

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΚΑΙ ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ

Πτυχιακή μελέτη

Έλεγχος διαγονιδιακών φυτών καπνού, για την ενσωμάτωση του γονιδίου της 59K πολυμέρασης του ιού tobacco rattle virus, TRV.

Εμμανουήλ Γ. Τσαγγούρη



Επιβλέπων εκπαιδευτικός: Μαρκόπουλος Κυριάκος
Επίκουρος Καθηγητής

Καλαμάτα 1996

Πρόλογος

Η μελέτη που παρατίθεται παρακάτω πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της πτυχιακής μελέτης των σπουδαστών ΤΕΙ για την απόκτηση πτυχίου Τεχνολόγου Γεωπόνου. Σκοπός της είναι η ενασχόληση του σπουδαστή, η επεξεργασία, η ανάπτυξη αλλά και η παρουσίαση του θέματος της τόσο από θεωρητικής πλευράς, όσο και από πλευράς εφαρμογής. Σε αυτό αποσκοπεί και η μελέτη αυτή, με την ελπίδα πως έχει αναπτυχθεί σωστά και πως μπορεί να προσφέρει στη σωστή συγγραφή άλλων εργασιών.

Η μελέτη αυτή αποτελείται από δύο τμήματα, ένα θεωρητικό, το οποίο παρέχει διάφορα βιβλιογραφικά στοιχεία που αφορούν το αντικείμενο του θέματός μας και ένα πειραματικό στο οποίο περιγράφεται ο σκοπός, η διαδικασία, τα αποτελέσματα και οι πιθανές εξηγήσεις που μπορούν να δοθούν στην πειραματική αυτή μελέτη.

Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου γεωπόνο Μαρκόπουλο Κυριάκο, για τις συμβουλές του και την καθοδήγησή του, ώστε να συγγραφεί σωστά η μελέτη αυτή. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω, ιδιαιτέρως τον προϊστάμενο του Εργαστηρίου Ιολογίας, του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου, γεωπόνο Μπεμ Φρειδερίκο, για τις υποδείξεις του, τόσο κατά τη διάρκεια όσο και κατά τη συγγραφή της πειραματικής αυτής εργασίας καθώς και όλο το υπόλοιπο δυναμικό του εργαστηρίου Ιολογίας για την πολύτιμη βοήθειά του.

Εμμανουήλ Γ. Τσαγγούρης

Περιεχόμενα

	σελ.
1. ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΣΤΟΝ ΚΑΠΝΟ ΓΙΑ ΑΝΤΟΧΗ ΣΕ ΕΧΘΡΟΥΣ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ	1
1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.2. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ΚΑΠΝΟΥ ΓΙΑ ΑΝΤΟΧΗ ΣΕ ΕΧΘΡΟΥΣ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ	2
1.3. ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΠΝΟΥ ΓΙΑ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΙΩΣΕΙΣ	8
1.4. ΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΤΟΥ ΚΑΠΝΟΥ	11
2. Ο ΙΟΣ ΤΟΥ "ΚΡΟΤΑΛΙΣΜΑΤΟΣ" ΤΟΥ ΚΑΠΝΟΥ (TOBACCO RATTLE VIRUS, TRV)	15
2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	15
2.2. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ TRV	15
2.3. Μ ΚΑΙ ΝΜ ΤΥΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΙΣ ΤΟΥ TRV	16
2.4. ΟΡΟΤΥΠΟΙ ΤΟΥ TRV	17
2.5. ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ ΦΥΣΙΚΩΣ ΜΟΛΥΣΜΕΝΩΝ ΞΕΝΙΣΤΩΝ	17
2.6. ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΤΟΥ TRV	19
2.7. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΣ ΜΟΛΥΣΜΕΝΟΙ ΞΕΝΙΣΤΕΣ	21
2.8. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ TRV	24
3. ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΣΤΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ	25
3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΕΝΝΟΙΑ ΤΟΥ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΟΥ ΦΥΤΟΥ	25
3.2. ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΕΠΙΤΥΓΧΑΝΕΤΑΙ ΜΕΣΩ ΤΟΥ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (<i>Agrobacterium tumefaciens</i> MEDIATED GENE TRANSFER)	27
3.3. ΑΛΛΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	32
3.4. ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ	39
4. ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	50

5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	52
5.1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	52
5.2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	52
5.3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	55
5.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	66
5.5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	82
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	86

1. ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΣΤΟΝ ΚΑΠΝΟ ΓΙΑ ΑΝΤΟΧΗ ΣΕ ΕΧΘΡΟΥΣ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο καπνός ανήκει στο γένος *Nicotiana* και είναι μέλος της μεγάλης και σημαντικής οικογένειας των Σολανωδών (*Solanaceae*). Τα καλλιεργούμενα είδη του καπνού που παρουσιάζουν οικονομική σημασία είναι τα *N. tabacum* και *N. rustica*.

Το γένος *Nicotiana* άρχισε να μελετάται από πολύ παλιά, πολύ πριν τις ημέρες του Mendel και απετέλεσε κατάλληλο υλικό για γενετικές μελέτες.

Κατά τη διάρκεια των τριών τελευταίων εκατονταετιών όπου η καλλιέργεια του καπνού έχει εντατικοποιηθεί, έχουν πολλαπλασιαστεί και τα προβλήματα από εχθρούς και ασθένειες. Η ιδιαίτερα μεγάλη αυξητική τάση που εμφανίζουν οι απώλειες των καλλιεργειών του καπνού από εχθρούς, κυρίως όμως από ασθένειες, κατέστησαν επιτακτική την ανάγκη της παραγωγής ποικιλιών οι οποίες θα είναι ανθεκτικές στις προσβολές από εχθρούς και ασθένειες. Μάλιστα, σε πολλές περιπτώσεις οι ποικιλίες αυτές, απετέλεσαν την περισσότερο οικονομική και συνάμα πρακτική λύση, ώστε να αντιμετωπιστούν τέτοια προβλήματα.

Οι ανθεκτικές ποικιλίες, δεν συνιστούν βέβαια την ολοκληρωμένη λύση στο πρόβλημα των εχθρών και των ασθενειών του καπνού. Από την άλλη πλευρά, οι διάφορες μέθοδοι που έχουν ως στόχο τον έλεγχο εχθρών και ασθενειών και αφορούσαν την πρόληψη τέτοιων προβλημάτων (καλλιέργειες κατ' εναλλαγή, χρήση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού, έλεγχος των φορέων, προληπτικός ψεκασμός, κλπ), την άμεση θεραπεία

των προβλημάτων (χημική καταπολέμηση) ή ακόμα και τον βιολογικό έλεγχο τους, δεν αποδείχθηκαν επαρκείς. Για το λόγο αυτό, κρίθηκε αναγκαία η δημιουργία ανθεκτικών ποικιλιών καπνού, οι οποίες σε συνδυασμό με τις παραπάνω μεθόδους, έδωσαν καλύτερα αποτελέσματα.

1.2. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ΚΑΠΝΟΥ ΓΙΑ ΑΝΤΟΧΗ ΣΕ ΕΧΘΡΟΥΣ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

Υπάρχουν 4 στάδια για τη δημιουργία ανθεκτικότητας έναντι εχθρών και ασθενειών στον καπνό, με τη χρήση της γενετικής βελτίωσης φυτών.

Αυτά είναι:

- Η απόκτηση της πηγής που προσφέρει την ανθεκτικότητα.
- Η μεταφορά της ανθεκτικότητας αυτής στην υπό βελτίωση σειρά.
- Η εκτίμηση της ανθεκτικότητας που εμφανίζει η σειρά ως προς την απόδοσή της και την ποιότητά της.
- Το πέρασμα της ανθεκτικής ποικιλίας στην κυκλοφορία.

Το πρώτο βήμα, στη βελτίωση του καπνού για την ανθεκτικότητα σε εχθρούς και ασθένειες, είναι η ανακάλυψη του κατάλληλου γενετικού υλικού.

Όπως και στην περίπτωση άλλων καλλιεργειών, έτσι και στον καπνό, η ανθεκτικότητα μπορεί να βρεθεί είτε μέσα στα ίδια τα είδη, είτε σε συγγενικά αυτών. Για το λόγο αυτό απαιτείται επιμελής έρευνα για αποθέματα σπόρων και εξαντλητικός έλεγχος ώστε να αποφασιστεί η ποσότητα, η μέθοδος της κληρονομησης και το είδος της ανθεκτικότητας που είναι διαθέσιμα για το ελεγχόμενο γενετικό υλικό.

Αρχικώς, όλες οι μορφές ανθεκτικότητας στον καπνό αποκτήθηκαν από το καλλιεργούμενο είδος καπνού, *N. tabacum*. Ανθεκτικότητα εμφανίστηκε στη βακτηριακή μάρανση (bacterial wilt), στη μαύρη σήψη των ριζών (black root rot) και μάλιστα σε υψηλό βαθμό, στη μωσαϊκωση από την ποικιλία "Ambalema" ("Ambalema" type of mosaic), στον νηματώδη που προκαλεί κόμπους, στις ρίζες, (root-knot nematode) και στη μπλε μούχλα (blue mold), σε χαμηλό επίπεδο όμως και σε συγκεκριμένες σειρές. Υπήρχε, βέβαια η ελπίδα, πως η ανθεκτικότητα αυτή, θα μπορούσε να ενσωματωθεί και σε εμπορικές ποικιλίες του καπνού. Ωστόσο, μόνο η ανθεκτικότητα στη βακτηριακή μάρανση και στη μαύρη σήψη των ριζών έγινε κατορθωτό να ενσωματωθούν σε εμπορικές ποικιλίες καπνού, ενώ οι υπόλοιπες δεν ενσωματώθηκαν αφού η ανάπτυξη ανθεκτικότητας, είναι συνδεδεμένη με την απόδοση και την ποιότητα της καλλιεργούμενης ποικιλίας.

Εφόσον έγινε εμφανές πως η εκμετάλλευση της ανθεκτικότητας στο είδος *N. tabacum*, είχε εξαντλήσει σχεδόν την υπάρχουσα παραλλακτικότητα εντός του συγκεκριμένου είδους, άρχισε η αναζήτηση μορφών ανθεκτικότητας σε άλλα είδη του γένους *Nicotiana*. Αξιοπρόσεχτα αποτελέσματα είχαν δώσει, όσον αφορά την ανθεκτικότητά τους σε ασθένειες του καπνού, κάποια άγρια είδη του γένους *Nicotiana*. Έτσι, έγινε κατορθωτό να παραχθεί το είδος *N. digluta*, το οποίο ήταν αποτέλεσμα της διασταύρωσης των ειδών *N. glutinosa* (με ανθεκτικότητα στη μωσαϊκωση του καπνού) και *N. tabacum*. Από συνεχείς αναδιασταυρώσεις του *N. digluta* με τον καπνό, προέκυψε μια σειρά της ποικιλίας Samsun του Τουρκικού καπνού, που ήταν ομοζύγωτη ως προς τις γονιδιακές θέσεις που έδιναν ανθεκτικότητα στην μωσαϊκωση του καπνού.

Αφού βρέθηκαν τα είδη του γένους *Nicotiana* τα οποία εμφάνιζαν ανθεκτικότητα σε εχθρούς και ασθένειες, εκείνα που άξιζαν να προσεχθούν ήταν αυτά που μπορούσαν να διασταυρωθούν με το *N. tabacum* και να παράγουν ζώντα σπόρο. Οι πηγές και τα επίπεδα της ανθεκτικότητας των επιτυχημένων διασταυρώσεων στον καπνό, φαίνονται στον πίνακα 1.1.

Το επόμενο, αλλά και το μεγαλύτερο βήμα, το οποίο ακολουθεί την ανίχνευση της πηγής της ανθεκτικότητας, είναι η μεταφορά αυτής, στην υπό βελτίωση σειρά. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ευρύτατα για τη βελτίωση στον καπνό σε σχέση με την ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε εχθρούς και ασθένειες, ήταν αυτή της αναδιασταύρωσης (backcross method). Με τη μέθοδο αυτή λαμβάνουν χώρα, επαναλαμβανόμενες αναδιασταυρώσεις των διαδοχικών υβριδίων-απογόνων, με τον γονέα-δέκτη που φέρει πολλά από τα επιθυμητά χαρακτηριστικά, επιλέγοντας κάθε φορά από τους απογόνους, τα φυτά εκείνα που έχουν τα επιθυμητά χαρακτηριστικά για την εμφάνιση ανθεκτικότητας (από τον μη επαναλαμβανόμενο γονέα). Ο αριθμός των αναδιασταυρώσεων, που είναι απαραίτητος, για να μεταφερθούν παράγοντες ανθεκτικότητας από άγρια είδη στο γένωμα του καπνού, είναι συνήθως από οκτώ έως δέκα.

Σε περιπτώσεις, όπου γίνεται προσπάθεια μεταφοράς ανθεκτικότητας μεταξύ φυτών του *N. tabacum*, δηλαδή περιπτώσεις διασταυρώσεων μεταξύ φυτών του αυτού είδους (intraspecific crosses), η μεταφορά πρέπει να γίνεται σε φυτά με ικανοποιητική απόδοση και ποιότητα αποκτώντας παράλληλα, την ανθεκτικότητα που επιθυμείται. Οι περιπτώσεις αυτές, μεταφοράς του παράγοντα ανθεκτικότητας είναι αναλογικά πιο εύκολες από αυτές της μεταφοράς ανθεκτικότητας μεταξύ

ειδών (intra-specific crosses), αφού οι συγγενείς ποικιλίες έχουν πολλά κοινά γονίδια, με συνέπεια να χρειάζονται πολύ λιγότερες αναδιασταυρώσεις, ώστε να ενσωματωθεί η ανθεκτικότητα στον επιθυμητό τύπο καπνού.

Πίνακας 1.1.

Κυριότερες πηγές και τα επίπεδα της ανθεκτικότητας σε ασθένειες του καπνού.

Ασθένειες	Πηγή της ανθεκτικότητας	Επίπεδο της ανθεκτικότητας
Φύλλου		
Μωσαϊκωση (Mosaic)	<i>Nicotiana glutinosa</i>	Ανοσία ¹
Υγρό καψάλισμα (Wildfire)	<i>N. longiflora</i>	Ανοσία
Μαύρο καψάλισμα (Blackfire)	<i>N. longiflora</i>	Ανοσία
Καφέ κηλίδωση (Brown Spot)	<i>N. tabacum</i>	Μέτρια ανθεκτικότητα
Μπλε μούχλα (Blue mold)	<i>N. debneyi</i>	Υψηλή ανθεκτικότητα
Στελέχους		
Βακτηριακή μάρανση (Bacterial - wilt)	<i>N. tabacum</i>	Μέτρια ανθεκτικότητα
Μάρανση από Φουζάριο (Wilt - Fusarium)	<i>N. tabacum</i>	Μέτρια ανθεκτικότητα
Μαύρισμα του στελέχους (Black shank)	<i>N. tabacum</i>	Μέτρια ανθεκτικότητα
Μαύρισμα του στελέχους (Black shank)	<i>N. longiflora</i>	Υψηλή ανθεκτικότητα
Μαύρισμα του στελέχους (Black Shank)	<i>N. plumbaginifolia</i>	Υψηλή ανθεκτικότητα
Ρίζας		
Μαύρη σήψη της ρίζας (Black root rot)	<i>N. tabacum</i>	Μέτρια-Υψηλή ανθεκτικότητα
Μαύρη σήψη της ρίζας (Black root rot)	<i>N. debneyi</i>	Ανοσία
Κόμπιασμα των ριζών (Root knot)	<i>N. megalosiphon</i>	Υψηλή ανθεκτικότητα

¹ Με τον όρο ανοσία, υπονοείται η κατάσταση της αδυναμίας του παρασίτου να αναπαραχθεί.

Από την άλλη πλευρά, σε περιπτώσεις διασταυρώσεων μεταξύ ειδών (interspecific crosses), πρέπει να αντιμετωπιστούν προβλήματα στειρότητας και ασυμβιβάστου, για τα οποία όμως υπάρχουν λύσεις όπως οι αμοιβαίες διασταυρώσεις (reciprocal crosses) ή ο διπλασιασμός των χρωμοσωμάτων με τη χορήγηση της κολχικίνης. Τα γονίδια ανθεκτικότητας που μεταφέρονται μέσω διειδικών διασταυρώσεων (διασταυρώσεις μεταξύ ειδών) έχουν ιδιαίτερη αξία διότι προσδίδουν υψηλότερο επίπεδο αντοχής η οποία ακολουθεί απλό τρόπο κληρονομησης και επομένως μπορεί να ενσωματωθεί στις ποικιλίες ευκολότερα απ' ό,τι οι αντοχές που αποκτώνται με χρήση γενετικών υλικών εντός του ίδιου είδους. Επιπρόσθετα, όταν διαθέτουμε δύο βελτιωμένες σειρές σε κάθε μία εκ των οποίων έχει ενσωματωθεί διαφορετικό γονίδιο ανθεκτικότητας που προσφέρει αντίστοιχα αντοχή σε διαφορετικό εχθρό ή ασθένεια, τότε με διασταύρωση των σειρών αυτών είναι δυνατόν να δημιουργηθούν ποικιλίες ανθεκτικές συγχρόνως και στους δύο εχθρούς ή ασθένειες. Από την άλλη πλευρά όμως, πρέπει να έχουμε υπόψη μας ότι, κατά τις διειδικές διασταυρώσεις τα γονίδια ανθεκτικότητας, στα πρώτα στάδια του προγράμματος, βρίσκονται πάνω σε μεμονωμένα χρωμοσώματα τρισωμικών σειρών που δημιουργούνται λόγω έλλειψης πλήρους ομολογίας μεταξύ των διασταυρωμένων ειδών. Επομένως, στις σειρές αυτές θα εκφράζονται πλήρως μόνο κυρίαρχα γονίδια ανθεκτικότητας ενώ δεν θα συμβαίνει το ίδιο για αντίστοιχα υποτελή γονίδια. Για το λόγο αυτό, μέσω των διειδικών διασταυρώσεων μπορεί να μεταφερθεί από τα άγρια είδη καπνού (με διαφορετικό αριθμό χρωμοσωμάτων) στον καλλιεργούμενο

καπνό *N. tabacum*, ευκολότερα η ανθεκτικότητα που είναι κυριαρχικού τύπου και όχι υποτελής.

Το τρίτο στάδιο της βελτίωσης του καπνού, για την αντοχή του σε εχθρούς και ασθένειες, αποτελεί η εκτίμηση των σειρών που έχουν παραχθεί. Η εκτίμηση για την εμφάνιση ανθεκτικότητας, μπορεί να γίνει είτε σε θερμοκήπιο είτε στον αγρό. Στο θερμοκήπιο, δηλαδή σε απολύτως ελεγχόμενες συνθήκες, οι διαδοχικώς αναδιασταυρούμενοι απόγονοι, εκτίθενται σε ασθένειες, ώστε να αποκλεισθούν τα ευαίσθητα στις ασθένειες αυτές φυτά. Με τον τρόπο αυτό, είναι δυνατόν να ελεγχθούν για την ανθεκτικότητά τους σε περισσότερες της μιας ασθένειες, σειρές που έχουν καταλλήλως βελτιωθεί. Στον αγρό, ο έλεγχος γίνεται αφού έχει σταθεροποιηθεί η ανθεκτικότητα στις διάφορες σειρές, σε εδαφοτεμάχια. Τα εδαφοτεμάχια είναι είτε μολυσμένα με κάποια ασθένεια όπου οι ποικιλίες ελέγχονται για την ανθεκτικότητά τους είτε είναι απαλλαγμένα από ασθένειες όπου οι σειρές ελέγχονται για την απόδοσή τους και την ποιότητά τους. Το χρονικό διάστημα του ελέγχου των σειρών του καπνού οι οποίες θεωρούνται ως υποψήφιες ανθεκτικές ποικιλίες, είναι σίγουρα δύο χρόνια και μπορεί να φτάσει ως τα πέντε ανάλογα με τις συνθήκες υπό τις οποίες διεξάγεται ο έλεγχος, πριν περάσουν στην κυκλοφορία. Αφού περάσουν, οι επιθυμούμενες σειρές, τους ελέγχους για τη διαπίστωση της ανθεκτικότητάς τους, συγκομίζεται η παραγωγή τους ώστε να διαπιστωθεί η απόδοσή τους, ενώ παράλληλα τα φύλλα τους ελέγχονται ως προς κάποια ποιοτικά χαρακτηριστικά όπως το χρώμα, το μέγεθος, την ελαστικότητα, την περιεκτικότητα σε έλαια, τη γεύση και το άρωμα του καπνού τσιγάρων-δειγμάτων καθώς και διάφορα άλλα. Αφού περάσουν οι

ανθεκτικές σειρές καπνού όλους τους ελέγχους, χωρίς πρόβλημα ακολουθεί η ονομασία τους και η κυκλοφορία τους.

Μια λίστα των ανθεκτικών σε ασθένειες ποικιλιών καπνού δίδεται στον πίνακα 1.2. (Lucas G.B., 1958).

1.3. ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΠΝΟΥ ΓΙΑ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΙΩΣΕΙΣ

Ο καπνός, είναι μια από τις καλλιέργειες που προσβάλλεται από αρκετούς ιούς, με αποτέλεσμα να καθίσταται απαραίτητη η δημιουργία ανθεκτικότητας μέσω της βελτίωσης των υπάρχουσών ποικιλιών του. Σημαντική προσπάθεια έχει γίνει, με κάποια επιτυχή αποτελέσματα, για τη δημιουργία ποικιλιών που είναι ανθεκτικές στους ιούς του μωσαϊκού του καπνού (TMV), του μωσαϊκού της αγγουριάς (CMV), του Υ της πατάτας (PVY), του κηλιδωτού μαρασμού της τομάτας (TSWV) και στον ιό του καφαλίσματος του καπνού (TEV).

Αρχικά, για τον ιό του μωσαϊκού του καπνού (TMV), που σε γενικές γραμμές τα περί ανθεκτικότητας αναφέρθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο, αναπτύχθηκε μια Κολομβιανή ποικιλία καπνού, η "Ambalema", η οποία εμφάνιζε πολύ ήπια συμπτώματα στον ιό TMV χωρίς όμως να έχει την υψηλή απόδοση ή την υψηλή ποιότητα παραγωγής που απαιτείται. Ακολούθως, χρησιμοποιήθηκαν ποικιλίες καπνού οι οποίες είχαν προέλθει από διαδοχικές αναδιασταυρώσεις του είδους *N. glabra* με το *N. tabacum* και οι οποίες εμφάνιζαν ανοσία στον ιό TMV σε κανονικές θερμοκρασίες, στον αγρό, λόγω του Ν γονιδίου, το οποίο ελέγχει την υπερευαισθησία στον TMV. Υπάρχουν επίσης και κάποιες άλλες σειρές καπνού, όπως η TI 245, που εμφανίζει χαρακτηριστική ανθεκτικότητα στον TMV η οποία ελέγχεται από δύο γονίδια, εκ των οποίων το ένα προσφέρει την τάση να

αποφεύγεται η μόλυνση, ενώ το άλλο περιορίζει την εξάπλωση του ιού. Στην σειρά TI 245, η ανθεκτικότητα συνδυάζεται και με έναν ιδιαίτερα χαμηλό αριθμό εκτοδεσμάτων στην επιφάνεια του φύλλου, που πιθανώς αντικατοπτρίζει τον μικρό αριθμό διόδων εισόδου του ιού TMV στα φύλλα του καπνού. Παρόμοια τάση αποφυγής της μόλυνσης με τον TMV έχει παρατηρηθεί και σε άλλες σειρές καπνού.

