



Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Agricultural University of Athens

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΣΥΓΧΡΟΝΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ,
ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗΣ ΤΟΠΙΟΥ»
Κατεύθυνση : Γεωργία, Βελτίωση Φυτών & Γεωργικός Πειραματισμός

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«Γενετικός μετασχηματισμός στο είδος *Nicotiana benthamiana* με
γονίδια φυτοπαθογόνων βακτηρίων»**

Γεωργία Α.Ασημακοπούλου



Επιβλέπων Καθηγητής : Σκαράκης Γεώργιος

ΑΘΗΝΑ, 2014

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΦΥΤΩΝ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΥ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Γενετικός μετασχηματισμός στο είδος *Nicotiana benthamiana* με γονίδια φυτοπαθογόνων βακτηρίων»

Γεωργία Α. Ασημακοπούλου

ΕΙΣΗΓΗΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Καθηγητής Σκαράκης Γεώργιος, *Επιβλέπων*

Καθηγήτρια Μπεμπέλη Πηνελόπη, Μέλος

Επικ. Καθηγήτρια Ταμπακάκη Αναστασία, Μέλος

ΑΘΗΝΑ, 2014

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να εκφράσω την εκτίμηση και ευγνωμοσύνη μου σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Γεωργικού Πειραματισμού και Βελτίωσης Φυτών που συνέβαλαν στην εκπόνηση της μεταπτυχιακής μου διατριβής και ιδιαίτερα στον επιβλέποντα Καθηγητή μου, κ. Σκαράκη Γεώργιο για την πολύτιμη καθοδήγηση, υποστήριξη και τις συμβουλές του, καθώς και για την άψογη συνεργασία μας όλο το διάστημα μέχρι την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

Ακόμα, επιθυμώ να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής που δέχθηκαν να συμμετάσχουν ως εισηγητική επιτροπή για τη βαθμολόγηση της παρούσας μελέτης: την Καθηγήτρια κ. Μπεμπέλη Πηνελόπη του εργαστηρίου Βελτίωσης Φυτών και Γεωργικού Πειραματισμού και την Επίκουρο Καθηγήτρια κ. Ταμπακάκη Αναστασία του τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Θα ήθελα να εκφράσω τις βαθύτατες ευχαριστίες μου στην κ. Κελαϊδή Γεωργία, Υποψήφια Διδάκτορα Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, για την συμπαράσταση, τη πολύτιμη βοήθειά της, την καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια της διεξαγωγής του πειράματός μου στο εργαστήριο, παρέχοντας πρωτόκολλα, υλικά και πολύτιμες συμβουλές, καθώς επίσης και για τη πολύτιμη και καθοριστική συμβολή της στη συγγραφή και διόρθωση της μελέτης μου. Επιπλέον, ευχαριστώ θερμά την κ. Παυλή Ουρανία για τη βοήθεια και τις πολύτιμες υποδείξεις της.

Τέλος, δεν μπορώ να παραλείψω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράσταση, κατανόηση και αγάπη που μου παρείχαν ανιδιοτελώς όλα αυτά τα χρόνια, καθώς επίσης και την ηθική και οικονομική υποστήριξή τους σε όλα μου τα βήματα στη ζωή μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά	1
1.2 Στρατηγικές επιβίωσης των φυτών	1
1.2.1 Κύριοι μηχανισμοί άμυνας των φυτών	2
1.2.2 Παθογόνα που καταστέλλουν την PTI	4
1.2.3 Παθητική αντοχή	4
1.2.4 Διασυστηματική Ανθεκτικότητα	5
1.2.5 Μεταφορά σήματος	6
1.2.6 Τοπική επαγόμενη αντοχή (Local Acquired Resistance/LAR)	7
1.2.7 Τα γονίδια αντοχής R και αμολυσματικότητας αντ των φυτών	7
1.3 Εκκριτικό σύστημα τύπου III (TTSS)	7
1.3.1 Πρωτεΐνες - Τελεστές: διπλοί συντελεστές σε βακτηριακές ασθένειες και στην άμυνα των φυτών	9
1.3.2 Κυτταροπλασματικές TTSS συνοδές πρωτεΐνες	10
1.4 Μέθοδοι βελτίωσης των φυτών	13
1.4.1 Συμβατικές μέθοδοι	13
1.4.1.1 Επιλογή	14
1.4.1.2 Υβριδισμός	14
1.4.1.3 Πολυπλοειδία	15
1.4.1.4 Επαγόμενη μετάλλαξη	15
1.4.2 Βιοτεχνολογικές μέθοδοι	16
1.4.2.1 In vitro καλλιέργεια φυτικών κυττάρων και αναγέννηση φυτών	16
1.4.2.2 In vitro επιλογή και σωματοκλωνική παραλλακτικότητα	17
1.4.2.3 Σύντηξη πρωτοπλάστων	17
1.4.3 Γενετική Μηχανική	17
1.4.3.1 Μεταφορά γονιδίων	18
1.4.3.2 Μεταφορά γονιδίων μέσω του <i>Agrobacterium</i>	18
1.4.3.3 Βομβαρδισμός σωματιδίων	19
1.4.3.4 Ηλεκτροπόρωση και απευθείας εισαγωγή DNA στους πρωτοπλάστες	20
1.4.3.5 Διαγονιδιακή έκφραση	20
1.4.3.6 Επιλογή και αναγέννηση του φυτού	21
1.5 Βακτηριακή κηλίδωση - <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	22

1.5.1 Βακτηριακή κηλίδωση - Συμπτώματα -----	22
1.5.2 Ο κύκλος και η επιδημιολογία της ασθένειας -----	23
1.5.3 Αντιμετώπιση -----	24

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Μετασχηματισμός των <i>Beta vulgaris</i> φυτών -----	27
2.1.1 Βιολογικά Υλικά -----	27
2.1.2 Πειραματική Διαδικασία -----	27
2.1.3 Έλεγχος για την ένθεση του διαγονιδίου -----	29
2.2 Μετασχηματισμός των <i>Nicotiana benthamiana</i> φυτών -----	31
2.2.1 Βιολογικό Υλικό -----	31
2.2.2. Πειραματική Διαδικασία -----	31
2.2.3 Έλεγχος μετασχηματισμού των ΤΟ φυτών -----	33
2.2.4 Δημιουργία φυτών Τ1 γενεάς -----	35
2.2.5 Τεστ ανθεκτικότητας των HraA διαγονιδιακών φυτών καπνού Τ1 γενεάς στη βακτηριακή κηλίδωση του καπνού -----	35

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Μετασχηματισμός των <i>Beta vulgaris</i> φυτών -----	37
3.1.1 Μετασχηματισμός ριζών ζαχαρότευτλου προς μελέτη της επίδρασης του γονιδίου HraA -----	37
3.1.2 Έλεγχος της ένθεσης του διαγονιδίου HraA στις χιμαιρικές ρίζες του ζαχαρότευτλου -----	41
3.2 Μετασχηματισμός φυτών του είδους <i>Nicotiana benthamiana</i> -----	43
3.2.1 Αναγέννηση μετασχηματισμένων εκφύτων -----	43
3.2.2 Έλεγχος της παρουσίας του διαγονιδίου -----	47
3.2.3 Παραγωγή διαγονιδιακών φυτών Τ1 γενεάς που εκφράζουν το γονίδιο HraA -----	48
3.2.4 Τεστ ανθεκτικότητας των HraA διαγονιδιακών φυτών καπνού Τ1 γενεάς στη βακτηριακή κηλίδωση του καπνού -----	51

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η συνεξέλιξη μεταξύ φυτών ξενιστών και φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών χαρακτηρίζεται από μία συνεχή μάχη, όπου η εξέλιξη των μικροοργανισμών περιλαμβάνει την κατοχή πρωτεϊνών-τελεστών που μεταβάλλουν προς όφελος τους την πρωτογενή και δευτερογενή άμυνα του ξενιστή. Η ανταπόκριση από μέρους των φυτών περιλαμβάνει την αναγνώριση των συγκεκριμένων πρωτεϊνών-τελεστών και την επακόλουθη ενεργοποίηση διαδοχικών επιπέδων άμυνας ώστε να καθίσταται ικανή η τοπική και διασυστηματική άμυνα έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών.

Στόχο της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η δημιουργία διαγονιδιακών φυτών *Nicotiana benthamiana* με το γονίδιο *HraA*, το οποίο έχει χαρακτηριστεί ως πρωτεΐνη-τελεστής με άγνωστη λειτουργία, προκειμένου να μελετηθεί η επίδρασή του υπό συνθήκες καταπόνησης με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση της διαγονιδιακής έκφρασης του γονιδίου *HraA*, παράλληλα με την εφαρμογή σταθερού μετασχηματισμού που αποτελεί χρονοβόρα και δύσκολη διαδικασία, αξιοποιήθηκε και η μεθοδολογία δημιουργίας διαγονιδιακών ριζών ζαχαρότευτλου μέσω του *A.rhizogenes*.

Από τα πειράματα παροδικού μετασχηματισμού των δύο ποικιλιών τεύτλου, Αλεξάνδρα και Πανδώρα, φάνηκε ότι το ριζικό σύστημα των μετασχηματισμένων φυτών διαφοροποιήθηκε συγκριτικά με αυτό των φυτών-μαρτύρων, παρέχοντας ενδείξεις ότι οι παρατηρηθείσες νεκρώσεις πιθανόν να συνδέονται με καθυστερημένη επαγωγή της αντίδρασης υπερευαισθησίας, ενώ παράλληλα δε μπορεί να αποκλειστεί η υπόθεση ύπαρξης τοξικής επίδρασης.

Ο σταθερός μετασχηματισμός στο φυτό μοντέλο *N. benthamiana* επέτρεψε την ανάπτυξη διαγονιδιακών φυτών παρά τις χαμηλές συχνότητες μετασχηματισμού και αναγέννησης. Επιπλέον, τα φυτά της T1 γενεάς χαρακτηρίστηκαν από φυσιολογική ανάπτυξη και από τα πειράματα βιοτικής καταπόνησης μέσω τεχνητής μόλυνσης με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* παρατηρήθηκε ότι, ενώ αναφορικά με την αποίκιση του βακτηρίου δεν υπήρξαν ουσιαστικές διαφοροποιήσεις μεταξύ διαγονιδιακών φυτών και μαρτύρων, τα πρώτα χαρακτηρίζονταν από καθυστερημένη και ηπιότερη ανάπτυξη συμπτωμάτων, γεγονός το οποίο πιθανόν να οφείλεται στην ενδογενή επίδραση του γονιδίου στη βασική άμυνα του φυτού.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας προκύπτουν ενδείξεις που συνδέουν τη δράση του γονιδίου *HraA* με την ενίσχυση της βασικής άμυνας των φυτών (που δεν αποτελούν φυσικό ξενιστή της ξανθομονάδας), αλλά δεδομένου ότι η παρούσα εργασία αποτελεί την πρώτη αναφορά για τη μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *HraA* σε φυτά, καθίσταται σαφές ότι χρειάζονται πολύ περισσότερες πληροφορίες προκειμένου να διεξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.

ABSTRACT

The coevolution between host plants and phytopathogenic microorganisms is characterized by a constant battle, where the evolution of microorganisms involves the possession of effector proteins that alter, for their advantage, the primary and secondary host's defense. Plant response includes the recognition of specific effector proteins and subsequent activation of successive levels of defense in order to enable local and systemic defense against pathogens.

The aim of this work was the production of transgenic *Nicotiana benthamiana* plants harbouring *HpaA* gene, which has been designated as effector protein with unknown function, in order to study its effect under stress conditions, induced by infection with the bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. To investigate the effect of transgene expression of *HpaA* gene, while implementing stable transformation, a time consuming and laborious process, *A.rhizogenes*-mediated generation of transgenic sugar beet roots has been employed.

Transient transformation of both sugar beet varieties, Alexandra and Pandora, revealed that the root system of transformed plants varied from that of control plants thus, providing evidence that the observed necrosis may be associated with delayed induction of hypersensitivity reaction, while the hypothesis of toxic effects cannot be excluded.

Despite the low frequencies of transformation and regeneration, table transformation of the model plant *N. benthamiana*, enabled the development of transgenic plants, which exhibited a normal phenotype both at the T0 and T1 generations. Moreover, our findings demonstrate that although artificial infection with the bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* results in similar levels of bacterial colonization between control and transgenic plants, the first were characterized by delayed and mild symptom development, which may be due to the effect of endogenous gene expression acting towards enhancing the basic defense of the plant.

Overall results provide evidence that the activity of the *HpaA* gene might strengthen basic defense of non-host plants. However, as the present work constitutes the first study of *HpaA* gene expression in plants, it is obvious that further experiments are required in order to draw robust conclusions regarding a possible correlation between transgene expression and plant resistance against biotic stresses.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά

Τα φυτά εξελίσσονται στη φύση παράλληλα με τα παθογόνα εδώ και εκατομμύρια χρόνια. Όμως, τα φυτά είναι ανθεκτικά στην πλειονότητα των παθογόνων και ένα πολύ μικρό ποσοστό αυτών είναι ικανό να αναπτύξει παθολογική σχέση με ένα δεδομένο φυτό-ξενιστή και να προκαλέσει ασθένεια. Η ικανότητα αυτή των φυτών να ανθίστανται στις επιθέσεις των παθογόνων αποτελεί βασική προϋπόθεση για τη διατήρηση κάθε φυτικού είδους. Ένας οργανισμός για να προκαλέσει ασθένεια σε ένα συγκεκριμένο φυτό-ξενιστή, πρέπει, μεταξύ άλλων, να είναι ικανός να υπερνικήσει τους αμυντικούς μηχανισμούς του και επιπλέον να καταστείλει βασικές κυτταρικές λειτουργίες του ή να διαταράξει το μεταβολικό-αναπτυξιακό του πρόγραμμα. Κατά συνέπεια, η εξελικτική πορεία των φυτικών ειδών περιλαμβάνει την προσαρμογή τους στην “πίεση” των παθογόνων οργανισμών, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη μηχανισμών που εμποδίζουν την προσβολή και κατά συνέπεια την πρόκληση απωλειών από τα διάφορα παθογόνα. Η διαδικασία αυτή αποτελεί μία παράλληλη εξελικτική πορεία όπου η απόκτηση από το φυτό ενός νέου μηχανισμού άμυνας έχει σαν συνέπεια την υιοθέτηση από το παθογόνο ενός εναλλακτικού μηχανισμού για την επανάκτηση της παθογένειάς του.

Η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών αποτελεί τον πιο οικονομικό, αλλά και φιλικό προς το περιβάλλον, τρόπο για την αντιμετώπιση των ασθενειών καθώς επίσης και των ζωικών εχθρών των φυτών. Η σημασία της γενετικής αντοχής στη φυτοπροστασία έχει αναγνωριστεί παγκόσμια, έτσι ώστε η δημιουργία ανθεκτικών ποικιλιών να αποτελεί, στις μέρες μας, ένα από τους σημαντικότερους στόχους της Βελτίωσης των Φυτών.

1.2 Στρατηγικές επιβίωσης των φυτών

Τα παθογόνα των φυτών χρησιμοποιούν διαφορετικές στρατηγικές επιβίωσης. Τα βακτήρια πολλαπλασιάζονται σε μεσοκυττάριους χώρους (στον αποπλάστη) μετά από την είσοδό τους μέσω του αέρα ή από τους υδατοπόρους (στόματα και hydathodes, αντίστοιχα), ή βρίσκουν πρόσβαση μέσω πληγών. Οι νηματώδεις και οι αφίδες τρέφονται με την απευθείας εισαγωγή μυζητήρα στο φυτικό κύτταρο. Οι μύκητες μπορούν να εισέλθουν απευθείας στα φυτικά επιδερμικά κύτταρα, ή να επεκτείνουν υφές επάνω, ανάμεσα ή εντός των φυτικών κυττάρων. Παθογόνα, συμβιωτικοί μύκητες και ωομύκητες μπορούν να εισάγουν μυζητήρες (haustoria), εντός της πλασματικής μεμβράνης του κυττάρου-ξενιστή. Οι μυζητήρες του παθογόνου, το εξωκυτταρικό υλικό και οι πλασματικές μεμβράνες του ξενιστή δημιουργούν μια σύνδεση από την οποία προσδιορίζεται το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης. Ποικίλες τάξεις παθογόνων

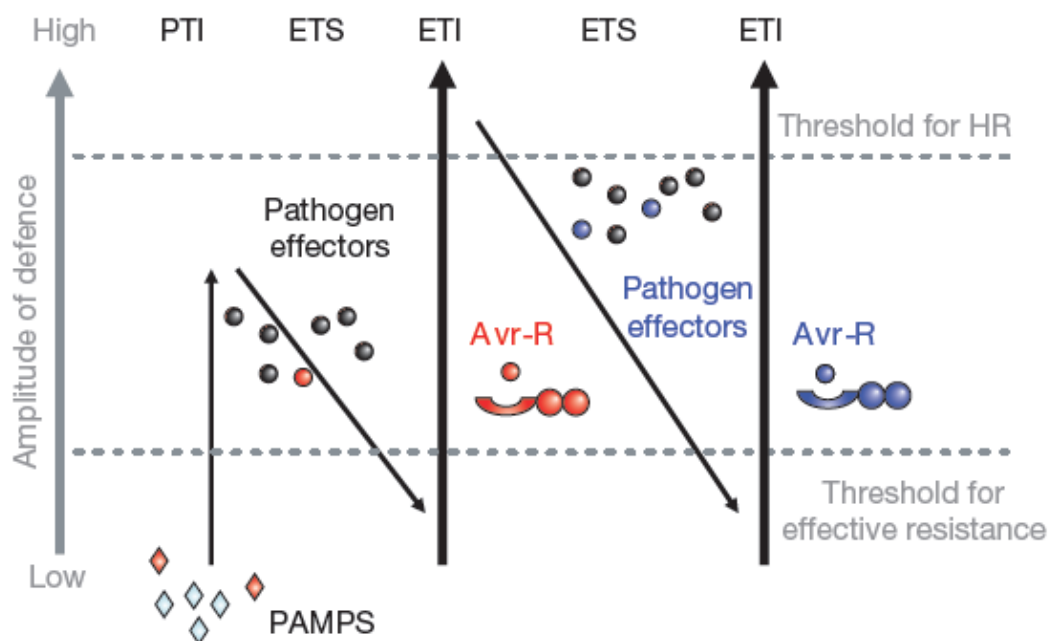
μεταφέρουν πρωτεΐνες τελεστές (παράγοντες μολυσματικότητας) στα φυτικά κύτταρα με σκοπό την επιβίωση του μικροβίου.

Τα φυτά, σε αντίθεση με τα θηλαστικά, στερούνται κινητών μηχανισμών άμυνας και μεσομορφικού τύπου προσαρμογής ανοσοποιητικό σύστημα. Αντί αυτού, βασίζονται στην ενδογενή άμυνα του κάθε κυττάρου και σε διασυστηματικώς μεταφερόμενα σήματα που προέρχονται από τα σημεία μόλυνσης (Dangl & Jones, 2001; Ausubel, 2005; Chisholm *et al.*, 2006). Επιπλέον, έχει διατυπωθεί η θεωρία ότι πολλές R πρωτεΐνες των φυτών πιθανώς ενεργοποιούνται έμμεσα από πρωτεΐνες-τελεστές που κωδικοποιούνται από τα παθογόνα, και όχι από άμεση αναγνώριση. Αυτή η «υπόθεση προστασίας» (**'guard hypothesis'**) συνεπάγεται ότι οι R πρωτεΐνες αναγνωρίζουν έμμεσα τις πρωτεΐνες-τελεστές του παθογόνου ελέγχοντας την ακεραιότητα των κυττάρων του ξενιστή που αποτελούν στόχο δράσης των πρωτεϊνών-τελεστών (Dangl & Jones, 2001; van der Biezen & Jones, 1998). Η ιδέα ότι οι R πρωτεΐνες αναγνωρίζουν τις αλλαγές που υφίσταται το φυτό από το παθογόνο προσομοιάζει στο μοντέλο αναγνώρισης σημάτων κινδύνου από τροποποιήσεις στον οργανισμό των θηλαστικών (Matzinger, 2002).

1.2.1 Κύριοι μηχανισμοί άμυνας των φυτών

Είναι πλέον σαφές ότι τα φυτά διαθέτουν δύο κύριους μηχανισμούς άμυνας. Στη μία περίπτωση, το φυτό χρησιμοποιεί διαμεμβρανικούς υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων (**pattern recognition receptors, PRRs**) που ανταποκρίνονται σε μοριακά πρότυπα αναγνώρισης του μικροβίου ή του παθογόνου (MAMPs ή PAMPs), όπως η flagellin (Zipfel & Felix, 2005). Στη δεύτερη περίπτωση, χρησιμοποιεί τις NB-LRR πολυμορφικές πρωτεΐνες, που κωδικοποιούνται από τα περισσότερα R γονίδια στο εσωτερικό των κυττάρων (Dangl & Jones, 2001). Η ονομασία τους προέρχεται από τα χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης, δηλαδή την περιοχή σύνδεσης σε νουκλεοτίδια (**nucleotide binding, NB**) και τις πλούσιες σε λευκίνη επαναλήψεις (**leucine rich repeat, LRR**). Οι NB-LRR πρωτεΐνες, σε γενικές γραμμές, σχετίζονται με τις ζωικές πρωτεΐνες CATERPILLER/NOD/NLR (Ting & Davis, 2005) και με STAND ATPases (Leipe *et al.*, 2004). Οι πρωτεΐνες-τελεστές παθογόνων από διαφορετικά βασίλεια αναγνωρίζονται από NB-LRR πρωτεΐνες και ενεργοποιούν παρόμοιες αποκρίσεις άμυνας. Η ανθεκτικότητα στις ασθένειες που προέρχεται από τροποποιημένη NB-LRR πρωτεΐνη, είναι αποτελεσματική μόνο κατά των παθογόνων που μπορούν να αναπτυχθούν σε ζωντανούς ιστούς του ξενιστή (υποχρεωτικά παράσιτα), ή προαιρετικά παράσιτα, αλλά όχι κατά των παθογόνων που θανατώνουν τους ιστούς του ξενιστή κατά τη διάρκεια της αποίκησης (νεκρότροφοι) (Glazebrook, 2005).

Μία πρόσφατη θεώρηση σχετικά με την άμυνα των φυτών μπορεί να αναπαρασταθεί ως μοντέλο τεσσάρων «ζιγκ ζαγκ» σταδίων (εικ.2.1).



Εικόνα 2.1. Μοντέλο Ζιγκ – Ζαγκ σταδίων άμυνας των φυτών

Στη φάση 1, τα PAMPs (ή MAMPs) αναγνωρίζονται από τους PRRs, προσδίδοντας ανθεκτικότητα προερχόμενη από τα PAMPs (**PAMP-triggered immunity, (PTI)**), που δύναται να σταματήσει την περαιτέρω αποίκηση. Στη φάση 2, τα παθογόνα χρησιμοποιούν πρωτεΐνες-τελεστές, οι οποίες συμβάλλουν στη μόλυσματικότητα. Οι πρωτεΐνες-τελεστές μπορεί να εμπλέκονται στην PTI, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ευαισθησία προερχόμενη από τον τελεστή (**effector-triggered susceptibility, ETS**). Στην φάση 3, ένας δεδομένος τελεστής αναγνωρίζεται ειδικά από μία από τις NB-LRR πρωτεΐνες, αποδίδοντας ανθεκτικότητα προερχόμενη από την πρωτεΐνη-τελεστή (**effector-triggered immunity, ETI**). Η αναγνώριση επιτυγχάνεται είτε έμμεσα, είτε άμεσα μέσω αναγνώρισης μίας πρωτεΐνης-τελεστή από τις NB-LRR. Η ETI είναι μία ταχύτερη και ενισχυμένη απόκριση της PTI, που συνεπάγεται ανθεκτικότητα στις ασθένειες και, συνήθως, αντίδραση υπερευαισθησίας κυτταρικού θανάτου (HR) στο σημείο της μόλυνσης. Στο στάδιο 4, η φυσική επιλογή οδηγεί το παθογόνο στην αποφυγή της ETI, είτε με διασπορά ή διαφοροποιώντας το αναγνωρισμένο γονίδιο-τελεστή, ή με την απόκτηση επιπλέον τελεστών που καταστέλλουν την ETI. Η φυσική επιλογή καταλήγει σε νέες εξειδικευμένες R αλληλεπιδράσεις έτσι ώστε η ETI να μπορεί να ενεργοποιηθεί και πάλι.

1.2.2 Παθογόνα που καταστέλλουν την ΡΤΙ

Τα παθογόνα χρησιμοποιούν ένα μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών-τελεστών, οι οποίοι εξυπηρετούν διαφορετικούς σκοπούς. Μερικοί τελεστές μπορεί να έχουν δομικό ρόλο, για παράδειγμα, στο εξωτερικό haustorial υλικό που σχηματίζεται κατά τη μόλυνση από μύκητες και ωομυκήτες (Schulze-Lefert & Panstruga, 2003). Άλλοι προκαλούν θρεπτική διαρροή ή χρησιμεύουν στη διασπορά του παθογόνου (Badel *et al.* 2002). Πολλοί είναι πιθανόν να συμβάλουν στην καταστολή ενός ή περισσότερων συστατικών της ΡΤΙ ή της ΕΤΙ. Οι δύο προκείμενοι μηχανισμοί ανοσίας δεν είναι απόλυτα διακριτοί, δεδομένου ότι μερικοί τελεστές μπορεί να στοχεύουν στην ΕΤΙ αντί της ΡΤΙ, ή το αντίστροφο (Εικ. 2.1).

Τα παθογόνα βακτήρια μεταφέρουν 15-30 πρωτεΐνες-τελεστές, ανά στέλεχος, στα κύτταρα των ξενιστών μέσω του εκκριτικού συστήματος τύπου III (TTSS). Οι πρωτεΐνες-τελεστές συμβάλλουν στη μολυσματικότητα του βακτηρίου, συχνά με τη μίμηση ή αναστολή των ευκαρυωτικών κυτταρικών λειτουργιών (Grant *et al.*, 2006; Abramovitch *et al.*, 2006; Mudgett, 2005). Μία μετάλλαξη στο TTSS του φυτοπαθογόνου στελέχους *P. syringae* καθιστά αδύνατη τη μεταφορά οποιασδήποτε πρωτεΐνης-τελεστή τύπου III και ενεργοποιεί έναν ταχύτερο και ισχυρότερο μεταγραφικό επαναπρογραμματισμό στο φασόλι συγκριτικά με το ισογονιδιακό στέλεχος άγριου τύπου (Jakobek *et al.*, 1993). Αυτό το στέλεχος, εκπροσωπώντας το άθροισμα όλων των βακτηριακών MAMPs/PAMPs, επάγει τη μεταγραφή των ίδιων κατ' ουσίαν γονιδίων προς την *flg22* (Thilmony, 2006; Tao *et al.*, 2003; Truman *et al.*, 2006). Ως εκ τούτου, οι τελεστές τύπου III από κάθε βακτήριο που επιτυγχάνει τη μόλυνση, ουσιαστικά μειώνουν την ΡΤΙ σε τέτοιο βαθμό ώστε να επιτυγχάνεται η αποίκηση (Nomura *et al.*, 2005) (Εικ.2.1).

1.2.3 Παθητική αντοχή

Παθητική ονομάζεται η ανθεκτικότητα που στηρίζεται σε κληρονομούμενα ανατομικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά, που λόγω της ύπαρξης τους πριν τη μόλυνση από το παθογόνο, παρεμποδίζουν ή καθυστερούν την είσοδο/εγκατάσταση του παθογόνου (Ζάχος *et al.* 1984). Η μόλυνση εμποδίζεται με την παθητική ανθεκτικότητα με τους παρακάτω τρόπους (Agris, 1997):

1. Προστατευτικά στρώματα της επιφάνειας του φυτού και φυσικά ανοίγματα (κηρώδης επίστρωση, τρίχες, στομάτια, φακίδια).
2. Πάχος και σκληρότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων των ιστών των φυτών.
3. Αντιμικροβιακές ουσίες που εκκρίνει το φυτό στο περιβάλλον του.

4. Απουσία στο φυτό ουσιών που είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη του παθογόνου.
5. Απουσία υποδοχέων στον ξενιστή ή θέσεων ευαισθησίας για τις τοξίνες του παθογόνου (Otani *et al.* 1998).
6. Οσμωτική πίεση, περιεκτικότητα σε νερό και ενεργό οξύτητα του φυτικού κυττάρου.

