες μετά τη μεταφύτευση. C: Φυτά *N. benthamiana* αγρίου τύπου (w.t.) 36 ημέρες μετά τη μεταφύτευση. Η μόλυνση από αλευρώδεις είναι σαφώς ορατή αποκλειστικά στα φυτά αγρίου τύπου.

Εικόνα 27. Φυτά *N. benthamiana 35S::hopX1* (T1) και *N. benthamiana* αγρίου τύπου (w.t.) τοποθετημένα το ένα δίπλα στο άλλο για 5 ημέρες.



Εικόνα 28. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες φύλλων ***N. benthamiana*** **wild type (w.t)** και ***35S::hopX1*** **(T1)** που φανερώνουν τις διαφορές στα επίπεδα μόλυνσης από αλευρώδεις 54 ημέρες μετά τη μεταφύτευσή τους.



Εικόνα 29. Αντιπροσωπευτικές στερεοσκοπικές φωτογραφίες φύλλων ***N. benthamiana*** **(w.t)** αγρίου τύπου.

Εικόνα 30. Αντιπροσωπευτικές στερεοσκοπικές φωτογραφίες φύλλων ***N. benthamiana 35S::hopX1*** **(T1)**.