Πίνακας 1.2.

Οι κυριότερες ποικιλίες καπνού που είναι ανθεκτικές σε ασθένειες

Ασθένειες	Ποικιλίες
Μαύρη σήψη της ρίζας (Black root rot)	Briarvet, Burley 1, Burley 11A, 11B, 21, Harmony, Haronova, Harrow Velvet, Improved Briar, Ky. 16, 19, 22, 26, 34, 35, 41A, 48, 52, 54, 55, 56, 57, Stand-up White Burley, White Burley, 400, Delcrest, Jadel, Vamorr 48, 50, Yellow special, Conn. 15, 64, Havana 142, 211, 307, 425, K 1, 2, Hibsichman.
Καφέ σήψη της ρίζας (Brown root rot)	Briarvet, Burley 1, 2, Havana, Green Briar, Jabel.
Μαύρισμα του στελέχους (Black shank)	Burley 11A, 11B, Coker 139, 140, 187, Dixie Bright 101, 102, 244, Oxford 1, 3, 1-181, Vesta Varieties, Dixie Shade, Fla. 301, R.G., Timor, "TV".
Μάρανση από Φουζάριο (Fusarium wilt)	Burley 11A, 11B, Ky. 33, Dixie Bright 101, 102, 244.
Υγρό καψάλισμα (Wildfire)	Burley 21.
Μωσαϊκωση (Mosaic)	Burley 21, Ky. 34, 35, 48, 52, 54, 55, 56, 57, Vamorr 48, 50, Va. 45, Havana 425, Ky. 150, 151, 152, 153, 160, 161.

Έχουν δημιουργηθεί, δηλαδή ως προς τον TMV, ανθεκτικές ποικιλίες καπνού, με ικανοποιητική απόδοση και καλή ποιότητα παραγωγής, χωρίς η ανθεκτικότητα αυτή να έχει υπερνικηθεί από κάποια φυλή του TMV.

Όσον αφορά τον ιό του μωσαϊκού της αγγουριάς (CMV), ανθεκτικότητα έχει εμφανιστεί στη σειρά TI 245, η οποία τείνει να αποφεύγει τη μόλυνση με τον CMV, εμφανίζοντας πάρα πολύ ελαφρά τοπικά συμπτώματα. Η ανθεκτικότητα αυτή, όπως αναφέρθηκε και στον TMV, ελέγχεται από δύο γονίδια ενώ εμφανίζεται σε τουλάχιστον έξι ιούς. Επίσης, έχουν επιλεγεί επτά φυτά ανθεκτικά στον CMV F₂ γενιάς, από περισσότερα από 39.000 φυτά, που προέκυψαν από διασταυρώσεις των ποικιλιών GAT₂ και GAT₄ με την υψηλής απόδοσης και ποιότητας ποικιλία, Hicks Broadley. Έχουν γίνει διαδοχικές αναδιασταυρώσεις και περαιτέρω επιλογές φυτών, ενώ γίνεται προσπάθεια δημιουργίας ποικιλιών υψηλής ποιότητας και απόδοσης.

Για τον ιό Y της πατάτας (PVY), μερικώς ανθεκτικά φυτά έχουν παρατηρηθεί σε μια μετάλλαξη της ποικιλίας Virginia A. Η προέλευση της ανθεκτικότητας εντοπίζεται σε κάποιο γονίδιο, χωρίς όμως να είναι γνωστό τίποτα για το μηχανισμό της ανθεκτικότητας. Είναι φανερό λοιπόν, πως τα καλύτερα μέτρα για την αντιμετώπιση του PVY αφορούν τη μείωση των πηγών της μόλυνσης και τον έλεγχο των φορέων του ιού.

Για τον ιό του κηλιδωτού μαρασμού της τομάτας (TSWV), έχουν παρατηρηθεί κάποιες ενδείξεις εμφάνισης ανεκτικότητας, σε κάποιες ποικιλίες, οι οποίες εμφανίζουν την ικανότητα να ξεπερνούν την αντίσταση του ιού, καθώς αυτές μεγαλώνουν, ενώ όσον αφορά τον ιό του καφαλίσματος του καπνού (TEV), ο οποίος σε γενικές γραμμές δεν προκαλεί σοβαρά συμπτώματα στις περισσότερες ποικιλίες του καπνού,

υπάρχει μια ποικιλία, η NC 2512, η οποία έδειξε καλή ανεκτικότητα στον ιό TEV, χάνοντας μόνο το 3% της απόδοσης παραγωγής της.

Ακολουθως, παρατίθενται οι κυριότερες ιώσεις που προκαλούν σημαντικές ζημιές στον καπνό, καθώς και τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά τους (Russel G.E., 1978).

1.4. ΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΤΟΥ ΚΑΠΝΟΥ

Περισσότεροι από 20 ιοί, έχουν αναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία να προσβάλλουν τον καπνό στον αγρό, ενώ στο εργαστήριο μολύνεται τουλάχιστον από 100 ιούς, μερικοί από τους οποίους έχουν ως ξενιστές στη φύση κυρίως άλλα Σολανώδη και πιθανώς τον καπνό.

Μερικοί από τους ιούς του καπνού, δεν προκαλούν έντονα συμπτώματα και συνεπώς δεν φαίνεται να ευθύνονται για σοβαρές απώλειες της παραγωγής, όπως ο ιός της ποικιλοχλώρωσης των νεύρων του καπνού (tobacco vein mottling rotynvirus, TVMV) που προκαλεί στις περισσότερες ποικιλίες ήπια συμπτωματολογία, με αποτέλεσμα οι απώλειες να περιορίζονται στο 10%. Βέβαια, όταν η συχνότητα εμφάνισης του ιού είναι υψηλή, οι απώλειες είναι σημαντικές. Αρκετοί ιοί, προκαλούν έντονα συμπτώματα και κατά συνέπεια οι απώλειες της παραγωγής είναι ιδιαίτερα σημαντικές. Ως ζημιογόνοι ιοί μπορούν να θεωρηθούν οι: ιός του κηλιδωτού μαρασμού της τομάτας (tomato spotted wilt tospovirus, TSWV), ιός του μωσαϊκού του καπνού (tobacco mosaic tobamovirus, TMV), ιός του μωσαϊκού της αγγουριάς (cucumber mosaic cucumovirus CMV), ιός Y της πατάτας (potato virus Y rotynvirus PVY), ιός του μωσαϊκού της μηδικής (alfalfa mosaic alfamovirus, AMV), και ο ιός του "κροταλίσματος" του καπνού (tobacco rattle tobnavirus, TRV).

Ο ιός του κηλιδωτού μαρασμού της τομάτας (tomato spotted wilt tospovirus, TSWV)

Ο ιός TSWV, έχει μεγάλο εύρος ξενιστών, που περιλαμβάνει αρκετά καλλιεργούμενα και καλλωπιστικά φυτά καθώς και πολυάριθμα ζιζάνια, τα οποία ανήκουν σε 34 οικογένειες. Προκαλεί, ποικιλία συμπτωμάτων που εξαρτώνται από τη φυλή του ιού (συχνά σε μολυσμένα φυτά συνυπάρχουν περισσότερες της μιας φυλές), από το στάδιο ανάπτυξης του ξενιστή κατά τη μόλυνση, από την ευρωστία του ξενιστή καθώς και από τις κλιματολογικές συνθήκες (θερμοκρασία, φως, υγρασία) που επικρατούν πριν ή κατά τη διάρκεια της μόλυνσης. Κατά τη μόλυνση των φυτών καπνού πάντως, εμφανίζονται οι πρώτες, τοπικές κηλίδες στα φύλλα και στη συνέχεια διασυστηματικά συμπτώματα, στο στέλεχος και τα φύλλα. Ο ιός TSWV, μεταδίδεται κυρίως με θρίπες-φορείς του ιού (8 είδη θριπών έχουν αναφερθεί με κυριότερο τον *Thrips tabaci*).

Ο ιός του μωσαϊκού του καπνού (tobacco mosaic tobamovirus, TMV)

Ο TMV προσβάλλει λαχανοκομικά και ανθοκομικά φυτά καθώς επίσης και μεγάλο αριθμό ζιζανίων, που ανήκουν σε περισσότερα από 200 είδη. Τα συμπτώματα της ασθένειας επηρεάζονται από τη φυλή του ιού, την ποικιλία του ξενιστή και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Τα κυριότερα συμπτώματα αφορούν αρχικά, την εμφάνιση διαφάνειας των νευρώσεων στα κορυφαία φύλλα, ενώ αργότερα την εκδήλωση έντονου μωσαϊκού και πιθανώς "καφάλισμα" των φύλλων της βάσης. Σε πρώιμες μολύνσεις, εμφανίζεται νανισμός στα φυτά καπνού, τα φύλλα συστρέφονται προς τα

κάτω και το έλασμα παραμορφώνεται ενώ σε όψιμες τα συμπτώματα εμφανίζονται σε νεαρά φύλλα της κορυφής. Αποτελεί ιδιαίτερα ζημιογόνο παράγοντα για τον καπνό αφού μειώνει σημαντικά την παραγωγή του ενώ και η ποιότητά του υποβαθμίζεται σημαντικά. Η μετάδοσή του γίνεται πάρα πολύ εύκολα είτε μηχανικά είτε με το σπόρο και με τα ενσωματωμένα φυτικά υπολείμματα.

Ο ιός του μωσαϊκού της αγγουριάς (cucumber mosaic cucumovirus, CMV)

Ο CMV αποτελεί ιδιαίτερα σημαντικό πρόβλημα στις καλλιέργειες Κολοκυνθοειδών και Σολανωδών. Τα συμπτώματα του ιού στον καπνό, συγχέονται με αυτά του TMV, αφού ανάλογα με τη φυλή, προκαλεί ποικιλοχλωρώσεις, μωσαϊκό, στένωση και παραμόρφωση του ελάσματος των φύλλων. Κάποιες ισχυρά παθογόνες φυλές ευθύνονται για μεσονεύριες χλωρώσεις και νεκρωτικά σχέδια "φύλλο βελανιδιάς" στα κατώτερα φύλλα ενώ στα ανώτερα, για συμπτώματα που μοιάζουν με εγκαύματα. Πηγή του ιού εκτός των καλλιεργούμενων ειδών αποτελούν και ζιζάνια ενώ η μετάδοσή του γίνεται με αφίδες (75 είδη), κυρίως με τα είδη *Myzus persicae* και *Aphis gossypii*.

Ο ιός Υ της πατάτας (potato virus Y potyvirus, PVY)

Ο PVY έχει ευρεία διάδοση όπου καλλιεργείται πατάτα και καπνός. Τα συμπτώματά του ποικίλουν αρκετά, ανάλογα με την ποικιλία του καπνού και τη φυλή του ιού. Το χαρακτηριστικό, κοινό σύμπτωμα μεταξύ των φυλών του ιού και των διαφόρων ποικιλιών είναι ο περινεύριος μεταχρωματισμός. Βέβαια, αυτό αποτελεί τυπικό σύμπτωμα και των ιών

της ποικιλόχρωσης των νεύρων του καπνού (*tobacco vein mottling virus*, TVMV) και του περινεύριου μεταχρωματισμού του καπνού (*tobacco veinbanding virus*, TVBV) που όμως δεν συναντώνται στη χώρα μας. Στη φύση, ο ιός συναντάται σε φυτά πατάτας, ντομάτας και πιπεριάς καθώς και σε κάποια ζιζάνια, ενώ η μετάδοσή του γίνεται με 30 και πλέον είδη αφίδων-φορέων. Δεν μεταδίδεται με το σπόρο.

Ο ιός του μωσαϊκού της μηδικής (alfalfa mosaic alfamovirus, AMV)

Ο AMV είναι ιδιαίτερα διαδεδομένος στις καλλιέργειες μηδικής ενώ πρόσφατα εντοπίστηκε και στον καπνό. Τα συμπτώματα εξαρτώνται από τη φυλή του ιού και την ποικιλία του καπνού. Αρχικά, εμφανίζεται με χλωρωτικές κηλίδες ή περιοχές ενώ στη συνέχεια στα νεότερα φύλλα με λεύκανση των νεύρων, λευκές δακτυλιοειδείς κηλίδες, τόξα και γραμμωτά σχέδια νεκρωτικών ιστών. Συνήθως, στη φύση συνυπάρχουν περισσότερες της μίας φυλές, με αποτέλεσμα να προκαλείται ποικιλομορφία συμπτωμάτων. Στον καπνό δεν μεταδίδεται με το σπόρο, ενώ διαιωνίζεται με το σπόρο ορισμένων καλλιεργούμενων φυτών (μηδική, πιπεριά) και ζιζανίων. Μεταδίδεται τουλάχιστον με 13 είδη αφίδων, με μη έμμονο τρόπο (Κατής Ν.Ι., 1995).

Ο ιός του "κροταλίσματος" του καπνού (tobacco rattle tobnavirus, TRV)

Αναλυτικά, ο ιός αυτός περιγράφεται παρακάτω.

2. Ο ΙΟΣ ΤΟΥ "ΚΡΟΤΑΛΙΣΜΑΤΟΣ" ΤΟΥ ΚΑΠΝΟΥ (TOBACCO RATTLE VIRUS, TRV)

2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο ιός tobacco rattle virus (TRV), αποτελεί το τυπικό μέλος της ομάδας των tobnavirus, της οποίας μέλος είναι και ο στενά συνδεδεμένος με τον TRV, *pea early browning virus* (PEBV). Ο TRV, που περιλαμβάνει μία ποικιλία ορολογικά διακρινόμενων φυλών, προσβάλλει πολλά είδη καλλιεργούμενων φυτών ανά τον κόσμο. Έχει βρεθεί σε πολλές χώρες της Ευρώπης, στη Βόρεια Αμερική, στη Βραζιλία, στην Ιαπωνία και στη Νέα Ζηλανδία.

2.2. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ TRV

Τα σωματίδια του TRV, που είναι ραβδοειδή, εμφανίζονται σε δύο επικρατέστερα μεγέθη, χαρακτηριστικά για κάθε μια απομόνωση του ιού, τα "μακριά" (L) και τα "κοντά" (S). Βέβαια, κάποιες απομονώσεις του ιού έχουν δώσει, ένα ακόμα μικρότερου μεγέθους ιοσωμάτιο το οποίο όμως δεν έχει μελετηθεί επακριβώς. Τα S μεγέθους σωματίδια του ιού, έχουν μέγεθος από 50 nm - 115 nm ανάλογα με την απομόνωση και συνήθως είναι δύο έως πέντε φορές περισσότερα σε σχέση με τα L μεγέθους σωματίδια, των οποίων το μέγεθος κυμαίνεται στα 185 nm - 197 nm.

Τα σωματίδια του ιού περιέχουν 5% περίπου RNA το οποίο συνίσταται από δύο είδη μονόκλωνων αλυσίδων, τις RNA-1 και RNA-2, οι οποίες αναλογούν στα L και S νουκλεοπρωτεϊνικά ιοσωμάτια, αντιστοίχως.

Η μολυσματικότητα συνδυάζεται με την ύπαρξη των L ιοσωματίων και με την εξαγωγή του RNA-1 το οποίο συνεπώς πρέπει να περιέχει τη γενετική πληροφορία για τον πολλαπλασιασμό του ιού. Αντίθετα, τα S

ιοσωμάτια δεν είναι μολυσματικά. Συγκεκριμένα, φυτικός ιστός μολυσμένος με L σωματίδια του TRV περιέχει μόνο το μολυσματικό RNA (RNA-1), χωρίς σωματίδια νουκλεοπρωτεΐνης ενώ φυτικός ιστός μολυσμένος με μίγμα L και S σωματιδίων του ιού περιέχει L και S νουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια δηλαδή RNA καλυμένο με την πρωτεϊνική κάψα του ιού. Συνεπώς το RNA-2 περιέχει το σιστρόν που κωδικοποιεί την παρασκευή της καψιδιακής πρωτεΐνης.

2.3. Μ ΚΑΙ ΝΜ ΤΥΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΙΣ ΤΟΥ TRV

Οι απομονώσεις του TRV εμπίπτουν σε δύο βασικές κατηγορίες. Στις Μ τύπου οι οποίες είναι σχετικά σταθερές στον κυτταρικό χυμό και μεταδίδονται εύκολα κατά τη μόλυνση με φυτικό χυμό. Για το λόγο αυτό και αποκαλούνται ως σταθερές, πλήρεις ή κανονικές απομονώσεις. Οι απομονώσεις της δεύτερης κατηγορίας, χαρακτηρίζονται ως τύπου ΝΜ και μπορούν να μεταδοθούν εύκολα μόνο όταν χρησιμοποιούνται ειδικές μέθοδοι και θεωρούνται μάλλον ασταθείς στον κυτταρικό χυμό.

Οι ΝΜ τύπου απομονώσεις του TRV, περιέχουν μόνο το RNA-1 χωρίς την καψιδιακή πρωτεΐνη με αποτέλεσμα να δίνουν έντονα συμπτώματα και νεκρώσεις οι οποίες όμως καθυστερούν να εμφανιστούν σε αντίθεση με τις Μ τύπου απομονώσεις του ιού. Οι Μ τύπου απομονώσεις, περιέχουν και τα δύο είδη RNA (RNA-1, RNA-2) υπό μορφή νουκλεοπρωτεϊνικών σωματιδίων. Ανεξάρτητα από τον τύπο των απομονώσεων και οι δύο προκαλούν διασυστηματικές μολύνσεις, ενώ πρέπει να αναφερθεί πως οι εποχιακές συνθήκες επιδρούν στην εκδήλωση των συμπτωμάτων.

2.4. ΟΡΟΤΥΠΟΙ ΤΟΥ TRV

Ένα χαρακτηριστικό των M απομονώσεων του TRV είναι η ποικιλία στην δομή των αντιγόνων τους. Οι απομονώσεις του TRV, παλαιότερα διαχωρίζονταν σε τρεις κατηγορίες οροτύπων (I, II και III) ανάλογα με την ορολογική τους συγγένεια. Όμως, έγιναν γνωστές και απομονώσεις ενδιάμεσης κατηγορίας μεταξύ των οροτύπων I και II, με αποτέλεσμα να συνδυαστούν οι δύο ορότυποι σε μια αντιγονικά ετερογενή ομάδα, γνωστή ως ορότυπος I-II. Στην ομάδα αυτή περιλαμβάνονται οι απομονώσεις του TRV που προέρχονται από τις Ευρωπαϊκές χώρες και από τη Βόρεια Αμερική. Ο ορότυπος III, ο οποίος περιλαμβάνει τις απομονώσεις της Βραζιλίας, του TRV, εμφανίζει μια πολύ μακρινή συγγένεια από ορολογική άποψη, σε σχέση με τον ορότυπο I-II.

2.5. ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ ΦΥΣΙΚΩΣ ΜΟΛΥΣΜΕΝΩΝ ΞΕΝΙΣΤΩΝ

Στη φύση υπάρχουν περισσότερα από 100 φυτικά είδη τα οποία είναι γνωστό ότι προσβάλλονται από τον TRV.

Φυτά καπνού τα οποία αναπτύσσονται στον αγρό και τα οποία έχουν προσβληθεί με τον TRV παρουσιάζουν διασυστηματικές νεκρωτικές προσβολές οι οποίες περιλαμβάνουν νεκρωτικές κηλίδες και σχέδια πάνω στα φύλλα και καφέ νεκρωτικές γραμμώσεις πάνω στους μίσχους των φύλλων και στο στέλεχος του φυτού. Συχνά οι νεκρώσεις αφορούν και τμήματα του κυρίου νεύρου των φύλλων, με αποτέλεσμα τα φύλλα να κατσαρώνουν και να σχίζονται.

Ωστόσο η πατάτα (*Solanum tuberosum*), παρουσιάζει τη μεγαλύτερη οικονομική σημασία από τους ξενιστές που προσβάλλει ο TRV. Συγκεκριμένα, προκαλεί συμπτώματα στον κόνδυλο της πατάτας τα οποία

αφορούν κατεστραμμένα τμήματα, μαύρου φελλώδους ιστού στη σάρκα του, γνωστά ως φελλώδεις, δακτυλιωτές κηλιδώσεις και εξωτερικά συμπτώματα στα σημεία που ο φελλώδης ιστός φτάνει στην επιφάνεια του κονδύλου. Σε κονδύλους οι οποίοι εμφανίζουν συμπτώματα, και οι οποίοι φυτεύονται, οι περισσότεροι από τους απογόνους τους δεν θα εμφανίζουν συμπτώματα και δεν θα περιέχουν καθόλου ιό. Στα λίγα φυτά στα οποία θα εμφανισθούν συμπτώματα, αυτά περιορίζονται σε ένα ή δύο βλαστούς οι οποίοι γίνονται διάστικτοι και φέρουν φύλλα με ελαφρύ μωσαϊκό (stem-mottle) ή εμφανίζουν μικρές, κιτρινωπές, δακτυλιωτές περιοχές (μορφή τύπου aucuba). Η δυνατότητα του TRV να μεταδοθεί από τους κονδύλους στους απογόνους, εξαρτάται από τη φυλή του ιού. Οι κόνδυλοι που παράγονται από μολυσμένα μητρικά φυτά, είναι δυνατόν να περιέχουν μικρές διασκορπισμένες καφέ κηλίδες ή φελλώδεις περιοχές που βρίσκονται κυρίως στο στόλωνα ή ακόμα μπορεί να είναι ελεύθερες ιών και ελεύθερες συμπτωμάτων. Τα διάφορα καλλωπιστικά βολβώδη (τουλίπα, υάκινθος, νάρκισσος, γλαδίολος, λίλιουμ και κρόκος) προσβάλλονται από τον TRV ο οποίος προκαλεί ελαφρύ μωσαϊκό στα περισσότερα απ' αυτά, ενώ στα φύλλα του γλαδίολου εμφανίζονται συμπτώματα υπό τη μορφή κυματισμού του ελάσματος. Οι βολβοί του υάκινθου, εμφανίζουν νεκρωτικές κηλιδώσεις, ενώ τα πέταλα της τουλίπας εμφανίζουν ραβδώσεις σκουρότερου χρωματισμού.

Τα συμπτώματα του TRV, σε άλλα φυσικώς μολυνόμενα είδη, ποικίλουν, όμως σε πολλές περιπτώσεις, περιλαμβάνουν κίτρινες κηλιδώσεις στα φύλλα τους (σακχαρότευτλα, σπανάκι, ορτανσία, άσπερ).