Η αντίληψη των σημάτων κινδύνου συμβαίνει στο άμεσο περιβάλλον του τραυματισμού και των σημείων της εισβολής των παθογόνων. Εκτός από τις τοπικές αμυντικές αντιδράσεις, μία μικροβιακή επίθεση μπορεί να προκαλέσει αντιδράσεις άμυνας διασυστηματικά. Κατά τα τελευταία έτη, δύο είναι οι κύριες μορφές της διασυστηματικής ανθεκτικότητας: η διασυστηματική επίκτητη ανθεκτικότητα (SAR) και επαγόμενη διασυστηματική ανθεκτικότητα (ISR). (Conrath *et al.*, 2006, Pieterse & Dicke, 2007).

1.2.4 Διασυστηματική Ανθεκτικότητα

Η επαγόμενη διασυστηματική ανθεκτικότητα είναι η ανθεκτικότητα που προέρχεται από αντιδράσεις του ξενιστή, οι οποίες ενεργοποιούνται μετά τη μόλυνσή του από το παθογόνο και εξελίσσονται σε συνάρτηση με αυτό. Οι αντιδράσεις αυτές, απαιτούν τη συμμετοχή του μεταβολισμού του φυτού-ξενιστή και παρουσιάζουν χαρακτήρα δυναμικής αντιμετώπισης του παθογόνου ή των μεταβολικών προϊόντων του. Οι αντιδράσεις αυτές χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες:

1. Άμεση αντίδραση των κυττάρων που δέχονται την εισβολή από το παθογόνο, ξεκινώντας από την αναγνώριση του σήματος και την μεταβίβασή του. Συχνά καταλήγει σε γρήγορο θάνατο των κυττάρων, ονομάζεται αντίδραση υπερευαισθησίας (HR) και λειτουργεί μόνο από υψηλής ειδίκευσης αναγνωρισμένα μόρια διεγερτών (elicitors) (Shah *et al.*, 1995).

2. Εντοπισμένη ενεργοποίηση των γονιδίων γύρω από το σημείο της μόλυνσης, καταλήγοντας σε σύνθεση δευτερευουσών ουσιών που μεταβάλλουν τη δομή και την περατότητα των κυτταρικών μεμβρανών. Οι πιο σημαντικές μεταβολές είναι:

- Η απελευθέρωση μορίων απαραίτητων για τη μεταγωγή του σήματος της αντίδρασης άμυνας μέσα και γύρω από το κύτταρο και πιθανόν διασυστηματικά σε ολόκληρο το φυτό.
- Η οξειδωση φαινολικών ενώσεων, η ενεργοποίηση αντιοξειδωτικών ενζύμων (Nicholson & Hammerschmidt, 1992; Baker & Orlandi, 1995) και η απελευθέρωση και συσσώρευση ενεργών ριζών οξυγόνου O_2 , H_2O_2 και $OH\cdot$ (Reactive Oxygen Species, ROS).

Η συσσώρευση υπεροξειδίου του υδρογόνου και των συγγενικών ριζών οξυγόνου (ROS) που συμβάλλουν στη συσσώρευση σαλικυλικού οξέος φαίνεται να επηρεάζει με πολλούς τρόπους την άμυνα του φυτού: α) στοχεύουν τοπικά στο θάνατο των υπερευαίσθητων κυττάρων, β) κατευθύνουν αντιμικροβιακές ενέργειες εναντίον του παθογόνου, γ) συμμετέχουν στην ενίσχυση του κυτταρικού τοιχώματος του φυτού (Pennel & Lamb, 1997). Το υπεροξείδιο του υδρογόνου παράλληλα δρα σαν ένα διάχυτο σήμα για την επαγωγή της αντοχής σε γειτονικούς ιστούς.

3. Διασυστηματική ενεργοποίηση γονιδίων που κωδικοποιούν την παραγωγή πρωτεϊνών παθογένεσης (Pathogenesis-Related proteins, PR-proteins), παρεμποδίζοντας άμεσα ή έμμεσα την ανάπτυξη του παθογόνου (Kombrink & Schemelzer, 2001). Η ομάδα των PR πρωτεϊνών περιλαμβάνει τις γλουκανάσες (PR-2), τις χιτινάσες (PR-3), ένζυμα που υδρολύουν τα κυτταρικά τοιχώματα των μυκήτων και πρωτεΐνες παρόμοιες με τις thaumatines (PR-5) (Oostendorp *et al.*, 2001).

Το στάδιο ανάπτυξης του φυτού παίζει σημαντικό ρόλο. Φυτά που παρουσιάζονται ανθεκτικά σε ένα στάδιο ανάπτυξης μπορεί να είναι ευπαθή σε ένα άλλο στάδιο. Τέλος οι περιβαλλοντικές συνθήκες συντελούν στην ανθεκτικότητα ή την ευπάθεια ενός φυτού σε ένα παθογόνο.

Αυτές οι διασυστηματικές αντιδράσεις είναι συνέπεια της τοπικής αντίληψης των MAMPs ή άλλων σημάτων κινδύνου στο σημείο της εισβολής. Αρκετά MAMPs έχουν καθοριστεί με σαφήνεια σε βιοχημικό επίπεδο, αλλά οι υποδοχείς τους δεν έχουν ακόμη προσδιοριστεί σε μοριακό επίπεδο.

Έως τώρα έχουν χαρακτηριστεί πρωτεϊνικά MAMPs, MAMPs από βακτήρια, από ωομύκητες, λιπόφιλα MAMPs, ολιγοσακχαρικά MAMPs, N-γλυκοζυλιωμένα πεπτίδια ζύμης, πεπτιδογλυκάνες, λιποολιγοσακχαρικά.

1.2.5 Μεταφορά σήματος

Η διασυστηματική αντοχή ενεργοποιείται σε ολόκληρο το φυτό με τη μεταφορά σήματος που διεγείρει τις διεργασίες εκείνες που θα εμποδίσουν την περαιτέρω μόλυνση. Το σήμα μεταφέρεται κατά μήκος του φυτού μέσω των αγγείων και ακολουθεί μοριακή αναγνώριση των σημάτων του παθογόνου από τα φυτικά κύτταρα. Στην περίπτωση που το παθογόνο δεν εισβάλει στα φυτικά κύτταρα, η αναγνώριση του παθογόνου γίνεται εξωκυτταρικά με την αλληλεπίδραση μορίων-υποδοχέων που βρίσκονται στην κυτταροπλασματική του μεμβράνη και μορίων-διεγερτών που παράγονται από την εισβολή του παθογόνου, ικανών να διαχέονται και να διαπερνούν το κυτταρικό τοίχωμα (Keen & Holiday, 1982; Gabriel & Rolfe, 1990).

1.2.6 Τοπική επαγόμενη αντοχή (*Local Acquired Resistance/LAR*)

Η τοπική επαγόμενη αντοχή εκφράζεται μόνο στο σημείο εισβολής του παθογόνου στο φυτό με νέκρωση και ξήρανση των ιστών και σχετίζεται με την αντίδραση υπερευαισθησίας. Η αντοχή αυτού του τύπου συνήθως αναπτύσσεται δύο μέρες μετά την μόλυνση, ενώ η διασυστηματική αντοχή συνήθως αναπτύσσεται σε επτά ή περισσότερες μέρες μετά την πρώτη μόλυνση και μπορεί να διαρκέσει από 3-5 εβδομάδες ή ακόμα και μήνες (Kombrink & Schmelzer, 2001; Agrios, 1997).

Σήμερα, θεωρείται ότι η αφύπνιση των λανθανόντων μηχανισμών αντοχής επάγεται ή αποκτάται κατόπιν διέγερσης, οπότε και τα δύο φαινόμενα (διασυστηματική και τοπική) είναι μορφές ανοσίας που στηρίζονται σε διαφορετικούς παράγοντες διέγερσης και σε ίδιους ή διαφορετικούς μηχανισμούς αντοχής (Τζάμος, 2004).

1.2.7 Τα γονίδια αντοχής *R* και αμολυσματικότητας αντ των φυτών

Σήμερα, μέσω της ανάπτυξης μοριακών τεχνικών για κλωνοποίηση γονιδίων άγνωστης λειτουργίας, έχει απομονωθεί και χαρακτηριστεί μία πλειάδα γονιδίων *R* από φυτά μοντέλα αλλά και από καλλιεργούμενα ήδη που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε παθογόνους μικροοργανισμούς όπως είναι τα βακτήρια, οι μύκητες και οι ιοί, καθώς και σε εχθρούς όπως π.χ. οι νηματώδεις και τα έντομα. Παρά την πληθώρα παθογόνων στα οποία δρουν τα *R* γονίδια, οι πρωτεΐνες που κωδικοεύουν απαντούν σε μόνο πέντε είδη πρωτεϊνών, από άποψη προβλεπόμενης δομής.

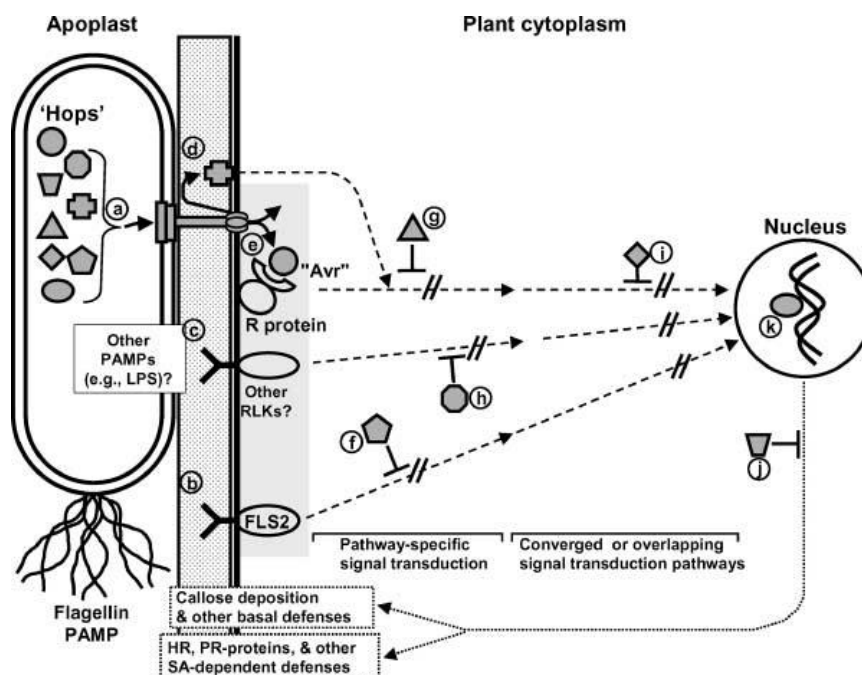
Η απομόνωση των γονιδίων ανθεκτικότητας *R* έχει συμβάλει σημαντικά, όχι μόνο στην ανάλυση των αλληλεπιδράσεων φυτών-παθογόνων σε μοριακό επίπεδο, αλλά και στην κατανόηση των διαδικασιών με τις οποίες δημιουργούνται νέα γονίδια ανθεκτικότητας κατά τη διαδικασία συνεξέλιξης φυτών-παθογόνων. Τα γονίδια *R* συχνά χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη γενετικά βελτιωμένων ποικιλιών που χαρακτηρίζονται από ανθεκτικότητα σε βιοτικές καταπονήσεις, ενώ παράλληλα, αποτελούν χρήσιμα μοριακά εργαλεία για τη γενετική τροποποίηση των φυτών, με στόχο την αντιμετώπιση των φυτικών ασθενειών με νέες ανθεκτικές ποικιλίες.

1.3 Εκκριτικό σύστημα τύπου III (TTSS)

Τα περισσότερο γνωστά αρνητικά κατά Gram βακτήρια χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη του εκκριτικού συστήματος τύπου III (TTSS), το οποίο πιθανότατα αποκτήθηκε μέσω μηχανισμών

οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς. Η πλειονότητα των συστατικών του TTSS, φαίνεται να εντοπίζονται στην εσωτερική μεμβράνη, έχοντας δομικές ομοιότητες με συστατικά οργάνωσης του βακτηριακού μαστιγίου (Initiative, 2000).

Το εκκριτικό σύστημα III αποτελείται από περίπου 20 πρωτεΐνες μεταξύ των οποίων μία ενδοκυτταρική μεμβρανική ATPάση. Οι περισσότερες από τις πρωτεΐνες της εσωτερικής μεμβράνης του συστήματος, έχουν ομολογία με τις πρωτεΐνες βιογένεσης του μαστιγίου των Gram-αρνητικών, αλλά και των Gram-θετικών βακτηρίων (Εικ. 1.2) (Fouts, 2002), ενώ μία πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης παρουσιάζει ομολογία με την πρωτεΐνη PulD του εκκριτικού συστήματος II. Όλα τα εκκριτικά συστήματα τύπου III των ζωικών και φυτικών παθογόνων βακτηρίων έχουν από κοινού έναν αριθμό κύριων δομικών συστατικών που είναι συντηρημένα (Initiative, 2000).



Εικόνα 2.2 Μοντέλο απεικόνισης της δράσης των TTSS πρωτεϊνών – τελεστών ως επαγωγείς και καταστολείς της άμυνας των φυτών

Αυτά τα συστατικά μπορούν να διαχωριστούν σε δύο ομάδες. Στην πρώτη ομάδα, ανήκουν οι εξωτερικές πρωτεΐνες της μεμβράνης (*peripheral membrane proteins*) συμπεριλαμβανομένης και μιας πρωτεΐνης που παρουσιάζει αλληλουχική ομοιότητα με μία οικογένεια μεταφορικών πρωτεϊνών, καθώς και λιγότερο συντηρημένες λιποπρωτεΐνες. Η άλλη ομάδα αποτελείται από πρωτεΐνες πλήρους ενσωμάτωσης στην μεμβράνη (*integral membrane proteins*) που παρουσιάζουν ομοιότητες με τη συσκευή βιογένεσης του μαστιγίου. Η υπερμοριακή δομή που

συνδέεται με το τύπου III σύστημα μεταφοράς της *Salmonella typhimurium* απομονώθηκε και απεικονίστηκε με την βοήθεια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (Leister *et al.*, 1996). Αυτή η δομή, που ονομάζεται σύμπλοκο βελόνας (needle complex), εκτείνεται στην εσωτερική και εξωτερική μεμβράνη του βακτηριακού φακέλου. Το σύμπλοκο βελόνας είναι μία μακριά άδεια δομή μήκους σχεδόν 120 nm και συντίθεται από δύο κύριες υποδομές (Εικ. 1.2).

Το εκκριτικό σύστημα τύπου III δείχνει να είναι ο αποκλειστικός μηχανισμός μεταφοράς των πρωτεϊνών παθογένειας στο κυτταρόπλασμα των ευκαρυωτικών κυττάρων. Σε πολλές περιπτώσεις, η έκκριση μέσω του TTSS φαίνεται να ελέγχεται από την φυσική επαφή του βακτηρίου με την επιφάνεια του κυττάρου στόχου. Η ικανότητα του εκκριτικού συστήματος να μεταφέρει πρωτεΐνες από το βακτηριακό κυτταρόπλασμα στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή, μελετήθηκε πρώτα στο βακτήριο *Yersinia pseudotuberculosis*. (Saraste *et al.*, 1990; Taira *et al.*, 1999).

Τα φυτοπαθογόνα βακτήρια τα οποία φέρουν το εκκριτικό σύστημα τύπου III διαχωρίζονται σε δύο ομάδες: την ομάδα I (*P. syringae* και *Erwinia spp*) και την ομάδα II (*R. solanacearum* και *Xanthomonas spp*), τα οποία διαφέρουν μεταξύ άλλων και ως προς την ομολογία των συστατικών πρωτεϊνών τους (Alfano & Collmer, 1997)

1.3.1 Πρωτεΐνες - Τελεστές: διπλοί συντελεστές σε βακτηριακές ασθένειες και στην άμυνα των φυτών

Πολλά φυτοπαθογόνα βακτήρια εγχέουν μολυσματικές πρωτεΐνες-τελεστές σε φυτικά κύτταρα μέσω ενός Hrp εκκριτικού συστήματος τύπου III (TTSS). Χωρίς το TTSS, αυτά τα παθογόνα δεν μπορούν να νικήσουν τις βασικές άμυνες, να αναπτύσσονται στα φυτά, να προκαλούν συμπτώματα κηλίδωσης στους ξενιστές, ή να προκαλέσουν την αντίδραση υπερευαισθησίας (HR) σε φυτά μη - ξενιστές. Έρευνες του γονιδιώματος του παθογόνου για τον προσδιορισμό των προαγωγέων του ρεγουλονίου Hrp του TTSS καθώς και του μονοπατιού σηματοδότησης του TTSS, δείχνουν ότι τα φυτοπαθογόνα *Pseudomonas*, *Xanthomonas* και *Ralstonia spp.* έχουν στη διάθεσή τους ένα μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών-τελεστών. Τα Hrp TTSS χρησιμοποιούν κυτταροπλασματικές συνοδές πρωτεΐνες, συντηρημένα μεταφορικά στοιχεία στον βακτηριακό φάκελο και ένα πιο εξειδικευμένο σύνολο από TTSS εκκρινόμενες πρωτεΐνες, προκειμένου να μεταφέρουν τελεστές στο κυτταρικό τοίχωμα και την πλασματική μεμβράνη. Πολλοί τελεστές μπορούν να δρουν ως μοριακοί διπλοί συντελεστές. Σε ορισμένες αλληλεπιδράσεις συμβάλλουν στην επαγωγή αμυντικών μηχανισμών, ενώ σε άλλες επιδρούν καταστέλλοντας την άμυνα του ξενιστή. Έρευνες για τις λειτουργίες των τελεστών εντός των φυτικών κυττάρων καταδεικνύουν τη μεμβράνη του πλάσματος και τον πυρήνα ως υποκυτταρικές θέσεις για αρκετούς τελεστές ενώ παράλληλα, προσδίδουν σε μερικούς τελεστές δράση πρωτεάσης

κυστεΐνης ή φωσφατάσης τυροσίνης, και παρέχουν νέες ενδείξεις για τη συνεξέλιξη βακτηριακών-φυτικών αλληλεπιδράσεων.

Πολλά Gram-αρνητικά παθογόνα των φυτών και των ζώων διαθέτουν εκκριτικά συστήματα τύπου III (TTSS) που μπορεί να μεταφέρουν μολυσματικές πρωτεΐνες - "τελεστές" στα κύτταρα του ξενιστή (Cornelis, 2000). Το TTSS είναι σημαντικό για την παθογένεια των φυτοπαθογόνων στα γένη *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Ralstonia*, *Erwinia* και *Pantoea*, στα βακτήρια που αποικίζουν στους μεσοκυττάριους χώρους (αποπλάστη) των φυτών και είναι γενικά ικανά να προκαλούν το θάνατο των κυττάρων των φυτών σε κάποιο στάδιο της παθογένεσης. Τα περισσότερα από αυτά τα παθογόνα παρουσιάζουν εξειδίκευση ως προς τον ξενιστή και έχουν συμβατές αλληλεπιδράσεις που οδηγούν σε μολυσματικότητα σε ένα περιορισμένο φάσμα ευπαθών ειδών φυτών ή σε ποικιλίες ενός είδους. Σε ανθεκτικά φυτά, αναπτύσσεται μία ασύμβατη αλληλεπίδραση, η οποία χαρακτηρίζεται από την αντίδραση υπερευαισθησίας (HR). Η αντίδραση HR αφορά σε ένα γρήγορο, προγραμματισμένο θάνατο των φυτικών κυττάρων που συμβαίνει στην περιοχή της μόλυνσης και σχετίζεται με παθογόνο αμολυσματικότητα. Συνοπτικά, η παθογένεια περιλαμβάνει την καταστολή της βασικής άμυνας των φυτών εναντίον μικροβίων, την αποφυγή ή καταστολή του παθογόνου με εξειδικευμένη άμυνα HR, την παρασιτική ανάπτυξη στον αποπλάστη και ενδεχομένως, δημιουργία πληγών και άλλων χαρακτηριστικών συμπτωμάτων της ασθένειας. Το TTSS μονοπάτι κωδικοποιείται από γονίδια Hrp (HR αντίδραση υπερευαισθησίας και P-παθογένεια) και Hrc (HR-αντίδραση υπερευαισθησίας και C-conserved συντηρημένα) (Bogdanove *et al.*, 1996). Οι πρωτεΐνες Hrc κατευθύνουν την έκκριση TTSS συστατικών διαμέσου του βακτηριακού φακέλου, ενώ ένα υποσύνολο των πρωτεϊνών Hrp εκκρίνεται απευθείας από το TTSS και κατευθύνουν τη μεταφορά των τελεστών μέσα από τα τοιχώματα του κυττάρου ξενιστή. Μερικοί από τους καλύτερα μελετημένους TTSS τελεστές ορίζονται ως Avg πρωτεΐνες επειδή ανιχνεύθηκαν από φαινοτύπους αμολυσματικότητας (Keen, 1990; Staskawicz *et al.*, 1984).

Οι TTSS τελεστές προφανώς προωθούν την ανάπτυξη των βακτηρίων στον αποπλάστη, υπερνικώντας την άμυνα του ξενιστή και απελευθερώνοντας θρεπτικές ουσίες από τα φυτικά κύτταρα. Μπορούμε σήμερα να διακρίνουμε δύο επίπεδα της άμυνας του ξενιστή που πρέπει να ξεπεραστούν. Οι βασικές άμυνες ενεργοποιούνται από μη-παθογόνα στο εξωτερικό των φυτικών κυττάρων, όπως τα PAMPs (Gomez-Gomez & Boller, 2002; Medzhitov & Janeway, 2002; Nurnberger & Brunner, 2002).

1.3.2 Κυτταροπλασματικές TTSS συνοδές πρωτεΐνες

Τα TTSSs στα παθογόνα των ζώων βασίζονται σε συνοδές πρωτεΐνες για την έκκριση ενός μέρους εκκρινόμενων πρωτεϊνών (Feldman & Cornelis, 2003; Parsot *et al.* 2003; Wattiau *et al.*,

1994). Οι συνοδές πρωτεΐνες μοιράζονται μικρές ομοιότητες σε επίπεδο αλληλουχίας, αλλά έχουν τα γενικά χαρακτηριστικά του να είναι μικρές (περίπου 15 kDa), όξινες (ισοηλεκτρικά σημεία < 6) και έχουν μία αμφιπαθική περιοχή στα C άκρα τους. Επίσης, τα γονίδια που κωδικοποιούν βρίσκονται συχνά δίπλα στα γονίδια των τελεστών με τα οποία αλληλεπιδρούν (Wattiau *et al.*, 1996). Οι TTSS συνοδές πρωτεΐνες έχουν χωριστεί σε κατηγορίες ανάλογα με το αν αλληλεπιδρούν με έναν ή πολλαπλούς τελεστές (ή άλλες TTSS εκκρινόμενες πρωτεΐνες) και κατά πόσο λειτουργούν σε παθογόνα TTSSs ή στη βιογένεση του TTSS των μαστιγίων (Cornelis, 2000, Parsot *et al.*, 2003). Οι TTSS συνοδές πρωτεΐνες δρουν στο κυτταρόπλασμα για να σταθεροποιήσουν ή να παρεμποδίσουν την ένωση των τελεστών πριν από την μεταφορά (Page & Parsot, 2002), για να διατηρήσουν τους τελεστές σε κατάλληλη μη-σφαιρική κατάσταση έκκρισης (Stebbins & Galan, 2001) και σε ορισμένες περιπτώσεις για να ρυθμίσουν τα TTSS (Francis *et al.*, 2002). Ο ρόλος των συνοδών πρωτεϊνών που στοχεύουν τους τελεστές στο μονοπάτι του TTSS δεν έχει ακόμα διαλευκανθεί, αλλά όσον αφορά στον τομέα πρόσδεσης των συνοδών σε μία εκκρινόμενη πρωτεΐνη, ίσως να συνιστά ένα δεύτερο σήμα έκκρισης (Cheng *et al.*, 1997) το οποίο δρα ανεξάρτητα από τα σήματα στα πρώτα 15 αμινοξέα ή στα mRNA κωδικόνια του τελεστή (Anderson & Schneewind, 1997; Sory & Cornelis, 1994).

Επειδή υπάρχουν ενδείξεις ότι οι συνοδές πρωτεΐνες βοηθούν τους τελεστές να ανταγωνιστούν για την πρόσβαση στο TTSS, η ταυτοποίηση των φυτοπαθογόνων συνοδών μπορεί να αποκαλύψει ποιοι τελεστές μεταφέρονται πρώτα στο φυτικό κύτταρο και έτσι να οδηγηθούν σε καλύτερη κατανόηση των πρώιμων σταδίων της φυτικής παθογένειας.

Η μεταφορά των TTSS πρωτεϊνών-τελεστών σε κύτταρα-ξενιστές απαιτεί την TTSS-έκκριση βοηθητικών πρωτεϊνών που ονομάζονται μεταφορείς (translocators), οι οποίοι σχηματίζουν πόρους στην ευκαρυωτική, πλασματική μεμβράνη. Αυτές έχουν χαρακτηριστεί εκτενώς σε αρκετά παθογόνα των ζώων (Büttner & Bonas, 2002; Cornelis, 2000), ενώ λιγότερα στοιχεία είναι γνωστά σχετικά με τους TTSS μεταφορείς σε παθογόνα φυτών.

Απαιτείται σαφώς περισσότερη έρευνα για να κατανοήσουμε πώς αυτές οι πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με άλλα συστατικά των TTSS, τον τρόπο που προωθούν τη μεταφορά του τελεστή μέσα από την πλασματική μεμβράνη του ξενιστή και πώς τα φυτά αμύνονται εναντίον αυτής της προκαρυωτικής εισβολής.

Ένα μέρος των φυτοπαθογόνων τελεστών είναι γνωστό ότι προάγει μολυσματικότητα σε συμβατές αλληλεπιδράσεις και ο κατάλογος είναι πιθανό να αυξηθεί με την ανάπτυξη πιο λεπτομερειικών ερευνών για μεταλλαγμένους φαινοτύπους (Badel *et al.*, 2002; Kjemtrup *et al.*, 2000; White *et al.*, 2000). Παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός ότι ορισμένοι τελεστές μπορούν να προωθήσουν τη δημιουργία τραυμάτων σε ευαίσθητους ξενιστές χωρίς ανάλογη επίδραση επί της βακτηριακής ανάπτυξης.

Είναι αξιοσημείωτο, ότι αρκετοί από τους τελεστές που έχουν αποδειχθεί πρόσφατα να έχουν δράση καταστολής HR, ανήκουν στην οικογένεια των τελεστών που είχαν προηγουμένως υποδειχθεί ότι έχουν δράση αμολυσματικότητας (Jamir *et al.*, 2004). Έτσι, πολλοί τελεστές μπορεί να είναι διπλοί συντελεστές και εάν θα επικρατήσει η διεγερτική τους ή η κατασταλτική τους δράση, θα εξαρτηθεί από τη διάθεση των R γονιδίων στον ξενιστή, των τελεστών στο βακτήριο και πιθανότερα και από ποσοτικούς παράγοντες που σχετίζονται με το χρόνο και το επίπεδο μεταφοράς συγκριτικά με άλλους τελεστές.

Ένα πιθανό σενάριο για την εξέλιξη του φυτοπαθογόνου συστήματος TTSS - τελεστών προκύπτει λαμβάνοντας υπόψη τις βασικές άμυνες των φυτών και της HR, την υπόθεση διαφύλαξης, καθώς και τη σημαντική συλλογή των τελεστών που φαίνεται να έχουν κατασταλτική δράση. Το μοντέλο προβλέπει τέσσερα στάδια συνεξέλιξης: α) Βασικές άμυνες που παρατάσσονται εναντίον όλων των μικροβίων ήταν πιθανόν ο πρώτος στόχος των αρχέγονων TTSS τελεστών (Klement *et al.*, 2003). β) Αυτοί οι τελεστές (ή η δραστηριότητά τους, σύμφωνα με την υπόθεση guard) αναγνωρίζονται και ελέγχονται από τις πρωτεΐνες R και από την πολύ ισχυρότερη άμυνα HR, η οποία ενεργοποιείται συνήθως μόνο από αμολυσματικά παθογόνα. γ) Οι ίδιες οι HR άμυνες τότε θα γίνουν στόχοι των μεταγενέστερα παραγόμενων αμυντικών πρωτεϊνών-τελεστών καταστολής. δ) Η συνεχιζόμενη συνεξέλιξη αυτών των παθοσυστημάτων θα δημιουργήσει πληθυσμούς που είναι ιδιαίτερα πολυμορφικοί στο R γονίδιό τους και στο γενετικό απόθεμα αντίστοιχων τελεστών. Η υπόθεση guard, η οποία είναι κεντρικής σημασίας για το μοντέλο αυτό, προτάθηκε για να εξηγήσει πώς η κυρίαρχη τάξη των NBS-LRR R πρωτεϊνών αναγνωρίζουν Avr πρωτεΐνες (Dangl & Jones, 2001; Van der Biezen & Jones, 1998). Αντίθετα από το μοντέλο που προτείνει R πρωτεΐνες να αναγνωρίζουν Avr πρωτεΐνες άμεσα ως λιγάσες (Gabriel & Rolfe, 1990), η υπόθεση guard πρότεινε ότι R πρωτεΐνες προστατεύουν ή διαφυλάσσουν παράγοντες ευπάθειας που στοχοποιούνται από τελεστές του παθογόνου. Έτσι, οι R πρωτεΐνες ανιχνεύουν τροποποιήσεις που έχουν προκληθεί από τελεστές και το φυτό αντιδρά με την ενεργοποίηση HR αμυνών.