Ο TRV προσβάλλει και ζιζάνια, σε καλλιεργούμενο έδαφος, τα οποία εμφανίζουν συμπτώματα όμοια με αυτά που εμφανίζουν και τα

καλλιεργούμενα φυτά ενώ κάποια μπορεί να μολυνθούν χωρίς να εμφανίσουν συμπτώματα (λανθάνοντες ξενιστές).

2.6. ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΤΟΥ TRV

Μετάδοση μέσω εμβολιασμού

Ο TRV μπορεί να μεταδοθεί με τον εμβολιασμό, για παράδειγμα από φυσικώς μολυσμένα φυτά πατάτας σε φυτά πατάτας ή τομάτας και από φυτά τομάτας σε φυτά πατάτας. Όμως, η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί πολύ λίγο για τον TRV και είναι πιθανώς λιγότερο αξιόπιστη, σε σχέση με άλλους φυτικούς ιούς διότι ο TRV τείνει να κινείται μερικώς διασυστηματικά σε φυσικώς μολυσμένα φυτά. Οι NM απομονώσεις μεταδίδονται με τον εμβολιασμό σε κατάλληλους ξενιστές, αλλά τα συμπτώματα εμφανίζονται αργότερα σε σχέση με αυτά που προκαλούνται από τις M απομονώσεις.

Μετάδοση μέσω της Κουσκούτας

Έχει βρεθεί, πως ο ιός TRV μπορεί να μεταδοθεί εύκολα από φυτά καπνού σε φυτά καπνού μέσω 6 ειδών του γένους *Cuscuta spp.* Ο ιός μολύνει τα ζιζάνια και μπορεί να προκαλέσει τοπικές νεκρώσεις πάνω στους βλαστούς τους.

Μετάδοση μέσω μηχανικής μόλυνσης με παρασκευάσματα που περιέχουν τον ιό TRV

Γενικά οι M απομονώσεις είναι λίγο ή πολύ εύκολα μεταδιδόμενες κατά τη μόλυνση με φυτικό χυμό, ανάλογα βέβαια με τη συγκέντρωση του ιού στους ιστούς, από τους οποίους προέκυψε το μόλυσμα ενώ οι NM

απομονώσεις μεταδίδονται πολύ λίγο με τη μέθοδο αυτή, ιδίως όταν χρησιμοποιούνται φυτά με μέτρια ευαισθησία στον ιό TRV. Είναι καλό, να σκονίζονται τα φυτά δείκτες με ένα προσκολλητικό όπως το Corundum ή το Carborundum (600 mesh) ακόμα και όταν μεταδίδονται Μ απομονώσεις, διότι έτσι διευκολύνεται η είσοδος του ιού στα κύτταρα μέσω των πληγών που δημιουργούνται στα κυτταρικά τους τοιχώματα.

Μετάδοση μέσω του σπόρου

Ο TRV σπάνια μεταδίδεται μέσω του σπόρου πειραματικώς μολυσμένων φυτών, όμως η μετάδοση μέσω του σπόρου ανιχνεύτηκε σε 5 από τα 15 φυσικώς μολυσμένα είδη ζιζανίων πράγμα το οποίο θεωρείται ότι παίζει κάποιο ρόλο στη διάδοση του ιού σε νέες θέσεις.

Μετάδοση μέσω νηματωδών

Ο TRV μεταδίδεται από διάφορα είδη φυτοпараσιτικών νηματωδών εδάφους, της οικογένειας Trichodoridae, των γενών *Paratrichodorus* και *Trichodorus*. Οι νηματώδεις, είναι σχετικά μικροί, μήκους μέχρι περίπου 2 mm, τείνουν να συγκεντρώνονται κάτω από το επίπεδο του καλλιεργούμενου στρώματος του εδάφους ή στο επίπεδο αυτό, κάποιες περιόδους του έτους και επηρεάζονται πολύ από τις αλλαγές των εδαφικών συνθηκών. Άτομα των νηματωδών αυτών, που φέρουν τον ιό, μπορούν να μολύνουν φυτά-ξενιστές όταν έρθουν σε επαφή με τις ρίζες τους για μία ώρα ενώ μακρύτερες περίοδοι επαφής είναι πιο αποτελεσματικές. Τα σωματίδια του ιού προσκολλώνται στην εσωτερική επιφάνεια του οισοφάγου του νηματώδη και εξέρχονται μαζί με τα στοματικά υγρά, για να προσβάλλουν τα κύτταρα της ρίζας, μέσω του στιλέτου της στοματικής του

κοιλότητας. Ο ιός, πιστεύεται, πως δεν πολλαπλασιάζεται στους φορείς-νηματώδεις, αν και τα ιοφόρα άτομα διατηρούν τη μολυσματικότητά τους για μήνες ή και χρόνια.

Μόλυνση των πρωτοπλάστων του μεσοφύλλου

Παρ' όλο που δεν έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση ή τη διάγνωση του TRV, οι πρωτοπλάστες του μεσοφύλλου του καπνού έχουν αποδειχθεί πολύ χρήσιμοι για τη μελέτη της συμπεριφοράς του TRV σε κυτταρικό επίπεδο.

2.7. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΣ ΜΟΛΥΣΜΕΝΟΙ ΞΕΝΙΣΤΕΣ

Κύκλος Ξενιστών

Περισσότερα από 400 φυτικά είδη, που ανήκουν σε περισσότερες από 50 οικογένειες, μπορούν να μολυνθούν με M απομονώσεις του TRV έπειτα από μόλυνση με φυτικό χυμό, ενώ περίπου τα μισά από αυτά προσβάλλονται και διασυστηματικά. Ο κύκλος των ξενιστών των NM απομονώσεων του TRV έχει μελετηθεί ολιγότερον, όμως δείχνει να είναι ο ίδιος με εκείνο των M απομονώσεων.

Ξενιστές για τη διάγνωση του TRV

Οι αντιδράσεις σε έξι είδη φυτών-δεικτών τα οποία χρησιμοποιούνται για να διαχωρίσουν τις M απομονώσεις του TRV από άλλους ιούς δίδονται στον πίνακα 2.1. Ο TRV διακρίνεται ευκολότερα από την ικανότητά του να προσβάλλει τα είδη *Pisum sativum* και *Vicia faba* διασυστηματικά και από τον τύπο των τοπικών πληγών, που παράγει στο είδος *Phaseolus vulgaris*. Οι NM απομονώσεις, παράγουν συμπτώματα σε γενικές γραμμές όμοια με

αυτά των M απομονώσεων όμως υπάρχουν και κάποιες διαφορές. Οι NM απομονώσεις του TRV προκαλούν, κατά κάποιο τρόπο, μεγαλύτερες τοπικές πληγές στα φύλλα του είδους *Chenopodium amaranticolor* σε σχέση με τις M απομονώσεις του ιού. Καθυστερούν, βέβαια, να προκαλέσουν διασυστηματική προσβολή σε κάποια είδη σολανωδών, όπως τα είδη *Nicotiana clevelandii* και *Petunia hybrida*, όμως προκαλούν περισσότερο έντονα συμπτώματα. Οι NM απομονώσεις του TRV, της φυλής SYM, αντίθετα με τις M απομονώσεις της φυλής αυτής του ιού, αποτυγχάνουν να μολύνουν διασυστηματικώς το είδος *Chenopodium amaranticolor*.

Πίνακας 2.1.

Συμπτώματα του ιού tobacco rattle virus σε φυτά-δείκτες

Φυτικά είδη	Συμπτώματα του TRV
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	I ¹ , νεκρωτικές κηλίδες διαμέτρου 2-6 mm. S ² , δεν προκαλεί μόλυνση.
<i>Cucumis sativus</i>	I, χλωρωτικές/νεκρωτικές κηλίδες διαμέτρου 2-3 mm. S, δεν προκαλεί μόλυνση.
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Samsun - NN	I, νεκρωτικές κηλίδες και δακτύλιους. S, νεκρωτικές κηλίδες, δακτύλιους και γραμμώσεις ³
<i>Phaseolus vulgaris</i> cv. The Prince	I, νεκρωτικές κηλίδες, μεγέθους κεφαλής καρφίτσας. S, δεν προκαλεί μόλυνση.
<i>Pisum sativum</i> cv. Onward	I, πολύ μικρές νεκρωτικές κηλίδες. S, δεν προκαλεί μόλυνση.
<i>Vicia faba</i> cv. The Sutton	I, μικρές νεκρωτικές κηλίδες. S, δεν μολύνονται.

¹ I: μηχανικώς μολυσμένα φύλλα.

² S: όχι μηχανικώς μολυσμένα φύλλα.

³ Εμφανίζονται από απομονώσεις που προκαλούν μη τυπικά συμπτώματα.

Ξενοιστές πολλαπλασιασμού και δοκιμής του TRV

Το είδος *Nicotiana clevelandii* είναι πιθανώς ο καλύτερος ξενοιστής για να αποκτηθούν καλλιέργειες του TRV καθώς και η πηγή για τον καθαρισμό του ιού αυτού. Το είδος *Chenopodium amaranticolor* και τα πρώτα άτυπα φύλλα του είδους *Phaseolus vulgaris* είναι κατάλληλα για δοκιμές διότι αντιδρούν με τοπικές κηλίδες στην μόλυνση με τον TRV ενώ και τα είδη *Nicotiana tabacum* και *Nicotiana glutinosa* μπορούν να χρησιμοποιηθούν με κάποιες απομονώσεις του TRV.

Συμπτωματολογικές διαφορές μεταξύ διαφόρων φυλών του TRV

Ο TRV φαίνεται πως είναι ένας ασυνήθιστα εύκολος σε μεταλλαγές ιός, όπου όταν συγκρίνονται απομονώσεις, τοπικών κηλίδων Μ τύπου, από την ίδια μητρική καλλιέργεια, κάποιες από αυτές θα μπορούσαν να διαχωριστούν από τις μικρές διαφορές στα συμπτώματα που εμφανίζουν στα φυτά-δείκτες. Είναι φανερό, πως η εμφάνιση τέτοιων παραλλαγών, δυσκολεύει σημαντικά τη διάγνωση. Κάποιες από τις περισσότερο μελετημένες φυλές του TRV είναι οι ακόλουθες:

1. TRV (φυλή CAM), μολύνει την ποικιλία White Burley του καπνού χωρίς να προκαλεί νεκρωτικές τοπικές κηλίδες.

2. TRV (φυλή Oregon Yellow), προκαλεί χρυσοκίτρινες δακτυλιωτές κηλιδώσεις και γραμμώσεις (line patterns) σε διάφορα είδη σολανωδών.

3. TRV (φυλή SYM), προκαλεί διασυστηματική παραμόρφωση και νέκρωση στο είδος *Chenopodium amaranticolor* εκτός κι αν χρησιμοποιηθεί αραιό μόλυσμα.

2.8. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ TRV

Όσον αφορά την αντιμετώπιση του TRV, γίνεται προσπάθεια για την πρόληψη της εμφάνισης νηματωδών-φορέων του ιού στα εδάφη που πρόκειται να εγκατασταθεί καλλιέργεια ευαίσθητη στον ιό και την καταπολέμηση των νηματωδών-φορέων του TRV με χημικά μέσα (διχλωροπροπάνιο-διχλωροπροπένιο, oxamy). Επίσης, εκτός από τα διάφορα, καλλιεργητικά μέτρα, γίνεται προσπάθεια για τη δημιουργία ανθεκτικών ποικιλιών με τη χρήση της γενετικής μηχανικής (Harrison B.D. κ.ά., 1981).

3. ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΣΤΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΕΝΝΟΙΑ ΤΟΥ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΟΥ ΦΥΤΟΥ

Με τον όρο διαγονιδιακά φυτά (transgenic plants), αναφερόμαστε σε φυτά γενετικώς τροποποιημένα, δηλαδή φυτά στα οποία έχει μεταφερθεί κάποιο (ή κάποια) γονίδια με σκοπό να εκφραστούν σε αυτά κάποια συγκεκριμένα χαρακτηριστικά.

Από τη στιγμή που δημιουργήθηκε το πρώτο διαγονιδιακό φυτό, έχει συντελεσθεί σημαντική πρόοδος προς την κατεύθυνση της αξιοποίησης της συγκεκριμένης αυτής τεχνικής. Η δυνατότητα να μεταφέρονται ξένα γονίδια στο γένωμα των φυτικών κυττάρων και η αναγέννηση στη συνέχεια ολόκληρων φυτών από τα κύτταρα αυτά ή από ιστούς, έδωσε τη δυνατότητα να κατανοηθούν σε σημαντικό βαθμό οι βιολογικές λειτουργίες των φυτών και την ευκαιρία να τροποποιηθούν και να βελτιωθούν τα καλλιεργούμενα φυτά.

Τα κυριότερα πλεονεκτήματα που προσέφερε η μεταφορά των γονιδίων στη γεωργική τεχνολογία αφορούσαν την αναπαραγωγή των φυτών, την παραγωγή σπόρων-υβριδίων, καθώς και τη χρήση τους για την παραγωγή θρεπτικών στοιχείων και την αντιμετώπιση των παθογόνων των φυτών. Με τη χρήση των πρώτων γενετικώς τροποποιημένων φυτών επιτεύχθηκε αφ' ενός μεν η βελτίωση της αποδοτικότητας της παραγωγής καθώς και η αύξηση του εύρους προϊόντων που διετίθεντο στην αγορά αφ' ετέρου δε δόθηκε η δυνατότητα της προστασίας του περιβάλλοντος. Η χρήση της γενετικής μηχανικής συνεισφέρει στις προσπάθειες βελτίωσης

των φυτών, μέσω της αύξησης της ποικιλίας των γονιδίων που είναι διαθέσιμα για την ενσωμάτωση στο γένωμα των καλλιεργούμενων φυτών καθώς και μέσω της μείωσης του χρονικού διαστήματος που απαιτείται για την παραγωγή νέων ποικιλιών και υβριδίων.

Τα πρώτα διαγονιδιακά φυτά στα οποία ενσωματώθηκαν και εκφράσθηκαν ξένα γονίδια ήταν φυτά καπνού τα οποία είχαν τροποποιηθεί με φορέα το βακτήριο *Agrobacterium tumefaciens*. Η τροποποίηση επιβεβαιώθηκε πρώτον, από την παρουσία των ξένων αλληλουχιών DNA τόσο στα τροποποιηθέντα φυτά όσο και στους απογόνους τους και δεύτερον, από την ανθεκτικότητα που εμφάνιζαν τα φυτά αυτά στο αντιβιοτικό Kanamycin και η οποία οφειλόταν στο χιμαιρικό γόνο της νεομυκίνης φωσφοτρανσφεράσης (neomycin phosphotransferase gene). Στα πρώτα πειράματα δημιουργίας τροποποιημένων φυτών, χρησιμοποιούνταν κυρίως πρωτοπλάστες. Η επακόλουθη ανάπτυξη των μεθόδων της τροποποίησης που βασίστηκε σε έκφυτα που είχαν τη δυνατότητα να αναγεννηθούν όπως φύλλα, βλαστοί και ρίζες, συνεισέφερε σημαντικά στην πραγματοποίηση εύκολων μεθόδων τροποποίησης οι οποίες χρησιμοποιούνται σήμερα σε πολλά φυτικά είδη δικοτύλων. Μια ποικιλία μεθόδων για ελεύθερη μεταφορά DNA έχει αναπτυχθεί και για την τροποποίηση μονοκοτύλων όπως το καλαμπόκι, το σιτάρι, το ρύζι. Λαμβάνοντας υπόψη την ταχύτατη πρόοδο που έχει γίνει, στον τομέα αυτό είναι πολύ πιθανό τα επόμενα χρόνια τα περισσότερα είδη δικοτύλων και μονοκοτύλων να είναι δυνατόν να βελτιωθούν με τη χρήση της γενετικής μηχανικής (Gasser C.S. κ.ά., 1989).

3.2. ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΕΠΙΤΥΓΧΑΝΕΤΑΙ ΜΕΣΩ ΤΟΥ

Agrobacterium tumefaciens (*Agrobacterium tumefaciens*

MEDIATED GENE TRANSFER)

Η μεταφορά γονιδίων που επιτυγχάνεται μέσω του *A. tumefaciens* εκμεταλλεύεται την φυσική ικανότητά του, να μεταφέρει DNA στα χρωμοσώματα των φυτών. Το *A. tumefaciens* είναι φυτοπαθογόνο βακτήριο το οποίο προκαλεί την ασθένεια "όγκος του στέμματος", (crown gall) στα ανώτερα φυτά. Η ασθένεια αυτή εμφανίζεται όταν μια πληγή στο βλαστό του φυτού, επιτρέπει στο βακτήριο να εισχωρήσει σ' αυτό. Αμέσως μετά τη μόλυνση το βακτήριο προκαλεί ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων στους ιστούς του βλαστού και συγκεκριμένα στην περιοχή του στέμματος, στη βάση του φυτού. Εφόσον ξεκινήσει η ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, μπορεί να συνεχιστεί χωρίς να είναι παρόν το *A. tumefaciens*, άρα είναι δυνατή η ανάπτυξη των κυττάρων αυτών σε υλικό που χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια ιστών υπό συνθήκες "in vitro". Τα καρκινικά κύτταρα παράγουν ένα μείγμα αμινοξέων, τις οπίνες, οι οποίες χρησιμοποιούνται ως πηγές ενέργειας γι' αυτά. Το είδος των οπινών που παράγει μια ομάδα καρκινικών κυττάρων εξαρτάται από τη φυλή του *A. tumefaciens* που την προκάλεσε. Οι πιο συνηθισμένοι τύποι οπινών είναι η οκτοπίνη και η νοπαλίνη. Αμφότερες, δηλαδή και η δημιουργία καρκινικών κυττάρων καθώς και η σύνθεση των οπινών, είναι συνδεδεμένες με την ύπαρξη ενός πλασμιδίου, γνωστό ως πλασμίδιο παραγωγής καρκινικών κυττάρων (Tumour inducing plasmid ή Ti plasmid), το οποίο το φέρει το *A. tumefaciens*. Αμέσως μετά τη μόλυνση, μέρος του πλασμιδίου το οποίο καλείται T-DNA,

ενσωματώνεται στο χρωμοσωμικό DNA του φυτού. Το T-DNA είναι σταθερό μέσα στο γένωμα του φυτού και μεταδίδεται στους απογόνους του χωρίς σημαντικές μεταβολές της ακολουθίας του DNA. Σε κάθε φυτικό κύτταρο θα υπάρχουν ένα ή περισσότερα αντίγραφα ενώ όσον αφορά το σημείο της εισαγωγής της αλληλουχίας του DNA στο γένωμα του φυτού, αυτή είναι προφανώς τυχαία. Η δυνατότητα του βακτηρίου να προκαλεί την ασθένεια του καρκίνου των φυτών μπορεί να αφαιρεθεί με την εξάλειψη των κατάλληλων γονιδίων στο T-DNA, χωρίς παράλληλα να χαθεί η ικανότητα της μεταφοράς και ενσωμάτωσης του DNA. Έχει κατασκευασθεί, δηλαδή, μια φυλή του *Agrobacterium* που δεν προκαλεί ασθένεια και η οποία ονομάζεται αφοπλισμένη. Σ' αυτήν την εργαστηριακή φυλή έχουν προσκολληθεί στα άκρα του DNA που θα μεταφερθεί, αλληλουχίες που να διαχωρίζουν το ενσωματωμένο T-DNA.

Στο εργαστήριο, μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορες φυλές *Agrobacterium* για να μεταφερθούν γονίδια, σε πρωτοπλάστες με μερικώς αναγεννημένα κυτταρικά τοιχώματα, σε κυτταροκαλλιέργειες, σε τμήματα φύλλων, και τμήματα βλαστών. Το κρίσιμο σημείο αφορά την αναδημιουργία ενός ολόκληρου φυτού από κύτταρα που έχουν αποκτήσει το T-DNA. Διάφορες μέθοδοι επιλογής χρησιμοποιούνται για να αναγνωρίσουν και να ευνοήσουν την ανάπτυξη μεταμορφωμένων κυττάρων.

Για παράδειγμα το γονίδιο που πρόκειται να μεταφερθεί, συνδέεται στο T-DNA με ένα γονίδιο που προσφέρει ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό όπως η Kanamycin, η οποία παρεμποδίζει στην ανάπτυξη του φυτού. Τα κύτταρα τα οποία επιβιώνουν, διαιρούνται και αναπτύσσονται υπό την παρουσία του αντιβιοτικού Kanamycin, είναι εκείνα μόνο τα οποία έχουν το κατασκευασμένο T-DNA. Αφού λοιπόν όλα τα γονίδια που

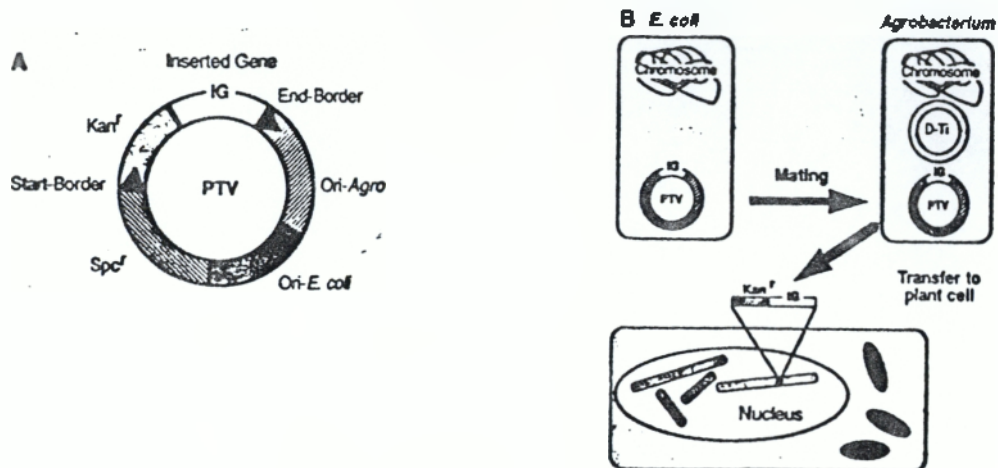
περιέχονται στο T-DNA μεταφέρονται κατά τη μεταμόρφωση των κυττάρων, τα κύτταρα που είναι ανθεκτικά στην Kanamycin, πρέπει να περιέχουν και οποιαδήποτε άλλα γονίδια που έχουν τοποθετηθεί στο T-DNA. Μία σχηματική παράσταση της μεταφοράς γονιδίων σε φυτά, μέσω του *Agrobacterium* φαίνεται στην εικόνα 3.1.

Η μεταφορά γονιδίων μέσω τροποποιημένων φυλών του *Agrobacterium* έχει γίνει ρουτίνα σε πολλά εργαστήρια, για φυτά όπως ο καπνός, η τομάτα, η πετούνια. Διεύρυνση των πειραματικών εργασιών σε άλλα, ίσως και περισσότερο σημαντικά, από οικονομική άποψη λαχανοκομικά φυτά ήταν πολύ δύσκολη, όμως έχει γίνει κάποια πρόοδος ειδικά σε ορισμένες οικογένειες δικοτυληδόνων. Σε κάποιες περιπτώσεις, μεταφορά γονιδίων έχει επιτευχθεί σε καλλιέργεια κυττάρων (σόγια), όμως από αυτά δεν έχει γίνει αναγέννηση φυτών. Όσον αφορά τα μονοκοτυλήδονα, παρ' όλο που υπάρχει η άποψη πως μπορεί να γίνει μεταφορά γονιδίων μέσω του *Agrobacterium*, ωστόσο ξεκάθαρα αποτελέσματα δεν υπάρχουν για ενσωμάτωση T-DNA σε φυτά, εκτός από το σπαράγγι από το οποίο όμως δεν έχουν παραχθεί τροποποιημένα φυτά (Gasser C.S. κ.ά., 1989).

Στα χρόνια στα οποία η μέθοδος αυτή είναι γνωστή, για την παρασκευή διαγονιδιακών φυτών, έχει επιτευχθεί σημαντική πρόοδος, όσον αφορά τη μεταφορά, χρήσιμων στη γεωργία, γονιδίων. Στα γονίδια αυτά περιλαμβάνονται και κάποια που προσφέρουν στα φυτά ανθεκτικότητα σε έντομα, ασθένειες ή ακόμα και σε κάποια "ασφαλή" ζιζανιοκτόνα.

Ένας αρχικός στόχος ήταν η προσπάθεια για τροποποίηση βακτηριακών ή φυτικών γονιδίων για τη δημιουργία ποικιλιών ανθεκτικών σε ευρέως φάσματος ζιζανιοκτόνα. Μια επιτυχής στρατηγική αφορούσε τη

μεταφορά κάποιου γονιδίου για ένα ένζυμο το οποίο συμπληρώνει το φυτικό ένζυμο του οποίου η δράση εμποδίζεται από το ζιζανιοκτόνο.



Εικόνα 3.1. (Α) Γενικευμένη μορφή ενός φορέα γενετικής τροποποίησης φυτών (PTV). Το πλασμίδιο περιέχει ένα γονίδιο που του επιτρέπει να αντιγράφεται στο *Agrobacterium* (Ori-Agro) και έναν υψηλό αριθμό αντιγράφων ενός γονιδίου για την αντιγραφή του στο βακτήριο *Escherichia coli* (Ori- *E. coli*). Με τον τρόπο αυτό γίνεται εφικτό να δημιουργηθούν και να ελεγχθούν τα τροποποιημένα πλασμίδια στο *E. coli*, πριν μεταφερθούν στο *Agrobacterium* και στη συνέχεια στα φυτά. Μαζί με τα παραπάνω γονίδια, στο πλασμίδιο υπάρχουν συνήθως και δύο γονίδια ανθεκτικότητας, ένα για να υπάρχει επιλογή στα βακτήρια, στην περίπτωση αυτή το γονίδιο για ανθεκτικότητα στη Spectinomycin (*Spc^r*) και ένα για να υπάρχει επιλογή στα φυτά. Στο παράδειγμα αυτό είναι το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην Kanamycin (*Kan^r*). Παρούσες είναι επίσης και θέσεις υποδοχής για κάποιο (ή κάποια) γονίδια (IG) καθώς και για τις οριακές αλληλουχίες του T-DNA οι οποίες καθορίζουν τα όρια της περιοχής του πλασμιδίου που θα μεταφερθεί στο φυτό. Για να μεταφερθεί το T-DNA στο φυτό, είναι φυσικά απαραίτητο, οι οριακές αλληλουχίες του, να αναγνωριστούν από τους μηχανισμούς μεταφοράς του *Agrobacterium*. (Β) Διάγραμμα της διαδικασίας τροποποίησης των φυτικών κυττάρων. Ο PTV που κατασκευάστηκε στο *E. coli* μεταφέρεται σε μία τροποποιημένη φυλή του *Agrobacterium*, από την οποία έχουν αφαιρεθεί τα γονίδια της παθογένειας (αφοπλισμένο Ti πλασμίδιο, D-Ti). Οι μηχανισμοί της μολυσματικότητας στο D-Ti του *Agrobacterium* επιδρούν, στις οριακές αλληλουχίες του PTV κατευθύνοντας την περιοχή εντός αυτών, των οριακών αλληλουχιών δηλαδή, στο φυτικό κύτταρο, ενσωματώνοντας την σε ένα από τα χρωμοσώματα στον πυρήνα του κυττάρου. Η επιλογή των τροποποιημένων φυτικών κυττάρων, γίνεται μέσω του γονιδίου ανθεκτικότητας στην Kanamycin κατά τη διάρκεια της αναγέννησης των φυτών.

Αυτό επιτεύχθηκε με την τροποποίηση ενός βακτηριακού γονιδίου, έτσι ώστε το παραγόμενο ένζυμο να μην είναι ευαίσθητο στο ζιζανιοκτόνο και την μετέπειτα μεταφορά του στο γένωμα του φυτού. Εναλλακτικά, το ίδιο γονίδιο του φυτού μπορεί να τροποποιηθεί κατάλληλα για να παράγει το φυτό μεγαλύτερη ποσότητα του ενζύμου αυτού, έτσι ώστε τα φυτά να μπορούν να επιζήσουν κάτω από την παρουσία του ζιζανιοκτόνου. Μια τρίτη στρατηγική αφορούσε την τροποποίηση φυτών ώστε να εκφράζονται γονίδια για ένζυμα τα οποία αδρανοποιούν χημικά το ζιζανιοκτόνο.

Βακτηριακά γονίδια για εντομοκτόνες πρωτεΐνες οι οποίες αποκτήθηκαν από το βακτήριο *Bacillus thuringiensis* και με τα οποία έχουν τροποποιηθεί γενετικά, φυτά, έχουν δώσει ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Όταν, δηλαδή, έντομα παρασιτούν πάνω στα φυτά αυτά, υφίστανται την επίδραση της βακτηριακής τοξίνης, η οποία και τα σκοτώνει. Η εντομοκτόνος πρωτεΐνη, η οποία θεωρείται πολύ ασφαλής, έχει ελεγχθεί πολλές φορές ενώ χρησιμοποιείται για πολλά χρόνια με μορφή ακατέργαστης σκόνης προερχόμενη από καλλιέργειες του *B. thuringiensis*. Η τοξικότητα της πρωτεΐνης είναι πάρα πολύ εξειδικευμένη, ενώ δεν προκαλεί βλάβη σε θηλαστικά, φυτά ή ακόμα και σε πολλά είδη εντόμων.

Ίσως το πιο ενδιαφέρον όσο και απρόσμενο αποτέλεσμα, γεωργικού ενδιαφέροντος, αποτελεί η χρήση του *Agrobacterium* στην τροποποίηση φυτών με κάποιο γονίδιο που κωδικοποιεί την παραγωγή της πρωτεΐνης του καψιδίου του ιού tobacco mosaic virus. Η έκφραση του γονιδίου αυτού σε φυτά καπνού και τομάτας έδωσε αποτελέσματα όσον αφορά την προστασία τους από τον ιό αυτό. Ο μηχανισμός που προσφέρει την ανθεκτικότητα στον ιό δεν έχει κατανοηθεί πλήρως, εάν όμως μπορεί να γενικευτεί και σε άλλους ιούς, τότε πρόκειται για μια ιδιαίτερα σημαντική

προσέγγιση στον έλεγχο από ιολογικές ασθένειες. Παράλληλα, έχουν δοκιμαστεί και τροποποιήσεις φυτών με γονίδια που κωδικοποιούν την παραγωγή ειδικών πρωτεϊνών (ρεπλικάσες), αλληλουχιών DNA (δορυφορικά, συμπληρωματικές αλληλουχίες), οι οποίες θα αναλυθούν ευρύτερα παρακάτω καθώς και τα αποτελέσματα που μπορούν να επιτευχθούν. Η χρήση των εντομοκτόνων για τον έλεγχο των εντόμων-φορέων των ιών με τον τρόπο αυτό μπορεί να μειωθεί σημαντικά. Μέχρι σήμερα, είναι γνωστό, ότι χημικές μέθοδοι προστασίας ή καταπολέμησης των ιολογικών μολύνσεων ήταν ανεπιτυχείς, με αποτέλεσμα η γενετική τροποποίηση των φυτών με κατάλληλα γονίδια να θεωρείται σημαντικό εργαλείο για την αντιμετώπισή τους (Goodman R.M. κ.ά., 1987).

3.3. ΑΛΛΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Μόλυνση με Agrobacterium (Agroinfection)

Με τη μέθοδο αυτή μία αλληλουχία DNA ενός ιού ενσωματώθηκε στο T-DNA ενός πλασμιδίου που προκαλεί καρκινικούς όγκους σύμφωνα με τη διαδικασία που ακολουθείται στο *Agrobacterium*. Όταν το T-DNA εισέρχεται στο φυτικό κύτταρο για να ενσωματωθεί, ελευθερώνει το DNA του ιού το οποίο αντιγράφεται και μεταφέρεται διασυστηματικά. Συνεπώς μέσω της μόλυνσης με το *Agrobacterium*, μπορεί να ενσωματωθεί το DNA του ιού και να παραχθούν διαγονιδιακά φυτά τα οποία θα περιέχουν το DNA του ιού όχι μόνο στα προσβεβλημένα αλλά και σε γειτονικά κύτταρα.

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για να τροποποιηθούν δημητριακά, διότι θεωρήθηκε πως θα ήταν δυνατό να ξεπεραστούν προβλήματα που υπήρχαν στην τροποποίηση φυτών μέσω του *Agrobacterium tumefaciens*. Όμως και η μέθοδος αυτή εμφανίζει προβλήματα αφού το DNA του ιού δεν

ενσωματώνεται στα φυτικά κύτταρα. Ακόμα όμως κι αν ενσωματωνόταν δεν θα είχε καμία συνέπεια, αφού τα γειτονικά κύτταρα των προσβεβλημένων καταστρέφονται. Συνεπώς η μέθοδος αυτή δεν εμφανίζει περισσότερες πιθανότητες να παράγει διαγονιδιακά φυτά σε σχέση με την τροποποίηση μέσω του *Agrobacterium tumefaciens*. Ωστόσο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη μελέτη της βιολογίας των ιών μέσω της μεταφοράς καταστροφικών μεταλλαγών ή απλών γονιδίων τους.

Χρήση ιών-φορέων (viral vectors)

Η χρήση των ιών-φορέων για την τροποποίηση φυτών, ξεκίνησε με την ενσωμάτωση ενός γονιδίου, που προσέφερε αντίσταση σε κάποιο αντιβιοτικό σε μία καταστροφική μεταλλαγή ενός DNA ιού. Ο ιός αυτός με τη διασπορά του μέσα στο φυτό, το έκανε ανθεκτικό στο αντιβιοτικό. Όμως μέχρι σήμερα, ο πολλαπλασιασμός και η διασυστηματική εξάπλωση του ιού, δεν ανταποκρίθηκαν στις προσδοκίες για την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων των επιθυμούμενων γονιδίων ή των προϊόντων των γονιδίων. Αυτό ίσως να οφείλεται στο γεγονός, ότι το γένωμα του ιού είναι ιδιαίτερα μικρό ώστε να ανεχθεί ξένα γονίδια.

Με την ανακάλυψη των RNA ιών οι οποίοι μπορούν μέσω της αντίστροφης αντιγραφής να μετατραπούν σε κλώνους συμπληρωματικού DNA (cDNA) ανοίχτηκαν νέοι δρόμοι στην τροποποίηση φυτών μέσω των RNA ιών. Όμως, το γεγονός, ότι οι DNA ιοί δεν ενσωματώνονται στο γένωμα των φυτών που προσβάλλουν ενώ δεν εμφανίζονται και στα μεριστώματα ή στους απογόνους τους, καθιστά δύσκολο να φανταστεί κανείς, πως ιοί-φορείς μπορούν να δώσουν διαγονιδιακά φυτά.

Πρωτοπλάστες και απευθείας μεταφορά DNA (Protoplasts and direct DNA transfer)

Η μέθοδος της απευθείας μεταφοράς DNA χρησιμοποιήθηκε ως εναλλακτική λύση για να αντιμετωπιστούν τα προβλήματα που εμφάνιζε η μεταφορά γονιδίων σε δημητριακά μέσω του *Agrobacterium*. Ως γνωστό, οι πρωτοπλάστες είναι απομονωμένα φυτικά κύτταρα τα οποία δεν έχουν κυτταρικό τοίχωμα και τα οποία είναι ιδανικά για να γίνει μεταφορά γονιδίων. Η πρόσληψη του DNA μπορεί να συμβεί με διάφορους χειρισμούς συμπεριλαμβανομένης της χρήσης πολυαιθυλενγλυκόλης (polyethylene glycol) και της ηλεκτροπόρωσης (electroporation). Στα χαρακτηριστικά της μεθόδου εντάσσεται το γεγονός ότι η περατή πρωτοπλασματική μεμβράνη εγγυάται πως τα γονίδια μπορούν να φτάσουν και να εισέλθουν σε κάθε πρωτοπλάστη σε συγκεντρώσεις DNA που ρυθμίζονται πειραματικά. Επίσης, μέσω της ενζυματικής ή της μηχανικής απομόνωσης των πρωτοπλαστών, προκαλούνται πληγές σ' αυτούς οι οποίες οδηγούν στη δημιουργία κυττάρων ικανών να τροποποιηθούν γενετικά, αυξάνοντας έτσι την πιθανότητα να ενσωματωθούν γονίδια στα κύτταρα αυτά και να αναγεννηθούν. Παράλληλα, τα διάφορα γονίδια πλησιάζουν κάθε ένα από τα κύτταρα που είναι ικανά να τροποποιηθούν γενετικά, αυξάνοντας έτσι την πιθανότητα να δημιουργηθούν διαγονιδιακά φυτά. Τέλος η μεταφορά γονιδίων δεν απαιτεί βιολογικό ξενιστή με αποτέλεσμα να ματαιώνονται πιθανά προβλήματα που να αφορούν τον ξενιστή.

Δυστυχώς, η μέθοδος αυτή παρουσιάζει σημαντικά προβλήματα που αφορούν την αναγέννηση φυτών από τους πρωτοπλάστες. Παρ' όλο που έχει πραγματοποιηθεί σημαντική πρόοδος, με μεγάλες δυνατότητες εξέλιξης μια και θεωρείται από τις πιο ευαίσθητες διαδικασίες η

αναγέννηση φυτών από πρωτοπλάστες, εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από παραμέτρους που δεν ελέγχονται πειραματικά. Πρέπει όμως να σημειωθεί, πως έχουν αναγεννηθεί πρόσφατα διαγονιδιακά φυτά από πρωτοπλάστες τα οποία δεν μπορούσαν να τροποποιηθούν μέσω του *Agrobacterium*.

Όπλο εκτόξευσης DNA (Particle gun or Biolistics)

Η μέθοδος αυτή αφορά την επιτάχυνση κάποιων βαρέων μικρομορίων, τα οποία έχουν επικαλυφθεί με DNA και τα οποία χρησιμοποιούνται για τη μεταφορά γονιδίων ουσιαστικά σε κάθε είδος κυττάρων και ιστών. Από τις μεθόδους για την τροποποίηση φυτών, μετά από αυτή του *Agrobacterium*, καμία δεν έχει αντιμετωπιστεί με τόσο ενθουσιασμό όσο αυτή του όπλου εκτόξευσης DNA. Η μέθοδος αυτή παρουσιάζει πάρα πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις υπόλοιπες. Τα σημαντικότερα από αυτά είναι:

- Η ευκολία χειρισμού της και η μεταφορά γονιδίων σε πολλά κύτταρα με μία προσπάθεια.
- Τα γονίδια που επικαλύπτουν το μόριο είναι βιολογικώς ενεργά.
- Τα κύτταρα-στόχοι μπορούν να διαφοροποιούνται από κύτταρα γύρης, κυτταροκαλλιέργειες διαφοροποιημένων ιστών και μεριστωμάτων.
- Υπάρχει η δυνατότητα της μεταφοράς γονιδίων σε πάρα πολλά κύτταρα, σε οποιοδήποτε σημείο του φυτού.

Η μεγάλη επένδυση που έχει γίνει στη μέθοδο αυτή έχει αποδώσει, αφού έχει γίνει κατορθωτό να αναγεννηθούν φυτά που δεν ήταν δυνατό να παραχθούν από άλλες μεθόδους.

Είναι χαρακτηριστικό ότι τα πρώτα διαγονιδιακά φυτά σόγιας παρήχθησαν μέσω της μεταφοράς γονιδίων με φορέα το *Agrobacterium* και

μέσω της χρήσης του όπλου εκτόξευσης DNA. Επίσης, μέσω του όπλου εκτόξευσης DNA, έγινε δυνατή η αναγέννηση γόνιμων διαγονιδιακών φυτών αραβοσίτου σε πάρα πολλά εργαστήρια. Παρ' όλη όμως την επιτυχία της μεθόδου αυτής στην επίτευξη διαγονιδιακών φυτών αραβοσίτου, ένα σημαντικό ερώτημα παραμένει: Γιατί η τεχνική αυτή, παρ' όλα τα πλεονεκτήματά της, εμφανίζεται μάλλον αναποτελεσματική για τη σταθερή ενσωμάτωση των γονιδίων στα φυτικά κύτταρα;

Μικροένεση (Microinjection)

Η μικροένεση χρησιμοποιεί μικροαγγεία και μικροσκοπικές κατασκευές για να εισάγει DNA σε καθορισμένα κύτταρα κατά τέτοιο τρόπο όμως που τα κύτταρα στα οποία έχει γίνει επέμβαση να επιβιώνουν και να μπορούν να πολλαπλασιάζονται. Με τη μέθοδο αυτή έχει γίνει κατορθωτή η παραγωγή διαγονιδιακών κλώνων από πρωτοπλάστες και διαγονιδιακών χειμερών από προέμβρυα προερχόμενα από μικροσπόρια. Όπως η μέθοδος του όπλου εκτόξευσης DNA έτσι και αυτή της μικροένεσης, μεταφέρουν γονίδια σε κύτταρα περιβαλλόμενα από κυτταρικό τοίχωμα. Η μέθοδος αυτή παρουσιάζει μειονεκτήματα σε σχέση με αυτή του όπλου εκτόξευσης DNA. Με την τεχνική αυτή ένα μόνο κύτταρο παραλαμβάνει DNA κατά την ένεση, ενώ ο χειρισμός της τεχνικής απαιτεί περισσότερη ικανότητα και οργάνωση. Εμφανίζει όμως και πλεονεκτήματα, τα κυριότερα εκ των οποίων είναι:

- Η βελτιστοποίηση της ποσότητας του DNA που φτάνει στο κύτταρο που τροποποιείται.
- Η επιλογή του κυττάρου στο οποίο θα αποδοθεί το DNA.

- Η ακριβής και προβλέψιμη, ακόμα και μέσα στον πυρήνα του κυττάρου, απόδοση του DNA, μάλιστα κάτω από οπτικό έλεγχο.
- Η τροποποίηση κυττάρων μικρών κατασκευών (μικροσπόρια) τα οποία δεν υπάρχουν σε μεγάλες ποσότητες ώστε να χρησιμοποιηθεί το όπλο εκτόξευσης του DNA.

Τέσσερις από τις μεθόδους που αναφέρθηκαν παραπάνω έχουν δώσει διαγονιδιακά φυτά (μεταφορά γονιδίων που επιτυγχάνεται μέσω του *Agrobacterium tumefaciens*, απευθείας μεταφορά γονιδίων σε πρωτοπλάστες, όπλο εκτόξευσης DNA και μικροένεση), ενώ δύο δεν έχουν δώσει (μόλυνση με *Agrobacterium* και χρήση ιών-φορέων). Βασικό στοιχείο, στην τροποποίηση, αποτελεί το ξεπέρασμα του κυτταρικού τοιχώματος που αποτελεί και βασικό στόχο κάποιων άλλων μεθόδων, οι οποίες δεν είχαν δώσει μέχρι σήμερα επιτυχή αποτελέσματα.

Επώαση αποξηραμένων σπόρων ή εμβρύων σε DNA (Incubation in DNA of dry seeds or embryos)

Η μέθοδος αυτή αφορά την επώαση αποξηραμένων σπόρων και εμβρύων, κυρίως δημητριακών και οσπρίων, μαζί με DNA ιού ή άλλου οργανισμού. Παρ' όλες τις ιδιαίτερα ενθαρρυντικές προβλέψεις, δεν έχει δώσει πρακτικά αποτελέσματα στην τροποποίηση φυτικών κυττάρων.

Επώαση διογκωμένων ιστών ή κυττάρων σε DNA (Incubation in DNA of turgescent tissue or cells)

Με τη μέθοδο αυτή, σπορόφυτα, φυτικά όργανα, έκφυτα ιστών, κυτταροκαλλιέργειες και κύτταρα έρχονται σε επαφή με το DNA και με

καθορισμένα γονίδια-δείκτες, χωρίς όμως να καταφέρει το DNA να διαπεράσει το κυτταρικό τοίχωμα, με συνέπεια να μην υπάρχει περίπτωση τροποποίησης.

Τροποποίηση γύρης (Pollen transformation)

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην προσπάθεια απορρόφησης του DNA από τη βλαστανούσα γύρη, με σκοπό να ενσωματωθεί στον σπερματικό πυρήνα ή μέσω του γυρεοσωλήνα να φτάσει στο ζυγωτό κύτταρο.

Μακροένεση (Macroinjection)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί βελόνες, με διάμετρο μεγαλύτερη από αυτή του κυττάρου. Στην περίπτωση όμως αυτή, τα κύτταρα-στοχοι συνήθως καταστρέφονται. Συνεπώς το DNA πρέπει να μεταφερθεί σε γειτονικά κύτταρα, ώστε να ενσωματωθεί, πράγμα που δεν είναι κατορθωτό.

Ηλεκτροπόρωση (Electroporation)

Αφορά, την τοποθέτηση ενός αγωγού μικρής ποσότητας ρεύματος (capacitor), σε κάποιο πληθυσμό κυττάρων με σκοπό τη δημιουργία παροδικών ανοιγμάτων στην πλασματική μεμβράνη. Με τον τρόπο αυτό, διευκολύνεται η είσοδος του DNA, το οποίο πρέπει να βρίσκεται σε άμεση επαφή με τη μεμβράνη. Το σύστημα αυτό χρησιμοποιείται ήδη για τροποποίηση πρωτοπλαστών χωρίς όμως επιτυχία στην τροποποίηση κυττάρων με κυτταρικό τοίχωμα.

Ηλεκτροφόρηση (Electrophoresis)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τη μεταφορά γονιδίων μέσα σε κύτταρα με τη βοήθεια ηλεκτρικού ρεύματος, χωρίς όμως επιτυχία, μάλλον λόγω του κυτταρικού τοιχώματος.