Ενδείξεις προς υποστήριξη της υπόθεσης guard, περιλαμβάνουν την ανακάλυψη ότι Avr πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν ως πρωτεάσες κυστεΐνης, εξαρτώνται από τα αμετάβλητα αμινοξέα των δραστικών θέσεων τους για να αναγνωρίζονται από τις συγγενικές τους E πρωτεΐνες (Orth *et al.*, 2000; Shao *et al.*, 2002). Αυτό σημαίνει ότι κάθε πρωτεΐνη R αναγνωρίζει ένα ενζυματικό προϊόν της Avr πρωτεΐνης της, παρά άμεσα την ίδια την πρωτεΐνη Avr.

Γνωρίζουμε τώρα ότι στη συλλογή πληροφοριών του κάθε τελεστή πρέπει να περιλαμβάνονται πληροφορίες σχετικά με την ύπαρξη των αντίστοιχων συνοδών πρωτεϊνών, τα επίπεδα έκφρασης και μεταφοράς κατά τη μόλυνση, ο υποκυτταρικός εντοπισμός *in planta*, και ερευνητικές δοκιμασίες απώλειας και ανάκτησης της λειτουργίας για την καταστολή της άμυνας και τις επιπτώσεις στην αποίκηση, την ανάπτυξη και την δημιουργία των

συμπτωμάτων. Οι τελευταίες δοκιμές θα πρέπει να περιλαμβάνουν φυτά άγριου τύπου, απαραίτητα σε διαγνωστικά μονοπάτια της άμυνας. Έρευνες για τη βιοχημική λειτουργία περιλαμβάνουν δοκιμασίες ενζυματικής δραστηριότητας, τροποποίηση του τελεστή *in planta*, ταυτοποίηση των αλληλεπιδρώντων φυτικών πρωτεϊνών (και τις τροποποιήσεις τους), καθώς και τον προσδιορισμό των πρωτεϊνικών δομών των τελεστών.

Σημαντικές ερωτήσεις που πρέπει να απαντηθούν είναι ποιες δοκιμασίες θα διαφοροποιήσουν με πιο αποτελεσματικό τρόπο τις κατασταλτικές δράσεις ορισμένων τελεστών όσον αφορά τη βασική και την HR άμυνα και πώς τα αποτελέσματα επηρεάζονται από τις μεγάλες διαφορές στα επίπεδα μεταφοράς των τελεστών, ανάλογα με το αν μεταφέρονται μέσω φυσικής μόλυνσης ή μέσω υπερέκφρασης σε μετασχηματισμένα φυτά. Για παράδειγμα, τα επίπεδα έκφρασης μπορεί να επηρεάσουν τη θέση εντοπισμού των τελεστών, εάν οι θέσεις σύνδεσης στη θέση στόχο είναι περιορισμένες (Axtell & Staskawicz, 2003; Jin *et al.*, 2003).

Με δεδομένη την ταχεία πρόοδο στην ταυτοποίηση και στο χαρακτηρισμό των TTSS τελεστών, μπορούμε να περιμένουμε αυτούς τους μοριακούς διπλούς συντελεστές να είναι ακόμη πιο σημαντικοί ως εργαλεία για την εξερεύνηση της φύσης της ασθένειας των φυτών και της άμυνας στο μέλλον.

1.4 Μέθοδοι βελτίωσης των φυτών

1.4.1 Συμβατικές μέθοδοι

Η βελτίωση των φυτών ορίζεται ως η αναγνώριση και επιλογή των επιθυμητών χαρακτηριστικών στα φυτά και ο συνδυασμός αυτών σε ένα μεμονωμένο φυτό. Από το 1900, οι νόμοι της γενετικής του Mendel παρείχαν την επιστημονική βάση για τη βελτίωση των φυτών. Δεδομένου ότι όλα τα γνωρίσματα ενός φυτού ελέγχονται από γονίδια που βρίσκονται στα χρωμοσώματα, η συμβατική βελτίωση των φυτών μπορεί να θεωρηθεί ως ο κατευθυνόμενος χειρισμός του συνδυασμού των χρωμοσωμάτων. Σε γενικές γραμμές, υπάρχουν τρεις βασικές διαδικασίες για τη διαχείριση των χρωμοσωμάτων του φυτού. Καταρχάς, τα φυτά ενός πληθυσμού που παρουσιάζουν επιθυμητά χαρακτηριστικά μπορούν να επιλεγούν και να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω βελτίωση και καλλιέργεια, μία διαδικασία που ονομάζεται επιλογή (καθαρής σειράς). Κατά δεύτερον, επιθυμητά χαρακτηριστικά που βρίσκονται σε διαφορετικές σειρές μπορούν να συνδυαστούν για να δημιουργηθούν φυτά τα οποία εμφανίζουν ταυτόχρονα και τα δύο χαρακτηριστικά, μία μέθοδος που ονομάζεται υβριδισμός. Η ετέρωση είναι ένα φαινόμενο υψηλής ευρωστίας, το οποίο προκύπτει με υβριδισμό καθαρών σειρών. Τρίτον, η πολυπλοειδία (αυξημένος αριθμός ζευγών χρωμοσωμάτων) μπορεί να

συμβάλει στη βελτίωση των καλλιεργειών. Τέλος, νέα γενετική παραλλακτικότητα μπορεί να εισαχθεί μέσω τυχαίων ή τεχνητών μεταλλάξεων. (Singh B.D., 2000; Καλτσίκης, 1989)

1.4.1.1 Επιλογή

Η επιλογή είναι η αρχαιότερη και βασικότερη διαδικασία για τη βελτίωση των φυτών. Πρόκειται συνήθως για τρία διακριτά στάδια. Στο πρώτο στάδιο, ένας μεγάλος αριθμός επιλογών πραγματοποιείται σε έναν ετερογενή αρχικό πληθυσμό. Στο δεύτερο στάδιο, οι σειρές των απογόνων που προέρχονται από την επιλογή μεμονωμένων φυτών, καλλιεργούνται χωριστά ώστε να επιτυγχάνεται η ευχερής φαινοτυπική αξιολόγηση γνωρισμάτων ενδιαφέροντος. Μετά από φαινοτυπικές παρατηρήσεις, τα επιλεγμένα φυτά καλλιεργούνται για αρκετά χρόνια για να ληφθούν μετρήσεις της απόδοσης, κάτω από διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες, προς επιλογή των καλύτερων σειρών. Τέλος, οι επιλεγμένες καθαρές σειρές συγκρίνονται με τις υπάρχουσες εμπορικές ποικιλίες ως προς την απόδοσή τους και ως προς άλλα σημαντικά αγρονομικά χαρακτηριστικά.

1.4.1.2 Υβριδισμός

Η συχνότερα χρησιμοποιούμενη τεχνική βελτίωσης των φυτών είναι ο υβριδισμός. Ο στόχος του υβριδισμού είναι να συνδυάσει επιθυμητά χαρακτηριστικά, που βρίσκονται σε διαφορετικές σειρές, σε μία μόνο σειρά μέσω διασταυρώσεων. Το πρώτο βήμα είναι να δημιουργηθούν ομοζύγωτες καθαρές σειρές, οι οποίες στη συνέχεια διασταυρώνονται μεταξύ τους. Ακολουθεί απογονικός έλεγχος και επιλογή των απογόνων που παρουσιάζουν υπέρτερους συνδυασμούς επιθυμητών χαρακτηριστικών. Σε περιπτώσεις διασταυρώσεων με άγρια συγγενικά είδη, όπου ένα γνώρισμα, π.χ. ανθεκτικότητα σε μία ασθένεια, πρέπει να εισαχθεί μέσα στο γονιδίωμα της καλλιέργειας, τότε ένας μεγάλος αριθμός ανεπιθύμητων χαρακτηριστικών (όπως η χαμηλή απόδοση, δυσάρεστη γεύση, χαμηλή θρεπτική αξία) μεταφέρονται λόγω γενετικής σύνδεσης. Αυτά τα ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά θα πρέπει να απομακρυνθούν μέσω χρονοβόρων διαδικασιών, όπως π.χ. επαναλαμβανόμενες διασταυρώσεις με τη γονεϊκή σειρά. Υπάρχουν δύο τύποι υβριδίων : τα ενδοειδικά και τα δυειδικά υβρίδια. Πέραν από ταξινομικούς περιορισμούς, ο υβριδισμός δεν μπορεί επίσης να επιτευχθεί λόγω γενετικής ασυμβατότητας, η οποία περιορίζει την πιθανότητα εισαγωγής επιθυμητών χαρακτηριστικών σε καλλιεργούμενα φυτά.

Η ετέρωση επιτυγχάνεται με τη διασταύρωση καθαρών σειρών (υψηλής ομοζυγωτίας) και έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία υβριδίων που υπερτερούν και των δύο γονέων ως προς ένα γνώρισμα. Η αυτογονιμοποίηση των περισσότερων καλλιεργειών οδηγεί σε σημαντική μείωση

της ευρωστίας και του μεγέθους, ειδικότερα κατά τις πρώτες γενεές ομομειξίας. Μετά από έξι ή επτά γενεές, δεν παρατηρείται περαιτέρω μείωση αυτών των χαρακτηριστικών. Όταν αυτά τα υψηλής ομοζυγωτίας φυτά διασταυρώνονται με άλλες καθαρές σειρές, μπορεί να δημιουργηθούν πολύ εύρωστα, μεγάλου μεγέθους φυτά. Ο όρος "ετέρωση" χρησιμοποιείται για να περιγράψει το φαινόμενο της υψηλής ευρωστίας στα υβρίδια. Το πιο αξιοσημείωτο και επιτυχημένο υβρίδιο που δημιουργήθηκε είναι το υβρίδιο αραβοσίτου. Μέχρι το 1919, το πρώτο εμπορικό υβρίδιο αραβοσίτου ήταν διαθέσιμο στις Ηνωμένες Πολιτείες. Δύο δεκαετίες αργότερα, σχεδόν όλα τα φυτά αραβοσίτου ήταν υβρίδια. Η καλλιέργεια ποικιλιών-υβριδίων παρουσιάζει το μειονέκτημα ότι οι παραγωγοί πρέπει να αγοράζουν νέους υβριδικούς σπόρους κάθε χρόνο, επειδή η επίδραση της ετέρωσης χάνεται στην πρώτη γενεά μετά τον υβριδισμό των καθαρών γονεϊκών σειρών.

1.4.1.3 Πολυπλοειδία

Τα περισσότερα φυτά είναι διπλοειδή. Τα φυτά με τρεις ή περισσότερες πλήρεις σειρές χρωμοσωμάτων αναφέρονται ως πολυπλοειδή. Η αύξηση των χρωμοσωμικών σειρών ανά κύτταρο μπορεί να προκληθεί τεχνητά με την εφαρμογή κολχικίνης, η οποία οδηγεί σε διπλασιασμό του αριθμού των χρωμοσωμάτων. Σε γενικές γραμμές, η κύρια επίδραση της πολυπλοειδίας είναι η αύξηση του μεγέθους των φυτών και η δημιουργία γενετικής παραλλακτικότητας. Από την άλλη πλευρά, τα πολυπλοειδή φυτά έχουν συχνά μειωμένη γονιμότητα και αναπτύσσονται πιο αργά.

1.4.1.4 Επαγόμενη μετάλλαξη

Πέραν της δημιουργίας γενετικής παραλλακτικότητας, μέσω της αξιοποίησης γονιδίων του ίδιου είδους αλλά και συγγενικών ή ακόμη και άγριων ειδών, μία εναλλακτική λύση είναι η δημιουργία μεταλλάξεων που προκαλούνται από χημικές ουσίες ή ακτινοβολία. Οι μεταλλάξεις που προκύπτουν εξετάζονται και επιλέγονται για πρόσθετα επιθυμητά χαρακτηριστικά. Η θέση της μετάλλαξης δεν μπορεί να ελεγχθεί όταν χρησιμοποιούνται ως παράγοντες μεταλλαξιγένεσης χημικά ή ακτινοβολία. Επειδή η μεγάλη πλειοψηφία των μεταλλάξεων φέρει ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά, η μέθοδος αυτή δεν έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε προγράμματα βελτίωσης. (Singh B.D., 2000; Καλτσίκης, 1989)

Η επιτυχία στην χρήση των παραδοσιακών αρχών βελτίωσης των φυτών και των γεωργικών τεχνικών έφτασε στο αποκορύφωμά της, όταν καλλιεργήθηκαν υψηλής απόδοσης σειρές σιταριού και ρυζιού στη δεκαετία του 1960. Ο διπλασιασμός και τριπλασιασμός της παραγωγικότητας αυτών των σημαντικών καλλιεργειών στην Ασία, σηματοδότησε μία

γεωργική επανάσταση στις αναπτυσσόμενες χώρες. Αυτή η έκρηξη της παραγωγικότητας που συνέβαλε στην αντιμετώπιση του υποσιτισμού, ιδιαίτερα στις υποανάπτυκτες χώρες, είναι γνωστή ως «Πράσινη Επανάσταση» και περιγράφει την κοινωνική, οικονομική και διατροφική επίδραση των νέων υψηλής απόδοσης ειδών σιταριού και ρυζιού. Ο Norman Borlaug τιμήθηκε με το βραβείο Nobel Ειρήνης το 1970 για τη συμβολή του στη βελτίωση νέων υψηλής απόδοσης ειδών σιτηρών. Ωστόσο, τα είδη αυτά ήταν εξαρτημένα σε μεγάλο βαθμό από τα λιπάσματα, την άρδευση και τα αγροχημικά και απαιτούσαν υψηλού ενεργειακού κόστους επενδύσεις. Αυτό οδήγησε στην υποβάθμιση και την απώλεια εδαφών και σε άλλα σοβαρά περιβαλλοντικά προβλήματα σε όλο τον κόσμο. (Singh B.D., 2000; Καλτσίκης, 1989)

1.4.2 Βιοτεχνολογικές μέθοδοι

Η βιοτεχνολογία είναι ο τομέας που ασχολείται με τη χρήση ζωντανών οργανισμών ή των προϊόντων αυτών. Με αυτή την ευρεία έννοια, επίσης, η παραδοσιακή γεωργία μπορεί να θεωρηθεί ως ένα είδος βιοτεχνολογίας. Η Ευρωπαϊκή Ομοσπονδία Βιοτεχνολογίας ορίζει τη βιοτεχνολογία ως «η ολοκληρωμένη χρήση των επιστημών της βιοχημείας, της μικροβιολογίας και της γενετικής μηχανικής, προκειμένου να τεθούν σε τεχνολογική (βιομηχανική) εφαρμογή οι δυνατότητες των μικροοργανισμών, της καλλιέργειας ιστών και εκφύτων». Τα τελευταία χρόνια, η βιοτεχνολογία έχει αναπτυχθεί ραγδαία ως ένα πρακτικό μέσο για την ταχύτερη βελτίωση των φυτών και τη βελτίωση οικονομικά σημαντικών καλλιεργειών. Οι σημαντικότερες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την επίτευξη αυτών των στόχων περιγράφονται παρακάτω.

1.4.2.1 In vitro καλλιέργεια φυτικών κυττάρων και αναγέννηση φυτών

Ορισμένα απομονωμένα σωματικά φυτικά κύτταρα μπορούν να καλλιεργηθούν *in vitro* και είναι ικανά να πολλαπλασιαστούν και να οργανωθούν σε ιστούς και τελικά σε πλήρη φυτά. Η διαδικασία της αναγέννησης ολόκληρων φυτών από φυτικά κύτταρα καλείται *in vitro* αναγέννηση. Οι τρεις παράγοντες που επηρεάζουν την αναγέννηση του φυτού είναι: ο γονότυπος, ο χρησιμοποιούμενος τύπος εκφύτου και οι συνθήκες καλλιέργειας, συμπεριλαμβανομένων των θρεπτικών μέσων καλλιέργειας και συνθηκών ανάπτυξης. Διαφορετικοί συνδυασμοί φυτικών ορμονών και άλλων χημικών ενώσεων χρησιμοποιούνται σε ποικίλες συγκεντρώσεις προκειμένου να επιτευχθεί η αναγέννηση των φυτών μέσω ιστοκαλλιέργειας. Καθώς οι ορμονικοί μηχανισμοί του φυτού δεν έχουν ακόμη κατανοηθεί πλήρως, η *in vitro* καλλιέργεια και οι μέθοδοι αναγέννησης, εξακολουθούν να βασίζονται σε μεγάλο βαθμό σε εμπειρική δοκιμή παραλλαγών των παραπάνω τριών αναφερόμενων παραγόντων. (Singh B.D., 2000; Καλτσίκης, 1989)

1.4.2.2 In vitro επιλογή και σωματοκλωνική παραλλακτικότητα

Τα φυτά που αναγεννώνται από ιστοκαλλιέργεια μπορεί να εμφανίζουν, σε ποικίλες συχνότητες, φαινότυπους που διαφέρουν από τα μητρικά φυτά. Το φαινόμενο αυτό κατά το οποίο η *in vitro* καλλιέργεια έχει ως αποτέλεσμα ποικιλομορφίας ονομάζεται «η σωμακλωνική παραλλακτικότητα». Αν αυτοί οι νέοι φαινότυποι προσδίδουν επιθυμητά αγρονομικά χαρακτηριστικά και ταυτόχρονα κληρονομούνται μπορούν να ενσωματωθούν σε προγράμματα Βελτίωσης. Ωστόσο η εύρεση ειδικών πολύτιμων γνωρισμάτων με την μέθοδο αυτή, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την τύχη και ως εκ τούτου είναι αναποτελεσματική. Αντίθετα, η *in vitro* επιλογή στοχεύει σε ειδικά χαρακτηριστικά, υποβάλλοντας μεγάλο πληθυσμό καλλιεργημένων κυττάρων στη δράση ενός επιλεκτικού παράγοντα στο τρυβλίο Petri. Με σκοπό την επίτευξη ανθεκτικότητας σε κάποια ασθένεια, η επιλογή αυτή μπορεί να παρέχεται από παθογόνα, ή από απομονωμένες παθοτοξίνες που είναι γνωστό ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση. Η επιλογή θα επιτρέψει μόνο στα ανθεκτικά κύτταρα να επιβιώσουν και να πολλαπλασιαστούν. Η επιλογή των κυττάρων παίζει επίσης έναν σημαντικό ρόλο στον τομέα της γενετικής μηχανικής, όπου ειδικά γονίδια αναφοράς χρησιμοποιούνται για την επιλογή των διαγονιδιακών κυττάρων. (Singh B.D., 2000; Καλτσίκης, 1989)

1.4.2.3 Σύντηξη πρωτοπλαστών

Η κυτταρική σύντηξη αναπτύχθηκε μετά την επιτυχή καλλιέργεια ενός μεγάλου αριθμού φυτικών κυττάρων από τα οποία είχαν αφαιρεθεί τα κυτταρικά τους τοιχώματα. Τα προκύπτοντα κύτταρα, χωρίς τα κυτταρικά τοιχώματα, αναφέρονται ως πρωτοπλάστες. Δεδομένου ότι οι πρωτοπλάστες μπορούν να συντηκονται και από φυλογενετικώς μη συγγενή είδη, έχουν γίνει προσπάθειες για να ξεπεραστεί η γενετική ασυμβατότητα χρησιμοποιώντας τη σύντηξη των πρωτοπλαστών. Στις περισσότερες περιπτώσεις, αυτές οι προσπάθειες απέτυχαν λόγω της αδυναμίας ανάπτυξης και διαίρεσης κυττάρων που είχαν ήδη συντηχθεί. Επιτυχείς συντήξεις μεταξύ γενετικά ασύμβατων ειδών πετούνιας και μεταξύ πατάτας και ντομάτας δεν οδήγησε σε προϊόντα με οικονομικό ενδιαφέρον, ωστόσο συνεισέφεραν στην κατανόηση της αναγέννησης των κυτταρικών τοιχωμάτων και άλλων μηχανισμών. (Singh B.D., 2000; Καλτσίκης, 1989)

1.4.3 Γενετική Μηχανική

Η γενετική μηχανική είναι ένας όρος που χρησιμοποιείται για τον κατευθυνόμενο χειρισμό των γονιδίων, όπως π.χ. η μεταφορά γονιδίων μεταξύ οργανισμών ή οι αλλαγές στην αλληλουχία ενός γονιδίου. Άλλες μέθοδοι συναφείς με αυτό το πεδίο είναι αυτές οι οποίες χρησιμοποιούν

γονίδια ή ειδικές αλληλουχίες για αναλύσεις προσδιορισμού της γονιδιακής λειτουργίας (Λειτουργική Γονιδιωματική) καθώς και άλλες μοριακές αναλύσεις.

1.4.3.1 Μεταφορά γονιδίων

Στη συμβατική βελτίωση, η δεξαμενή των διαθέσιμων γονιδίων και τα χαρακτηριστικά που κωδικοποιούν είναι περιορισμένα λόγω ταξινομικών εμποδίων που καθιστούν αδύνατες τις διασταυρώσεις με διαφορετικά καλλιεργούμενα είδη ή/και με άγρια συγγενικά είδη. Ο περιορισμός αυτός μπορεί να ξεπεραστεί με τη χρήση των μεθόδων της γενετικής μηχανικής, η οποία κατ' αρχήν επιτρέπει την εισαγωγή πολύτιμων γνωρισμάτων που κωδικοποιούνται από συγκεκριμένα γονίδια οποιουδήποτε οργανισμού (άλλα φυτά, βακτήρια, μύκητες, ζώα, ιούς) στο γονιδίωμα του κάθε φυτού. Τα πρώτα πειράματα μεταφοράς γονιδίων σε φυτά πραγματοποιήθηκαν στις αρχές του 1980. Κανονικά, τα διαγονίδια εισάγονται στο πυρηνικό γονιδίωμα ενός φυτικού κυττάρου. Πρόσφατα έχει καταστεί δυνατή η εισαγωγή γονιδίων στο γονιδίωμα των χλωροπλαστών και άλλων πλαστιδίων (μικρά οργανίδια των φυτικών κυττάρων τα οποία διαθέτουν ένα ξεχωριστό γονιδίωμα).

Διαγονιδιακά φυτά έχουν ληφθεί με τη μεταφορά γονιδίων μέσω του φορέα *Agrobacterium* καθώς και με απευθείας μεταφορά DNA και με σύγχρονες μεθόδους μεταφοράς, όπως ο βομβαρδισμός μικροσωματιδίων, η ηλεκτροπόρωση και η εφαρμογή πολυαιθυλενικής γλυκόλης. Η πλειοψηφία των φυτών έχουν μετασχηματιστεί χρησιμοποιώντας το φορέα *Agrobacterium*. (Singh B.D., 2000; Καλτσίκης, 1989)

1.4.3.2 Μεταφορά γονιδίων μέσω του *Agrobacterium*

Η τεχνική μετασχηματισμού μέσω του *Agrobacterium* περιλαμβάνει το φυσικό σύστημα μεταφοράς γονιδίων στα φυτά που υφίσταται στα παθογόνα βακτήρια του γένους *Agrobacterium*. Στη φύση, το *Agrobacterium tumefaciens* και το *Agrobacterium rhizogenes* είναι υπεύθυνα για τις ασθένειες του κορονωτού κάλλου και των ριζικών τριχιδίων, αντίστοιχα. Η χρησιμότητα του *Agrobacterium* ως ένα σύστημα μεταφοράς γονιδίων αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά, όταν αποδείχθηκε ότι αυτές οι ασθένειες των φυτών πράγματι παράγονταν ως αποτέλεσμα της μεταφοράς και της ενσωμάτωσης γονιδίων από τα βακτήρια εντός του γονιδιώματος του φυτού. Και τα δύο είδη *Agrobacterium* μεταφέρουν ένα μεγάλο πλασμίδιο (μικρό κυκλικό μόριο DNA) που ονομάζεται Ti στο *A. tumefaciens* και Ri στο *A. rhizogenes*. Ένα τμήμα αυτού του πλασμιδίου, που χαρακτηρίζεται ως T-DNA, μεταβιβάζεται από το βακτήριο σε μεμονωμένα φυτικά κύτταρα, συνήθως μέσα στον τραυματισμένο ιστό. Το τμήμα T-DNA διαπερνά τον πυρήνα του φυτικού κυττάρου και ενσωματώνεται τυχαία μέσα στο γονιδίωμα

όπου ενσωματώνεται σταθερά και κληρονομείται όπως και κάθε άλλο γονίδιο του φυτού με τον προβλέψιμο, κυρίαρχο τρόπο που περιγράφηκε από τον Mendel. Η έκφραση των γονιδίων που φυσιολογικά εδράζουν στο T-DNA οδηγεί στη σύνθεση προϊόντων που κατευθύνουν τις προαναφερθείσες μορφολογικές αλλαγές, δηλαδή τον όγκο ή το σχηματισμό ριζικών τριχιδίων.

Στη γενετική μηχανική, τα γονίδια ογκογένεσης που εδράζουν στην T-DNA περιοχή και που προκαλούν την ασθένεια των φυτών, απομακρύνονται και αντικαθίστανται από ξένα γονίδια. Αυτά τα γονίδια ενσωματώνονται σταθερά στο γονιδίωμα του φυτού μετά τη μόλυνση με το γενετικά τροποποιημένο στέλεχος του *Agrobacterium*, όπως ακριβώς συμβαίνει και στο φυσικό T-DNA. Επειδή όλα τα γονίδια που προκαλούν όγκο έχουν απομακρυνθεί, η μεταφορά γονιδίου δεν επάγει κανένα σύμπτωμα της ασθένειας. Αυτή η αξιόπιστη μέθοδος μεταφοράς γονιδίων είναι κατάλληλη για φυτά τα οποία είναι ξενιστές του *Agrobacterium*. Δυστυχώς, πολλά είδη, ιδίως οικονομικά σημαντικά όσπρια και μονοκοτυλήδονα όπως τα δημητριακά, δεν ανταποκρίνονται θετικά στο μετασχηματισμό μέσω του *Agrobacterium*. Για αυτά τα φυτά, πρέπει να εφαρμόζονται οι μέθοδοι άμεσης πρόσληψης DNA που περιγράφονται κατωτέρω. (Singh B.D., 2000; Καλτσίκης, 1989)

1.4.3.3 Βομβαρδισμός σωματιδίων

Η μέθοδος αυτή, που αναφέρεται επίσης ως βιοβαλιστικός μετασχηματισμός (από βιολογικά βαλλιστικά) περιλαμβάνει τη χρήση επιταχυνόμενων με μεγάλη ταχύτητα μικροσωματιδίων χρυσού ή βολφραμίου ώστε να διαπεράσουν τις εξωτερικές κυτταρικές στοιβάδες ή τα κυτταρικά τοιχώματα και να εισαχθούν μέσα στα κύτταρα. Τα μικροσωματίδια στην ουσία είναι σωματίδια ανενεργού υλικού, όπως βολφράμιο ή χρυσός (παρουσία αιθανόλης), καλυμμένα συνήθως από DNA ή άλλα βιομόρια, όπως RNA ή πρωτεΐνες. Τα σωματίδια διαπερνούν το τοίχωμα του φυτικού κυττάρου και ενσωματώνονται στο εσωτερικό του κυττάρου, όπου το DNA απελευθερώνεται, με αποτέλεσμα το μετασχηματισμό ενός μεμονωμένου κυττάρου του εκφύτου. Αυτή η τεχνική είναι γενικά λιγότερο αποτελεσματική από το μετασχηματισμό μέσω του *Agrobacterium*, αλλά είναι ιδιαίτερως χρήσιμη σε αρκετά είδη φυτών, κυρίως σε καλλιέργειες δημητριακών. Η εισαγωγή του DNA σε οργανωμένους, μορφογενετικούς ιστούς όπως οι σπόροι, τα έμβρυα ή τα μεριστώματα, επέτρεψε τον επιτυχή μετασχηματισμό και την αναγέννηση στο ρύζι, το σιτάρι, τη σόγια και τον αραβόσιτο, αποδεικνύοντας έτσι το τεράστιο δυναμικό αυτής της μεθόδου. (Singh B.D., 2000; Καλτσίκης, 1989)

1.4.3.4 Ηλεκτροπόρωση και απευθείας εισαγωγή DNA στους πρωτοπλάστες

Η ηλεκτροπόρωση είναι το φαινόμενο κατά το οποίο η μεμβράνη του κυττάρου που εκτίθεται σε μικρούς χρονικά παλμούς υψηλού ηλεκτρικού πεδίου, μπορεί παροδικά να αποσταθεροποιηθεί και να δημιουργήσει «μεμβρανικούς πόρους», οι οποίοι στη συνέχεια κλείνουν. Η εφαρμογή ηλεκτρικών παλμών επιτρέπει τη διάχυση των μακρομορίων, όπως το DNA, μέσα από τη φυσιολογικά αδιαπέρατη πλασματική μεμβράνη. Επειδή το φυτικό κυτταρικό τοίχωμα δεν επιτρέπει την αποτελεσματική διάχυση πολλών διαγονιδιακών κασετών, η μέθοδος καθίσταται αποτελεσματικότερη όταν η εφαρμογή λαμβάνει χώρα σε πρωτοπλάστες. Η απαίτηση αυτή παρουσιάζει ένα σημαντικό εμπόδιο για πολλές εφαρμογές, καθώς για πολλά φυτικά είδη δεν υπάρχουν τα κατάλληλα πρωτόκολλα ώστε να καταστεί δυνατή η αναγέννηση ολόκληρων φυτών από πρωτοπλάστες. .