Μικρολείζερ (Microlaser)

Η μέθοδος αυτή κατευθύνει την ακτίνα του λέιζερ, μέσω μικροσκοπίου, σε συγκεκριμένα κύτταρα ώστε να διατρήσει το κυτταρικό τοίχωμα. Αμέσως, ακολουθεί επώαση των κυττάρων αυτών σε DNA. Η μέθοδος αυτή δεν έχει δώσει ξεκάθαρα αποτελέσματα, ενώ θα μπορούσε να προσφέρει έργο σε περιπτώσεις που δεν είναι δυνατή η χρήση τεχνικών όπως η μικροένεση ή το όπλο εκτόξευσης DNA (Portykus I., 1991).

3.4. ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΙΟΛΟΓΙΚΩΝ

ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ

Ανθεκτικότητα που επιτυγχάνεται μέσω της καψιδιακής πρωτεΐνης (Coat-protein mediated resistance)

Ανάμεσα στις υποθέσεις, για το μηχανισμό της "σταυρωτής προστασίας" (cross protection) στις αρχές της δεκαετίας του '80, ήταν και μια πρόταση η οποία ανέφερε πως η καψιδιακή πρωτεΐνη του ιού που προσέφερε την προστασία, παρεμπόδιζε την "αποκάλυψη" (uncoating) της εισερχόμενης φυλής του ιού. Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση του ιού tobacco mosaic virus (TMV), όπου η έκφραση της καψιδιακής πρωτεΐνης του καθυστέρησε την ανάπτυξη της ιολογικής ασθένειας. Ωστόσο, δεν υπάρχει ακόμα απόδειξη πως η συμβατική σταυρωτή προστασία λειτουργεί μέσω της καψιδιακής πρωτεΐνης ή μέσω της παρεμπόδισης της αποκάλυψης του

μορίου του ιού. Πρέπει να σημειωθεί, πως από τη στιγμή που έγινε γνωστή η εμφάνιση προστασίας μέσω της καψιδιακής πρωτεΐνης για τον TMV, παρόμοια εμφάνιση ανθεκτικότητας δημοσιοποιήθηκε και για τουλάχιστον 20 ακόμα φυτικούς ιούς (Nejidat A. κ.ά., 1990).

Ο μηχανισμός της ανθεκτικότητας αποδιδόμενη στην καψιδιακή πρωτεΐνη, παρ' όλο που δεν έχει κατανοηθεί επαρκώς, είναι πολύ πιθανό να οφείλεται στη δυνατότητα της καψιδιακής πρωτεΐνης να αναμειγνύεται στη διαδικασία της αποκάλυψης του γενώματος του ιού. Εν τούτοις, πρέπει να λαμβάνεται πάντοτε υπόψη, η πιθανότητα να υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί μέσω των οποίων η έκφραση της καψιδιακής πρωτεΐνης του ιού, να μπορεί να παρεμποδίσει την ιολογική μόλυνση.

Η προστασία που προσφέρει η καψιδιακή πρωτεΐνη, φυσικά δεν είναι ολοκληρωτική και βασικά έχει τρεις επιδράσεις. Πρώτον, μειώνει τον αριθμό των θέσεων του μολυσμένου φύλλου στις οποίες αναπτύσσονται μολύνσεις, όπως αυτό εκτιμάται από μείωση του αριθμού των κηλίδων οι οποίες εμφανίζονται πάνω στα μολυσμένα φύλλα, κατόπιν μηχανικής μόλυνσεως. Μολύνσεις, μέσω φυσικών φορέων όπως έντομα, νηματώδεις, σε διαγονιδιακά φυτά, δεν έχουν μελετηθεί εκτεταμένα με αποτέλεσμα να μην μπορούν να πραγματοποιηθούν γενικεύσεις, πάνω στα αποτελέσματα της έκφρασης, των πρωτεϊνών των καψιδίων των ιών, σε φυσικώς μολυσμένες θέσεις. Για παράδειγμα, σε ένα πείραμα, δύο σειρές πατάτας που εξέφραζαν την πρωτεΐνη του καψιδίου του ιού Y της πατάτας (PVY), και οι οποίες ήταν ανθεκτικές στη μηχανική μόλυνση με τον ιό, εμφάνιζαν διαφορετική συμπεριφορά στη μόλυνση μέσω αφίδων. Δηλαδή, η μια ήταν ανθεκτική ενώ η άλλη δεν ήταν. Το παραπάνω παράδειγμα αποδεικνύει τη σπουδαιότητα του ελέγχου της ανθεκτικότητας που προσδίδει η πρωτεΐνη

του καψιδίου του ιού, σε φυσικώς μολυσμένα, διαγονιδιακά φυτά. Δεύτερον, η μορφή αυτή της προστασίας έχει ποικίλες επιδράσεις στην έκταση της διασυστηματικής μόλυνσης, διαβαθμιζόμενη από πλήρη προστασία σε μία τέτοια προσβολή έως την επιβράδυνση της εμφάνισής της. Υπάρχει βέβαια, διαφοροποίηση στην διασυστηματική προσβολή από φυτό σε φυτό ακόμα και μέσα σε μια ομάδα μιας σειράς διαγονιδιακών φυτών. Τρίτον, στα διασυστηματικά μολυσμένα, διαγονιδιακά φυτά, η ποσότητα του ιού που εντοπίζεται είναι αισθητά μειωμένη.

Η ανθεκτικότητα που αποδίδεται στην καψιδιακή πρωτεΐνη, μπορεί να ξεπεραστεί από υψηλές ποσότητες μολύσματος ενώ δεν λειτουργεί στις περιπτώσεις μόλυνσης με RNA. Επίσης, το μέγεθος της προστασίας από ιολογικές μολύνσεις, εξαρτάται από τη συγγένεια της καψιδιακής πρωτεΐνης του ιού που προκαλεί την ασθένεια με αυτή του προστατεύοντος ιού. Σε μια ανάλυση της ομάδας των tobamovirus έγινε φανερό ότι ο τύπος της καψιδιακής πρωτεΐνης του TMV προστάτευε καλά, ενάντια σε φυλές ιών που εμφάνιζαν περισσότερο από 85% ομολογία στην πρωτεΐνη του καψιδίου, λιγότερο καλά απέναντι σε φυλές ιών που εμφάνιζαν 60-85% ομολογία και πολύ λίγο σε φυλές που εμφάνιζαν ομολογία γύρω στο 45%.

Η προστασία που αποδίδεται στην καψιδιακή πρωτεΐνη αναπτύχθηκε πριν γίνει γνωστός και κατανοητός ο τρόπος λειτουργίας του μηχανισμού αυτού. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η παρεμπόδιση συμβαίνει σ' ένα αρχικό στάδιο της μόλυνσης, το οποίο πιθανώς να είναι το στάδιο της αποκάλυψης του γενώματος του ιού. Υπάρχουν δύο δυνατές εξηγήσεις για την παραπάνω εκτίμηση. Η πρώτη, προτείνει ότι υπάρχουν θέσεις υποδοχής για να συμβεί η αποκάλυψη του ιού, οι οποίες καταλαμβάνονται από την καψιδιακή του πρωτεΐνη με αποτέλεσμα να υπάρχει παρεμπόδιση της

δράσης του. Η δεύτερη, προτείνει, πως η εκφρασμένη καψιδιακή πρωτεΐνη, αλλοιώνει την ισορροπία μεταξύ των σωματιδίων του ιού που αποκαλύπτονται για να δώσουν μόρια πρωτεΐνης και νουκλεϊκών οξέων και των μορίων νουκλεϊκού οξέος που επικαλύπτονται (coating) για την παραγωγή σωματιδίων του ιού. Ωστόσο, είναι πιθανό μια ποσότητα ιού να αποκαλυφθεί ή ακόμα και να πολλαπλασιαστεί. Καταλήγοντας, θα αναφέραμε πως οι μηχανισμοί που εξηγούν την εμφάνιση της ανθεκτικότητας μπορεί να είναι σύνθετοι, όμως εφ' όσον εξηγηθούν είναι πιθανό να χρησιμοποιείται η ανθεκτικότητα που αποδίδεται στην καψιδιακή πρωτεΐνη του ιού περισσότερο αποτελεσματικά.

Ανθεκτικότητα που επιτυγχάνεται μέσω συμπληρωματικών αλυσίδων νουκλεϊκών οξέων (Antisense nucleic acids mediated resistance)

Συμπληρωματικές αλυσίδες νουκλεϊκού οξέος του ιού χρησιμοποιήθηκαν αρχικά με σκοπό να διαμορφώσουν την έκφραση γονιδίων του πυρήνα του φυτικού κυττάρου. Η χρήση συμπληρωματικών αλυσίδων RNA, ως μια προσέγγιση για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας των φυτών σε ιολογικές ασθένειες ερευνήθηκε για κάποιο χρονικό διάστημα. Ενώ θεωρητικά, αναμενόταν πως συμπληρωματικές αλυσίδες νουκλεϊκών οξέων στις κατάλληλες θέσεις πάνω στην εντολοδόχο ή αναπαραγωγική μορφή του RNA θα ανέστειλαν τον πολλαπλασιασμό του ιού, ερωτήματα όπως το να υπάρχουν επαρκείς ποσότητες συμπληρωματικής αλυσίδας ώστε να μπλοκάρει έναν πολλαπλασιαζόμενο ιό ή το να γνωρίζεις ποια είναι τα καλύτερα τμήματα προς ενεργοποίηση ώστε να τοποθετηθούν στις κατάλληλες θέσεις του κυττάρου, αποτελούν προβλήματα που οπωσδήποτε

πρέπει να αντιμετωπιστούν. Ωστόσο, παρ' όλο που διάφορα προκαταρκτικά πειράματα υπό συνθήκες "in vivo" με μόρια RNA φυτικών ιών, θεωρούνταν πως θα ήταν επιτυχή, η επιτυχία υπό τις συνθήκες αυτές είναι πολύ περιορισμένη. Σε διαγονιδιακά φυτά που είχαν τροποποιηθεί με ενσωμάτωση συμπληρωματικής αλυσίδας RNA του ιού του μωσαϊκού της αγγουριάς (CMV), δεν εμφανιζόταν ανθεκτικότητα στην προσβολή από τον ιό CMV, εκτός από μια σειρά η οποία όμως παρήγαγε πάρα πολύ μικρή ποσότητα συμπληρωματικού RNA του ιού. Άρα λοιπόν δεν υπάρχει καμία απόδειξη, πως η αλυσίδα του συμπληρωματικού RNA του ιού CMV προσέφερε την ανθεκτικότητα αυτή. Σε διαγονιδιακά φυτά πατάτας συμπληρωματική αλυσίδα του RNA, για την κωδικοποίηση της καψιδιακής πρωτεΐνης του ιού X της πατάτας (PVX), προσέφερε ανθεκτικότητα μόνο σε χαμηλές συγκεντρώσεις μολύσματος.

Τα βασικά προβλήματα της μεθόδου αυτής φαίνεται πως είναι δύο. Πρώτον, η ποσότητα της συμπληρωματικής αλυσίδας του νουκλεϊκού οξέος που χρειάζεται για να αντιμετωπίσει το αναπαραγωγικό σύστημα του ιού, το οποίο μπορεί αμέσως να παράγει μεγάλες ποσότητες νουκλεϊκού οξέος του ιού. Δεύτερον, το RNA του ιού βρίσκεται σε μεγάλο ποσοστό διάσπαρτο μέσα στο κυτόπλασμα του κυττάρου, σε αντίθεση με τις παραγόμενες αλυσίδες συμπληρωματικού RNA οι οποίες παράγονται στον πυρήνα του κυττάρου. Το δεύτερο πρόβλημα μάλιστα οξύνεται ακόμη περισσότερο, αν το νουκλεϊκό οξύ του ιού που αναπαράγεται στο κυτόπλασμα είναι συνδεδεμένο με πρωτεϊνικά μόρια για το μεγαλύτερο χρονικό διάστημα της αναπαραγωγής του. Για το λόγο αυτό, είναι πιθανό η συμπληρωματική αλυσίδα σε ένα αρχικό στάδιο της αναπαραγωγής ενός ιού να μειώνει την αναπαραγωγή αυτή, ενώ σε έναν ιό που εμφανίζει και μια

φάση αναπαραγωγής στον πυρήνα του κυττάρου, η δράση θα είναι μεγαλύτερη. Συνεπώς σε ομάδες ιών όπως οι geminiviruses που πολλαπλασιάζονται στον πυρήνα του κυττάρου ή ακόμα σε ομάδες όπως οι caulimoviruses και οι badnaviruses που εμφανίζουν ένα στάδιο του πολλαπλασιασμού τους στον πυρήνα του κυττάρου, η συμπληρωματική αλυσίδα του νουκλεϊκού οξέος μπορεί να εμποδίσει την αναπαραγωγή τους (Hull R. κ.ά., 1992).

*Ανθεκτικότητα που επιτυγχάνεται μέσω δορυφορικού RNA
(Satellite RNA mediated resistance)*

Οι δορυφόροι είναι μικρές αλληλουχίες RNA οι οποίες βασίζονται στο μητρικό μόριο του ιού για να αναπαραχθούν. Μερικά δορυφορικά RNA ελαττώνουν την ένταση των συμπτωμάτων και την αναπαραγωγή των ιών, άλλα υποβοηθούν τη δημιουργία συμπτωμάτων και άλλα δεν έχουν καμία επίδραση. Διαγονιδιακά φυτά καπνού τροποποιημένα με αντίγραφα DNA, του δορυφόρου του ιού CMV, εμφάνισαν μείωση της εντάσεως των συμπτωμάτων που προκαλεί ο ιός. Παρόμοια αντίδραση εμφανίστηκε και σε άλλους ιούς μεταξύ των οποίων και ο tomato aspermy virus (TAV), χωρίς όμως να υπάρχει η δυνατότητα πλήρους επεξήγησης των αποτελεσμάτων. Είναι ωστόσο δυνατόν, να υφίσταται παρεμπόδιση, μέσω του δορυφορικού RNA, ο πολλαπλασιασμός του ιού χωρίς να παρεμποδίζεται η αντιγραφή του ιού ή η συσσώρευσή του για να μειωθεί η παραγωγή συμπτωμάτων (Yie Y. κ.ά., 1993).

Η στρατηγική του δορυφορικού RNA είναι περιορισμένη, λόγω του γεγονότος ότι ελάχιστοι ιοί εμφανίζουν τέτοιας μορφής RNA ενώ υπάρχει και η πιθανότητα κάποιοι συνδυασμοί δορυφορικού RNA-ιού να αποδώσουν

περισσότερο ισχυρά συμπτώματα με καταστροφικά αποτελέσματα σε άλλα είδη φυτών. Αυτό μπορεί να συμβεί σε διαγονιδιακά φυτά τα οποία όμως προσβάλλονται από διαφορετικό ιό σε σχέση με το δορυφόρο ή σε φυτά που λειτουργούν ως πηγές παραγωγής δορυφορικού RNA το οποίο εν συνεχεία μπορεί να μεταφερθεί σ' άλλα φυτά. Επίσης, είναι δυνατόν να προκύψουν μεταλλάξεις στα δορυφορικά RNA, οι οποίες πιθανόν να εμφανίζουν θανατηφόρα αποτελέσματα στα φυτά αφού η διαφορά μεταξύ ήπιας και δριμύας μορφής του δορυφορικού RNA έγκειται σε ένα-δύο νουκλεοτίδια.

Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων τα δορυφορικά RNA μειώνουν την αντιγραφή πρέπει να εξηγηθούν ακόμα καλύτερα, πριν αυτοί αρχίσουν να χρησιμοποιούνται. Είναι πάρα πολύ πιθανό, λοιπόν, να κατασκευασθεί ένα μικρό δορυφορικό RNA το οποίο θα επιτυγχάνει τη μείωση των συμπτωμάτων, όμως ούτως ή άλλως θα αφοπλίζεται και δεν θα έχει τη δυνατότητα της επικάλυψής του με πρωτεΐνη ή της διασποράς του.

Φυσικά, οι τεχνικές των δορυφορικών RNA καθώς και οι άλλες οι οποίες βασίζονται στην αντίστροφη αντιγραφή των νουκλεϊκών οξέων, συνεχίζουν να επεξεργάζονται και να βελτιώνονται. Άλλα μόρια τα οποία πιθανώς να εμπλέκονται με την αντιγραφή είναι τα τεχνητά δορυφορικά RNA, κάποια τμήματα γονιδίων υπεύθυνα για την αντιγραφή ή και τα αποκαλούμενα ελλιπή εμπλεκόμενα μόρια (defective interfering molecules, DIs).

Ανθεκτικότητα που επιτυγχάνεται μέσω ελλিপών μορίων νουκλεϊκού οξέος (Defective interfering molecules, DIs, mediated resistance)

Τα ελλιπή εμπλεκόμενα μόρια DIs τα οποία είναι αλληλουχίες συγγενείς με τις αντίστοιχες του μητρικού ιού και τα οποία χρειάζονται το μητρικό ιό για να αντιγραφούν, είναι γνωστά, για κάποιο χρονικό διάστημα, από την εμφάνισή τους μεταξύ διαφόρων ομάδων ιών.

Μετά από πολλή θεώρηση, παραδείγματα της δράσης των DIs σε φυτικούς ιούς, έχουν πρόσφατα καταγραφεί και αφορούν μείωση της συγκέντρωσης του ιού, πιθανώς οφειλόμενη στον ανταγωνισμό του με το γενωμικό RNA κατά την αντιγραφή του ιού καθώς και μείωση της ποσότητας των συμπτωμάτων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η περίπτωση του ιού tomato bushy stunt virus (TBSV).

Μια διαφορετική προσέγγιση, όσον αφορά την αναζήτηση φυσικών DIs, αποτελεί η δημιουργία τους από τις θέσεις σύνδεσης γονιδίων που εμπλέκονται στην αντιγραφή του ιού. Πειράματα που έγιναν με τον ιό bromo mosaic virus (BMV) έδειξαν πως μεταλλαγμένες μορφές RNA του ιού μείωσαν ή ελαχιστοποίησαν την αντιγραφή των αλληλουχιών του RNA που ήταν υπεύθυνες για την αντιγραφή του ιού. Αυτή λοιπόν η προσέγγιση θεωρείται πως έπειτα από κατάλληλη επεξεργασία μπορεί να επεκταθεί για την προστασία απέναντι σε πολλούς φυτικούς ιούς.

Μείωση των συμπτωμάτων καθώς και της αντιγραφής του ιού στα φυτά εμφανίστηκε και σε διαγονιδιακά φυτά που είχαν τροποποιηθεί με ένα γονίδιο για την παραγωγή DI σωματιδίων του ιού African casava mosaic virus (ACMV). Μάλιστα η μείωση των συμπτωμάτων ήταν συνδυασμένη με την ποσότητα και την αντιγραφή του υπογενωμικού (ελλιπούς) μορίου DNA με

το οποίο είχε γίνει η τροποποίηση. Το φαινόμενο αυτό αφορά ειδικά τον ιό ACMV και κάποιους άλλους ιούς της ομάδας των geminiviruses και δεν επιδέχεται διεύρυνση σε άλλους ιούς (Hull R. κ.ά., 1992).

Ανθεκτικότητα που επιτυγχάνεται μέσω αλληλουχιών μη δομικών γόνων (Non structural genes mediated resistance)

Εκτός από τη χρήση των δομικών γονιδίων (καψιδιακή πρωτεΐνη) στην αντιμετώπιση των ιών, εξετάζεται και η πιθανότητα μη δομικές πρωτεΐνες ή οι αλληλουχίες που τις κωδικοποιούν (non structural genes) να προσφέρουν κάποια μορφή ανθεκτικότητας σε ιολογικές ασθένειες.

Σε διαγονιδιακά φυτά τα οποία είχαν τροποποιηθεί με κάποιο γονίδιο που κωδικοποιεί την παραγωγή μιας μη δομικής πρωτεΐνης εμφανιζόταν πρόβλημα ανίχνευσης της πρωτεΐνης αυτής. Αυτό οφειλόταν είτε σε κάποιο λάθος της πρωτεΐνης είτε στην ενσωμάτωση του γονιδίου της πρωτεΐνης σε μη ενεργή ζώνη του γενώματος του φυτού.

Συνεπώς, αδυναμία εντοπισμού της μη δομικής πρωτεΐνης δε σημαίνει αυτόματα πλήρη απόρριψη της μεθόδου αυτής. Είναι απαραίτητο λοιπόν για την καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού μέσω του οποίου λειτουργεί η ανθεκτικότητα που αποδίδεται σε αλληλουχίες που κωδικοποιούν μη δομικές πρωτεΐνες, να πραγματοποιηθούν πειράματα με αναπαραγωγή ιών υπό συνθήκες "in vitro".

Ιδιαίτερα ενθαρρυντικά αποτελέσματα είχαν πειράματα με διαγονιδιακά φυτά που είχαν τροποποιηθεί με κάποιο γονίδιο που κωδικοποιεί μια μη δομική πρωτεΐνη ιού και η οποία παρεμπόδιζε την αντιγραφή του. Χαρακτηριστική τέτοια περίπτωση αποτελεί αυτή του tobacco mosaic virus (TMV) όπου διαγονιδιακά φυτά που είχαν τροποποιηθεί

με τον γόνο που κωδικοποιεί την 54K πρωτεΐνη συγκεκριμένης φυλής του ιού (U1), ανέπτυσαν ανθεκτικότητα όχι μόνο σ' αυτή τη φυλή του ιού, αλλά και σε μια συγγενική αυτής (YSI/1). Μάλιστα σε αντίθεση με γονίδια που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη του καψιδίου του ιού TMV (δομική πρωτεΐνη), η ανθεκτικότητα δεν υπερνικούνταν από υψηλές συγκεντρώσεις μολύσματος. Ανάλογα αποτελέσματα, έδωσε και η τροποποίηση φυτών *Nicotiana benthamiana*, με κάποια αλληλουχία RNA ανάλογη με αυτή του 54K γονιδίου του TMV, για ανάπτυξη ανθεκτικότητας στον ιό *pea early browning virus* (PEBV) (Hull R. κ.ά., 1992).

Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων εμφανίστηκε παρεμπόδιση της αντιγραφής των ιών, από γονίδια που κωδικοποιούν μη δομικές πρωτεΐνες, δεν είναι ακόμα κατανοητοί. Ωστόσο, παρατίθενται δύο βασικά μοντέλα τα οποία θεωρούνται πως είναι πιθανά για να επεξηγηθεί η ανθεκτικότητα, εφόσον βέβαια, η μη δομική πρωτεΐνη είναι υπεύθυνη για την παρεμπόδιση.