1.4.3.5 Διαγονιδιακή έκφραση

Η επιτυχία του γενετικού μετασχηματισμού έγκειται αφενός μεν στην εισαγωγή του γονιδίου στο γονιδίωμα του φυτού και αφετέρου στην έκφραση αυτού, δηλαδή τη μετατροπή της DNA αλληλουχίας σε mRNA, μέσω της μεταγραφής, και στη συνέχεια τη σύνθεση της πρωτεΐνης, μέσω της μετάφρασης. Ένας προαγωγέας είναι μία αλληλουχία νουκλεϊκών οξέων στην μήτρα DNA, όπου προσδέεται η RNA-πολυμεράση (ένα ένζυμο που συνθέτει το μεταγραφικό mRNA). Η φύση του προαγωγέα καθορίζει (μαζί με άλλα ρυθμιστικά στοιχεία έκφρασης) τις συνθήκες και την ένταση με την οποία ένα γονίδιο θα μεταγραφεί. Ο προαγωγέας του γονιδίου 35S του ιού του μωσαϊκού του κουνουπιδιού χρησιμοποιείται πολύ συχνά στην γενετική μηχανική των φυτών. Αυτός ο προαγωγέας προσδίδει υψηλού επιπέδου έκφραση των εξωγενών γονιδίων στους περισσότερους τύπους κυττάρων. Δεδομένου ότι είναι συχνά πλεονέκτημα να εκφράζουν ένα διαγονίδιο μόνο σε ορισμένους ιστούς ή ποσότητες ή σε ορισμένες χρονικές περιόδους, ένας αριθμός άλλων προαγωγέων είναι διαθέσιμος, π.χ. προαγωγείς που επάγουν την έκφραση μετά από τραυματισμό ή μόνο κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των φρούτων.

Οι μέθοδοι μεταφοράς γονιδίων που χρησιμοποιούνται επί του παρόντος, καταλήγουν στην τυχαία ενσωμάτωση του ξένου DNA σε όλο το γονιδίωμα των δεκτικών κυττάρων. Το σημείο της ένθεσης μπορεί να έχει μία ισχυρή επίδραση στα επίπεδα έκφρασης του διαγονιδίου, ακόμη και εάν έχει χρησιμοποιηθεί η ίδια γονιδιακή κασέτα προαγωγέας/γονίδιο. Ο ακριβής μηχανισμός αυτού του φαινομένου δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητός. (Singh B.D., 2000; Καλτσίκης, 1989)

1.4.3.6 Επιλογή και αναγέννηση του φυτού

Σε ένα πείραμα μετασχηματισμού, η αναλογία των μετασχηματισμένων κυττάρων είναι συνήθως μικρή σε σχέση με τον αριθμό των μη τροποποιημένων κυττάρων. Προκειμένου να επιλεγούν μόνο κύτταρα στα οποία έχουν πράγματι ενσωματωθεί τα νέα γονίδια, μαζί με τα γονίδια που κωδικοποιούν το επιθυμητό γνώρισμα μεταφέρεται και ένα γονίδιο το οποίο επιτρέπει την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων, τα λεγόμενα γονίδια επιλογής. Η έκφραση του γονιδίου επιλογής επιτρέπει στα διαγονιδιακά κύτταρα να αναπτυχθούν παρουσία ενός επιλεκτικού παράγοντα, συνήθως ενός αντιβιοτικού ή ζιζανιοκτόνου, ενώ τα κύτταρα χωρίς το γονίδιο επιλογής νεκρώνονται. Ένα από τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα γονίδια επιλογής είναι το βακτηριακό γονίδιο αμινογλυκοσιδικής-3'-φωσφοτρανσφεράσης (APH (3') II), που αναφέρεται επίσης ως φωσφοτρανσφεράση της νεομυκίνης 11 (NPTII). Αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί ένα ένζυμο που αδρανοποιεί τα αντιβιοτικά καναμυκίνη, νεομυκίνη και G418 μέσω φωσφορυλίωσης. Εκτός από την NPTII, ένας αριθμός άλλων γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά έχει χρησιμοποιηθεί για επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων, π.χ. το γονίδιο της φωσφοτρανσφεράσης της υγρομυκίνης που προσδίδει ανθεκτικότητα στην υγρομυκίνη.

Μία άλλη ομάδα γονιδίων επιλογής είναι τα γονίδια ανθεκτικότητας στα ζιζανιοκτόνα. Ανθεκτικότητα στα ζιζανιοκτόνα έχει ληφθεί μέσω της ενσωμάτωσης και έκφρασης ενός γονιδίου το οποίο είτε αποτοξινώνει το ζιζανιοκτόνο με τρόπο παρόμοιο όπως τα προϊόντα των γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά ή μέσω ενός γονιδίου που εκφράζει ένα προϊόν το οποίο δρα όπως το ζιζανιοκτόνο-στόχος, αλλά δεν επηρεάζεται από το ζιζανιοκτόνο. Η ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα μπορεί όχι μόνο να χρησιμεύσει ως ένα χρήσιμο χαρακτηριστικό για την επιλογή κατά την ανάπτυξη των διαγονιδιακών φυτών, αλλά επιπλέον έχει και κάποιο εμπορικό ενδιαφέρον.

Ο μετασχηματισμός πρωτοπλαστών, κυττάρων και ιστών των φυτών στις περισσότερες περιπτώσεις είναι χρήσιμος μόνο εάν μπορεί να γίνει αναγέννηση ολόκληρων φυτών. Τα ποσοστά της αναγέννησης ποικίλουν σημαντικά όχι μόνο μεταξύ των διαφορετικών ειδών, αλλά και μεταξύ των ποικιλιών του ίδιου είδους. Σε πολλές περιπτώσεις, η αναγέννηση ολόκληρων φυτών από κύτταρα δεν είναι δυνατή ή είναι πολύ δύσκολη. Εκτός από τη δυνατότητα εισαγωγής ενός γονιδίου στο γονιδίωμα ενός φυτικού είδους, η αναγέννηση υγιών, γόνιμων φυτών από μετασχηματισμένα κύτταρα ή ιστούς αποτελεί τον πλέον περιοριστικό παράγοντα στην ανάπτυξη διαγονιδιακών φυτών. (Singh B.D., 2000; Καλτσίκης, 1989)

1.5 Βακτηριακή κηλίδωση - *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*

Η βακτηριακή κηλίδωση προκαλείται από βακτήρια που ανήκουν στην φθορίζουσα ομάδα των φυτοπαθογόνων ψευδομονάδων. Η ταξινόμηση αυτής της ομάδας εξακολουθεί να είναι άλυτη. Παλαιότερα, το βακτήριο που προκαλούσε τη βακτηριακή κηλίδωση περιγράφηκε ως ένα ξεχωριστό είδος, το *Pseudomonas tabaci* (Wolf & Foster) Stevens.

Το *P. syringae* pv. *tabaci* είναι ένα μη-καψιδιακό βακτήριο, το οποίο δεν σχηματίζει σπόρια, είναι Gram-αρνητικό, μη-οξυάντοχο, ράβδους μήκους 0,5 x 2-2.5 μm, με έξι διπολικά μαστίγια και παράγει μία πράσινη φθορίζουσα χρωστική ουσία στις καλλιέργειες, την καπνοτοξίνη, η οποία έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τη συνθετάση της γλουταμίνης και το επίπεδο της χλωροφύλλης. Αυτό οδηγεί σε χλώρωση του ιστού πριν από τη νέκρωση και τη χλωρωτική άλω που παράγεται γύρω από τα σημεία προσβολής κατά την ασθένεια της βακτηριακής κηλίδωσης.

Οι αποικίες που σχηματίζονται κατά την *in vitro* καλλιέργεια του βακτηρίου είναι τυπικά λευκές, ελαφρώς αυξημένες και έχουν μία ημιδιαφανή άκρη με ένα αδιαφανές κέντρο. Τα προϊόντα απομονώσεων γενικά χάνουν την παθογένειά τους γρήγορα μετά από επαναλαμβανόμενη μεταφορά στην καλλιέργεια, αλλά διατηρούν την παθογένειά τους μέσω συχνών εμβολιασμών και επαναπομονώσεων στον καπνό. Το βακτήριο μπορεί να αποθηκευθεί για μεγάλες χρονικές περιόδους σε αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό για να διατηρηθεί η μολυσματικότητα ενός πρωτότυπου προϊόντος απομόνωσης.

1.5.1 Βακτηριακή κηλίδωση - Συμπτώματα

Η βακτηριακή κηλίδωση και η γωνιακή κηλίδα φύλλου είναι παρόμοιες βακτηριακές ασθένειες που χαρακτηρίζονται από την παρουσία μιας κίτρινης άλους γύρω από τις κηλίδες των φύλλων στην πρώτη και στην απουσία μιας τέτοιας άλους στη δεύτερη. Η ασθένεια περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1917 στη Βόρεια Καρολίνα, αν και πολλές αναφορές δείχνουν ότι είχε παρατηρηθεί νωρίτερα και σε άλλες χώρες. Αυτές οι ασθένειες έχουν αναφερθεί με διάφορα ονόματα και είναι γνωστές σε όλες σχεδόν τις περιοχές παραγωγής καπνού του κόσμου. Σοβαρές εστίες, κυρίως της βακτηριακής κηλίδωσης, εμφανίστηκαν σποραδικά στις Ηνωμένες Πολιτείες κατά το πρώτο μισό αυτού του αιώνα, αλλά η εισαγωγή ποικιλιών με ανθεκτικότητα στην ασθένεια το 1950, επέφερε τόσο σημαντική μείωση της συχνότητας εμφάνισης της ασθένειας όσο και των προκαλούμενων απωλειών.

Τα συμπτώματα της βακτηριακής κηλίδωσης είναι τυπικά των ασθενειών κηλίδωσης των φύλλων που προκαλούνται από βακτήρια. Οι κηλίδες είναι στην αρχή υδατώδεις, αργότερα γίνονται νεκρωτικές, μαυρίζουν ή γίνονται μαύρες κατά την ξήρανση και έχουν γωνιακά περιθώρια. Οι κηλίδες της βακτηριακής κηλίδωσης περιβάλλονται από χλωρωτική άλω,

πλάτους έως 2.5 cm. Μεμονωμένες νεκρώσεις κυμαίνονται σε διάμετρο από 1 - 8 χιλιοστά, ενώ κηλίδες μπορούν να συνενώνονται, σχηματίζοντας πολύ μεγαλύτερες νεκρές περιοχές πάνω στα φύλλα. Η βακτηριακή κηλίδωση είναι η πιο σοβαρή από τις δύο ασθένειες, ικανή να προκαλέσει τη νέκρωση των νεαρών δενδρυλλίων. Τα κρούσματα των ασθενειών στα αναπτυσσόμενα φύλλα καταλήγουν σε παραμόρφωση και συστροφή των φύλλων, καθώς οι υγιείς ιστοί των φύλλων συνεχίζουν να επεκτείνονται γύρω από τις πληγείσες περιοχές. Σε μεταγενέστερα στάδια, τα μολυσμένα φύλλα έχουν μία τραχιά και φθαρμένη εμφάνιση όπου ο μολυσμένος ιστός αποκολλάται συχνά από το κυρίως έλασμα και αποπίπτει ως αποτέλεσμα δημιουργίας αφοριστικού ιστού. Οι δύο ασθένειες είναι πιο πιθανό να συμβούν σε φυτώρια, ιδιαίτερα κατά τις βροχερές περιόδους ή σε σπορεία που ποτίζονται συχνά, από ό, τι στο χωράφι. Η ασθένεια αναπτύσσεται συχνά σε περιοχές έντονης προσβολής, σε εντοπισμένες περιοχές κοντά στην αρχική εστία μόλυνσης. Και οι δύο ασθένειες είναι ικανές να αναπτυχθούν σε καλλιέργειες καπνού στο χωράφι, ιδιαίτερα κατά τις περιόδους ισχυρών βροχών που συνοδεύονται από εξίσου ισχυρούς ανέμους. Σοβαρά προσβεβλημένα φύλλα παραμορφώνονται και αποκτούν μικρή αξία.

Στα σπορεία, τα φύλλα αναπτύσσουν περιφερειακές υγρές σήψεις, που επεκτείνονται και καλύπτουν όλη τη φυλλική επιφάνεια. Μερικά φυτά μπορεί να νεκρωθούν στο σπορείο ή αμέσως μετά τη μεταφύτευσή τους. Στον αγρό, τα φύλλα αναπτύσσουν κηλίδες αρχικά χλωρωτικές και αργότερα νεκρωτικές που μεγαλώνουν ταχέως με αποτέλεσμα την πτώση τμημάτων των φύλλων σε υγρό καιρό. Το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* διαχειμάζει στο έδαφος, σε υπολείμματα των φυτών και στο σπόρο. Από εκεί μεταφέρεται στα φύλλα κυρίως με τις σταγόνες της βροχής, με τον άνεμο, ή κατά το χειρισμό των φυτών. Υψηλή σχετική υγρασία ή ύπαρξη λεπτού στρώματος νερού είναι απαραίτητα για να εμφανισθούν μολύνσεις και για την ανάπτυξη επιδημιών. Τα βακτήρια εισέρχονται στα φύλλα από τα στομάτια, τα υδατώδη καθώς και από τις πληγές και πολλαπλασιάζονται, με αποτέλεσμα την εκδήλωση των συμπτωμάτων.

1.5.2 Ο κύκλος και η επιδημιολογία της ασθένειας

Η ασθένεια συχνά παρατηρείται σε φυτώρια μετά από περιόδους υγρού καιρού. Εστίες αποτελούν τα εργοστάσια απορριμμάτων καπνού από ήδη μολυσμένα φυτά και πιθανόν από μολυσμένο σπόρο. Οι παθογόνοι οργανισμοί έχουν επίσης ανακτηθεί από φυσικά μολυσμένες τσουκνίδες (*Polygonum hydropiper* L.), καψέλλα (*Capsella Bursa-pastoris* (L.) Medik), στύφνο (*Solanum nigrum* L.), μουχρίτσα (*Echinochloa crusgalli* (L.) P.Beauv.) και πικραλίδα (*Taraxacum officinale* Wigg.) και από τις ρίζες των φυτών σίκαλη, σιτάρι, και κριθάρι. Το *P. syringae* pv. *tabaci* έχει απομονωθεί στην Καλιφόρνια από το έδαφος κατά πάσα πιθανότητα, ενώ ποτέ δεν έχει απομονωθεί από τον καπνό.

Εξάπλωση των βακτηρίων εμφανίζεται όταν υπάρχει κίνηση του ύδατος από μία πηγή των βακτηρίων σε φυτά καπνού. Αυτό συμβαίνει όταν τα επιφανειακά ύδατα διακινούνται, μεταφέροντας τα βακτηριακά μολύσματα από τις μολυσμένες στις μη-μολυσμένες περιοχές, ή όταν οι βροχοπτώσεις ή γενικά οι σταγόνες του νερού άρδευσης μεταφέρουν τα βακτήρια από το έδαφος σε φύλλα καπνού στο σπορείο ή στο χωράφι. Η εξάπλωση από φύλλο σε φύλλο ή από φυτό σε φυτό λαμβάνει χώρα κυρίως κατά τη διάρκεια των βροχοπτώσεων που συνοδεύονται και από αέρα, αλλά και κατά τις μεταχειρίσεις των φυτών υπό συνθήκες υψηλής υγρασίας.

Τα βακτήρια εισέρχονται εντός των φύλλων άλλοτε δια μέσου των στοματίων του φύλλου και άλλοτε μέσω των πηγών. Το νερό διαβροχής των ιστών των φύλλων διευκολύνει σε μεγάλο βαθμό την εντός των φύλλων διακίνηση των βακτηρίων και τη μετέπειτα ανάπτυξή τους. Ένας αριθμός παραγόντων, όπως οι καταιγίδες που συνοδεύονται από ισχυρούς ανέμους, κατά τις οποίες το νερό διαχέεται με φυσικό τρόπο στα μεσοκυττάρια διαστήματα των φύλλων αυξάνουν τη σοβαρότητα της ασθένειας. Ωστόσο, οι ασθένειες εμφανίζονται επίσης κατά τη διάρκεια λιγότερο δραστικών συνθηκών. Νερό διαβροχής εμφανίζεται φυσικά σε περιόδους υψηλής ατμοσφαιρικής και εδαφικής υγρασίας και απαλής βροχής (ή συχνή άρδευση) και ευνοείται από τις υψηλές συγκεντρώσεις αζώτου και χαμηλής λίπανσης καλίου. Μερικές φορές στο εσωτερικό των υδατωδών φύλλων τα βακτήρια πολλαπλασιάζονται γρήγορα, άλλες εκκρέουν από νεκρωτικό ιστό όταν είναι υγρός και εξαπλώνονται κατά τη βροχή και την άρδευση μέσω των αυλάκων ή μέσω τεχνητής βροχής ή ακόμα και μέσω της στάγδην άρδευσης.

1.5.3 Αντιμετώπιση

Η αντιμετώπιση της βακτηριακής κηλίδωσης απαιτεί πρακτικές υγιεινής, ανθεκτικότητα του ξενιστή και χημική προστασία. Κανένα από τα μέτρα αυτά αν χρησιμοποιείται μόνο του δεν μπορεί να επιτύχει ικανοποιητική διαχείριση και των δύο ασθενειών. Η εξυγίανση μειώνει το αρχικό υλικό εμβολιασμού, αλλά δεν το εξαλείφει τελείως. Η ανθεκτικότητα που υπάρχει σήμερα είναι αποτελεσματική ενάντια στη βακτηριακή κηλίδωση. Οι χημικοί έλεγχοι μειώνουν την ανάπτυξη της ασθένειας στο φυτώριο, αλλά δεν εξαλείφουν τον παθογόνο παράγοντα, ενώ η χρήση των χημικών προϊόντων δεν είναι πρακτική για το χωράφι.

Προκειμένου να καταπολεμηθεί το βακτήριο συνιστώνται τα ακόλουθα μέτρα:

1. Χρησιμοποίηση ανθεκτικών ποικιλιών (όπου είναι εφικτό).
2. Σπορά υγιούς σπόρου με εφαρμογή επιφανειακής απολύμανσης.
3. Απολύμανση του εδάφους του σπορείου πριν από τη σπορά.

4. Χρήση χαλκούχων για την προστασία των φυταρίων.
5. Απομάκρυνση ασθενών φυτών από το σπορείο και μεταφύτευση μόνο υγιών στον αγρό.
6. Αποφυγή υπερβολικής λιπάνσεως.

Πρέπει να καταβληθεί κάθε δυνατή προσπάθεια για να αποφευχθεί μόλυνση του φυτωρίου από το βακτήριο. Ιδανικά, πρέπει να εφαρμόζεται αμειψισπορά κάθε χρόνο και να αποφεύγεται η καλλιέργεια σε περιοχές όπου τα επιφανειακά ύδατα μπορεί να μολύνουν τις καλλιέργειες. Οι αύλακες θα πρέπει να παρέχονται γύρω από τους τόπους του φυτωρίου για την πρόληψη της μόλυνσης από επιφανειακή απορροή. Η εργασία στο σπορείο, όταν τα φυτά είναι βρεγμένα θα πρέπει να αποφεύγεται, καθώς αυτό διευκολύνει την εξάπλωση των βακτηρίων.

Επί του παρόντος, πολλές ποικιλίες τύπου burley που καλλιεργούνται στις Ηνωμένες Πολιτείες είναι ανθεκτικές στην βακτηριακή κηλίδωση. Για την ανθεκτικότητα στην βακτηριακή κηλίδωση ευθύνεται ένα κυρίαρχο γονίδιο που προέρχεται από το *N. longiflora*. Είναι γνωστά τα στελέχη του βακτηρίου της ασθένειας αυτής, τα οποία καταπολεμούν αυτή την πηγή ανθεκτικότητας.

Η βακτηριακή κηλίδωση μπορεί να αντιμετωπιστεί με προληπτικούς χειρισμούς είτε με bluestone-lime (μίγμα Bordeaux) ή με στρεπτομυκίνη.

1.6 Σκοπός της εργασίας

Το γονίδιο *HraA*, που προέρχεται από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *X. campestris* pv. *campestris*, έχει αναγνωρισθεί ως παράγοντας παθογένειας που σχετίζεται την ανάπτυξη συμπτωμάτων ασθένειας σε ευαίσθητα φυτά και την επαγωγή της αντίδρασης υπερευαισθησίας σε ανθεκτικά φυτά και έχει χαρακτηριστεί ως ρυθμιστής έκκρισης πρωτεϊνών του εκκριτικού συστήματος τύπου III. Παράλληλα έχει χαρακτηριστεί και ως πρωτεΐνη-τελεστής, δεδομένου ότι μεταφέρεται και δρα εντός του πυρήνα του φυτικού κυττάρου, με άγνωστη έως τώρα λειτουργία. Στο πλαίσιο αυτό, η μελέτη της δράσης του *HraA* σε ετερόλογο σύστημα αναφοράς μπορεί να παρέχει χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με την αδιευκρίνιστη έως τώρα λειτουργία του και κατ' επέκταση την εν δυνάμει αξιοποίησή του στη βελτίωση της ανθεκτικότητας των φυτών έναντι βιοτικών καταπονήσεων.

Η παρούσα εργασία εντάσσεται σε ένα ευρύτερο ερευνητικό πλαίσιο όπως περιγράφεται ανωτέρω και έχει ως στόχο τη δημιουργία διαγονιδιακών φυτών που φέρουν το γονίδιο *HraA*, προκειμένου να μελετηθεί η επίδρασή του στο φυτό μοντέλο *Nicotiana benthamiana* και υπό συνθήκες βιοτικής καταπόνησης με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Δεδομένου

ότι ο σταθερός μετασχηματισμός αποτελεί χρονοβόρα και δύσκολη διαδικασία, πραγματοποιήθηκαν παράλληλα πειράματα παροδικού μετασχηματισμού σε ρίζες ζαχαρότευτλου, ως προκαταρκτική μελέτη αξιολόγησης της δράσης του εν λόγω γονιδίου.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Μετασχηματισμός των *Beta vulgaris* φυτών

Ο μετασχηματισμός ζαχαρότευτλων εφαρμόστηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφηκε από τους Pavli & Skaracis (2011).

2.1.1 Βιολογικά Υλικά

A. Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια

Για τα πειράματα γενετικής τροποποίησης στο ζαχαρότευτλο χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος R1000 του *Agrobacterium rhizogenes*. Το βακτηριακό στέλεχος έφερε το υπό μελέτη γονίδιο *HraA*, μεγέθους 866bp, το οποίο απομονώθηκε από το βακτήριο *Xanthomonas campestris pv campestris* και κλωνοποιήθηκε στο φορέα pK7WG2D (Gateway), υπό τον έλεγχο του προαγωγέα CaMV35S, από την Γ. Κελαϊδή (Υποψήφια Διδάκτορα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών). Το αντιβιοτικό επιλογής για τις μετασχηματισμένες ρίζες του ζαχαρότευτλου ήταν η καναμυκίνη σε συγκέντρωση 150 mg/l.

B. Φυτικό Υλικό

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα γενετικού μετασχηματισμού του ζαχαρότευτλου ήταν οι εμπορικές ποικιλίες Αλεξάνδρα και Πανδώρα που δημιουργήθηκαν στα πλαίσια βελτιωτικών προγραμμάτων της Ελληνικής Βιομηχανίας Ζάχαρης. Η ποικιλία Αλεξάνδρα είναι διπλοειδές, μονόσπερμο υβρίδιο (EU Common Variety Catalogue, ed. 27, E297A/20-11-2008). Η Αλεξάνδρα είναι υψηλοαποδοτική ποικιλία που χαρακτηρίζεται από υψηλή ανθεκτικότητα στην κερκόσπορα και ευαισθησία στη ριζομανία. Η Πανδώρα είναι υβρίδιο που χαρακτηρίζεται από υψηλή αποδοτικότητα και ανθεκτικότητα στη ριζομανία.

2.1.2 Πειραματική Διαδικασία

A. Στάδιο Απολύμανσης (διάρκειας 30 λεπτών)

Αρχικά τοποθετούνται περίπου 100 σπόροι σε αποστειρωμένα Falcon, προστίθεται 20% χλωρίνη και αναδεύονται για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, μεταφέρονται σε άλλο αποστειρωμένο Falcon μαζί με 100ml αποστειρωμένο νερό για να ξεπλυθούν από τα υπολείμματα της χλωρίνης. Η διαδικασία έκπλυσης των σπόρων επαναλαμβάνεται 4 φορές. Η διαδικασία της

απολύμανσης των σπόρων ολοκληρώνεται με τη μεταφορά τους σε αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί για απομάκρυνση της πλεονάζουσας υγρασίας έως τη χρήση τους.

B. Στάδιο εκβλάστησης σπόρων (διάρκειας 7-10 ημερών)

Η εκβλάστηση των σπόρων πραγματοποιείται *in vitro* σε τρυβλία petri (περίπου 10 στο καθένα) που περιέχουν 20mL θρεπτικό υπόστρωμα βλάστησης (Germination Medium: 1xMS βασικών αλάτων, 3% σακχαρόζη και 5gr/lit άγαρ). Οι σπόροι παραμένουν στα τρυβλία σε θάλαμο ανάπτυξης ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασίας 21-23°C και 16/8 ώρες φωτοπερίοδο) για μία περίπου εβδομάδα.

Γ. Στάδιο προετοιμασίας υλικού εμβολιασμού (διάρκειας 3 ημερών)

Τρεις ημέρες πριν τον εμβολιασμό των εκφύτων, ξεκινάει η προετοιμασία του βακτηριακού μολύσματος. Σε πρώτη φάση, επιστρώνονται τα βακτήρια από stock γλυκερόλης στην επιφάνεια των τρυβλίων που περιέχουν LB μαζί με τα κατάλληλα αντιβιοτικά επιλογής και επώάζονται στους 30°C για μία ημέρα. Έπειτα, γίνεται επιλογή μιας μοναδικής αποικίας, η οποία διαλύεται σε 1mL υγρού LB μέσου, προσθέτοντας τα κατάλληλα αντιβιοτικά επιλογής, ενώ στη συνέχεια αφήνονται για επώαση υπό ήπια ανάδευση στους 30°C για μία μέρα. Ύστερα, γίνεται επίστρωση 200mL από το βακτηριακό εναιώρημα σε 2 νέα τρυβλία επιλογής και επώαση στους 30°C για 16-18 ώρες. Μετά την επώαση, έχει σχηματιστεί ένα βακτηριακό στρώμα, το οποίο χρησιμοποιείται ως υλικό εμβολιασμού στα πειράματα γενετικού μετασχηματισμού των φυτών ζαχαρότευτλου.

Δ. Στάδιο επαγωγής ριζικών τριχιδίων (διάρκειας 2-3 εβδομάδων)

Από τα νεαρά φυτάρια που έχουν αναπτυχθεί *in vitro*, γίνεται επιλογή των πιο εύρωστων και πιο υγιών, προκειμένου να εμβολιαστεί το υποκοτύλιο από όπου θα εκπτυχθούν τα μετασχηματισμένα ριζικά τριχίδια. Με τη βοήθεια ενός αποστειρωμένου νυστεριού, πραγματοποιείται τομή στο υποκοτύλιο και αφαιρείται το υπόγειο τμήμα του. Το υποκοτύλιο εμβαπτίζεται στη βακτηριακή καλλιέργεια και τα έκφυτα τοποθετούνται σε τετράγωνα τρυβλία petri που περιέχουν θρεπτικό υπόστρωμα συγκαλλιέργειας (Co-Cultivation Medium), συνιστώμενο από 1/2 MS βασικών αλάτων, 3% σακχαρόζη και 9gr/lit άγαρ, πάνω σε αποστειρωμένο χαρτί που τα σκεπάζει πάνω-κάτω στο μισό του μήκους τους. Τα τρυβλία σφραγίζονται με parafilm και μεταφέρονται κάθετα στο θάλαμο επώασης στους 21-23°C για 2-5 μέρες. Αφού ολοκληρωθεί η φάση της συγκαλλιέργειας, τα φυτάρια μεταφέρονται σε νέα

τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα επαγωγής των ριζικών τριχιδίων (Emergence Medium, συνιστώμενο από 1/2 MS με βιταμίνες και MES, 2% σουκρόζη, 9 gr/lit άγαρ, 150mg/lit καναμυκίνη και 250mg/lit σεφοταξίμη) ανά 15 ημέρες. Η σεφοταξίμη είναι αντιβιοτικό, υπεύθυνο για την καταστολή της ανάπτυξης του βακτηρίου καθώς και για την προώθηση της ανάπτυξης των ριζικών τριχιδίων, ενώ η καναμυκίνη λειτουργεί ως αντιβιοτικό επιλογής των μετασηματισμένων ριζικών τριχιδίων. Κατά τη μεταφορά των φυταρίων, τα αποστειρωμένα διηθητικά χαρτιά αντικαθίστανται με καινούρια, τα τρυβλία κλείνονται με parafilm και τοποθετούνται εκ νέου κάθετα στο θάλαμο επώασης, όπου χρήζουν τακτικής παρακολούθησης για την διαπίστωση της ανάπτυξης ριζικών τριχιδίων. Μετά από 15 μέρες, τα έκφυτα μεταφέρονται σε φρέσκο θρεπτικό μέσο. Σε αυτό το στάδιο, τα ριζικά τριχίδια έχουν αποκτήσει μήκος περίπου 4cm.

2.1.3 Έλεγχος για την ένθεση του διαγονιδίου

A. Απομόνωση DNA για εφαρμογή της PCR

Η απομόνωση DNA των μετασηματισμένων ριζών ζαχαροτεύτλου πραγματοποιήθηκε με το FTA card kit pK1 (Whatman), με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή. Κατά την πρώτη φάση έγινε σύνθλιψη των διαγονιδιακών ριζών πάνω σε αποστειρωμένο απορροφητικό χαρτί Whatman και στη συνέχεια λήψη των δειγμάτων, τα οποία και μεταφέρθηκαν σε tubes της PCR. Κατόπιν, διεξήχθησαν δύο πλύσεις με 50μL FTA διάρκειας 10 λεπτών η κάθε μία και έπειτα δύο επιπλέον πλύσεις με 20μL TE διάρκειας 5 λεπτών η κάθε μία. Κατά το τελικό στάδιο, αφαιρέθηκε το TE ρυθμιστικό διάλυμα και τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν απευθείας ως μήτρα για την ενίσχυση του επιθυμητού γονιδίου μέσω PCR αντίδρασης.

B. Εφαρμογή της PCR στο DNA που απομονώθηκε από τις διαγονιδιακές ρίζες

Το μείγμα της PCR αποτελείται από: 1x ρυθμιστικού διαλύματος, 1mM MgCl₂, 5mM μείγματος dNTPs, 10pmoles από τον κάθε εκκινητή, 1,5u Taq πολυμεράση και νερό έως τελικού όγκου του μείγματος 20μL. Το μείγμα τοποθετήθηκε απευθείας στα tubes της PCR, όπου απομονώθηκε το DNA των ριζών με τη διαδικασία που περιγράφηκε προηγουμένως και η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις ρυθμίσεις του **Πίνακα 2.1**:

Πίνακας 2.1 Συνθήκες PCR για την ενίσχυση του διαγονιδίου *HpaA* σε μετασηματισμένες ρίζες ζαχαρότευτλου

	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	94	5 min	1
Αποδιάταξη αλυσίδων	94	30sec	30
Υβριδισμός Εκκινητών	50	1min	
Ενίσχυση αλληλουχιών	72	1min	
Τελική Ενίσχυση	72	7min	1

Γ. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR από τις διαγονιδιακές ρίζες ζαχαρότευτλου

Ο έλεγχος των προϊόντων της PCR διενεργήθηκε μετά από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτική αгарόζης 1%, σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE (1X). Για τη χρώση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε βρωμιούχο αιθίδιο 1%, ενώ για τον έλεγχο του μεγέθους των ζωνών χρησιμοποιήθηκε ο 100bp DNA Ladder (Biolabs). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 90Volts για 1 ώρα.

2.2 Μετασχηματισμός των *Nicotiana benthamiana* φυτών

Ο σταθερός μετασχηματισμός των φυτών καπνού *Nicotiana benthamiana* εφαρμόστηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Horsh *et al.* (1995).

2.2.1 Βιολογικό Υλικό

A. Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια

Ο σταθερός μετασχηματισμός των φυτών καπνού πραγματοποιήθηκε αξιοποιώντας το βακτηριακό στέλεχος GV3101 του *Agrobacterium tumefaciens* για το γονίδιο *HpaA*, μεγέθους 866bp. Το γονίδιο απομονώθηκε από το βακτήριο *Xanthomonas campestris pv campestris* και κλωνοποιήθηκε στο φορέα pK7WG2D (Gateway), υπό τον έλεγχο του προαγωγέα CaMV35S, από την Γ. Κελαϊδή (Υποψήφια Διδάκτορα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών).

Τα αντιβιοτικά επιλογής των μετασχηματισμένων βακτηρίων για το στέλεχος GV3101 του *Agrobacterium tumefaciens* ήταν η σπεκτινομυκίνη 50mg/lit, η ριφαμυκίνη 30mg/lit και η γκενταμυκίνη 25mg/lit, ενώ ως αντιβιοτικό επιλογής για το μετασχηματισμό των φυτών καπνού χρησιμοποιήθηκε η καναμυκίνη σε συγκέντρωση 150mg/lit.

B. Φυτικό υλικό

Ως φυτικό υλικό, χρησιμοποιήθηκαν φυτά του άγριου είδους *Nicotiana benthamiana*, τα οποία αναπτύχθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών για δύο μήνες. Επιλέχθηκαν τα πιο εύρωστα φυτά που είχαν αναπτύξει 3 – 5 πλήρως ανεπτυγμένα πραγματικά φύλλα.

2.2.2. Πειραματική Διαδικασία

A. Προετοιμασία εκφύτων

Η απολύμανση του φυτικού υλικού πραγματοποιήθηκε σε τράπεζα νηματικής ροής υπό ασηπτικές συνθήκες, με τη χρήση αποστειρωμένων διαλυμάτων και σκευών. Τα νεαρά φύλλα εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα χλωρίνης 20% υπό ανάδευση για 5 περίπου λεπτά. Στη συνέχεια, έγινε έκπλυση των φύλλων τέσσερις φορές με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό όπου και διατηρήθηκαν μέχρι τη χρήση τους.

B. Προετοιμασία βακτηριακού μολύσματος

Το στελέχος του *A. tumefaciens* που χρησιμοποιήθηκε για το εμβολιασμό των εκφύτων καπνού ήταν το GV3101 για τη μεταφορά του γονιδίου *HraA*.

Για τη διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν βακτηριακές καλλιέργειες, οι οποίες προκύπτουν από stocks γλυκερόλης που βρίσκονται στους -80°C και παρασκευάζονται 3 μέρες πριν την έναρξη του πειράματος. Βακτηριακά κύτταρα του στελέχους που έφεραν το γονίδιο *HraA*, επιστρώθηκαν σε στέρεο LB μέσο με τα κατάλληλα αντιβιοτικά επιλογής και αφέθηκαν για επώαση στους 28°C. Μετά από μία ημέρα, πραγματοποιήθηκε υγρή καλλιέργεια των 10 mL από μία μοναδική αποικία και επώαστηκε στις ίδιες συνθήκες. Με το πέρας μίας ημέρας και αφού έχει ολοκληρωθεί το στάδιο αυτό, μεταφέρονται 2,5mL από τη αρχική καλλιέργεια σε μία φιάλη του 1L που περιέχει 250mL υγρό μέσο LB μαζί με τα κατάλληλα αντιβιοτικά, και παραμένει στους 28°C υπό ανάδευση (~250rpm) ώσπου η οπτική πυκνότητα να φθάσει στο 0,8-1. Ύστερα, η καλλιέργεια του *Agrobacterium* φυγοκεντρείται στις 4000rpm για 10 λεπτά και στους 22°C. Τα βακτηριακά κύτταρα επαναδιαλύονται σε MS βασικών αλάτων, pH 5.7, υπό ήπια ανάδευση στις 60rpm για περίπου 30 λεπτά προτού χρησιμοποιηθεί.

Γ. Εμβολιασμός με το *A. tumefaciens*

Στο σημείο αυτό συντελείται ο μετασχηματισμός των φύλλων, αφού προηγηθεί ο τεμαχισμός τους σε αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί, εμποτισμένο με MS που περιείχε τα μετασχηματισμένα κύτταρα του *A. tumefaciens*. Ως αποτέλεσμα αυτού προκύπτουν έκφυτα μεγέθους 0,5 cm², τα οποία συγκαλλιεργούνται με το διάλυμα των μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων για 30 λεπτά σε τρυβλίο Petri.

Δ. Αναγέννηση και επιλογή των μετασχηματισμένων εκφύτων

Μετά το πέρας 2 ημερών, αφότου έχει πραγματοποιηθεί ο μετασχηματισμός, έγινε μεταφορά των εκφύτων σε θρεπτικό υπόστρωμα επιλογής που περιέχει καρμπενικιλίνη για τη νέκρωση του βακτηρίου (MS με βιταμίνες, NAA 0,1mg/lit, BAP 1mg/lit, 3% ζαχαρόζη, 5gr/lit agar και καρμπενικιλίνη 250mg/lit). Την πέμπτη ημέρα μετά το μετασχηματισμό, τα έκφυτα μεταφέρονται σε θρεπτικό υπόστρωμα επιλογής σε καναμυκίνη (MS με βιταμίνες, NAA 0,1mg/lit, BAP 1mg/lit, 3% ζαχαρόζη, 5gr/lit agar, καρμπενικιλίνη 250mg/lit, καναμυκίνη 150mg/lit) Ύστερα από περίπου δύο εβδομάδες, τα έκφυτα τοποθετούνται σε νέο θρεπτικό υπόστρωμα επιλογής ώσπου να αναπτύξουν κάλλο και νεαρούς βλαστούς. Οι εκπτυσσόμενοι νεαροί βλαστοί αφαιρέθηκαν από τον κάλλο και μεταφέρθηκαν σε δοχεία magenta που εμπεριείχαν θρεπτικό μέσο επιλογής. Αφού σχηματίστηκαν 3-5 πραγματικά φύλλα,

μεταφέρθηκαν τα φυτά σε magenta με θρεπτικό μέσο που επάγει τη ριζογένεση. Το μέσο ριζογένεσης αποτελείται από MS χωρίς ορμόνες, 3% ζαχαρόζη, 5gr/l agar, σεφοταξίμη 250mg/l, υπεύθυνη για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης του βακτηρίου και την προώθηση της ανάπτυξης των ριζών, καθώς και καναμυκίνη (150mg/l) προς διατήρηση της επιλογής των μετασχηματισμένων φυτών. Στο στάδιο αυτό, έγινε επιλογή των φυτών με καλά ανεπτυγμένο ριζικό σύστημα, τα οποία και φυτεύτηκαν σε γλάστρες που περιείχαν μίγμα φυτοχώματος και περλίτη σε αναλογία 3:1 και σκεπάστηκαν με πλαστικές σακούλες προς διατήρηση υψηλής υγρασίας. Τα φυτά τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης ελεγχόμενων συνθηκών θερμοκρασίας και φωτοπεριόδου (23°C, 16/8 ώρες) όπου και σκληραγωγήθηκαν για διάστημα περίπου 2-4 εβδομάδων με τη σταδιακή έως την ολική αφαίρεση της κάλυψης. Τέλος, τα φυτά παρέμειναν για αυτογονιμοποίηση στις ελεγχόμενες αυτές συνθήκες έως ότου σχηματίσουν σπόρο T1 γενεάς.

2.2.3 Έλεγχος μετασχηματισμού των ΤΟ φυτών

A. Απομόνωση DNA για εφαρμογή της PCR

Η απομόνωση DNA από τα μετασχηματισμένα φυτά καπνού πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του Inisorb spin plant mini kit της Invitex με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ειδικότερα, έγινε λειοτρίβηση 100 mg φυλλικού ιστού από κάθε δείγμα διαγονιδιακού φυτού σε υγρό άζωτο. Στη συνέχεια, έγινε προσθήκη 400μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και 20μl πρωτεΐνάσης K σε κάθε ομογενοποιημένο μείγμα. Αφού το μείγμα αναδεύτηκε αρκετά, ακολούθησε επώαση στους 65°C για 30 λεπτά και τοποθετήθηκε σε erpendorfs με τη βοήθεια ειδικών φίλτρων προκειμένου να συλλεχθούν τα υπολείμματα των ιστών. Ύστερα, το μείγμα φυγοκεντρήθηκε για 1 λεπτό στις 12000rpm και αφού αφαιρέθηκε το φίλτρο προστέθηκαν στο μείγμα 40μl RNάσης A για την αποδόμηση του RNA. Μετά από ανάδευση και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, έγινε προσθήκη 200μL ρυθμιστικού διαλύματος πρόσδεσης και μεταφορά του μείγματος σε νέα erpendorfs, τα οποία είναι εφοδιασμένα με ειδικό φίλτρο πρόσδεσης του DNA. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε επώαση για 1 λεπτό και φυγοκέντρωση στις 12000 rpm για 1 λεπτό και μετά από την απομάκρυνση του υποκειμένου, το φίλτρο επανατοποθετήθηκε στο erpendorf. Κατόπιν, έγινε προσθήκη 550μl ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης I και φυγοκέντρωση των δειγμάτων στις 12000 rpm για 1 λεπτό. Η έκπλυση επαναλήφθηκε και έπειτα έγινε προσθήκη 550μl ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης II και φυγοκέντρωση των δειγμάτων στις 12000rpm για 1 λεπτό. Τα φίλτρα τοποθετήθηκαν σε νέα erpendorfs και προστέθηκαν 100μl ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης. Αφού ολοκληρώθηκε επώαση 3 λεπτών, ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 12000 rpm για 1 λεπτό.

B. Εφαρμογή πολλαπλής PCR (multiplex PCR) προς έλεγχο της ένθεσης των διαγονιδίων και της απουσίας του γονιδίου *virG* του *Agrobacterium tumefaciens*

Η παρουσία του διαγονιδίου και η απουσία υπολειμμάτων του *A. tumefaciens* εξετάστηκε μέσω πολλαπλής PCR αντίδρασης, χρησιμοποιώντας εξειδικευμένους εκκινητές για το γονίδιο *HraA* καθώς και για το γονίδιο *virG* του *Agrobacterium tumefaciens*. Το μείγμα της PCR για τα μετασηματισμένα με το *HraA* φυτά περιείχε:

- √ 2μl DNA ως μήτρα
- √ 0.25μM από κάθε εκκινητή
- √ 200μM dNTPs
- √ 1.25mM MgCl₂
- √ 1x buffer
- √ 1.25u polymerase (GoTaq Flexi DNA polymerase, Promega)
- √ Απεσταγμένο νερό (ddH₂O)

Η αντίδραση ρυθμίστηκε σε 20 μl τελικό όγκο

Οι συνθήκες της PCR ρυθμίστηκαν ως αναφέρονται στον πίνακα 2.2

Πίνακας 2.2 Συνθήκες PCR για την ενίσχυση των διαγονιδίων *HraA* και *HraB*, καθώς και του γονιδίου *virG* σε μετασηματισμένα φυτά καπνού

	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	94	5min	1
Αποδιάταξη αλυσίδων	94	30sec	30
Υβριδισμός Εκκινητών	50	1min	
Ενίσχυση αλληλουχιών	72	1min	
Τελική Ενίσχυση	72	7min	1

Γ. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR από τα διαγονιδιακά ΤΟ φυτά

Ο έλεγχος των προϊόντων της PCR διενεργήθηκε μετά από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτική αгарόζης 1%, σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE (1X). Για τη χρώση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε βρωμιούχο αιθίδιο 1%, ενώ για τον έλεγχο του μεγέθους των ζωνών χρησιμοποιήθηκε ο 100bp DNA Ladder (Biolabs). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 90Volts για 1 ώρα.

2.2.4 Δημιουργία φυτών T1 γενεάς

Προκειμένου να αποφευχθεί κάθε είδους μόλυνση η διαδικασία πραγματοποιείται σε θάλαμο νηματικής ροής και τοποθετούνται οι σπόροι των σειρών A1, A2, A3, A4 σε ξεχωριστά tubes. Στη συνέχεια, σε καθένα από τα tubes προστίθεται 1mL διαλύματος χλωρίνης 5%, έτσι ώστε να απολυμανθούν, ενώ ακολουθεί ανάδευση για 10 λεπτά. Ύστερα, απομακρύνεται με προσοχή το διάλυμα χλωρίνης με τη βοήθεια πιπέτας. Έπειτα, προστίθεται 1mL αποστειρωμένο απιονισμένο νερό στο tube και γίνεται ανάδευση για 2-3 λεπτά. Κατόπιν, απομακρύνεται με τη βοήθεια της πιπέτας, όπως προηγουμένως με το διάλυμα χλωρίνης. Το ξέπλυμα αυτό των σπόρων με το αποστειρωμένο απιονισμένο νερό επαναλαμβάνεται 3 φορές. Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία της απολύμανσης των σπόρων, οι σπόροι τοποθετούνται σε αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί για απομάκρυνση της περίσσειας υγρασίας από τους σπόρους και τοποθετούνται άμεσα σε τρυβλία petri, που περιέχουν θρεπτικό υπόστρωμα 1/2MS με βιταμίνες, 3% σουκρόζη, 3gr/lit άγαρ και 100mg/lit καναμυκίνη. Τα τρυβλία τοποθετούνται στο θάλαμο ανάπτυξης στους 24°C μέχρι να φυτρώσουν οι σπόροι για να μεταφερθούν μετά σε πλαστικά vials και αργότερα σε magenta, με σκοπό να δημιουργήσουν αρκετό ριζικό σύστημα έτσι ώστε να μεταφερθούν σε γλαστράκια στο θάλαμο ανάπτυξης ελεγχόμενων συνθηκών και να δώσουν εύρωστα φυτά T1 γενεάς. Όταν τοποθετηθούν στα γλαστράκια, σκεπάζονται σε πρώτη φάση με διαφανείς πλαστικές σακούλες και, προκειμένου να εγκλιματιστούν σταδιακά στις νέες συνθήκες, κόβεται η σακούλα στο επάνω μέρος της ανά πέντε ημέρες έως την ολική αφαίρεση της κάλυψης.

2.2.5 Τεστ ανθεκτικότητας των HraA διαγονιδιακών φυτών καπνού T1 γενεάς στη βακτηριακή κηλίδωση του καπνού

Προκειμένου να ελεγχθεί η δράση του γονιδίου *HraA* σε σχέση με την ασθένεια της βακτηριακής κηλίδωσης του καπνού, 3 φυτά από 4 διαφορετικές σειρές φυτών καπνού T1 γενεάς καθώς και 2 φυτά άγριου τύπου, μολύνθηκαν με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* και διενεργήθηκαν συγκριτικές μετρήσεις της αποίκησης του βακτηρίου στα μολυσμένα

φύλλα, σε δύο διαφορετικούς χρόνους, στις 2 και 4 ημέρες μετά τη μόλυνση. Αναλυτικά, η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

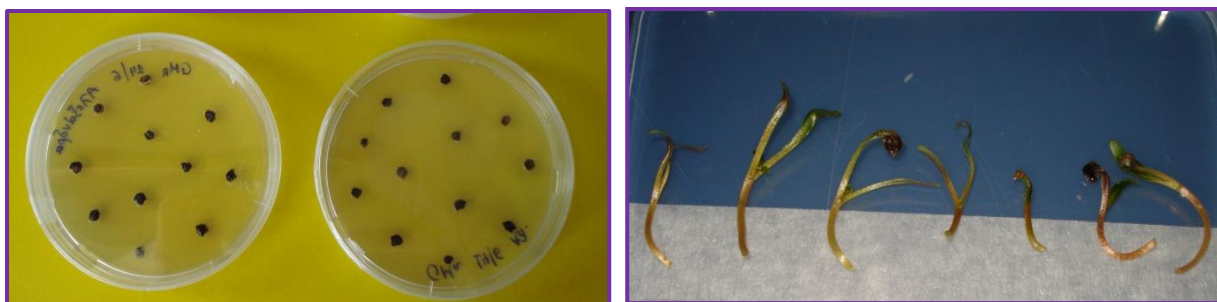
Το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* καλλιεργήθηκε σε 10ml υγρού μέσου LB με ριφαμπικίνη 50mg/lit για δύο ημέρες, στους 28 °C. Η καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε στις 2.500 rpm για 10 λεπτά, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και τα βακτηριακά κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα MgCl₂ 10mM έως ότου η οπτική πυκνότητα φθάσει το OD= 0,1-0,2. Με τη χρήση μιας σύριγγας, από την οποία αφαιρέθηκε η βελόνα, πραγματοποιήθηκε εμποτισμός 3 νεαρών φύλλων σε τρία φυτά από κάθε διαγονιδιακή σειρά καπνού T1 γενεάς: A1, A2, A3, A4, καθώς και από δύο φυτά καπνού άγριου τύπου, που εξυπηρέτησαν ως μάρτυρες. Οι μετρήσεις των αποικιών έγιναν 2 και 4 ημέρες μετά τη μόλυνση. Συγκεκριμένα, 3 φυλλικοί δίσκοι διαμέτρου 1cm από 1 φύλλο για το κάθε φυτό, τοποθετήθηκαν σε 1,5 ml tubes που περιείχε 1ml αποστειρωμένο mQ νερό και λειοτριβήθηκαν με τη βοήθεια ειδικού εμβόλου. Ακολούθησε αραιώση του βακτηριακού διαλύματος 1/100 και 1/200 και από τις δύο αυτές αραιώσεις επιστρώθηκαν 20 και 30μl σε τρυβλία petri που περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα LB και ριφαμπικίνη 50mg/lit και επώαστηκαν στους 28 °C. Έπειτα από μία ημέρα, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις των αποικιών που αναπτύχθηκαν στο κάθε τρυβλίο και έγινε συγκριτική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων, λαμβάνοντας υπόψη και το φαινότυπο που παρουσίασαν τα μολυσμένα φυτά.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Μετασχηματισμός των *Beta vulgaris* φυτών

3.1.1 Μετασχηματισμός ριζών ζαχαρότευτλου προς μελέτη της επίδρασης του γονιδίου *HraA*

Για τον παροδικό μετασχηματισμό ριζών ζαχαρότευτλου μέσω του *A. rhizogenes*, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο των Pavnli *et al.* (2011). Το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε για τη μεταφορά του γονιδίου *HraA*, ήταν το R1000 του *Agrobacterium rhizogenes*, ενώ η επιλογή των μετασχηματισμένων ριζών έγινε σε συγκέντρωση καναμυκίνης 150mg/lit. Ως φυτικό υλικό, χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές εμπορικές σειρές ζαχαρότευτλου, Αλεξάνδρα και Πανδώρα. Ο μετασχηματισμός επετεύχθη με εμφύσηση του υποκοτυλίου ασηπτικά αναπτυσσόμενων σπορόφυτων ζαχαρότευτλου σε συνενωμένες αποικίες του βακτηρίου (βακτηριακό στρώμα) που έφεραν το υπό μελέτη γονίδιο.

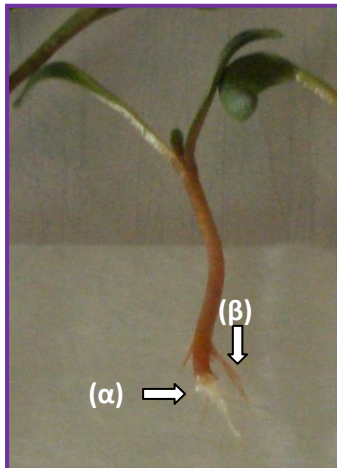


Εικόνα 3.1

Αριστερά: *In vitro* βλάστηση σπόρων ζαχαρότευτλου των σειρών Αλεξάνδρα και Πανδώρα,

Δεξιά: έκφυτα ζαχαρότευτλου, εμβολιασμένα με το *Agrobacterium rhizogenes*

Έπειτα από 2 περίπου εβδομάδες σχηματίστηκαν χμαιρικές ρίζες με ριζικά τριχίδια που πιθανώς έφεραν το γονίδιο *HraA*. Ένας περιορισμένος αριθμός ριζών που σχηματιζόταν πλευρικά του στελέχους ως αντίδραση στην αφαίρεση του μεριστώματος της ρίζας, 3-4 ημέρες μετά την αφαίρεση του υπάρχοντος ριζικού συστήματος, δεν λαμβάνονταν ως μετασχηματισμένες εφόσον δεν είχαν υποστεί την κατάλληλη πίεση επιλογής.