Πρώτον, η πρωτεΐνη που επιδρά στην αντιγραφή του ιού πιθανώς να είναι αυτή που λειτουργεί ως ρυθμιστική πρωτεΐνη σε μία φυσική προσβολή απ' τον ιό. Έτσι, η έκφρασή της στα διαγονιδιακά φυτά πιθανώς να ρυθμίζει σε χαμηλά επίπεδα την αντιγραφή μέσω της αλλοίωσης της ισορροπίας μεταξύ της θετικής και της αρνητικής αλυσίδας της αντιγραφής. Αυτό το μοντέλο μπορεί να αποδοθεί στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας που εμφανίζεται στους ιούς TMV και PEBV από διαγονιδιακά φυτά που εκφράζουν το γόνο της 54K πρωτεΐνης του κάθε ιού.

Δεύτερον, η πρωτεΐνη που επιδρά στην αντιγραφή, είτε μέσω του τρόπου της έκφρασής της σε μια μεταλλαγμένη ή ελλειπή μορφή είτε μέσω της έκφρασής της συνεχώς ή σε ακατάλληλες συγκεντρώσεις στο κύτταρο του φυτού, αναμειγνύεται στην αντιγραφή, συναγωνιζόμενη τη φυσική

μορφή της πρωτεΐνης που παράγεται κατά την αντιγραφή του ιού. Ο συναγωνισμός αυτός αφορά είτε κάποιους παράγοντες ή κάποια συστατικά που επιδρούν πάνω στην αντιγραφή του ιού. Αυτό το δεύτερο μοντέλο και μάλιστα η δεύτερη περίπτωση του συναγωνισμού, φαίνεται πως δικαιολογεί περισσότερο τις περιπτώσεις ανάπτυξης ανθεκτικότητας σε ιούς, λόγω του παρεμποδισμού της αντιγραφής του.

Οπωσδήποτε όμως, είναι απαραίτητο να συνεχιστεί η έρευνα και για άλλους ιούς οι οποίοι εμφανίζουν ανάλογα γονίδια, ώστε να ελεγχθεί η πιθανότητα ανάπτυξης παρόμοιας ανθεκτικότητας. Επίσης, αφού το γονίδιο της 54K πρωτεΐνης του ιού είναι τμήμα της πολυμεράσης του ιού και εφόσον υπάρχουν και άλλες ομάδες ιών με παρόμοιες RNA κατευθυνόμενες - RNA πολυμεράσες, η επεξήγηση του μηχανισμού ανάπτυξης ανθεκτικότητας πιθανώς να αποτελεί τη βάση για την αντιμετώπιση των ιών (Carr J.P. κ.ά, 1993).

4. ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η εργασία που περιγράφεται στο "πειραματικό μέρος" της πτυχιακής μελέτης μου, αποτελεί μέρος του Ερευνητικού Προγράμματος που πραγματοποιείται στο Εργαστήριο Ιολογίας του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου σε συνεργασία με το Scottish Crop Research Institute της Βρετανίας και έχει ως στόχο τη δημιουργία ανθεκτικότητας στον καπνό έναντι του ιού TRV με τη χρήση μεθόδων γενετικής μηχανικής.

Τα στάδια και η μεθοδολογία που χρησιμοποιούνται για να επιτευχθεί ο στόχος του προγράμματος αυτού, αναφέρονται εν συντομία παρακάτω:

Αρχικά, δημιουργήθηκαν τροποποιημένα κύτταρα καπνού της σειράς S53 μετά από ενσωμάτωση του γονιδίου της 59K πολυμεράσης του ιού TRV (ελληνικός ορρότυπος) στο γένωμα των κυττάρων. Ο μετασχηματισμός αυτός πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια μιας αφοπλισμένης (μη ογκογόνου) φυλής του βακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens* στο πλασμίδιο της οποίας είχε τοποθετηθεί ένα αντίγραφο συμπληρωματικού DNA (cDNA) του γονιδίου της 59K πολυμεράσης του TRV μαζί με cDNA ενός γονιδίου επιλογής, που προσδίδει στα τροποποιημένα φυτά ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό Kanamycin.

Ακολούθως, από τα μετασχηματισμένα κύτταρα έγινε αναγέννηση βλαστών υπό συνθήκες "in vitro" οι οποίοι πολλαπλασιάστηκαν αγενώς και έδωσαν τροποποιημένα φυτά καπνού.

Τα φυτά αυτά υποβλήθηκαν στους εξής ελέγχους:

- 1) Έλεγχος του DNA του γενώματος των φυτών για ανίχνευση του γονιδίου της 59K πολυμεράσης του TRV ώστε να επιβεβαιωθεί η ενσωμάτωσή του.

Αυτή η εργασία αποτέλεσε το πειραματικό μέρος της πτυχιακής μου μελέτης.

2) Έλεγχος του ολικού RNA των φυτών για να διαπιστωθεί εάν το ενσωματωμένο γονίδιο εκφράζεται από τα φυτά.

3) Έλεγχος ανθεκτικότητας των τροποποιημένων φυτών έναντι των μηχανικών μολύνσεων με διάφορες φυλές του TRV. Επίσης έλεγχος ανθεκτικότητας με μολύνσεις μέσω του νηματώδη-φορέα του ιού.

4) Έλεγχος διατήρησης της ανθεκτικότητας των φυτών υπό ακραίες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας στην ύπαιθρο.

Τα φυτά που θα επιλεγούν τελικά από τους παραπάνω ελέγχους, θα αυτογονιμοποιηθούν επί δύο γενεές για την παραγωγή ομοζύγωτου σπόρου.

5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5.1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σε γενετικώς τροποποιημένα φυτά καπνού, ποικιλίας Samsun, της σειράς S53, πραγματοποιήθηκε προκαταρκτικός έλεγχος για την ενσωμάτωση σ' αυτά, του γονιδίου της 59K πολυμεράσης του ιού TRV, με το οποίο είχαν τροποποιηθεί. Από τις 74 σειρές καπνού που είχαν τροποποιηθεί γενετικά, 18 δεν είχαν ικανοποιητική ανάπτυξη σε διάλυμα που περιείχε το αντιβιοτικό Kanamycin. Έξι σειρές περιείχαν το επιθυμητό γονίδιο της 59K πολυμεράσης (θετική ένδειξη στην αντίδραση PCR). Από αυτές, οι τρεις σειρές παρουσίασαν ανθεκτικότητα στις μηχανικές μολύνσεις με τις φυλές SYM και GR του TRV ενώ άλλες δύο σειρές ήταν ανθεκτικές μόνον στη φυλή SYM του ιού. Χαρακτηριστικό, όμως, είναι το πολύ υψηλό ποσοστό των τροποποιημένων σειρών οι οποίες για κάποιο λόγο δεν εμφάνιζαν ανθεκτικότητα, αν και ξεπέρασαν την αντίσταση στο αντιβιοτικό Kanamycin.

5.2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Ιολογίας του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου, στα πλαίσια της πρακτικής άσκησης σπουδαστών και αφορά τον έλεγχο φυτών καπνού, ποικιλίας Samsun, σειράς S53 που είχαν τροποποιηθεί γενετικά με το γονίδιο της 59K πολυμεράσης του ιού tobacco rattle virus (TRV) για επιβεβαίωση της ενσωμάτωσης του γονιδίου αυτού σε φυτά καπνού συγκεκριμένων τροποποιημένων σειρών. Αναλυτικά, από αναγεννημένους βλαστούς και μέσω αγενούς πολλαπλασιασμού τους, παρήχθησαν φυτά που

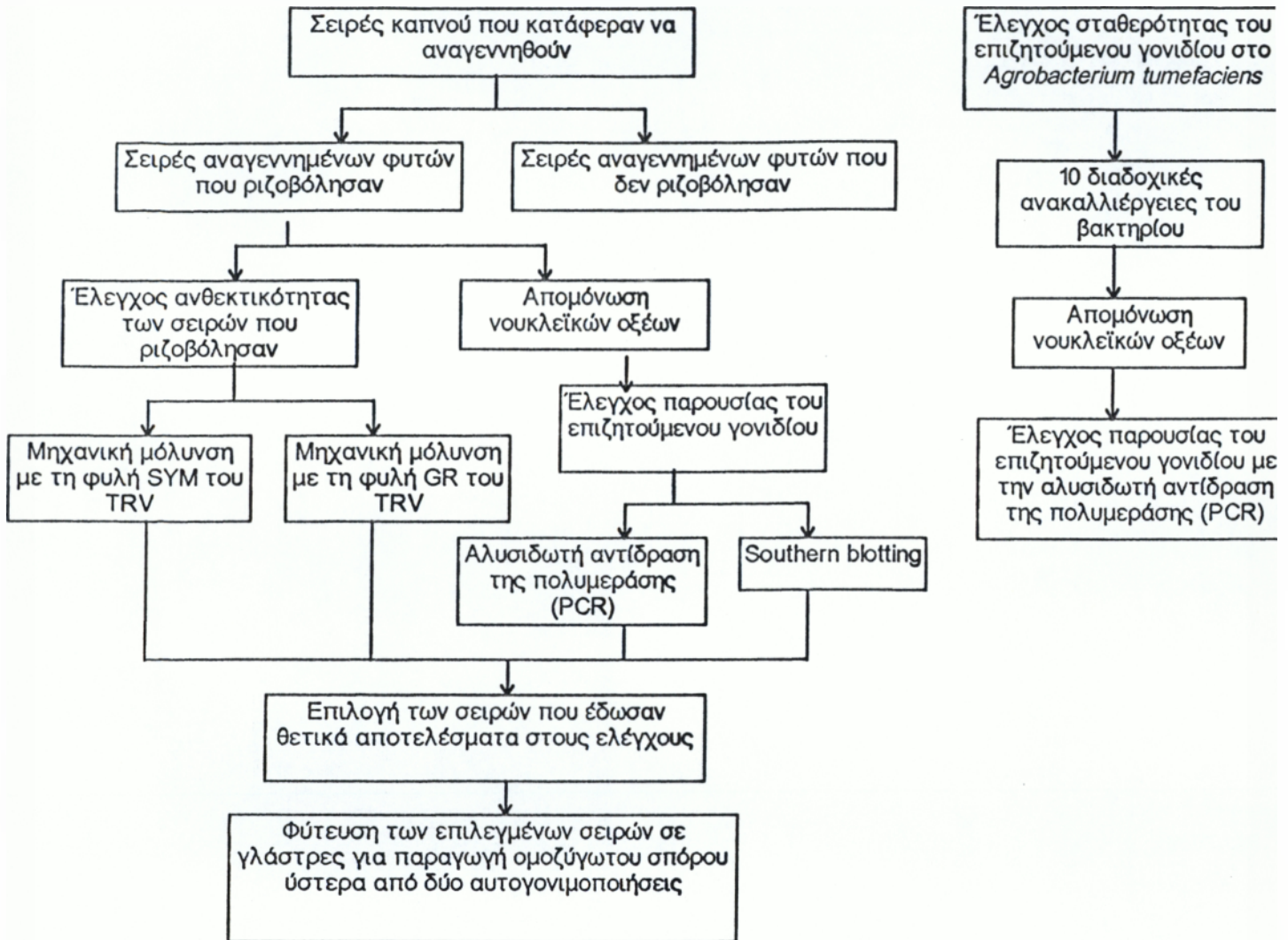
χρησιμοποιήθηκαν για προκαταρκτικούς ελέγχους. Οι έλεγχοι αυτοί αφορούσαν την ενσωμάτωση και την έκφραση ή όχι του μεταφερθέντος γονιδίου από τα τροποποιημένα φυτά καθώς και την παρουσίαση ανθεκτικότητας στη μόλυνση με διάφορες φυλές του TRV. Η παρούσα εργασία αποτελεί τμήμα του έργου που έχει σα στόχο τη δημιουργία ανθεκτικότητας στον καπνό έναντι του ιού TRV, με τη χρήση μεθόδων γενετικής μηχανικής και εντάσσεται στα πλαίσια των κοινών ερευνητικών και τεχνολογικών προγραμμάτων μεταξύ Ελλάδας και Βρετανίας. Ένα σχεδιάγραμμα της διαδικασίας της πειραματικής αυτής εργασίας φαίνεται στο σχήμα 5.1.

Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν από άλλους ερευνητές με γονίδια "ρεπλικασών" έδωσαν αποτελέσματα, που υπόσχονται πολλά για την αντιμετώπιση των φυτικών ιών. Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση της γενετικής τροποποίησης φυτών καπνού (ποικιλίας Χανθι-NN), με τμήμα του γονιδίου της "54K ρεπλικάσης" της φυλής U1 του ιού tobacco mosaic virus (TMV), η οποία έδωσε φυτά, πλήρως ανθεκτικά στη φυλή αυτή του ιού (Golemborski D.B. κ.ά., 1990). Επίσης φυτά του είδους *Nicotiana benthamiana* που τροποποιήθηκαν με κάποιο άλλο γονίδιο της "54K ρεπλικάσης" του ιού pea early browning virus (PEBV), που είναι ανάλογο με το γονίδιο της "54K ρεπλικάσης" του TMV, εμφάνισαν ανθεκτικότητα στην προσβολή από τον ιό αυτό.

Τα τροποποιημένα φυτά *N. benthamiana* με το γονίδιο που κωδικοποιεί την 54K πρωτεΐνη του PEBV, δοκιμάστηκαν ως προς την ανθεκτικότητά τους και σε φυλή του TRV, που ανήκει στην ίδια ιολογική ομάδα με τον PEBV, χωρίς όμως επιτυχία (MacFarlane S.A. κ.ά., 1992).

Σχήμα 5.1.

Σχεδιάγραμμα της πορείας των εργασιών της πειραματικής εργασίας



Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα, ανεξαρτήτως του γεγονότος ότι δεν έχει αποκαλυφθεί ο ακριβής μηχανισμός της λειτουργίας των γονιδίων αυτών στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας, είναι άκρως ενθαρρυντικά και σαφώς καλύτερα από αυτά της ανθεκτικότητας που αποδίδεται στην καψιδιακή πρωτεΐνη. Παρακάτω λοιπόν, περιγράφεται η διαδικασία ελέγχου των φυτών καπνού της ποικιλίας Samsun στα οποία έχει εισαχθεί το γονίδιο της 59K πολυμεράσης του ιού TRV το οποίο είναι ανάλογο προς

αυτό του ΡΕΒV, για τη δημιουργία ανθεκτικότητας σε φυτά καπνού στις διάφορες φυλές του ιού TRV.

5.3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Πολλαπλασιασμός των διαγονιδιακών φυτών

Ύστερα από την αναγέννηση βλαστών από τα μετασχηματισμένα κύτταρα, ξεκίνησε ο πολλαπλασιασμός τους ώστε να υπάρχει επαρκές υλικό για να ελεγχθούν εάν συνέβη πραγματικά ο μετασχηματισμός των κυττάρων και αν τα μετασχηματισμένα φυτά ήταν ανθεκτικά στον TRV.

Τα φυτά του καπνού πολλαπλασιάστηκαν με τη διαδικασία του μικροπολλαπλασιασμού. Ως έκφυτα χρησιμοποιήθηκαν γόνατα των αναγεννημένων βλαστών καπνού τα οποία τοποθετήθηκαν σε γυάλες με διάλυμα ριζοβολίας BGS (Πίνακας 5.1.).

Στο διάλυμα ριζοβολίας BGS είχαν προστεθεί 40 mg/ml του αντιβιοτικού Kanamycin και 250 mg/ml του αντιβιοτικού Cefotaxime.

Πίνακας 5.1.
Διάλυμα ριζοβολίας BGS

Στο βασικό διάλυμα MS 30 προστίθενται:

- 0,00875 mgr/ml IAA
- 0.03 mgr/ml Kinetin
- 0.001 mgr/ml Folic acid

Βασικό διάλυμα MS 30

Απεσταγμένο νερό 1000 ml
Σκόνη διαλύματος αλάτων και βιταμινών για 1 lt διαλύματος
Σακχαρόζη 30 gr.
pH στο 5,8 με NaOH
Difco Bacto Agar 0,7%

Το διάλυμα MS 30 αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο και ψύχεται στους 55°C πριν την προσθήκη ορμονών ή άλλων συμπληρωμάτων.

Η Kanamycin χρησιμοποιήθηκε ως μια ουσία για την επιλογή των μετασχηματισμένων φυτών, αφού μαζί με το γονίδιο της πολυμεράσης, στην αφοπλισμένη φυλή του *Agrobacterium tumefaciens* που χρησιμοποιήθηκε για την τροποποίηση των κυττάρων του καπνού, τοποθετήθηκε και ένα γονίδιο που προσέδιδε ανθεκτικότητα στην Kanamycin. Συνεπώς, ήταν επόμενο τα φυτά που επιβίωναν στο διάλυμα ριζοβολίας που περιείχε το αντιβιοτικό, να ήταν αυτά στα οποία είχε συμβεί επιτυχώς η τροποποίηση. Η Kanamycin, συνεχίστηκε να προστίθεται στο διάλυμα ριζοβολίας των φυτών καπνού, μέχρι το χρονικό εκείνο σημείο όπου τα φυτά που είχαν επιλεγεί, κατάφερναν να ξεπερνούν την αντίσταση του αντιβιοτικού αυτού. Από την άλλη πλευρά, το αντιβιοτικό Cefotaxime, χρησιμοποιήθηκε στο διάλυμα ριζοβολίας, με σκοπό να παρεμποδίσει την εξάπλωση του *A. tumefaciens* με το οποίο πραγματοποιήθηκε η τροποποίηση των κυττάρων του καπνού. Με τον τρόπο αυτό αποφεύγονται κατά την εφαρμογή των διαφόρων μεθόδων ανίχνευσης του επιζητούμενου γονιδίου, οι εσφαλμένες τυχόν θετικές αντιδράσεις οι οποίες οφείλονται στην παρουσία του τροποποιημένου βακτηρίου και όχι στο ενσωματωμένο στο γένωμα του φυτού, γονίδιο.

Οι γυάλες οι οποίες ήταν αποστειρωμένες στους 121°C όπως και τα λοιπά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό των φυτών του καπνού, καλύπτονταν με ειδικά ζελατινάκια με φίλτρο ώστε να γίνεται η ανταλλαγή των αερίων, χωρίς προβλήματα μόλυνσης των φυτών. Οι γυάλες με τα φυτά, που διατηρούνταν ώστε να υπάρχει επάρκεια φυτικού υλικού για την πραγματοποίηση όλων των απαραίτητων ελέγχων, ήταν τοποθετημένες σε ειδικό θάλαμο όπου η θερμοκρασία, διατηρείτο στους 21°C και υπήρχε φωτοπερίοδος 16h. Επίσης όλα τα φυτά, τα οποία είχαν

δημιουργηθεί από ένα αρχικό κύτταρο το καθένα, είχαν και από ένα χαρακτηριστικό κωδικό αριθμό, που τα συνόδευε καθ' όλη τη διάρκεια του ελέγχου και αποτελείτο από ένα γράμμα που αντιστοιχούσε στην κάθε προσπάθεια για την τροποποίηση των φυλλικών δίσκων καπνού (ένα εκ των A, B, C, D), από τον κλώνο του βακτηρίου που χρησιμοποιήθηκε για την τροποποίηση (ένας εκ των $\neq 3$, $\neq 7$, $\neq 17$) και από έναν αύξοντα αριθμό που χαρακτήριζε τα φυτά που κατάφεραν να αναγεννηθούν. Όσα από τα φυτά δεν χρησιμοποιήθηκαν για το μικροπολλαπλασιασμό των φυτών καπνού, μεταφυτεύθηκαν σε γλαστράκια με χώμα, στο χώρο του θερμοκηπίου, αφού διατηρούνταν για μερικές ημέρες σε ειδικό θάλαμο (25°C, 16h φωτοπερίοδος) ώστε να ξεπεράσουν το "σοκ" της μεταφύτευσης. Αυτά τα φυτά χρησιμοποιούνταν για τον έλεγχο ανθεκτικότητας.

Απομονώσεις νουκλεϊκών οξέων

Η απομόνωση νουκλεϊκών οξέων απετέλεσε σημαντικό κομμάτι του ελέγχου των φυτών αφού σ' αυτήν στηρίχτηκαν όλες οι μέθοδοι για την ανίχνευση του επιζητούμενου γονιδίου, που εφαρμόστηκαν. Απομόνωση τόσο DNA όσο και RNA πραγματοποιήθηκε από φύλλα τα οποία πάρθηκαν από φυτά καπνού κατά το στάδιο του μικροπολλαπλασιασμού τους και από φυτά καπνού που είχαν τοποθετηθεί στο χώρο του θερμοκηπίου, παίρνοντας όμως τα κοντινότερα προς την κορυφή φύλλα, τα οποία περιέχουν μεγαλύτερη ποσότητα νουκλεϊκών οξέων.

Η απομόνωση DNA πραγματοποιήθηκε από φύλλα υγιών και μολυσμένων με τον ιό TRV φυτών καπνού. Αναλυτικά η μέθοδος που εφαρμόστηκε περιγράφεται παρακάτω και ολοκληρώνεται σε δύο ημέρες.

Αρχικά ομογενοποιήθηκαν 700mgφ φύλλου καπνού σε 1ml διαλύματος απομόνωσης DNA (DNA extraction buffer). Ο χυμός τοποθετήθηκε σε πλαστικό σωλήνα που περιείχε 1ml φαινόλης και ανακατεύτηκε καλά. Εν συνεχεία αφέθηκε για 10 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 56°C, με περιστασιακή ανάδευση. Το παρασκεύασμα φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά (min) στις 6.000 στροφές ανά λεπτό (rpm) και συλλέχθηκε η επάνω φάση του περιεχομένου του σωλήνα (υδατική φάση). Ακολούθησαν 2 πλύσεις της φάσης αυτής, μία με ίσο όγκο μείγματος φαινόλης : χλωροφόρμιου (1:1) και μία με ίσο όγκο μείγματος χλωροφορμίου : ισοαμυλαλκοόλης (24:1), ακολουθούμενες από φυγοκεντρήσεις των 10min στις 6.000 rpm, παίρνοντας την πάνω φάση του περιεχομένου του σωλήνα κάθε φορά. Τα νουκλεϊκά οξέα που υπάρχουν στην πάνω φάση κατακρημνίστηκαν με την προσθήκη 0,1 όγκου οξικού νατρίου 3M (Sodium acetate 3M) pH 5.5 και 2 όγκων απολύτου αιθανόλης αφού αφέθηκαν στους -20°C για όλη τη νύχτα. Ακολούθησε φυγοκέντρωση για 15min στις 6000rpm ώστε να καταβυθιστούν τα νουκλεϊκά οξέα. Το ίζημα αναδιαλύθηκε σε 100μl, διάλυμα RN-άσης (20μg/ml Rnase σε TE buffer) και τοποθετήθηκε για 1h στο υδατόλουτρο στους 37°C αναδεύοντας περιστασιακά, ώστε να καταστραφεί το υπάρχον RNA. Το DNA που παρέμεινε κατακρημνίστηκε με 0,1 όγκο 3M Sodium acetate και 2 όγκους απολύτου αιθανόλης ενώ ψύχθηκε για 30min στους -70°C. Επακολούθησε φυγοκέντρωση για 8min στις 10.000 rpm, αναδιάλυση του ιζήματος σε 100μl TE buffer, κατακρήμνιση του DNA με 20μl 3M Sodium acetate και 250μl απόλυτης αιθανόλης, ψύξη του για 30min στους -70°C και φυγοκέντρωση 8 λεπτών στις 10.000rpm. Το ίζημα που περιείχε πλέον καθαρό DNA αναδιαλύθηκε σε 100μl TE buffer, αφού πρώτα είχε στεγνώσει, για 10min σε αντλία κενού, ώστε να απομακρυνθούν πλήρως τα υπολείματα αιθανόλης. Τελικά έγινε μέτρηση της περιεκτικότητας του διαλύματος σε DNA στο

φασματοφωτόμετρο, κατακρήμνιση του DNA με 0,1 όγκους Sodium acetate και 2 όγκους απόλυτης αιθανόλης και κατάψυξή του στους -30°C μέχρι της χρησιμοποιήσεώς του.