Εικόνα 3.2: Δημιουργία νεοσχηματισμένων ριζών ζαχαρότευτλου. Ως μετασχηματισμένες λαμβάνονται οι ρίζες που εκπτύσσονται από το υποκοτύλιο (α), ενώ αυτές που εκπτύσσονται πλευρικά λαμβάνονται ως μη μετασχηματισμένες(β)

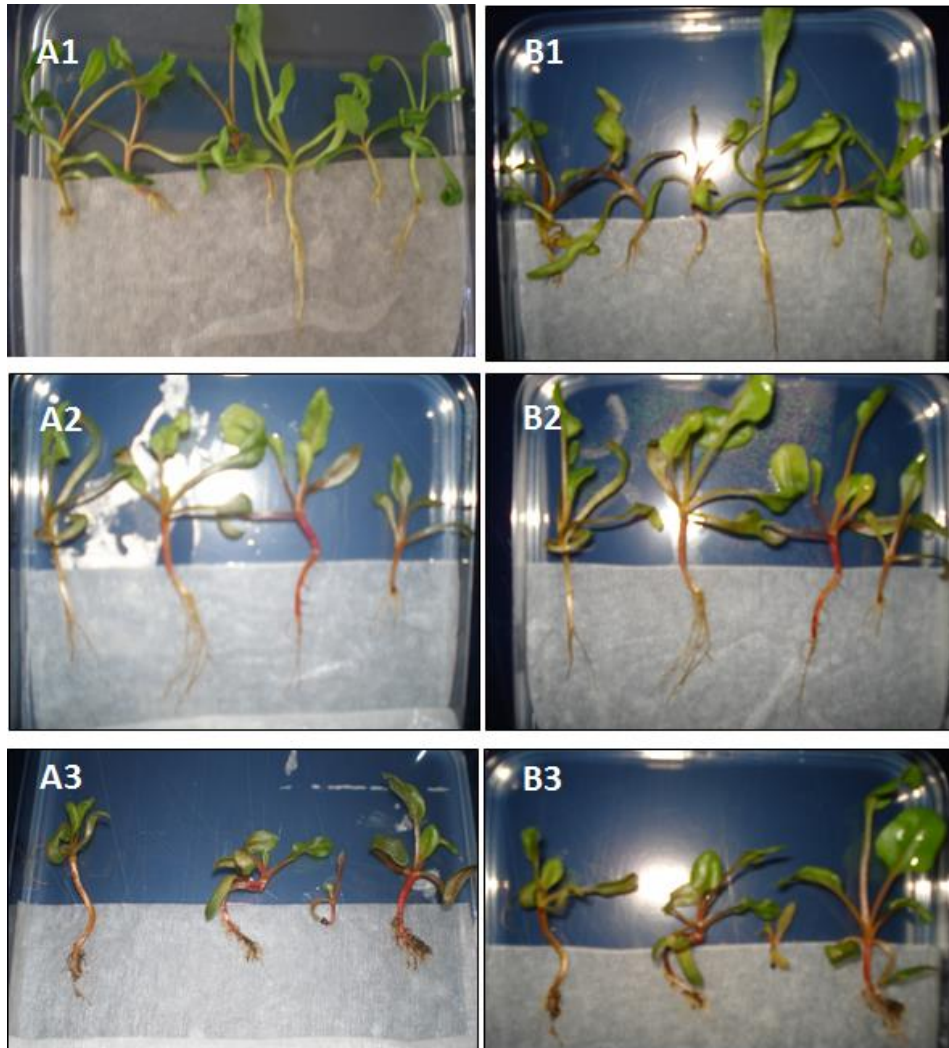
Στο πείραμα περιλήφθηκαν φυτά - μάρτυρες και για τις δύο σειρές ζαχαρότευτλου, τα οποία δεν εμβολιάστηκαν με το βακτήριο, αλλά αναπτύχθηκαν υπό τις ίδιες συνθήκες με τα μετασχηματισμένα φυτά (αρνητικοί μάρτυρες) και παράλληλα, φυτά που αναπτύχθηκαν χωρίς πίεση επιλογής σε καναμυκίνη (θετικοί μάρτυρες), προκειμένου να γίνει συγκριτική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και να διεξαχθούν συμπεράσματα.

Η διαδικασία του εμβολιασμού πραγματοποιήθηκε συνολικά σε 40 έκφυτα της σειράς Πανδώρα και σε 40 έκφυτα της σειράς Αλεξάνδρα, ενώ για την κάθε σειρά συμπεριλήφθηκαν 10 θετικοί και 10 αρνητικοί μάρτυρες.

Τα φυτά αριθμήθηκαν στα τρυβλία προκειμένου να γίνουν μακροσκοπικές παρατηρήσεις αναφορικά με το ρυθμό ανάπτυξης, τη δομή, και την διακλάδωση των νεοσχηματισμένων ριζών. Ανά δέκα περίπου ημέρες, τα έκφυτα μεταφέρονταν σε νέο θρεπτικό υπόστρωμα (emergence medium) και λαμβάνονταν φαινοτυπικές παρατηρήσεις σε σύγκριση με τους αρνητικούς και θετικούς μάρτυρες αλλά και μεταξύ των δύο ποικιλιών.

Στα έκφυτα της ποικιλίας Αλεξάνδρα, αναπτύχθηκαν ρίζες στις πρώτες 10 ημέρες μετά την αφαίρεση του υπάρχοντος ριζικού συστήματος προσομοιάζοντας φαινοτυπικά με το ριζικό σύστημα που ανέπτυξαν τα αντίστοιχα φυτά που δεν είχαν υποστεί καμία μεταχείριση και αναπτύχθηκαν ελλείψει πίεσης επιλογής (θετικοί μάρτυρες). Αντίθετα, στα μη μετασχηματισμένα έκφυτα που αναπτύχθηκαν υπό πίεση επιλογής με αντιβιοτικά (αρνητικοί μάρτυρες) εκπτύχθηκαν πλάγιες ρίζες, οι οποίες νεκρώθηκαν από τις πρώτες ημέρες (Εικ. 3.3).

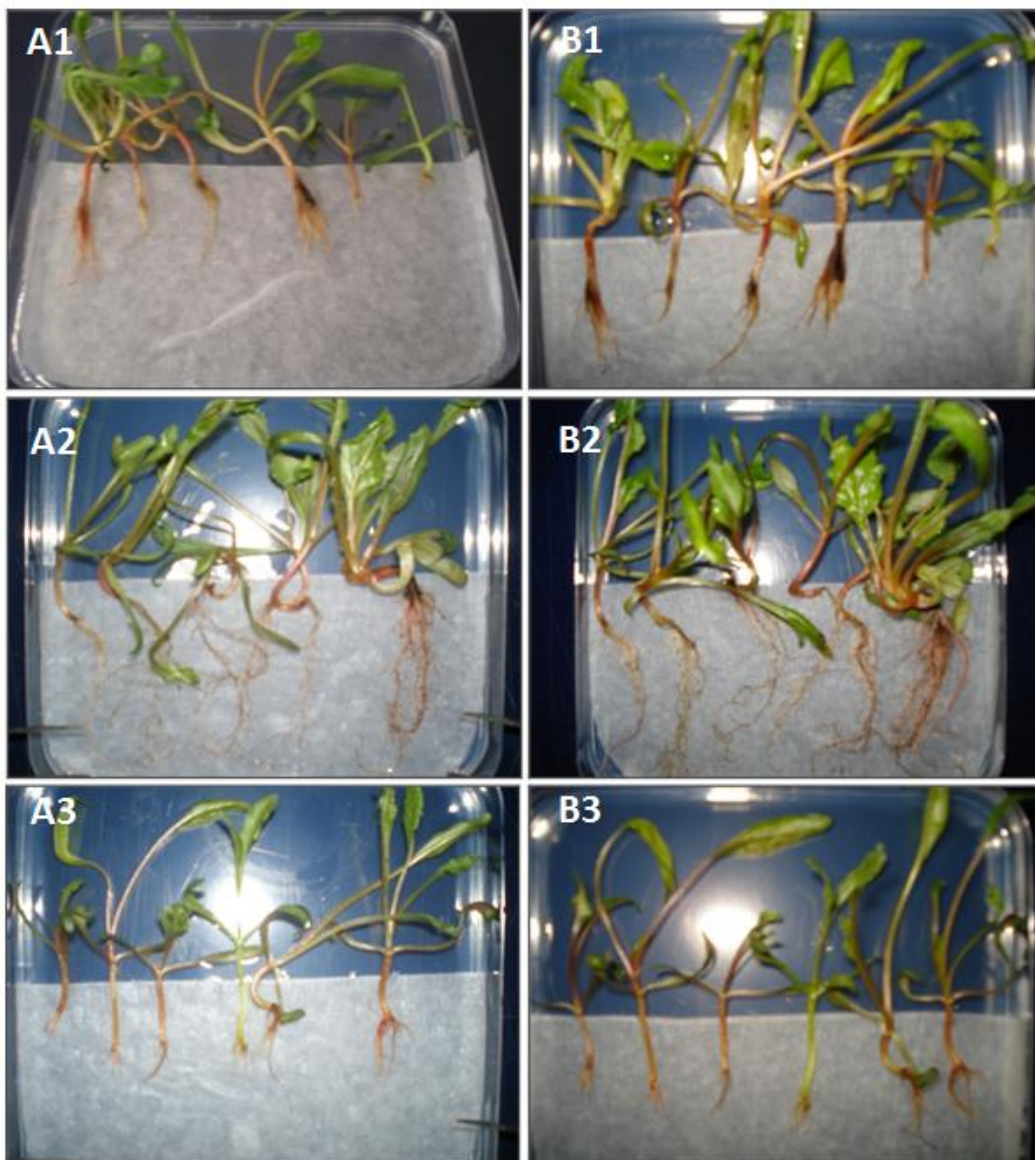
Με την πάροδο 20 ημερών μετά το μετασχηματισμό, οι χιμαιρικές ρίζες των εκφύτων της ποικιλίας Αλεξάνδρα διαφοροποιήθηκαν συγκριτικά με τους θετικούς μάρτυρες όσον αφορά στην ανάπτυξή τους, η οποία ήταν μειωμένη. Το γεγονός αυτό αποδόθηκε αρχικά στην ασκούμενη πίεση επιλογής. Έπειτα από 30 ημέρες, το ριζικό σύστημα των μετασχηματισμένων εκφύτων παρέμεινε στο ίδιο σχεδόν στάδιο ανάπτυξης και παράλληλα παρατηρήθηκε ότι ούτε το υπέργειο μέρος αναπτυσσόταν κανονικά. Στο στάδιο αυτό, οι χιμαιρικές ρίζες εμφάνιζαν νεκρώσεις.



Εικόνα 3.3: Νεοεκπτυχθείσες ρίζες της ποικιλίας Αλεξάνδρα (**α**) 10 και (**β**) 20 ημέρες μετά το μετασχηματισμό με το *A. rhizogenes*. **1.** Χιμαιρικές ρίζες ζαχαρότευτλου, **2.** Θετικοί μάρτυρες, **3.** Αρνητικοί μάρτυρες

Όσον αφορά στα έκφυτα της ποικιλίας Πανδώρα, οι διαφοροποιήσεις μεταξύ χιμαιρικών ριζών και μαρτύρων ήταν πιο έντονες. Από τις πρώτες 10 ημέρες μετά το μετασχηματισμό, οι χιμαιρικές ρίζες εμφάνιζαν μεταχρωματισμούς (καφέτιασμα) οι

οποίοι εξελίσσονταν σε νεκρώσεις. Ομοίως, παρατηρήθηκε αναστολή της ανάπτυξης τόσο των διαγονιδιακών ριζών όσο και του υπέργειου μέρους των εκφύτων. Αντίθετα, οι θετικοί μάρτυρες είχαν αυξημένη ανάπτυξη ριζικού συστήματος με ανάλογη ανάπτυξη του υπέργειου μέρους, ενώ οι αρνητικοί μάρτυρες χαρακτηρίζονταν από μειωμένη ανάπτυξη ριζικού συστήματος καθώς και υπέργειου μέρους (Εικ. 3.4). Είναι αξιοσημείωτο ότι παρά το γεγονός ότι κατά τις πρώτες 20 ημέρες οι αρνητικοί μάρτυρες παρουσίασαν μειωμένη ανάπτυξη, δεν εμφανίστηκαν συμπτώματα μεταχρωματισμού όπως στις χιμαιρικές ρίζες, υποδεικνύοντας ότι τα συμπτώματα αυτά πιθανώς αποδίδονται στη διαγονιδιακή έκφραση του *HraA*.

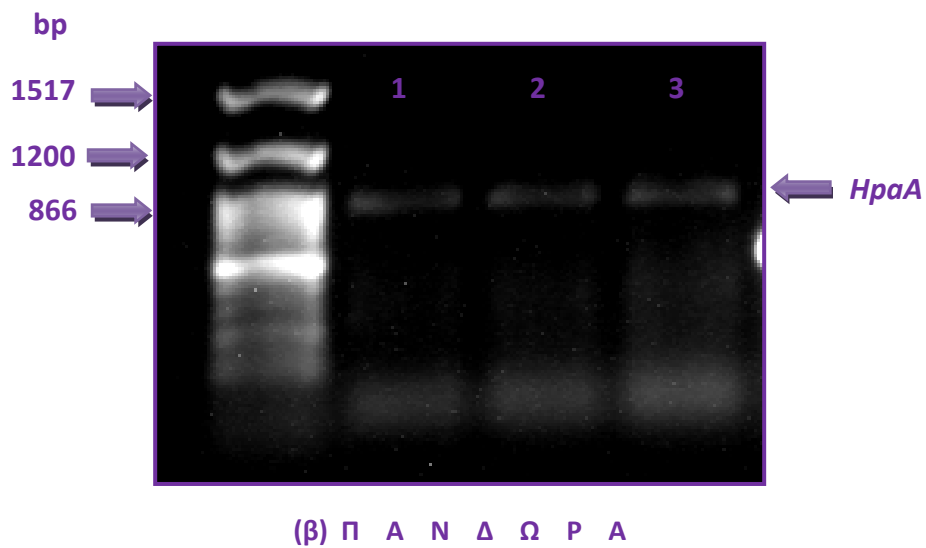
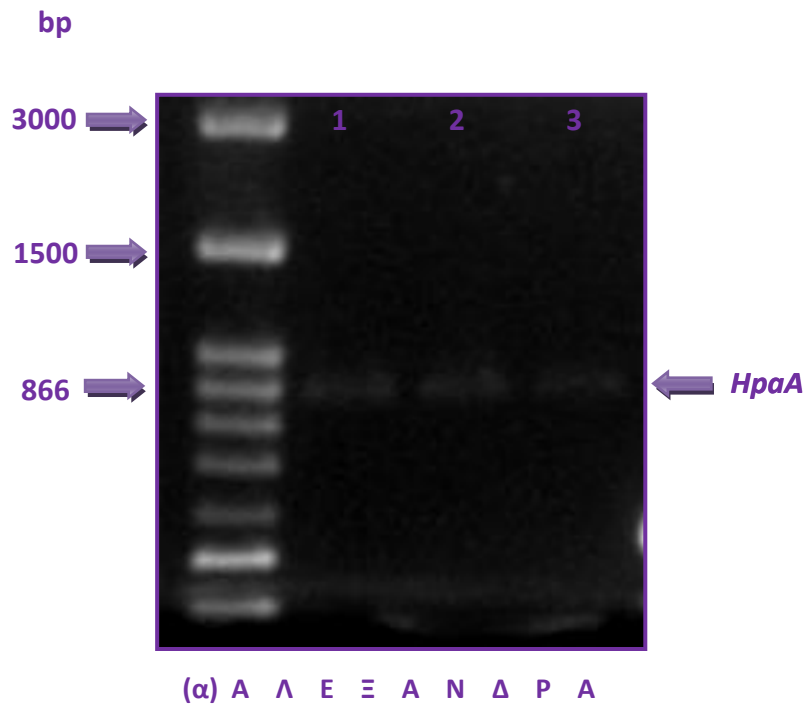


Εικόνα 3.4: Νεοεκπτυχθείσες ρίζες της ποικιλίας Πανδώρα (**α**) 10 και (**β**) 20 ημέρες μετά το μετασχηματισμό με το *A. rhizogenes*. **1.** Χιμαιρικές ρίζες ζαχαρότευτλου, **2.** Θετικοί μάρτυρες, **3.** Αρνητικοί μάρτυρες

3.1.2 Έλεγχος της ένθεσης του διαγονιδίου *HraA* στις χιμαιρικές ρίζες του ζαχαρότευτλου

Ο έλεγχος για την παρουσία του διαγονιδίου *HraA* έγινε δειγματοληπτικά σε ρίζες διαγονιδιακών εκφύτων ζαχαρότευτλου που επιβίωσαν έπειτα από την ασκούμενη πίεση επιλογής και ανέπτυξαν ικανοποιητικό ριζικό σύστημα. Για την αξιολόγηση του μετασχηματισμού, απομονώθηκε DNA από διαγονιδιακές ρίζες τριών φυτών από την κάθε σειρά (Αλεξάνδρα και Πανδώρα) και ακολούθησε PCR με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών για την ενίσχυση των εισαχθέντος γονιδίου. Η αντίδραση της PCR ενίσχυσε προϊόντα αναμενόμενου μεγέθους (866bp), καταδεικνύοντας την επιτυχή ένθεση του διαγονιδίου.

Και στις δύο χρησιμοποιηθείσες ποικιλίες, Αλεξάνδρα και Πανδώρα, παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις σε σχέση με τους μάρτυρες, αναφορικά με το ρυθμό ανάπτυξης των διαγονιδιακών ριζών, την ανάπτυξη του υπέργειου μέρους των φυτών, καθώς και την εμφάνιση νεκρώσεων στο σύνολο των χιμαιρικών ριζών έπειτα από 15 – 20 ημέρες. Λαμβάνοντας υπόψη ότι τα αποτελέσματα ταυτοποίησης της ένθεσης του διαγονιδίου ήταν θετικά, οι νεκρώσεις δεν μπορούν να αποδοθούν σε μη επιτυχή μετασχηματισμό του ριζικού συστήματος και επομένως είναι πιθανό να οφείλονται στην επίδραση του γονιδίου *HraA*.



Εικόνα 3.5 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR για τον έλεγχο της παρουσίας του διαγονιδίου *HraA* σε μετασχηματισμένες ρίζες ζαχαρότευτλου: **(α)** της σειράς Αλεξάνδρα και **(β)** της σειράς Πανδώρα. Ο ladder που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο του μεγέθους των προϊόντων της PCR ήταν ο 100bp DNA Ladder (Biolabs)

3.2 Μετασχηματισμός φυτών του είδους *Nicotiana benthamiana*

3.2.1 Αναγέννηση μετασχηματισμένων εκφύτων

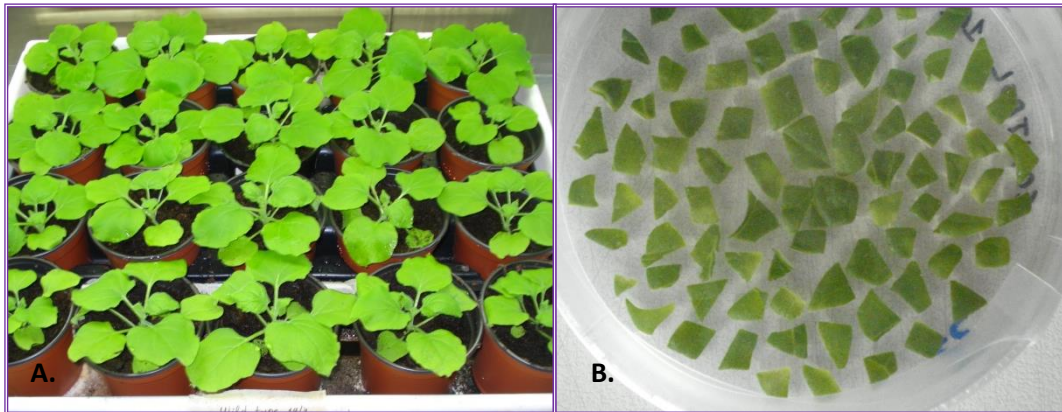
Για το μετασχηματισμό των φυτών του είδους *N. benthamiana* χρησιμοποιήθηκε το διαγονίδιο *HraA* που έχει χαρακτηριστεί ως ρυθμιστής έκφρασης καθώς και ως τελεστής του βακτηριακού στελέχους *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Οι αναγεννημένοι βλαστοί, αφού έφθασαν στο στάδιο των 3-5 πραγματικών φύλλων, μεταφέρθηκαν σε υπόστρωμα ριζοβολίας και στη συνέχεια σε χώμα. Το ποσοστό ριζογένεσης ήταν 24% για τα *HraA* μετασχηματισμένα φυτά, ενώ το ποσοστό φυτών που επέζησαν της σκληραγώγησης ήταν 5,7%. Ο ακριβής αριθμός των φυτών που έφθασαν στο στάδιο ριζογένεσης και τελικώς επιβίωσαν κατά τη σκληραγώγηση, καθώς και ο αριθμός των φυτών που άνθισαν και τελικώς έδωσαν σπόρο T1 γενεάς αναφέρεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 3.1

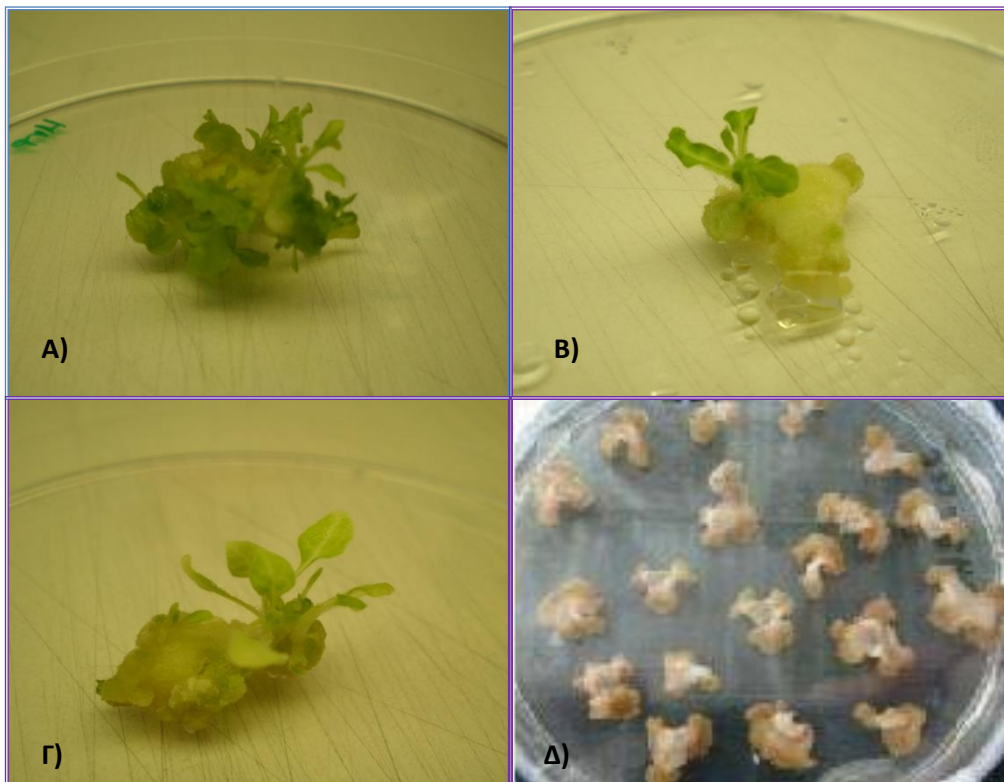
Διαγονίδιο	Αρχικός αριθμός εκφύτων	Αριθμός φυτών σε στάδιο ριζογένεσης	Τελικός Αριθμός φυτών ΤΟ γενεάς	Αριθμός ΤΟ φυτών που παρήγαγαν σπόρο
<i>HraA</i>	350	85	20	10

Ο σταθερός μετασχηματισμός έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Horsch *et al.* (1995). Η μεταφορά των εκφύτων σε νέο θρεπτικό μέσο γινόταν κάθε 15 ημέρες, ενώ οι αδιαφοροποίητοι κάλλοι άρχιζαν να εμφανίζονται 2-3 εβδομάδες μετά το μετασχηματισμό. Πολλοί φυλλικοί δίσκοι νεκρώθηκαν κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, ενώ εκείνοι που επιβίωσαν, έδωσαν κατά μέσο όρο δύο διαφορετικούς κάλλους, καθένας από του οποίους αποτελούσε και διαφορετικό συμβάν αναγέννησης. Οι κάλλοι διαχωρίζονταν από το υπόλοιπο φύλλο και συνέχιζαν να αναπτύσσονται αυτόνομα στο ίδιο θρεπτικό μέσο. Προοδευτικά άρχισε η διαφοροποίηση των ιστών και αναπτύχθηκαν βλαστοί και φύλλα. Πέντε με έξι εβδομάδες μετά το μετασχηματισμό, οι νεαροί βλαστοί αποκόπηκαν από τους κάλλους

και μεταφέρθηκαν (στο ίδιο θρεπτικό μέσο) σε δοχεία ιστοκαλλιέργειας με μεγαλύτερη χωρητικότητα.

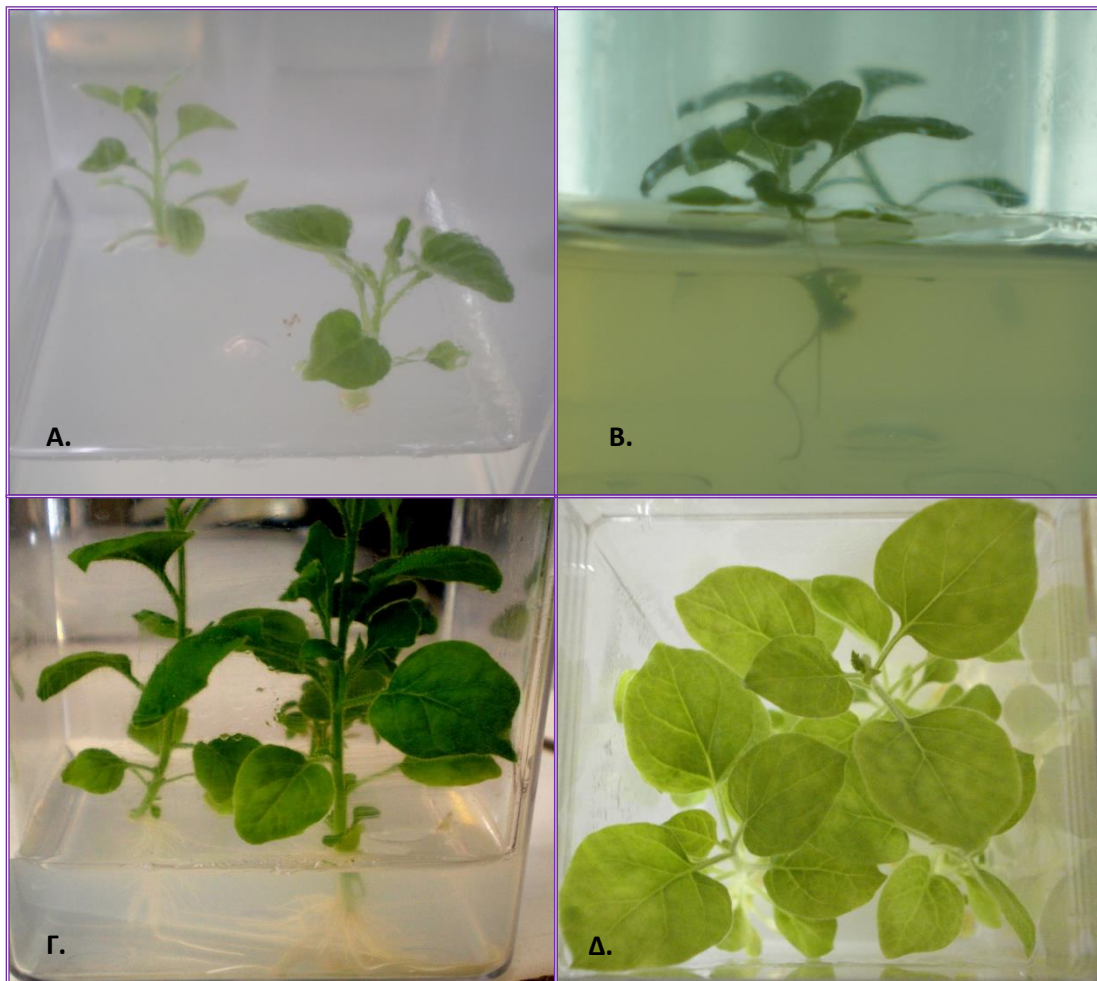


Εικόνα 3.6: **A.** Νεαρά φυτά *N. benthamiana* άγριου τύπου σε κατάλληλο στάδιο ανάπτυξης προς λήψη εκφύτων, **B.** Έκφυτα φύλλων σε στάδιο συγκαλλιέργειας με το βακτήριο *A. tumefaciens*.



Εικόνα 3.7: Έκφυτα *N. benthamiana* μετασχηματισμένα με το *A. tumefaciens*. **A.** Καλλογένεση και διαφοροποίηση κυττάρων σε βλαστούς, **B., Γ.:** Βλαστογένεση και ανάπτυξη νεαρών φύλλων, **Δ.** Έκφυτα – μάρτυρες που δεν επιβιώνουν υπό την πίεση επιλογής σε καναμυκίνη.

Τελικά, από κάθε κάλλο, που συνιστούσε διαφορετικό γεγονός αναγέννησης, αποκόπηκαν 2-4 φυτάρια που αποτελούνταν από διαμορφωμένο βλαστό και φύλλα και μεταφέρθηκαν ξεχωριστά η κάθε ομάδα σε δοχεία με θρεπτικό μέσο ριζογένεσης, χωρίς ορμόνες και με τα κατάλληλα αντιβιοτικά επιλογής (Εικ. 3.8). Ως ανεξάρτητα γενονότα μετασχηματισμού, θεωρήθηκαν βλαστοί που εκπτύχθηκαν σε διαφορετικούς κάλλους.