Η απομόνωση RNA, πραγματοποιήθηκε μόνο από φύλλα υγιών φυτών ώστε να μην υπάρχει RNA του ιού αναμειγμένο με το φυτικό RNA. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η ακόλουθη και ολοκληρώθηκε σε 2 ημέρες. Αρχικά, ομογενοποιήθηκαν 700mgf φυτικού υλικού (φύλλου) με 1ml διαλύματος απομόνωσης RNA (RNA extraction buffer) και ο χυμός τοποθετήθηκε σε σωλήνα πλαστικό, που περιείχε 1ml φαινόλης. Το περιεχόμενο του σωλήνα ανακατεύθηκε και επώασθηκε στο υδατόλουτρο στους 80°C για 5min. Προστέθηκε 1ml μείγματος χλωροφορμίου: ισοαμυλαλκοόλης (24:1) αφού πρώτα αφέθηκε να κατέβει η θερμοκρασία κάτω από τους 55°C . Ανακατεύθηκε και φυγοκεντρήθηκε στις 5.000rpm για 7min. Πάρθηκε η επάνω φάση (υδατική φάση), προστέθηκε 1 όγκος 4M LiCl, ανακατεύθηκε καλά και αφέθηκε στο ψυγείο ($+4^{\circ}\text{C}$) για μια νύχτα. Φυγοκεντρήθηκε στις 5.000rpm για 7min, ώστε να παραληφθεί ίζημα. Όλη η διαδικασία από εδώ και ύστερα πραγματοποιήθηκε σε πάγο, λόγω της μεγάλης ευαισθησίας του RNA. Το ίζημα αναδιαλύθηκε σε 250μl TE buffer και κατακρημνίστηκε με την προσθήκη 0,1 όγκου Sodium acetate 3M και 2 όγκων απόλυτης αιθανόλης. Ακολούθησε ψύξη για 30min στους -70°C και κατόπιν φυγοκέντρωση για 5min στις 10.000rpm. Το ίζημα ξεπλύθηκε με 400μl 70% αιθανόλης και ανακατεύτηκε. Επαναλήφθηκε φυγοκέντρωση στις 10.000rpm για 2 όμως λεπτά. Ύστερα, το ίζημα που περιείχε καθαρό πλέον RNA στέγνωσε για 10 περίπου λεπτά, χωρίς να ξεραθεί τελείως ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα αιθανόλης και αναδιαλύθηκε σε 100μl TE Buffer. Μετρήθηκε το RNA στο φασματοφωτόμετρο, κατακρημνίστηκε με 0,1

όγκους 3M Sodium acetate και με 2 όγκους απόλυτης αιθανόλης και τελικώς καταψύχθηκε στους -30°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

Εκτός από την απομόνωση φυτικού DNA πραγματοποιήθηκαν και εξαγωγές πλασμιδιακού DNA από τροποποιημένα βακτήρια *Escherichia coli* και *Agrobacterium tumefaciens*.

Η μέθοδος που εφαρμόστηκε για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από το βακτήριο *E. coli* περιγράφεται ακολούθως. Φυγοκεντρήθηκαν 2ml καλλιέργειας του βακτηρίου για 5min στις 10.000rpm. Το ίζημα που δημιουργήθηκε και περιείχε τα βακτηριακά κύτταρα, αναδιαλύθηκε σε 100μl μείγματος 50mM γλυκόζης + 10mM EDTA + 25mM Tris/HCl pH 8. Προστέθηκαν επίσης 200μl 0,2N NaOH που περιείχε 1% SDS, αναμειγνύοντας προσεκτικά. Ακόμη προστέθηκαν 200μl χλωροφορμίου χωρίς ανάμειξη. Αφού πέρασε 1 λεπτό προστέθηκαν 150μl οξικού καλίου, pH4.8 (60ml Potassium acetate 5M + 11,5ml παγωμένου οξικού οξέος + 28,5ml νερού) και αναμείχθηκαν καλώς. Φυγοκεντρήθηκαν για 3min στις 10.000rpm. Πάρθηκε η πάνω φάση και προστέθηκαν 900μl απολύτου αιθανόλης. Ακολούθησε φυγοκέντρηση 8 λεπτών στις 10.000 rpm, πλύση του ιζήματος με 500μl 70% αιθανόλης, νέα φυγοκέντρηση 8 λεπτών στις 10.000rpm και τέλος αναδιάλυση του ιζήματος σε 50μl διάλυμα RNάσης (1μl/ml RNase σε TE buffer) για την απομάκρυνση του RNA. Το παρασκεύασμα αυτό του DNA του *E. coli* χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας στις αντιδράσεις PCR και Southern blotting.

Απομόνωση DNA πραγματοποιήθηκε και από το βακτήριο *A. tumefaciens* και από τους τρεις κλώνους (#3, #7, #17) που χρησιμοποιήθηκαν για την τροποποίηση των φυτών καπνού. Πραγματοποιήθηκαν επίσης και 10 υποκαλλιέργειες των τριών κλώνων των βακτηρίων ώστε να διαπιστωθεί η

σταθερότητα του γονιδίου στις συνεχείς υποκαλλιέργειες του βακτηρίου. Ελέγχθηκαν, για το λόγο αυτό οι πρώτες καλλιέργειες από κάθε κλώνο και οι τελευταίες υποκαλλιέργειες τους. Για τον κλώνο (#7) χρησιμοποιήθηκε η 9η υποκαλλιέργεια αφού η 10η δεν πολλαπλασιάστηκε. Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκαν 70μl από κάθε καλλιέργεια τα οποία φυγοκεντρήθηκαν στις 6.000rpm για 6min. Το ίζημα (βακτηριακά κύτταρα) αναδιαλύθηκε σε 100μl H₂O millipore- αποστειρωμένο και το παρασκεύασμα τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 100°C για 5min. Ακολούθησε νέα φυγοκέντρηση στις 6.000rpm για 6min και το υπερκείμενο υγρό που περιείχε το πλασμιδιακό DNA, χρησιμοποιήθηκε για αντίδραση PCR.

Μέθοδοι ανίχνευσης του επιζητούμενου γονιδίου

α. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η αντίδραση αυτή απετέλεσε το βασικό εργαλείο για την ανίχνευση του επιζητούμενου γονιδίου. Τα φυτά που επιλέχθηκαν ήταν φυσικά εκείνα τα οποία κατάφεραν να ξεπερνούν την δράση του αντιβιοτικού Kanamycin. Σε όλες τις περιπτώσεις η αντίδραση της PCR έγινε σε όγκο 50μl, ενώ το PCR μείγμα περιείχε: PCR buffer 10X, 25mM MgCl₂, 2mM dNTP's, 1mg/ml από τον κάθε ένα από τους δύο εκκινητές (primers) και 2,5U Taq polymerase. Ανάλογα με την ποσότητα του κάθε δείγματος που θα προστίθετο στην αντίδραση, ρυθμιζόταν και η ποσότητα του νερού (αποστειρωμένο - millipore) που θα έπρεπε να προστεθεί για να συμπληρώσει τον όγκο 50 μl για την αντίδραση. Η συγκέντρωση του DNA που χρησιμοποιήτο, κάθε φορά, ανά αντίδραση PCR ήταν 8μg. Αφού γινόταν η ανάμειξη της ποσότητας του μείγματος και της ποσότητας του δείγματος, ακολουθούσε τοποθέτησή του στον

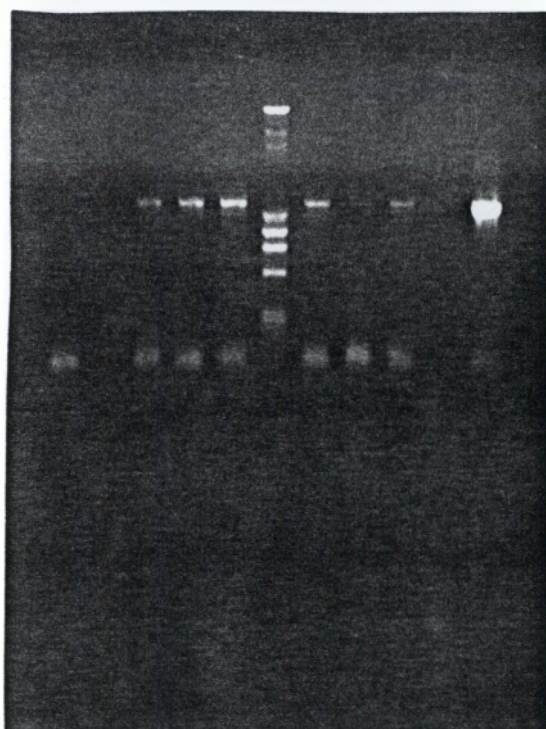
θερμικό ανακυκλωτή που πολλαπλασιάζει το επιζητούμενο γονίδιο σε πολλά αντίγραφα και επιλεγόταν το κατάλληλο θερμικό πρόγραμμα για τον TRV. Το πρόγραμμα πραγματοποιούσε διαχωρισμό των αλυσίδων DNA στους 95°C για 1min ενώ έπονταν 5 κύκλοι αποτελούμενοι από 1min στους 94°C και 30sec στους 55°C. Ακολουθούσαν 25 κύκλοι αποτελούμενοι ο καθένας από 30sec στους 94°C, 30sec στους 55°C και 30sec στους 72°C. Τέλος, ακολουθούσε πεντάλεπτη παραμονή στους 72°C και φύλαξη των δειγμάτων στους 4°C μέχρι τη χρησιμοποίησή τους. Στους 94°C γινόταν ο διαχωρισμός των αλυσίδων DNA και ευθυγράμμιση αυτών (denaturation και linearization), στους 55°C ο υβριδισμός των εκκινητών στα σημεία του DNA όπου υπήρχε το ενσωματωμένο γονίδιο του TRV και στους 72°C η σύνθεση των νέων αλυσίδων. Η διαδικασία της PCR, πάντοτε πραγματοποιείτο σε πάγο, λόγω της ευαισθησίας των αντιδραστηρίων και των δειγμάτων.

Αφού τελείωνε η αντίδραση της PCR ακολουθούσε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων στα 180V και 70mA. Χρησιμοποιούνταν 1% gel αγαρόζης σε Tris-borate-EDTA (TBE) 1x buffer, το οποίο περιείχε 10μg/ml ethidium bromide. Το χρονικό διάστημα της ηλεκτροφόρησης ήταν 2h εκ των οποίων η πρώτη ώρα γινόταν χωρίς τα δείγματα, τα οποία προστίθενταν τη δεύτερη ώρα της ηλεκτροφόρησης (εικόνα 5.1).

β. Southern blotting

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για να διασταυρώσει τα αποτελέσματα κάποιων δειγμάτων της PCR που είχαν ενδιαφέρον.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η ακόλουθη και ολοκληρώθηκε σε 4 ημέρες. Η ηλεκτροφόρηση του ολικού γενωμικού DNA του τροποποιημένου φυτού πραγματοποιήθηκε στα 16V και 7mA για όλη τη νύχτα ενώ το gel ήταν 1% αγαρόζης σε TBE buffer και περιείχε 10μg/ml ethidium bromide.



Εικόνα 5.1. Gel ηλεκτροφόρησης, δειγμάτων για 2h στα 180V και 70mA. Τα δείγματα προστέθηκαν τη δεύτερη ώρα. Η σειρά τοποθέτησης των δειγμάτων στο gel ήταν: αρνητικός μάρτυρας, κενό, δείγματα 1,2,3, δείκτης(marker), δείγματα 4,5,6, κενό, θετικός μάρτυρας. Και τα 6 δείγματα έδωσαν θετική ένδειξη.

Της ηλεκτροφόρησης είχε προηγηθεί ολονύχτια πέψη του DNA με το περιοριστικό ένζυμο Hind III στους 37°C, για να κοπεί σε μικρότερες αλυσίδες το πολύ μακρύ γενωμικό DNA του φυτού, κατακρήμνιση με 0,1 όγκους Sodium acetate 3M και 2 όγκους απόλυτης αιθανόλης, φυγοκέντριση στις 6.000rpm για 6min, αναδιάλυση σε 15ml H₂O millipore-αποστειρωμένο και 5ml loading buffer. Αφού τελείωσε η ηλεκτροφόρηση το gel τοποθετήθηκε για 20min σε depurinating solution (HCl πυκνό 2,5ml + απεσταγμένο H₂O 97,5ml) ενώ ακολούθησαν 2 πλύσεις με απεσταγμένο νερό, υπό συνεχή ανάδευση.

Ακολούθησαν δύο πλύσεις του gel με denaturing solution (0,5M NaOH και 1,5M NaCl) η μία και neutralising solution (1,5M NaCl, 0,5M Tris, 0,001M

EDTA, pH 7,2) η άλλη, 20 λεπτών εκάστη. Το gel τοποθετήθηκε κάτω από νάilon μεμβράνη, ισομεγέθη του gel, ενώ πάνω από την μεμβράνη τοποθετήθηκαν 6 διηθητικά χαρτιά και μία δεσμίδα πάχους 2cm χασαπόχαρτο, ίδιων διαστάσεων με την μεμβράνη. Το gel ήταν τοποθετημένο πάνω σε κομμάτι plexiglass, τυλιγμένο με μεμβράνη περιτυλίγματος ενώ η νάilon μεμβράνη αφού διαβρέχθηκε καλά με απεσταγμένο H₂O, τοποθετήθηκε σε διάλυμα SSC 2X καθ' όλη τη διάρκεια των πλυσιμάτων του gel. Το σύστημα gel-μεμβράνη-χαρτιά πατήθηκε με βάρος περίπου μισού κιλού και αφέθηκε όλη τη νύχτα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για να μεταφερθούν οι ζώνες του DNA από το gel στη μεμβράνη. Αφού στέγνωσε η μεμβράνη μέσα σε δύο διηθητικά χαρτιά, ξεκίνησε η διαδικασία της υβριδοποίησης και της ανοσολογικής ανίχνευσης του επιζητούμενου γονιδίου πάνω στη μεμβράνη, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Boehringer Mannheim Biochemica (Boehringer Mannheim Biochemica, Τεχνικό φυλλάδιο). Το "crosslinking" (διαδικασία για την καλύτερη σύζευξη του DNA στη νάilon μεμβράνη) πραγματοποιήθηκε με έκθεση της μεμβράνης στο υπεριώδες φως (U.V.) για 3min, από την πλευρά της μεμβράνης που βρισκόταν το DNA. Η προϋβριδοποίηση, πραγματοποιήθηκε στο φούρνο υβριδοποίησης, με 20ml hybridization buffer στους 68°C για 2h. Η υβριδοποίηση πραγματοποιήθηκε στο φούρνο υβριδοποίησης, στους 68°C για όλη τη νύχτα, με hybridization buffer που περιείχε τον μοριακό ανιχνευτή (probe - συμπληρωματική, προς το επιζητούμενο γονίδιο, αλληλουχία DNA), συνολικού όγκου 20 ml. Για το πλύσιμο της μεμβράνης έγιναν 2 πεντάλεπτες πλύσεις με 100ml wash solution I (2x SSC+SDS 0,1%) σε θερμοκρασία δωματίου και 2 δεκαπεντάλεπτες πλύσεις με 100ml wash solution II (0,1 xSSC+0,1% SDS)

στους 68°C. Μετά τα πλύσιμα η μεμβράνη τοποθετήθηκε και διατηρήθηκε σε διηθητικά χαρτιά. Η ανοσολογική ανίχνευση ξεκίνησε με ένα μονόλεπτο πλύσιμο με buffer-1 και ακολούθως με επώαση σε 100ml buffer-2, για 30min. Η πραγματοποίηση της σύζευξης του αντισώματος στη συμπληρωματική αλληλουχία DNA, που αφορούσε τον επιζητούμενο γονίδιο, επιτεύχθηκε με την τοποθέτηση της μεμβράνης σε 20ml antibody-AP-conjugate solution για 45min. Ακολούθησαν 2 δεκαπεντάλεπτες πλύσεις με 100ml buffer-1 η κάθε μια και μια δίλεπτη τοποθέτηση της μεμβράνης σε buffer-3. Η χρώση των ζωνών στη μεμβράνη επιτεύχθηκε με την τοποθέτησή της σε 10 ml colour substrate solution για 24h και σε σκοτάδι. Καθ' όλη τη διάρκεια της ανοσολογικής ανίχνευσης του DNA εκτός της περίπτωσης της χρώσης, το δοχείο που γίνονταν οι χειρισμοί της μεμβράνης, βρισκόταν υπό συνεχή ανάδευση.

Μηχανικές μολύνσεις φυτών καπνού

Οι μηχανικές μολύνσεις φυτών καπνού απετέλεσαν βασική μέθοδο για την ανίχνευση της εμφάνισης ανθεκτικότητας στα φυτά καπνού στα οποία είχε γίνει γενετική τροποποίηση. Η διαδικασία αυτή αφορούσε τροποποιημένα φυτά καπνού που προέρχονταν από μικροπολλαπλασιασμό, ενώ σε μερικές περιπτώσεις πραγματοποιήθηκαν και επαναμολύνσεις αρχικώς μολυσμένων μηχανικά φυτών. Σε κάθε μηχανική μόλυνση τροποποιημένων φυτών πραγματοποιήθηκε και μηχανική μόλυνση υγιών μη τροποποιημένων φυτών καπνού ποικιλίας S53, τα οποία χρησιμοποιούνταν ως μάρτυρες. Τα φυτά καπνού που χρησιμοποιήθηκαν για τις μηχανικές μολύνσεις με τον ιό TRV, είχαν μεταφυτευτεί σε γλαστράκια με τύρφη και βρισκόνταν στο χώρο του θερμοκηπίου αφού πρώτα είχαν εγκλιματιστεί για

μερικές ημέρες, στους 25°C με φωτοπερίοδο 16h. Οι μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν σε 3-6 φύλλα τα οποία είχαν επιπαστεί με *carborundum* (σκόνη που προκαλεί πληγές στο φύλλο αν τριφτεί). Για την παρασκευή του μολύσματος χρησιμοποιήθηκαν γύρω στα 500mg φύλλων τα οποία ομογενοποιούνταν με 10ml H₂O. Το ομογενοποιημένο παρασκεύασμα απλώθηκε προσεκτικά με το χέρι ώστε να μην προκληθούν σοβαρές μηχανικές ζημιές στο φύλλο. Ως πηγή του μολύσματος χρησιμοποιούνταν φύλλα που εμφάνιζαν τυπικά συμπτώματα προσβολής από τον ιό, ενώ οι μηχανικές μολύνσεις γίνονταν σε φύλλα που δεν ήταν κορυφαία ώστε να διαπιστωνόταν περίπτωση διασυστηματικής προσβολής, με την πάροδο του χρόνου. Μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν με 2 φυλές του ιού TRV, τη φυλή SYM η οποία απετέλεσε και τη φυλή του ιού, της οποίας το γονίδιο χρησιμοποιήθηκε για την τροποποίηση και τη φυλή GR του ιού η οποία είναι η φυλή που συναντάται στην Ελλάδα.

5.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ένα συνοπτικό σχεδιάγραμμα των αποτελεσμάτων της πειραματικής εργασίας φαίνεται στο σχήμα 5.2.

Μικροπολλαπλασιασμός των φυτών καπνού

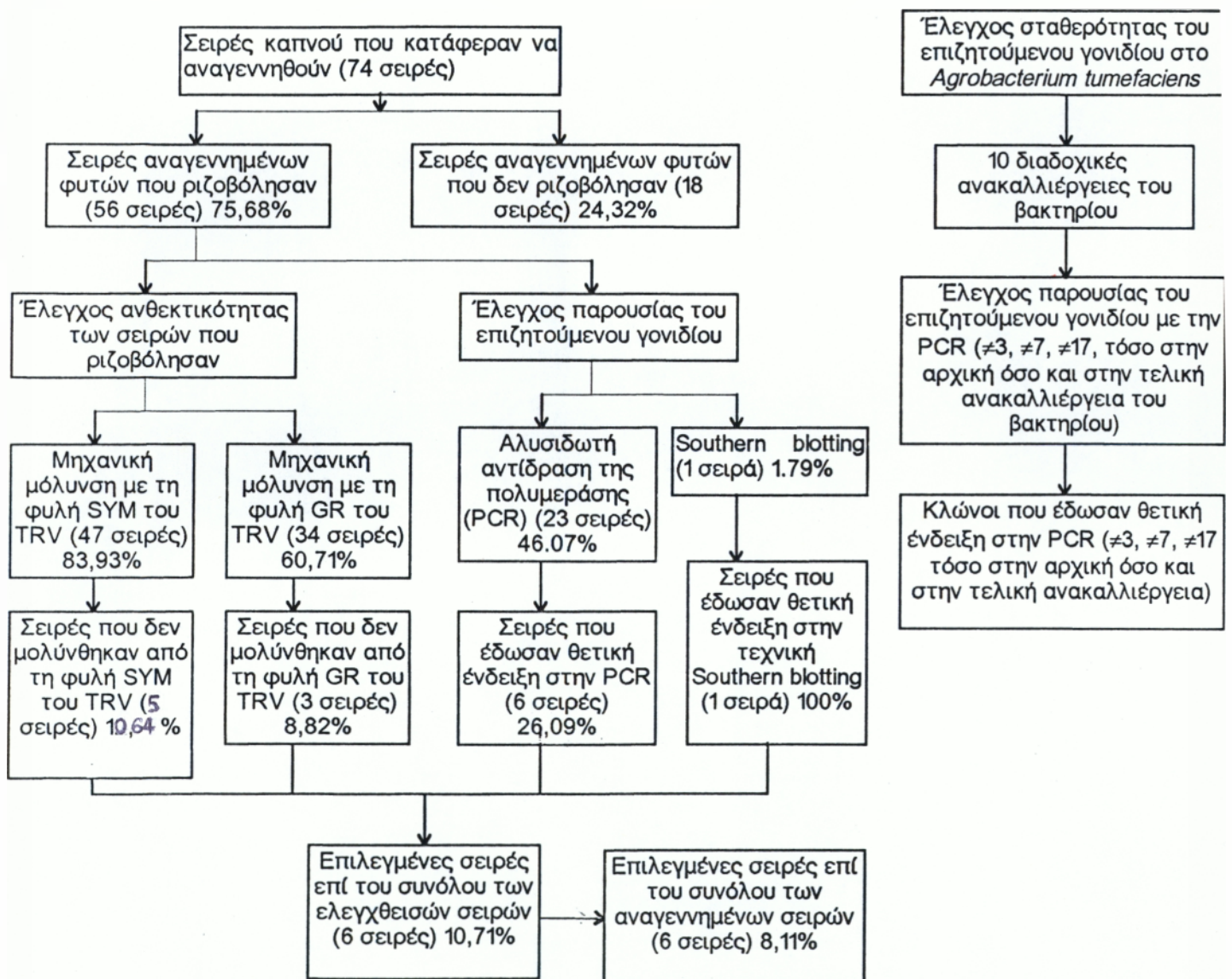
Για τον έλεγχο, και τη διαπίστωση της ενσωμάτωσης στο γένωμα του φυτού του γονιδίου της 59K πολυμεράσης του ιού TRV, πολλαπλασιάστηκαν "in vitro" τα ακόλουθα φυτά καπνού.