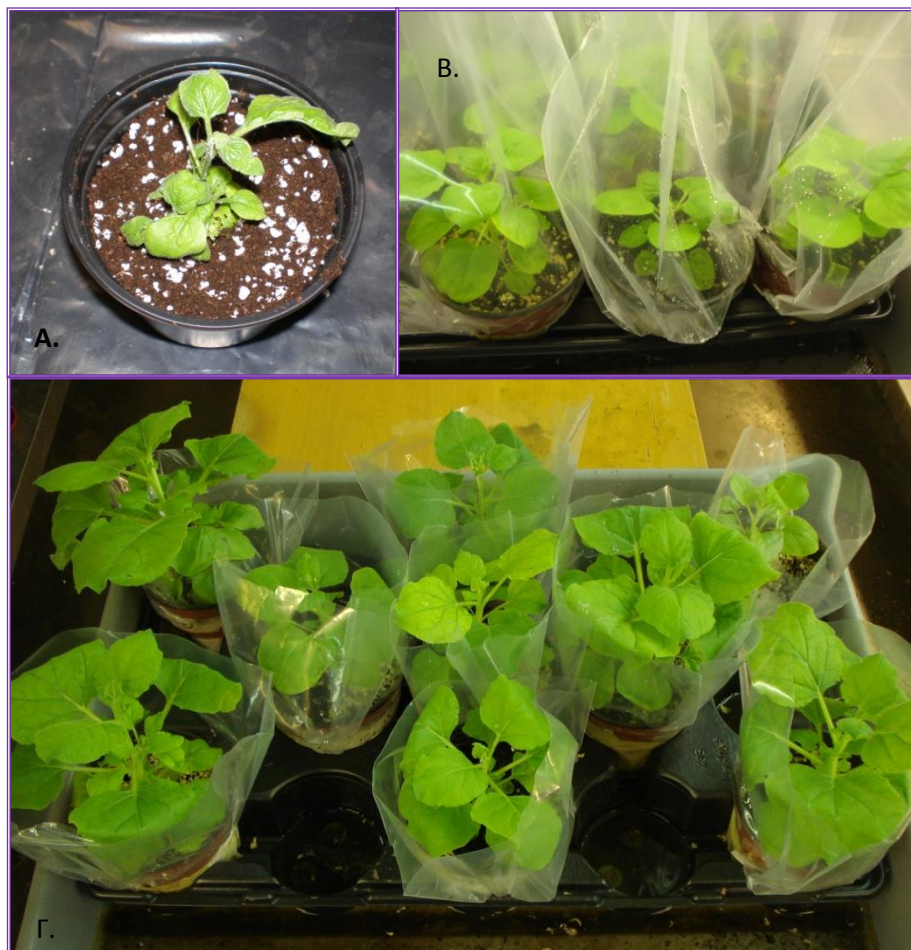


Εικόνα 3.8: Αναγεννημένα φυτά *N. benthamiana*, μετασχηματισμένα με το *A. tumefaciens*. **A.** Αναγέννηση βλαστών σε υπόστρωμα επιλογής, **B, Γ.** Ριζογένεση και ανάπτυξη ριζικού συστήματος σε νεαρά φυτά, **Δ.** Φυτά με ικανοποιητική ανάπτυξη σε στάδιο μεταφοράς σε χώμα.

Το στάδιο της ριζογένεσης είναι το κύριο στάδιο επιλογής των μετασχηματισμένων φυταρίων, δεδομένου ότι πρέπει να επιβιώσουν αυτόνομα πλέον (χωρίς την ύπαρξη κάλλου) στο αντιβιοτικό επιλογής (καναμυκίνη). Κατά την ανάπτυξή τους επάνω στον κάλλο, οι νεαροί βλαστοί δύνανται να επιβιώνουν επειδή γειτονικά σε αυτά κύτταρα

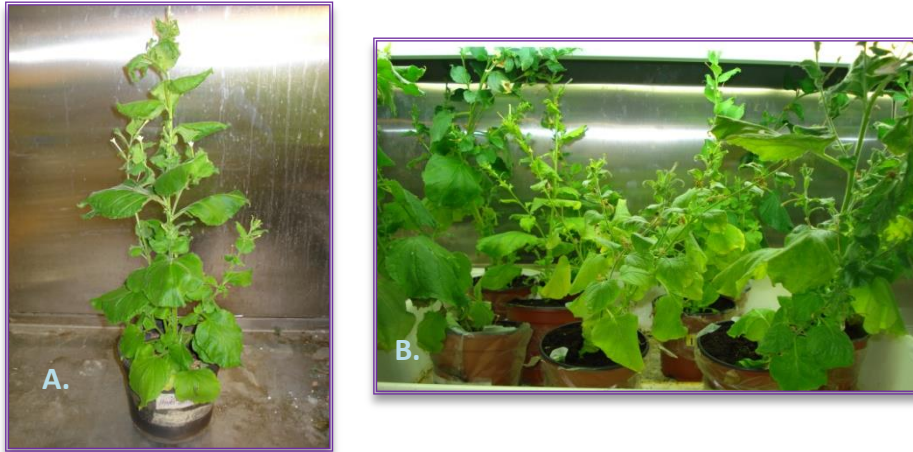
πιθανόν να διασπούν την καναμυκίνη και να δημιουργούν έτσι μία περιοχή όπου δεν ασκείται πίεση επιλογής στα μετασηματισμένα κύτταρα.

Μετά από 1-2 εβδομάδες παραμονής σε θρεπτικό υπόστρωμα ριζογένεσης, τα φυτάρια που είχαν αναπτύξει επαρκές ριζικό σύστημα μεταφέρθηκαν σε χώμα. Το ποσοστό ριζογένεσης για τα αναγεννημένα φυτά που μετασηματίστηκαν με το γονίδιο *HpaA* ήταν 24% (Πίνακας 3.1). Αρχικά, παρέμειναν σκεπασμένα με διαφανή πλαστικά καλύμματα και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης ελεγχόμενων συνθηκών. Ανά πέντε περίπου ημέρες, τα καλύμματα αποκόπτονταν όλο και περισσότερο, έτσι ώστε τα φυτά να εκτίθενται σταδιακά στην υγρασία και τη θερμοκρασία του θαλάμου, προκειμένου να σκληραγωγηθούν και να εγκλιματιστούν σταδιακά στις συνθήκες του περιβάλλοντος.



Εικόνα 3.9: Αναγεννημένα φυτά σε στάδιο σκληραγώγησης και εγκλιματισμού. **A.** Μεταφορά νεαρού φυτού σε χώμα, **B.** Κάλυψη φυτών ιστοκαλλιέργειας με σακούλες, **Γ.** Σταδιακή αφαίρεση της κάλυψης προς εγκλιματισμό των φυτών σε συνθήκες περιβάλλοντος.

Στο σύνολο, παράχθηκαν 20 μετασχηματισμένα φυτά με το γονίδιο *HraA*, τα οποία μεταφέρθηκαν στο θερμοκήπιο για το τελευταίο στάδιο εγκλιματισμού (Εικ. 3.9). Από την σκληραγώγηση επέζησαν σε ποσοστό 50% τα *HraA* φυτά (Πίνακας 3.1) και στο στάδιο αυτό αφαιρέθηκαν τελείως τα καλύμματα, έπειτα από συνολική διάρκεια εγκλιματισμού ενός περίπου μήνα.



Εικόνα 3.10: Μετασχηματισμένα *N. benthamiana* φυτά (Τ0 γενεάς) **A.** Νεαρό φυτό σε στάδιο άνθισης, **B.** Τ0 φυτά μετασχηματισμένα με το γονίδιο *HraA*

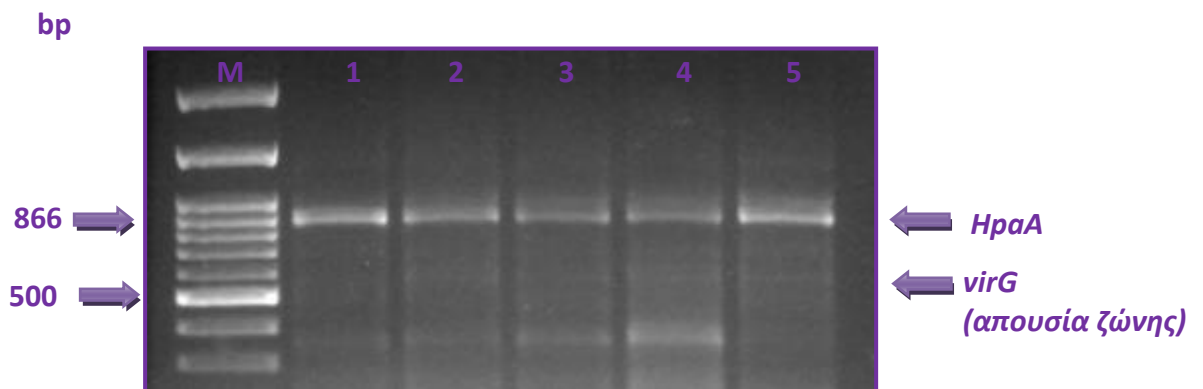
Στο σημείο αυτό, είναι σημαντικό να αναφερθεί το γεγονός ότι ένα μεγάλο ποσοστό των μετασχηματισμένων φυτών που ανέπτυξαν ικανοποιητικό ριζικό σύστημα και μεταφέρθηκαν σε χώμα (76,5%), αν και παρουσίαζαν φυσιολογικό φαινότυπο, δεν κατάφεραν να επιβιώσουν σε συνθήκες περιβάλλοντος, ενώ τα μισά σχεδόν από τα Τ0 φυτά παρουσίασαν αδυναμία παραγωγής απόρου από αυτογονιμοποίηση.

Ταυτόχρονα, τα φυτά που εκφράζουν αυτό το γονίδιο βακτηριακής προέλευσης, παρουσίασαν νεκρώσεις σε όλα σχεδόν τα στάδια του μετασχηματισμού, αναγέννησης, εγκλιματισμού σε περιβαλλοντικές συνθήκες, άνθισης και παραγωγής σπόρου.

3.2.2 Έλεγχος της παρουσίας του διαγονιδίου

Τα μετασχηματισμένα *N. benthamiana* φυτά που επέζησαν της σκληραγώγησης και παρήγαγαν σπόρο Τ1 γενεάς, εξετάστηκαν για την παρουσία του διαγονιδίου *HraA*. Για τα πειράματα βιοτικών καταπονήσεων σε φυτά Τ1 γενεάς επιλέχθηκαν συνολικά 5 φυτά Τ0 γενεάς, μετασχηματισμένα με το γονίδιο *HraA*. Ο έλεγχος της ποιότητας και

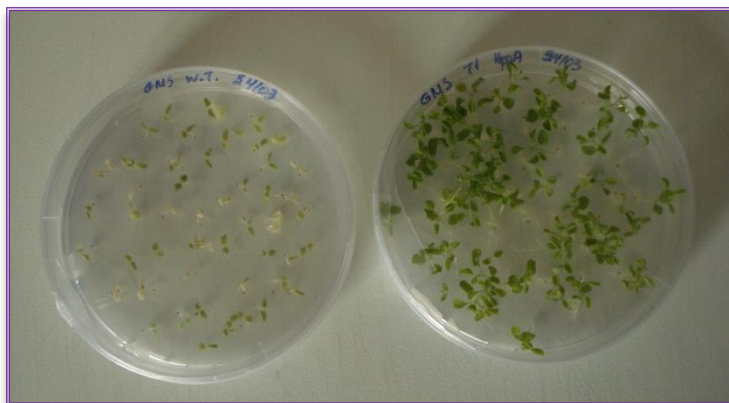
ποσότητας του DNA που απομονώθηκε από τα φύλλα των μετασηματισμένων φυτών, πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση και ακολούθησε PCR χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους για την ενίσχυση του διαγονιδίου εκκινητές και παράλληλα τους εκκινητές που ενισχύουν το γονίδιο *virG* του βακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens*. Τα προϊόντα ενίσχυσης ήταν μεγέθους 866 και (590bp) για τα *HraA* και *virG* αντίστοιχα. Η παρουσία των εισαχθέντων αλληλουχιών επιβεβαιώθηκε σε όλα τα φυτά που εξετάστηκαν, υποδεικνύοντας την απουσία αποδράσεων και ταυτόχρονα την επάρκεια της πίεσης επιλογής. Η απουσία του προϊόντος ενίσχυσης της περιοχής *virG* απέκλεισε το ενδεχόμενο επιμόλυνσης με το αγροβακτήριο και συνεπώς επιβεβαίωσε την επιτυχία του μετασηματισμού.



Εικόνα 3.11: Προϊόντα ενίσχυσης πολλαπλής PCR σε μετασηματισμένα φυτά του είδους *N. benthamiana*. M: Marker (bp) 100bp DNA Ladder (Biolabs). 1,2,3,4,5: Μετασηματισμένα φυτά (T0 γενιά) που φέρουν το διαγονίδιο *HraA* (866 bp), απουσία ζώνης μεγέθους 590 bp που αντιστοιχεί στο γονίδιο *virG* του *A. tumefaciens*

3.2.3 Παραγωγή διαγονιδιακών φυτών T1 γενεάς που εκφράζουν το γονίδιο *HraA*

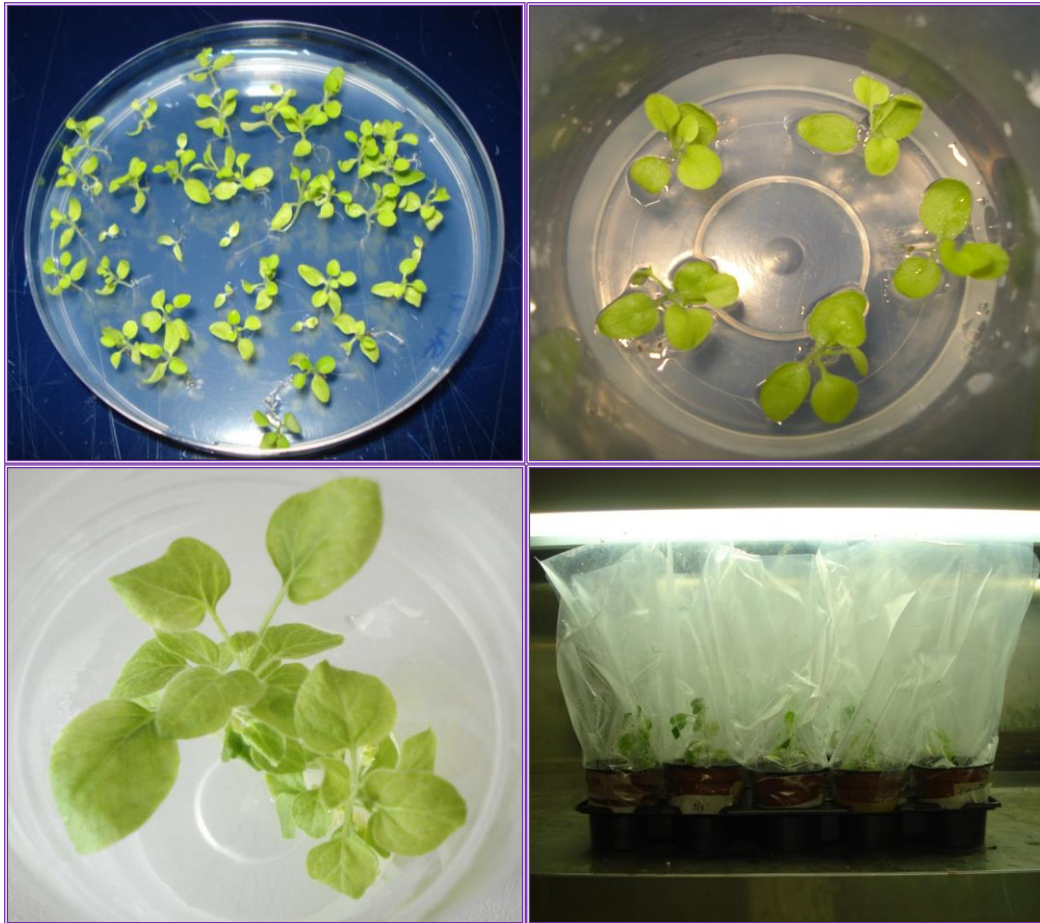
Συνολικά, παράχθηκαν 10 διαγονιδιακές *HraA* σειρές (φυτά) T0, από τα οποία επιλέχθηκαν 5 σειρές για τη δημιουργία φυτών T1 γενεάς από σπόρο αυτογονιμοποίησης. Η φυσιολογική έκφραση του υπό μελέτη γονιδίου ελέγχθηκε με έμμεσο τρόπο, μέσω της *in vitro* ανάπτυξης τους υπό πίεση επιλογής σε καναμυκίνη. Σχεδόν όλα τα διαγονιδιακά φυτά επιβίωσαν υπό την ασκούμενη πίεση επιλογής σε όλα τα στάδια ανάπτυξης τους, αντίθετα με τα φυτά αγρίου τύπου (αρνητικοί μάρτυρες) τα οποία παρουσίασαν αδυναμία ανάπτυξης και, τελικώς, επιβίωσης λόγω της επίδρασης του αντιβιοτικού.



Εικόνα 3.12: *In vitro* βλάστηση σπόρων T1 γενεάς υπό πίεση επιλογής σε καναμυκίνη, **Αριστερά:** Αρνητικοί μάρτυρες (Φυτά *N. benthamiana* άγριου τύπου), **Δεξιά:** Διαγονιδιακά φυτά *N. benthamiana*, μετασχηματισμένα με το γονίδιο *HraA*

Παράλληλα, αναπτύχθηκαν *in vitro* φυτά άγριου τύπου απουσία του αντιβιοτικού, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως μάρτυρες στα πειράματα βιοτικών καταπονήσεων που επακολούθησαν. Όλα τα φυτά (T0, T1) είχαν φυσιολογικό φαινότυπο, ενώ δεν παρουσίασαν νεκρωτικά ή άλλου τύπου συμπτώματα λόγω της ενδογενούς έκφρασης του βακτηριακού γονιδίου. Επιπλέον, τα διαγονιδιακά φυτά χαρακτηρίζονταν από αυξημένο ρυθμό ανάπτυξης και υψηλή ευρωστία συγκριτικά με τα φυτά άγριου τύπου (Εικόνα 3.13). Τα φυτά των διαγονιδιακών σειρών που βρίσκονταν σε στάδιο ανάπτυξης ανάλογο με τα φυτά αγρίου τύπου, μεταφέρθηκαν σε χώμα και εγκλιματίστηκαν στις περιβαλλοντικές συνθήκες του θαλάμου ανάπτυξης ελεγχόμενων συνθηκών, κατά τον ίδιο τρόπο που ακολουθήθηκε και για τα T0 διαγονιδιακά φυτά.

Τελικώς, τα φυτά που επιβίωσαν από την σκληραγώγηση και παρουσίασαν καλύτερο φαινότυπο, επιλέχθηκαν για μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.



Εικόνα 3.13: Ανάπτυξη διαγονιδιακών φυτών T1 γενεάς, **A.** Βλάστηση σπόρων, **B., Γ.** Ανάπτυξη νεαρών σπορόφυτων, **Δ.** Μεταφορά νεαρών φυταρίων σε χώμα

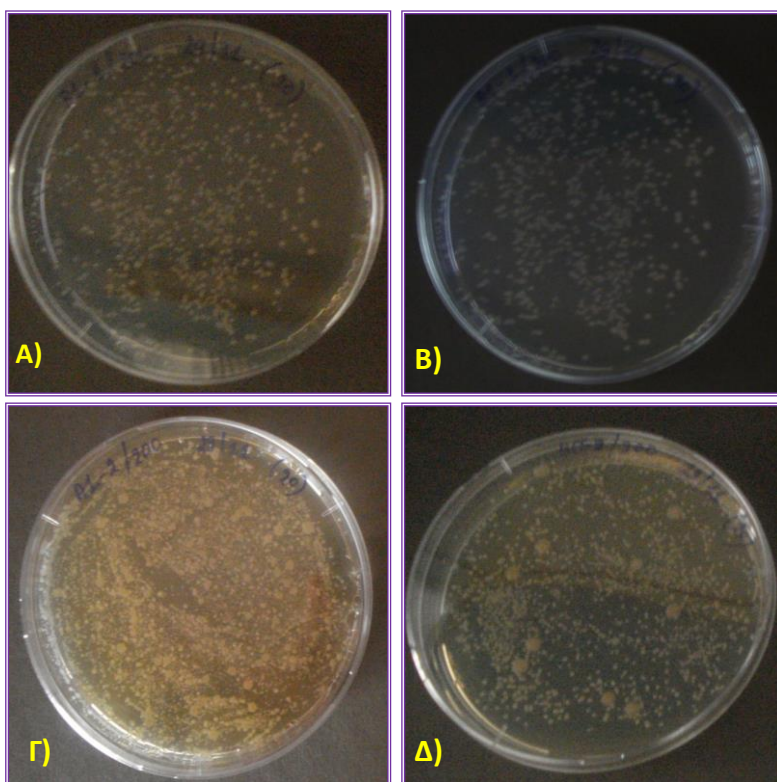


Εικόνα 3.14: Εγκλιματισμός - Σκληραγώγηση T1 διαγονιδιακών φυτών σε συνθήκες περιβάλλοντος

3.2.4 Τεστ ανθεκτικότητας των *HraA* διαγονιδιακών φυτών καπνού T1 γενεάς στη βακτηριακή κηλίδωση του καπνού

Προκειμένου να ελεγχθεί η επίδραση του γονιδίου *HraA* στα διαγονιδιακά T1 φυτά του είδους *Nicotiana benthamiana*, αναφορικά με την ασθένεια της βακτηριακής κηλίδωσης του καπνού, επιλέχθηκαν 3 φυτά από 4 διαφορετικές διαγονιδιακές σειρές καθώς και 2 φυτά άγριου τύπου και μολύνθηκαν με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Έπειτα από 2 και 4 ημέρες, λήφθηκαν δείγματα ιστού από τα μολυσμένα φύλλα και διενεργήθηκαν μετρήσεις της αποίκησης του βακτηρίου μέσω μέτρησης των αποικιών που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο επιλογής.

Η επίστρωση των εναιωρημάτων του βακτηρίου που εξήχθησαν από το μολυσμένο ιστό, πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικές αραιώσεις ώστε να επιλεγεί η καταλληλότερη προς μέτρηση.



Εικόνα 3.15 : Ανάπτυξη αποικιών του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 4 ημέρες μετά τη μόλυνση των *N. benthamiana* διαγονιδιακών φυτών T1 γενεάς. **A., B., Γ.:** αποικίες του βακτηρίου από διαφορετικές σειρές των *HraA* - διαγονιδιακών φυτών **Δ.** αποικίες του βακτηρίου από φυτό - μάρτυρα (*N. benthamiana* άγριου τύπου)

Στην αραίωση 1/100 δεν κατέστη δυνατή η καταμέτρηση καθώς οι αποικίες συνενώνονταν, ενώ στην αραίωση 1/200 και επίστρωση 20 μ lt δείγματος στο κάθε τρυβλίο επιλογής (ριφαμυκίνη 50mg/lt), οι αποικίες διαχωρίζονταν και καταμετρήθηκαν σε όλη την έκταση του τρυβλίου. Σημειώνεται ότι στα τρυβλία επιλογής, αναπτύχθηκαν αποικίες μόνο του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στον πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2 Αποτελέσματα μετρήσεων των αποικιών του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* στα διαγονιδιακά T1 φυτά καπνού

Δείγμα	Αριθμός αποικιών/τρυβλίο	
	2 ημέρες μετά τη μόλυνση	4 ημέρες μετά τη μόλυνση
WT1 (μάρτυρας)	828	2973
WT2 (μάρτυρας)	692	1740
A1-1	880	3480
A1-2	534	2600
A1-3	680	1400
A2-1	760	3014
A2-2	960	2480
A2-3	890	2320
A3-1	240	1800
A3-2	768	2022
A3-3	920	2310
A4-1	815	2305
A4-2	778	1876
A4-3	630	1365

Από τα αποτελέσματα των μετρήσεων φάνηκε ότι δεν υπήρξαν ουσιαστικές διαφοροποιήσεις μεταξύ διαγονιδιακών φυτών και μαρτύρων ούτε στις 2 αλλά ούτε και στις 4 ημέρες μετά τη μόλυνση. Πιο συγκεκριμένα, ενώ μεμονωμένα φυτά εμφάνισαν είτε μεγαλύτερη (A2-2 – 2 ημέρες) είτε μικρότερη βακτηριακή ανάπτυξη

(A3-1 – 2 ημέρες) σε σχέση με τους μάρτυρες, δεν παρουσίασαν ανάλογη διαφοροποίηση στις 4 ημέρες μετά τη μόλυνση, καθώς επίσης δεν υπήρξε αντίστοιχη ανάπτυξη στα υπόλοιπα φυτά της ίδιας σειράς. Από τους μέσους όρους των μετρήσεων για την κάθε διαγονιδιακή σειρά (πίνακας 3.3) καθώς και το συνολικό μέσο όρο όλων των βιολογικών επαναλήψεων σε σύγκριση με το μέσο όρο των φυτών – μαρτύρων, δεν ανιχνεύθηκαν σημαντικές διαφορές για κανένα από τους δύο διαφορετικούς χρόνους μετρήσεων. Κατά συνέπεια, από την πειραματική διαδικασία αξιολόγησης της αποίκησης του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, αναδεικνύεται ότι το γονίδιο *HraA* δεν είχε κάποια επίδραση στον πολλαπλασιασμό του προκείμενου παθογόνου.

Πίνακας 3.3 Μέσοι όροι των μετρήσεων των αποικιών του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* ανά διαγονιδιακή T1 σειρά

Διαγονιδιακή σειρά	Μέσοι όροι της μέτρησης των αποικιών ανά σειρά	
	2 ημέρες μετά τη μόλυνση	4 ημέρες μετά τη μόλυνση
WT (μάρτυρας)	760	2356
A1	698	2493
A2	870	2604
A3	642	2044
A4	741	1848
Συνολικοί μέσοι όροι των διαγονιδιακών σειρών	737,75	2247,25

Ακολούθησε συγκριτική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων, λαμβάνοντας υπόψη και το φαινότυπο που παρουσίασαν τα μολυσμένα φυτά σε σχέση με τους μάρτυρες. Από τις φαινοτυπικές παρατηρήσεις στα μολυσμένα με το *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* διαγονιδιακά φυτά και φυτά – μάρτυρες, φάνηκαν διαφορές αναφορικά με το μέγεθος της καταπόνησης. Πιο συγκεκριμένα, τα φυτά – μάρτυρες εμφάνισαν υγρές σήψεις και στα φύλλα που είχαν εμποτιστεί με το βακτήριο αλλά και στα κατώτερα φύλλα, από τις 2 πρώτες ημέρες μετά τη μόλυνση, σε αντίθεση με τα διαγονιδιακά φυτά που παρουσίαζαν ελαφριά μάρανση μόνο στα φύλλα που είχαν εμποτιστεί (Εικ. 316).



Εικόνα 3.16: Εμφάνιση φυτών καπνού 2 ημέρες μετά τη μόλυνσή τους με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. **Αριστερά:** Φυτό -Μάρτυρας (*Nicotiana benthamiana* άγριου τύπου) **Δεξιά:** Διαγονιδιακό φυτό T1 γενεάς που φέρει το γονίδιο *HraA*. (σε κύκλο εμφανίζονται φύλλα που εμποτίστηκαν με το βακτήριο)

Στις 4 ημέρες μετά τη μόλυνση των υπό μελέτη φυτών, στα φυτά άγριου τύπου, (μάρτυρες) η συμπτωματολογία της ασθένειας επεκτάθηκε σε ολόκληρο το φυτό και 2 εβδομάδες μετά τη μόλυνση είχαν νεκρωθεί. Αντιθέτως, τα *HraA* - διαγονιδιακά φυτά παρουσίαζαν παρόμοιο φαινότυπο στις δύο και στις 4 ημέρες μετά τη μόλυνση, ενώ τα συμπτώματα της ασθένειας έγιναν εμφανή στις 15 ημέρες μετά τη μόλυνση και οξύνονταν σταδιακά έως την καθολική νέκρωση των φυτών μετά το πέρας 30 ημερών.



Εικόνα 3.17: Εμφάνιση φυτών καπνού 4 ημέρες μετά τη μόλυνσή τους με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. **Αριστερά:** Φυτά -Μάρτυρες (*Nicotiana benthamiana* άγριου τύπου), **Δεξιά:** Διαγονιδιακά φυτά T1 γενεάς που φέρουν το γονίδιο HraA.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η συνεξέλιξη μεταξύ φυτών ξενιστών και φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών χαρακτηρίζεται από μία συνεχή μάχη, όπου η εξέλιξη των μικροοργανισμών περιλαμβάνει την κατοχή πρωτεϊνών-τελεστών που μεταβάλλουν προς όφελος τους την πρωτογενή και δευτερογενή άμυνα του ξενιστή (για άρθρο ανασκόπησης βλέπε, Wit, 2007). Η ανταπόκριση από μέρους των φυτών περιλαμβάνει την αναγνώριση των συγκεκριμένων πρωτεϊνών-τελεστών και την επακόλουθη ενεργοποίηση διαδοχικών επιπέδων άμυνας ώστε να καθίσταται ικανή η τοπική και διασυστηματική άμυνα έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών. Αυτή η υπόθεση, είναι περισσότερο βάσιμη στην περίπτωση παθογόνων όπως είναι τα βακτήρια, οι μύκητες και οι ωομύκητες, λόγω της κατοχής πληθώρας πρωτεϊνών-τελεστών (Alfano & Collmer, 2004; Hauck *et al.*, 2003).

Το γονίδιο *HraA*, που προέρχεται από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *X. campestris* pv. *campestris*, έχει αναγνωρισθεί ως παράγοντας παθογένειας που σχετίζεται την ανάπτυξη συμπτωμάτων ασθένειας σε ευαίσθητα φυτά και την επαγωγή της αντίδρασης υπερευαισθησίας σε ανθεκτικά φυτά. Έρευνες που αφορούσαν τόσο σε *in vivo* όσο και σε *in vitro* λειτουργικές μελέτες, υποδεικνύουν ότι η λειτουργία του *HraA* σχετίζεται με την έκκριση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στο σχηματισμό πόρου και πρωτεϊνών - τελεστών και επιπλέον, εκκρίνεται και ενσωματώνεται εντός του φυτικού κυττάρου. Μελέτες που αφορούν σε αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών, προτείνουν ότι η έκκριση πρωτεϊνών μη-τελεστών λαμβάνει χώρα κατά την πρόσδεση του *HraA* στο *HraB* ενώ αντίθετα, η έκκριση πρωτεϊνών - τελεστών προϋποθέτει την απελευθέρωση του *HraB*. Στο σύνολό τους, τα ευρήματα αυτά ενισχύουν την υπόθεση ότι το *HraA* δρα ως ρυθμιστής του εκκριτικού συστήματος T3S (Lorenz *et al.*, 2008).

Επιπρόσθετα, η παρουσία δύο λειτουργικών NLS μοτίβων (nuclear localization signals), παρέχει ενδείξεις ότι το γονίδιο *HraA* δρα εντός του πυρήνα των φυτικών κυττάρων (Huguet *et al.*, 1998). Παρόλα αυτά, ο τρόπος δράσης του *HraA* παραμένει αδιευκρίνιστος, καθώς το γονίδιο δεν παρουσιάζει σημαντική αμινοξική ομολογία με πρωτεΐνες γνωστής λειτουργίας (Kay & Bonas, 2009; Lorenz *et al.*, 2008).

Στα πλαίσια αυτά, στόχο της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η δημιουργία διαγονιδιακών φυτών με το γονίδιο *HraA*, προκειμένου να μελετηθεί η επίδρασή του σε ετερόλογο σύστημα αναφοράς και υπό συνθήκες στρες. Απώτερος σκοπός είναι η συλλογή πληροφοριών που σχετίζονται με τη δράση του υπό μελέτη γονιδίου εντός των φυτικών κυττάρων και ο έλεγχος της δυνατότητάς του να επάγει απευθείας αντίδραση υπερευαισθησίας ή να έχει θετική

επίδραση στη βασική άμυνα των φυτών, προκειμένου να αξιοποιηθεί στη βελτίωση της ανθεκτικότητάς τους υπό συνθήκες βιοτικών καταπονήσεων.

Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση της διαγονιδιακής έκφρασης του γονιδίου *HraA*, πριν την εφαρμογή σταθερού μετασχηματισμού που αποτελεί χρονοβόρα και δύσκολη διαδικασία, αξιοποιήθηκε η μεθοδολογία δημιουργίας διαγονιδιακών ριζών μέσω του *A.rhizogenes*. Η συγκεκριμένη μεθοδολογία, λόγω του σύντομου χρονικού διαστήματος και της ευκολίας εφαρμογής της, αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για τη δημιουργία διαγονιδιακών ριζών που αξιοποιούνται σε μελέτες γονιδιακής λειτουργίας. Η προσέγγιση αυτή έχει στο παρελθόν χρησιμοποιηθεί σε μελέτες που αφορούν στη βιολογία και φυσιολογία των φυτών ή στην αλληλεπίδρασή τους με υποχρεωτικά παράσιτα ρίζας (Ehlers *et al.*, 1991; Paul *et al.*, 1990; Mugnier, 1987), για την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών μέσω υποκαλλιέργειας των μετασχηματισμένων ριζών (Hamill *et al.*, 1986), καθώς και για την αναγέννηση ολόκληρων φυτών από διαγονιδιακές ρίζες (Damgaard & Rasmussen, 1991; Shahin *et al.*, 1986). Πρόσφατα, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο μέσω του *A. rhizogenes* μετασχηματισμός ριζών για μελέτες που αφορούν στην αζωτοδέσμευση ως αποτέλεσμα της συμβιωτικής σχέσης μεταξύ ψυχανθών και ριζόβιων βακτηρίων που οδηγεί στο σχηματισμό φυματίων (Limpens *et al.*, 2004, 2005).

Στην παρούσα πειραματική διαδικασία, για την προκαταρκτική αξιολόγηση του γονιδίου *HraA*, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο των Pavnli *et al.* (2011), το οποίο είναι βελτιστοποιημένο και αποδίδει υψηλά ποσοστά μετασχηματισμού κατά την εφαρμογή του στο ζαχαρότευτλο. Δεδομένου ότι δεν πραγματοποιήθηκε καμία τροποποίηση σε κανένα από τους κύριους παράγοντες που επηρεάζουν την επιτυχία του μετασχηματισμού, όπως: γονότυπος φυτικού υλικού, βακτηριακό στέλεχος, ασκούμενη πίεσης επιλογής, σύσταση θρεπτικών υποστρωμάτων κλπ, οι διαφοροποιήσεις στα αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας μεταξύ διαγονιδιακών ριζών και μαρτύρων, αποδίδονται σε σημαντικό βαθμό στην επίδραση του εισαχθέντος γονιδίου. Ο μετασχηματισμός πραγματοποιήθηκε με το στέλεχος R1000 που, σύμφωνα με αναφορές στη βιβλιογραφία, είναι από τα πλέον μολυσματικά στελέχη του *A.rhizogenes* (Tao & Li, 2006; Kovalenko & Maliuta, 2003; Park & Fachini, 2000) και εφαρμόστηκε σε δύο διαφορετικές ποικιλίες ζαχαρότευτλου (Αλεξάνδρα και Πανδώρα).

Ο εμβολιασμός νεαρών σποροφύτων τεύτλου με μετασχηματισμένα κύτταρα του *A.rhizogenes*, οδήγησε στην ανάπτυξη μετασχηματισμένων ριζών που φέρουν το προς ενσωμάτωση διαγονίδιο. Η παρουσία του διαγονιδίου σε όλα τα φυτά που εξετάστηκαν, υποδεικνύει την καταλληλότητα της μεθόδου για την δημιουργία μετασχηματισμένων ριζών τεύτλου.

Το γονίδιο *HraA*, μέσα από ταυτοποίηση της εκφραζόμενης πρωτεΐνης στο NCBI, έχει δειχθεί ότι είναι συντηρημένο στα είδη της Ξανθομονάδας. Δεδομένου ότι το ζαχαρότευτλο αποτελεί μη φυσικό ξενιστή του συγκεκριμένου στελέχους ξανθομονάδας, το υπό μελέτη σύστημα φυτού – παθογόνου παρουσιάζει μη συμβατή αλληλεπίδραση. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με την παρατήρηση ότι το ριζικό σύστημα των μετασχηματισμένων φυτών διαφοροποιήθηκε συγκριτικά με αυτό των φυτών-μαρτύρων, παρέχει ενδείξεις ότι οι παρατηρηθείσες νεκρώσεις πιθανόν να συνδέονται με καθυστερημένη επαγωγή της αντίδρασης υπερευαισθησίας. Παράλληλα, από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι οι πρωτεΐνες-τελεστές λειτουργούν σε φυτά-ξενιστές ως μολυσματικοί παράγοντες και πολύ συχνά έχουν τοξική επίδραση αναλόγως της ποσότητας της παραγόμενης πρωτεΐνης, καθώς επίσης εμφανίζουν φαινοτύπους αναστολής της ανάπτυξης. Δεδομένου ότι η παρούσα εργασία αποτελεί την πρώτη αναφορά για τη μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *HraA* σε φυτά, η υπόθεση ύπαρξης τοξικής επίδρασης δεν μπορεί να αποκλειστεί και προφανώς χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Το πρωτόκολλο μετασχηματισμού φυτών του είδους *N.benthamiana* που εφαρμόστηκε όπως περιγράφηκε από τους Horsch *et al.* (1995) επέτρεψε την ανάπτυξη διαγονιδιακών φυτών παρά τις χαμηλές συχνότητες μετασχηματισμού και αναγέννησης. Η παρουσία του προς ενσωμάτωση διαγονιδίου καθώς και η ταυτόχρονη απουσία αλληλουχιών DNA του αγροβακτηρίου σε όλα τα φυτά που εξετάστηκαν, επιβεβαιώνει την καταλληλότητα της μεθόδου και τη χρήση των *N. benthamiana* φυτών ως μοντέλο για τη σταθερή ενσωμάτωση, ακόμη και βακτηριακής προέλευσης, γονιδίων προς μελέτη της έκφρασης και λειτουργίας τους. Επιπλέον, τα φυτά της T1 γενεάς χαρακτηρίστηκαν από φυσιολογική ανάπτυξη και η έκφραση του διαγονιδίου επιβεβαιώθηκε μέσω της βλάστησης των σπόρων υπό πίεση επιλογής σε καναμυκίνη.

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της διαγονιδιακής έκφρασης του γονιδίου *HraA* στην απόκριση των φυτών που έχουν υποστεί καταπόνηση από βιοτικούς παράγοντες, πραγματοποιήθηκε τεχνητή μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Η απόκριση των φυτών αξιολογήθηκε τόσο σε φαινοτυπικό επίπεδο, με μακροσκοπικές παρατηρήσεις, όσο και με μέτρηση της αποίκησης του βακτηρίου σε δύο διαφορετικούς χρόνους. Παρά το γεγονός ότι αναφορικά με την αποίκηση του βακτηρίου δεν υπήρξαν ουσιαστικές διαφοροποιήσεις μεταξύ διαγονιδιακών φυτών και μαρτύρων ούτε στις 2 αλλά ούτε και στις 4 ημέρες μετά τη μόλυνση, τα πρώτα χαρακτηρίζονταν από καθυστερημένη και ηπιότερη ανάπτυξη συμπτωμάτων.

Η καθυστέρηση στην ανάπτυξη συμπτωμάτων πιθανόν να οφείλεται στην ενδογενή επίδραση του γονιδίου στη βασική άμυνα του φυτού. Πολλές φορές η αυξημένη ανάπτυξη και ευρωστία

που επιδεικνύουν τα γενετικά τροποποιημένα φυτά οφείλεται στην *in vitro* ανάπτυξή τους. Για το λόγο αυτό, τα φυτά μάρτυρες αναπτύχθηκαν υπό τις ίδιες συνθήκες προκειμένου να αποκλειστεί το αναπτυξιακό αυτό πλεονέκτημα (πρόσληψη όλων των απαιτούμενων θρεπτικών λόγω ιστοκαλλιέργειας) και να είναι πιο αντικειμενικά τα αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας. Είναι σαφές ότι χρειάζονται πολύ περισσότερες πληροφορίες προκειμένου να διεξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για τη δράση του γονιδίου *HraA* εντός του φυτικού κυττάρου. Οι ενδείξεις κατευθύνονται προς την ενίσχυση της βασικής άμυνας των φυτών (που δεν αποτελούν φυσικό ξενιστή της ξανθομονάδας) και είναι σκόπιμο να εφαρμοστούν μοριακές αναλύσεις αναφορικά με βιοχημικά μονοπάτια που εμπλέκονται σε αυτή, ώστε να αποκλειστεί το γεγονός της καθυστέρησης στην ανάπτυξη των συμπτωμάτων ασθένειας να οφείλεται σε τυχαίους παράγοντες.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Abramovitch R.B., Anderson J.C. & Martin G.B. (2006).** Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 601–611.
- **Agrios G. N. (1997).** Plant Pathology, 4th Ed. Academic Press. 616 p.
- **Alfano J.R. & Collmer A. (1997).** The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins and death. *J. Bacteriol.* 179, 5655.
- **Alfano J.R. & Collmer A. (2004).** Type III secretion system effector proteins: Double Agents in Bacterial Disease and Plant Defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42:385–414.
- **Anderson D.M., Schneewind O. (1997).** A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *Science* 278:1140–43.
- **Ausubel F.M. (2005).** Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nature Immunol.* 6, 973–979.
- **Axtell M.J., Staskawicz B.J. (2003).** Initiation of RPS2–specified disease resistance in *Arabidopsis* is coupled to the AvrRpt2–directed elimination of RIN4. *Cell* 112:369–77.
- **Badel J.L., Charkowski A.O., Deng W.L. & Collmer A. (2002).** A gene in the *Pseudomonas syringae* pv. tomato Hrp pathogenicity island conserved effector locus, hopPtoA1, contributes to efficient formation of bacterial colonies in planta and is duplicated elsewhere in the genome. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15, 1014–1024.
- **Baker C.J., Orlandi E.W. (1995).** Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* 33:299-321.

- **Bogdanove, A. J., S.V. Beer, U. Bonas, C.A. Boucher, A. Collmer, D.L. Coplin, G.R. Cornelis, H.C. Huang, S.W. Hutcheson, N.J. Panopoulos, and F. VanGijsegem (1996).** Unified nomenclature for broadly conserved hrp genes of phytopathogenic bacteria. *Mol. Microbiol.* 20:681-683.

- **Boller T., Felix G. (2009).** A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60:379–406.

- **Bretz J.R., Mock N.M., Charity J.C., Zeyad S., Baker C.J., Hutcheson S.W. (2003).** A translocated protein tyrosine phosphatase of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 modulates plant defence response to infection. *Mol. Microbiol.* 49:389–400.

- **Büttner D., Bonas U. (2002).** Port of entry—the type III secretion translocon. *Trends Microbiol.* 10:186–92.

- **Büttner D., Noël L., Thieme F. & Bonas U. (2003).** Genomic approaches in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* allow fishing for virulence genes. *Journal of Biotechnology* 106, 203–214.

- **Cheng L.W., Anderson D.M., Schneewind O. (1997).** Two independent type III secretion mechanisms for YopE in *Yersinia enterocolitica*. *Mol. Microbiol.* 24:757– 65.

- **Chen Z., Kloek A.P., Cuzick A., Moeder W., Tang D. et al. (2004).** The *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpt2 functions downstream or independently of SA to promote virulence on *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 37:494–504.

- **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.

- **Conrath U., Beckers G.J.M., Flors V., Garcia-Agustin P., Jakab G., et al. (2006).** Priming: getting ready for battle. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19:1062–71.

- **Cornelis G.R. (2000).** Molecular and cell biology aspects of plague. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:8778–83.
- **Damgaard O., Rasmussen O. (1991).** Direct regeneration of transformed shoots in *Brassica napus* from hypocotyl infections with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Mol Biol* 17:1–8.
- **Dangl J.L. & Jones J.D.G. (2001).** Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411, 826–833.
- **Deall M.W. and Core J.S. (1986).** A comparative study of the pathogenicity and epidemiology of strains of *Pseudomonas syringae pv.tabaci* that cause wildfire and angular leaf spot disease of tobacco in Zimbabwe. *Plant Pathol.* 35:74-81.
- **Dye D.W., Bradbury J.F., Goto M., Hayward A.C., Lelliott R.A. and Schroth M.N. (1980).** International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. *Rev. Plant Pathol.* 59:153:168.
- **Ehlers U., Commandeur U., Frank R., Landsmann J., Koenig R., Burgermeister W. (1991).** Cloning of the coat protein gene from beet necrotic yellow vein virus and its expression in sugar beet hairy roots. *Theor Appl Genet* 81:777–782.
- **Feldman M.F., Cornelis GR. (2003).** The multitasking type III chaperones: all you can do with 15 kDa. *FEMS Microbiol. Lett.* 219:151–58.
- **Fouts D.E. (2002).** Genomewide identification of *Pseudomonas syringae pv. tomato* DC3000 promoters controlled by the HrpL alternative sigma factor, PNAS, F, vol. 99, no. 4, 2275–2280.

- **Francis M.S., Wolf-Watz H., Forsberg A. (2002).** Regulation of type III secretion systems. *Curr. Opin. Microbiol.* 5:166– 72.
- **Fritz-Laylin L.K., Krishnamurthy N., Tor M., Sjolander K.V. & Jones J.D. (2005).** Phylogenomic analysis of the receptor-like proteins of rice and Arabidopsis. *Plant Physiol.* 138, 611–623.
- **Gabriel D.W. & Rolfe B.G. (1990).** Working models of specific recognition in plant microbe interactions. *Annu. Rev. Phytopath.* 28: 365-391.
- **Glazebrook J. (2005).** Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 205–227.
- **Gomez-Gomez L., Boller T. (2002).** Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci.* 7:251–56.
- **Grant S. R., Fisher E. J., Chang J.H., Mole B.M. & Dangl J.L. (2006).** Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 60, 425–449.
- **Hamill D., Parr A.J., Robins R.J. and Rhodes M.J.C. (1986).** Secondary product formation by cultures of *Beta vulgaris* and *Nicotiana rustica* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Reports* 5:111 – 114.
- **Huguet E., Hahn K., Wengelnik K. & Bonas U. (1998).** HpaA mutants of *Xanthomonas campestris* pv.vesicatoria are affected in pathogenecity but retain the ability to induce host-specific hypersensitivity reaction. *Molecular Microbiology*, 29(6), 1379-1390.
- **Initiative T.A.G. (2000).** Analysis of the genome of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796–815.
- **Jakobek J.L., Smith J.A. & Lindgren P.B. (1993).** Suppression of bean defense responses by *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell* 5, 57–63.

- **Jamir Y., Guo M., Oh H.-S., Petnicki- Ocwieja T., Chen S., Tang X., et al. (2004).** Identification of *Pseudomonas syringae* type III secreted effectors that suppress programmed cell death in plants and yeast. *Plant J.* 37:554–65.
- **Jin P., Wood M.D., Wu Y., Xie Z.Y., Katagiri F. (2003).** Cleavage of the *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpt2 requires a host factor(s) common among eukaryotes and is important for AvrRpt2 localization in the host cell. *Plant Physiol.* 133:1072–82.
- **Jones J.D.G & Jeffery L. Dangl J.L. (2009).** The plant immune system, Vol.444/16, nature 052861.
- **Kay S. & Bonas U. (2009).** How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. *Current Opinion in Microbiology*, 12:37–43.
- **Keen N.T. (1990).** Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Genet.* 24:447–63.
- **Keen N. & Holliday M.J. (1982).** Recognition of bacterial pathogens by plants, p. 179-220. In M. S. Mount and G. H. Lacy (ed.), *Phytopathogenic prokaryotes*, vol. 2. Academic Press, Inc., New York.
- **Kjemtrup S., Nimchuk Z., Dangl J.L.(2000).** Effector proteins of phytopathogenic bacteria: bifunctional signals in virulence and host recognition. *Curr. Opin. Microbiol.* 3:73–78.
- **Klement Z., Bozso Z., Besenyi E., Czelleng A., Kecskes M.L., Ott P.G. (2003).** Early induced resistance, a general, symptomless plant response to bacteria. In *Pseudomonas syringae* and Related Pathogens: Biology and Genetics, ed. N.S. Iacobellis, A. Collmer, S.W. Hutcheson, J.W. Mansfield, C.E. Morris, et al. ,pp.301–9. Dordrecht: Kluwer.
- **Kombrink E. & Schmelzer E.(2001).** The hypersensitive response and its role in local and systemic disease resistance. *European Journal of Plant Pathology* 107.

- **Leipe D.D., Koonin E.V. & Aravind L. (2004).** STAND, a class of P-loop NTPases including animal and plant regulators of programmed cell death: multiple, complex domain architectures, unusual phyletic patterns, and evolution by horizontal gene transfer. *J. Mol. Biol.* 343, 1–28.
- **Leister R.T., Ausubel F.M. and Katagiri F. (1996).** Molecular recognition of pathogen attack occurs inside of plant cells in plant disease resistance specified by the *Arabidopsis* genes RPS2 and RPM1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:15497–11502.
- **Limpens E., Rossana M., Fedorova E., Franken C., Franssen H., Bisseling T. and Geurts R. (2005).** Formation of organelle-like N₂-fixing symbiosomes in legume root nodules is controlled by DMI2. *PNAS* 102 (29):10375–10380.
- **Lorenz C., Kirchner O., Egler M., Stuttmann J., Bonas U. and Büttner D. (2008).** HpaA from *Xanthomonas* is a regulator of type III secretion. *Molecular Microbiology*, 69(2), 344–360.
- **Lucas G.B. (1975).** Diseases of tobacco, 3rd ed. Biological Consulting Associates, Raleigh, NC. 621pp.
- **Matzinger P. (2002).** The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296, 301–305.
- **Medzhitov R., Janeway C.A. Jr. (2002).** Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296:298–300.
- **Mudgett M.B. (2005).** New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 509–531.
- **Nicholson R.L., Hammerschmidt R. (1992).** Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu Rev Phytopathol.*, 30:369–389.
- **Nomura K., Melotto M. & He S.Y. (2005).** Suppression of host defense in compatible plant–*Pseudomonas syringae* interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 361–368.

- **Nurnberger T., Brunner F. (2002).** Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5:318–24.
- **Oostendorp M., Kunz W., Dietrich B. & Staub T. (2001).** Induced disease resistance in plants by chemicals. *European Journal of Plant Pathology* 107.
- **Orth K., Xu Z., Mudgett M.B., Bao Z.Q., Palmer L.E., et al. (2000).** Disruption of signaling by *Yersinia* effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease. *Science* 290:1594–97.
- **Otani H., Kohnobe A., Kodama M., Kohmoto K. (1998).** Production of a host-specific toxin by germinating spores of *Alternaria brassicicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 52:285-295.
- **Page A.L., Parsot C. (2002).** Chaperones of the type III secretion pathway: jacks of all trades. *Mol. Microbiol.* 46:1–11.
- **Park S.U. & Facchini P.J. (2000).** *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of opium poppy, *Papaver somniferum* L., and California poppy, *Eschscholzia californica* Cham., root cultures. *Journal of Experimental Botany*, **51** (347), pp. 1005-1016.
- **Parsot C., Hamiaux C., Page A.L. (2003).** The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Curr. Opin. Microbiol.* 6:7–14.
- **Paul H., van Deelen J.E.M., Henken B., de Bock T.S.M., Lange W., Krens F.A. (1990).** Expression in vitro of resistance to *Heterodera schachtii* in hairy roots of an alien monotelosomic addition plant of *Beta vulgaris*, transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Euphytica* 48:153–157.
- **Pennel R.I., Lamb C. (1997).** Programmed cell death in plants. *Plant Cell* 9:1157-1168.
- **Pieterse C.M.J., Dicke M. (2007).** Plant interactions with microbes and insects: from molecular mechanisms to ecology. *Trends Plant Sci.* 12:564–69.

- **Saraste M., Sibbald P.R. & Wittinghofer A. (1990).** The P-loop—a common motif in ATP- and GTPbinding proteins. *Trends Biotechnol.* 15, 430–435.
- **Schulze-Lefert P. & Panstruga R. (2003).** Establishment of biotrophy by parasitic fungi and reprogramming of host cells for disease resistance. *Annu.Rev.Phytopathol.*41, 641–667.
- **Shah D. M., Rommens C. M. T., Beachy R. N. (1995).** Resistance to disease and insects in transgenic plants: progress and applications to agriculture. *Trends Biotechnol.* 13. pp. 362–368.
- **Shao F., Merritt P.M., Bao Z., Innes R.W., Dixon J.E. (2002).** A *Yersinia* effector and a *Pseudomonas avirulence* protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Cell* 109:575– 88.
- **Shao F. et al. (2003).** Cleavage of *Arabidopsis* PBS1 by a bacterial type III effector. *Science* 301, 1230–1233.
- **Shew H.D. and Lucas G.B (1991).** Compendium of Tobacco Diseases, *APS PRESS The American Phytopathological Society*
- **Singh B.D. (2000).** Plant breeding-Principles and Methods. *Kalyani Publishers*
- **Sory M.-P., Cornelis G.R. (1994).** Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from *Yersinia enterocolitica* into HeLa cells. *Mol. Microbiol.* 14:583– 94.
- **Staskawicz B.J., Dahlbeck D., Keen N.T. (1984).** Cloned avirulence gene of *Pseu- domonas syringae pv. glycinea* determines race specific incompatibility on *Glycinemax(L.) Merr. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6024–28.
- **Stebbins C.E., Galan J.E. (2001).** Maintenance of an unfolded polypeptide by a cognate chaperone in bacterial type III secretion. *Nature* 414:77–81.
- **Taira S., Tuimala J., Roine E., Nurmiaho-Lassila E.L., Savilahti H., Romantschuk M. (1999).** Mutational analysis of the *Pseudomonas syringae pv. tomato hrpA* gene encoding Hrp pilus subunit. *Mol Microbiol*, 34:737-744.

- **Tao J. & Li. L. (2006).** Genetic transformation of *Torenia fournieri* L. mediated by *Agrobacterium rhizogenes*. *South African Journal of Botany* 72, 211 – 216.
- **Tao Y. et al.(2003).** Quantitative nature of Arabidopsis responses during compatible and in compatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell* 15, 317–330.
- **Thilmony R., Underwood W. & He S.Y. (2006).** Genome-wide transcriptional analysis of the *Arabidopsis thaliana* interaction with the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv.tomato DC3000 and the human pathogen *Escherichia coli* O157:H7.*Plant J.*46, 34–53.
- **Ting J.P. & Davis B.K. (2005).** CATERPILLER: a novel gene family important in immunity, cell death, and diseases. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 387–414.
- **Truman W., de Zabala M.T. & Grant M. (2006).** Type III effectors orchestrate a complex interplay between transcriptional networks to modify basal defence responses during pathogenesis and resistance. *Plant J.* 46, 14–33.
- **Turner J.G. (1981).** Tabtoxin, produced by *Pseudomonas tabaci*, decreases *Nicotiana tabacum* glutamine synthetase in vivo and causes accumulation of ammonia. *Physiol.Plant Pathol.* 19:57-67.
- **van der Biezen E.A. & Jones J.D.G. (1998).** Plant disease resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem. Sci.* 23, 454–456.
- **Wannamaker M.J. (1988).** A study of the angular leaf spot disease of *Nicotiana tabacum*. Ph.D.Thesis, North Carolina State University. 61pp.
- **Wattiau P., Bernier B., Deslee P., Michiels T., Cornelis G.R. (1994).** Individual chaperones required for Yop secretion by *Yersinia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10493–97.
- **Wattiau P., Woestyn S., Cornelis G.R. (1996).** Customized secretion chaperones in pathogenic bacteria. *Mol. Microbiol.* 20:255–62.

- **White F.F., Yang B., Johnson L.B. (2000).** Prospects for understanding avirulence gene function. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3:291–98.
- **Zipfel C. & Felix G.(2005).** Plants and animals: a different taste for microbes? *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 353–360.
- **Βακαλουνάκης Δ.Ι. & Φραγκιαδάκης Γ.Α. (2003),** «Φυτοπαθοβελτίωση με έμφαση στην τομάτα και στα κολοκυνθοειδή», Εκδόσεις Τυποκρέτα Α.Ε., σελ.518
- **Καλτσίκης Π.Ι. (1989).** ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΦΥΤΩΝ-Αρχές και Μέθοδοι. Εκδόσεις Σταμούλης Α.
- **Ζάχος Δ.Γ., Παναγόπουλος Χ.Γ., Θανασουλόπουλος Κ.Κ., Μπίρης Δ.Α., Κυριακοπούλου Π.Η. (1984).** Λεξικό Φυτοπαθολογικών Όρων. Ελληνική Φυτοπαθολογική Εταιρεία, Αθήνα.
- **Τζάμος Ε. (2007).** ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ. Εκδόσεις Σταμούλης Α.