A#17/2, B#17/3, A#3/10, B#7/11, B#3/13, A#3/17, B#3/18, B#7/21, B#7/24, B#3/26, B#3/27, B#3/28, B#3/29, B#17/33, A#17/35, A#7/37, A#3/38, B#3/41,

B≠7/43, B≠3/48, B≠3/49, B≠7/50, B≠7/51, B≠7/52 C≠7/53, B≠17/54, B≠17/55,
A≠7/58, C≠7/60, C≠7/61, B≠7/62, B≠7/63, C≠7/64, C≠7/65, C≠7/66, D≠17/67,
B≠7/68, C≠7/69, B≠17/70, D≠3/71, C≠3/75, C≠3/76, C≠3/77, C≠3/78, B≠7/79,
B≠17/80, C≠3/81, B≠7/82, D≠3/83, B≠17/84, D≠7/86, D≠7/87, D≠17/88,
D≠7/89, και ως αρνητικός μάρτυρας το φυτό Original S53.

Σχήμα 5.2.

Σχεδιάγραμμα των αποτελεσμάτων της πειραματικής εργασίας



Πετάχθηκαν, οι ακόλουθες σειρές καπνού, οι οποίες δεν κατάφεραν να ριζοβολήσουν σε διάλυμα που περιείχε το αντιβιοτικό Kanamycin (εικόνα 5.2.) και στις οποίες συνεπώς δεν είχε επιτευχθεί η γενετική τροποποίηση με το γονίδιο του ιού. A≠7/1, A≠17/4, A≠17/6, A≠3/7, A≠3/8, B≠7/23, B≠17/30, B≠17/31, B≠17/32, B≠17,34, A≠7/36, B≠3/39, B≠3/40, B≠7/44, A≠7/45, A≠7/46, A≠7/47, B≠17/85.

Τα αποτελέσματα της ριζοβολίας των γενικώς τροποποιημένων φυτών καπνού που κατάφεραν να αναγεννηθούν φαίνονται στον πίνακα 5.2.

Πίνακας 5.2.

Αποτελέσματα της ριζοβολίας των γενετικώς τροποποιημένων φυτών καπνού, που κατάφεραν να αναγεννηθούν.

Προσπάθεια τροποποίησης φυλλικών δίσκων καπνού	Κλώνος βακτηρίου	Σειρά αναγεννημένων φυτών	Συνολικός κωδικός αναγεννημένων φυτών	Αποτέλεσμα ριζοβολίας
A	≠7	1	A ≠ 7/1	-
A	≠17	2	A ≠ 17/2	+
B	≠17	3	B ≠ 17/3	+
A	≠17	4	A ≠ 17/4	-
A	≠17	6	A ≠ 17/6	-
A	≠3	7	A ≠ 3/7	-
A	≠3	8	A ≠ 3/8	-
A	≠3	10	A ≠ 3/10	+
B	≠7	11	B ≠ 7/11	+
B	≠3	13	B ≠ 3/13	+
A	≠3	17	A ≠ 3/17	+
B	≠3	18	B ≠ 3/18	+

Προσπάθεια τροποποίησης φυλλικών δίσκων καπνού	Κλώνος βακτηρίου	Σειρά αναγενημέ- νων φυτών	Συνολικός κωδικός αναγενημέ- νων φυτών	Αποτέλεσμα ριζοβολίας
B	≠7	21	B ≠ 7/21	+
B	≠7	23	B ≠ 7/23	-
B	≠7	24	B ≠ 7/24	+
B	≠3	26	B ≠ 3/26	+
B	≠3	27	B ≠ 3/27	+
B	≠3	28	B ≠ 3/28	+
B	≠3	29	B ≠ 3/29	+
B	≠17	30	B ≠ 17/30	-
B	≠17	31	B ≠ 17/31	-
B	≠17	32	B ≠ 17/32	-
B	≠17	33	B ≠ 17/33	+
B	≠17	34	B ≠ 17/34	-
A	≠17	35	A ≠ 17/35	+
A	≠7	36	A ≠ 7/36	-
A	≠7	37	A ≠ 7/37	+
A	≠3	38	A ≠ 3/38	+
B	3	39	B ≠ 3/39	-
B	3	40	B ≠ 3/40	-
B	≠3	41	B ≠ 3/41	+
B	≠7	43	B ≠ 7/43	+
B	≠7	44	B ≠ 7/44	-
A	≠7	45	A ≠ 7/45	-
A	≠7	46	A ≠ 7/46	-
A	≠7	47	A ≠ 7/47	-

Προσπάθεια τροποποίησης φυλλικών δίσκων καπνού	Κλώνος βακτηρίου	Σειρά αναγεννημέ- νων φυτών	Συνολικός κωδικός αναγεννημέ- νων φυτών	Αποτέλεσμα ριζοβολίας
B	≠3	48	B ≠ 3/48	+
B	≠3	49	B ≠ 3/49	+
B	≠7	50	B ≠ 7/50	+
B	≠7	51	B ≠ 7/51	+
B	≠7	52	B ≠ 7/52	+
C	≠7	53	C ≠ 7/53	+
B	≠17	54	B ≠ 17/54	+
B	≠17	55	B ≠ 17/55	+
A	≠7	58	A ≠ 7/58	+
C	≠7	60	C ≠ 7/60	+
C	≠7	61	C ≠ 7/61	+
B	≠7	62	B ≠ 7/62	+
B	≠7	63	B ≠ 7/63	+
C	≠7	64	C ≠ 7/64	+
C	≠7	65	C ≠ 7/65	+
C	≠7	66	C ≠ 7/66	+
D	≠17	67	D ≠ 17/67	+
B	≠7	68	B ≠ 7/68	+
C	≠7	69	C ≠ 7/69	+
B	≠17	70	B ≠ 17/70	+
D	≠3	71	D ≠ 3/71	+
C	≠3	75	C ≠ 3/75	+
C	≠3	76	C ≠ 3/76	+
C	≠3	77	C ≠ 3/77	+
C	≠3	78	C ≠ 3/78	+

Προσπάθεια τροποποίησης φυλλικών δίσκων καπνού	Κλώνος βακτηρίου	Σειρά αναγεννημένων φυτών	Συνολικός κωδικός αναγεννημένων φυτών	Αποτέλεσμα ριζοβολίας
B	≠7	79	B ≠ 7/79	+
B	≠17	80	B ≠ 17/80	+
C	≠3	81	C ≠ 3/81	+
B	≠7	82	B ≠ 7/82	+
D	≠3	83	D ≠ 3/83	+
B	≠17	84	B ≠ 17/84	+
B	≠17	85	B ≠ 17/85	-
D	≠7	86	D ≠ 7/86	+
D	≠7	87	D ≠ 7/87	+
D	≠17	88	D ≠ 17/88	+
D ¹	≠7 ²	89 ³	D ≠ 7/89	+

Τα φυτά που πολλαπλασιάστηκαν ελέγχθηκαν με αντιδράσεις PCR, Southern blotting και με μηχανικές μολύνσεις ώστε να διατηρηθούν εκείνα τα οποία περιείχαν το γονίδιο του ιού και ήταν ανθεκτικά στη μόλυνση με τον ιό. Από τον ανωτέρω έλεγχο, οι τροποποιημένες σειρές καπνού που έδωσαν θετικά αποτελέσματα ήταν: B≠7/24, B≠7/51, C≠3/75, C≠3/77, C≠3/81, D≠7/89.

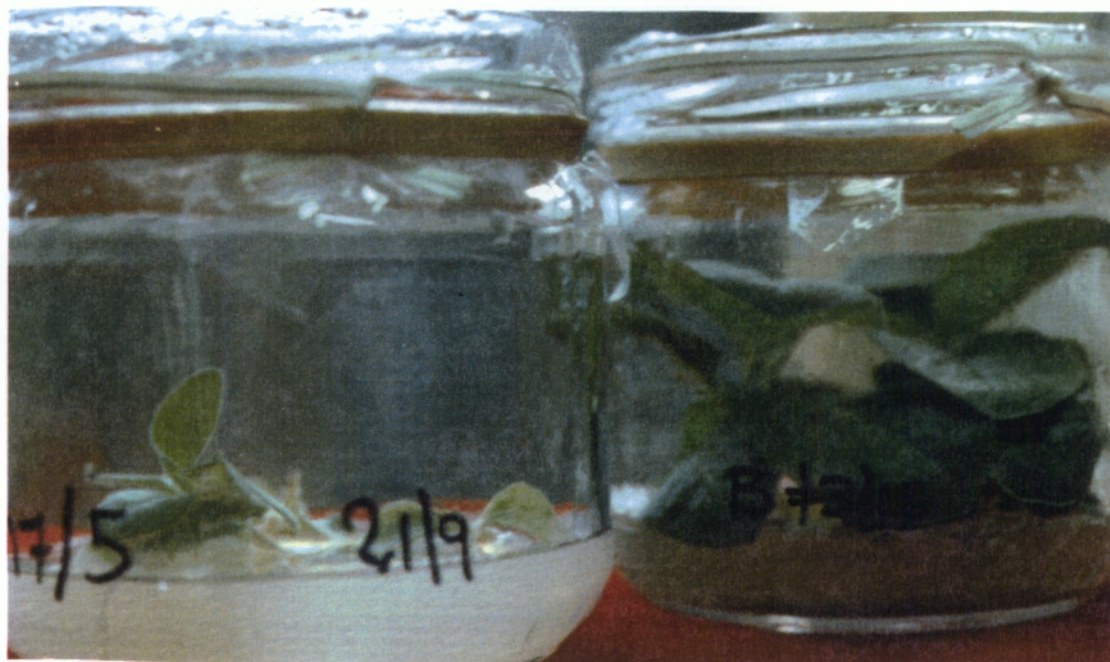
¹ Τα γράμματα A,B,C,D αντιστοιχούν σε κάθε μια προσπάθεια για τροποποίηση των φυλλικών δίσκων καπνού.

² Τα στοιχεία ≠3, ≠7, ≠17, αντιστοιχούν σε κάθε έναν από τους τρεις κλώνους του βακτηρίου *A. tumefaciens* με το οποίο έγινε η τροποποίηση.

³ Το κάθε ένα από τα νούμερα αυτά αντιστοιχεί σε κάθε μία από τις σειρές που κατάφεραν να αναγεννηθούν.

Αντίδραση της PCR

Τα φυτά στα οποία πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR ώστε να διαπιστωθεί η ενσωμάτωση του επιζητούμενου γονιδίου στο γένωμα τους ήταν τα ακόλουθα: A#7/1, A#17/2, A#3/10, B#3/13, B#3/19, B#7/23, B#3/26, B#3/27, B#3/28, A#7/37, B#7/44, B#7/51, B#7/52, B#17/54, B#17/55, D#3/71, C#3/78 καθώς και τα B#7/24, C#3/75, C#3/77, C#3/81, D#7/89 και το φυτό Original S53 ως αρνητικός μάρτυρας. Τα αποτελέσματα της PCR ήταν θετικά ως προς την ύπαρξη του επιζητούμενου γονιδίου στις ακόλουθες σειρές: B#7/51, B#7/24, C#3/75, C#3/77, C#3/81 και D#7/89.



Εικόνα 5.2.Φαίνονται δύο γυάλες με φυτά καπνού, όπου στη μία τα φυτά κατάφεραν να ξεπεράσουν το αντιβιοτικό Kanamycin ενώ στην άλλη όχι. Στην πρώτη περίπτωση, στα φυτά είχε επιτευχθεί η γενετική τροποποίησή τους ενώ στη δεύτερη όχι.

Αξιοπρόσεκτο ήταν το γεγονός ότι ελέγχθηκαν περισσότερα του ενός φυτά της ίδιας σειράς, χωρίς όμως να δίδουν όλα πάντα θετικά αποτελέσματα

στην PCR. Ελέγχθηκαν 2 φυτά της σειράς '51', εκ των οποίων το ένα έδινε πάντα θετική ένδειξη στην PCR. Από την σειρά '24' δύο στα τρία έδωσαν θετική αντίδραση στην PCR, από τη σειρά '75' ένα στα τρία, από τη σειρά '77' δύο στα δύο, από τη σειρά '81' τέσσερα στα τέσσερα και από την σειρά '89' ένα στο ένα (εικόνα 5.3.). Από το φυτό Original S53 (υγιές φυτό καπνού της ποικιλίας S53) πάντα πάρθηκαν αρνητικά αποτελέσματα ενώ και ο θετικός μάρτυρας (τροποποιημένο βακτήριο *E. coli*) έδωσε πάντα θετικά αποτελέσματα στην PCR.

Αποτελέσματα του ελέγχου σταθερότητας του γονιδίου στα βακτήρια

Από τα βακτήρια στα οποία έγινε αντίδραση PCR, θετικά αποτελέσματα για την ύπαρξη του γονιδίου πάρθηκαν από όλους τους κλώνους του βακτηρίου *A. tumefaciens* (#3, #7, #17) τόσο από την αρχική καλλιέργεια όσο και από την τελευταία υποκαλλιέργειά τους.

Αποτελέσματα της μεθόδου Southern blotting

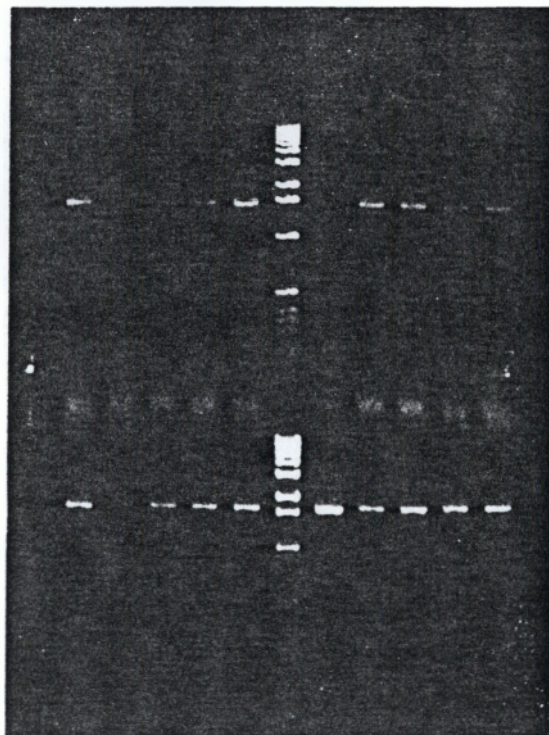
Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε συμπληρωματικά ώστε να διασταυρωθούν τα αποτελέσματα της αντίδρασης PCR για κάποια από τα θετικά ως προς αυτήν δείγματα. Θετική ένδειξη για την εμφάνιση του γόνου έδωσε ένα φυτό της σειράς '51' το οποίο έδειχνε θετική ένδειξη και στην αντίδραση PCR.

Η μέθοδος αυτή, χρησιμοποιήθηκε και για κάποια δείγματα τα οποία ήταν ανθεκτικά σε μηχανική μόλυνση στη φυλή SYM του TRV χωρίς όμως να "δουλέψει" σωστά, στην περίπτωση αυτή.

Μηχανικές μολύνσεις με τον TRV-SYM

Μηχανικές μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν με τον TRV-SYM στα ακόλουθα φυτά: A#3/10, B#7/11, A#3/17, B#3/18, B#7/21, B#7/24, B#3/26, B#3/27, B#3/28, B#3/29, B#17/33, A#7/37, A#3/38, B#3/41, B#7/42, B#7/43, B#3/48, B#3/49, B#7/50, B#7/52, C#7/53, B#17/54, B#17/55, A#7/58, B#7/59, C#7/60, C#7/61, B#7/62, B#7/63, C#7/64, C#7/65, C#7/66, D#17/67, B#7/68, C#7/69, B#17/70, C#3/75, C#3/76, C#3/77, C#3/78, B#7/79, B#17/80, C#3/81, B#7/82, D#3/83, D#17/88, D#7/89.

Τα στοιχεία των μολύνσεων αυτών περιγράφονται στον πίνακα 5.3.



Εικόνα 5.3. Gel ηλεκτροφόρησης των ακόλουθων δειγμάτων: (Επάνω σειρά) κενό, θετικός μάρτυρας, αρνητικός μάρτυρας, σειρά 51, σειρά 75, σειρά 77, δείκτης (marker), σειρά 81, σειρά 89, σειρά 24α, σειρά 24β, σειρά 24γ. (Κάτω σειρά) αρνητικός μάρτυρας, σειρά 51α, σειρά 75β, σειρά 75γ, σειρά 77α, σειρά 77β, δείκτης (marker), σειρά 81α, σειρά 81β, σειρά 81γ, σειρά 81δ, σειρά 89. Τα γράμματα α, β, γ, δ συμβολίζουν διαφορετικά φυτά της κάθε σειράς.

Ανθεκτικότητα στη φυλή SYM του ιού TRV εμφανίστηκε στις ακόλουθες περιπτώσεις. Στη σειρά '24' όπου τρία από τα φυτά που μολύνθηκαν μηχανικά δεν εμφάνισαν κανένα σύμπτωμα. Ακολούθησε μηχανική επαναμόλυνση των φυτών αυτών σε νεότερα φύλλα, από τα ήδη μολυνθέντα, με αποτέλεσμα σε όλα τα φυτά να εμφανιστούν τοπικά συμπτώματα (συμπτώματα στα φύλλα στα οποία έγινε μηχανική μόλυνση, εικ. 5.4.) ενώ δύο μολύνθηκαν και διασυστηματικά (συμπτώματα στο στέλεχος στους μίσχους των φύλλων ή και στα φύλλα, όπου δεν έγινε μηχανική μόλυνση, λόγω της ανοδικής κίνησης των σωματίων του ιού, εικ. 5.5.). Επίσης τρία φυτά της σειράς '75' τα οποία είχαν μολυνθεί μηχανικά με τη φυλή SYM του TRV δεν έδειξαν σημάδια συμπτωμάτων. Από τη σειρά '77' μολύνθηκαν μηχανικά δύο φυτά χωρίς να εμφανιστεί όμως σύμπτωμα σε κανένα από αυτά. Από τη σειρά '81' μολύνθηκαν μηχανικά 4 φυτά χωρίς να εμφανιστούν συμπτώματα ούτε τοπικά ούτε διασυστηματικά. Επίσης από τη σειρά '89', σε ένα από αυτά που μολύνθηκαν μηχανικά δεν εμφανίστηκε κανένα σύμπτωμα (εικ. 5.6.).

Πίνακας 5.3.
Αποτελέσματα των μολύνσεων με τον TRV-SYM

Μολυνθείσες σειρές καπνού	Αριθμός φυτών	Φυτά με τοπικά συμπτώματα ¹	Φυτά με διασυστηματικά συμπτώματα ²
A ≠ 3/10	1	1	1

¹ Με τον όρο τοπικά συμπτώματα εννοούνται τα συμπτώματα που εμφανίζονται στα φύλλα στα οποία έγινε μηχανική μόλυνση.

² Με τον όρο διασυστηματικά συμπτώματα εννοούνται τα συμπτώματα που εμφανίζονται στο στέλεχος, στους μίσχους των φύλλων ή και στα φύλλα που δεν έγινε μηχανική μόλυνση, λόγω της ανοδικής κίνησης των ισωματίων που προκαλούν τη μόλυνση.

Μολυνθείσες σειρές καπνού	Αριθμός φυτών	Φυτά με τοπικά συμπτώματα	Φυτά με διασυστηματικά συμπτώματα
B ≠ 7/11	3	3	-
A ≠ 3/17	2	2	-
B ≠ 3/18	1	1	1
B ≠ 7/21	4 ³	4	1
B ≠ 7/24	4 ⁴	1	-
B ≠ 3/26	1	1	1
B ≠ 3/27	1	1	-
B ≠ 3/28	4	4	-
B ≠ 3/29	2	2	1
B ≠ 17/33	3	3	2
A ≠ 7/37	1	1	1
A ≠ 3/38	5	5	2
B ≠ 3/41	4	4	2
B ≠ 7/42	5	5	3
B ≠ 7/43	4	4	1
B ≠ 3/48	6	6	1
B ≠ 3/49	5	5	1
B ≠ 7/50	2	2	1
B ≠ 7/52	1	1	1
C ≠ 7/53	5	5	2
B ≠ 17/54	2	2	-
B ≠ 17/55	1	1	1
A ≠ 7/58	3	3	1
B ≠ 7/59	4	4	1
C ≠ 7/60	4	4	3
C ≠ 7/61	4	4	2

³ 1 φυτό αναμολύνθηκε, αφού δεν εμφάνιζε συμπτώματα και έδωσε τόσα τοπικά όσο και διασυστηματικά συμπτώματα.

⁴ 3 φυτά αναμολύνθηκαν, αφού δεν εμφάνιζαν συμπτώματα και έδωσαν τα δύο τοπικά και διασυστηματικά συμπτώματα, ενώ το τρίτο ελαφρά τοπικά συμπτώματα.

Μολυνθείσες σειρές καπνού	Αριθμός φυτών	Φυτά με τοπικά συμπτώματα	Φυτά με διασυστηματικά συμπτώματα
B ≠ 7/62	4	4	3
B ≠ 7/63	5	5	2
C ≠ 7/64	4	4	3
C ≠ 7/65	3	3	2
C ≠ 7/66	5	5	3
D ≠ 17/67	2	2	1
B ≠ 7/68	4	4	1
C ≠ 7/69	4	4	3
B ≠ 17/70	5	5	2
C ≠ 3/75	3	-	-
C ≠ 3/76	3	3	2
C ≠ 3/77	2	-	-
C ≠ 3/78	2	2	-
B ≠ 7/79	3	3	2
B ≠ 17/80	4	4	1
C ≠ 3/81	4	-	-
B ≠ 7/82	3	3	1
D ≠ 3/83	4	4	4
D ≠ 17/88	1	1	1
D ≠ 7/89	2 ¹	1	1

Αξίζει να σημειωθεί πως 3 μάρτυρες (υγιή-μη τροποποιημένα φυτά S53) στους οποίους έγινε μηχανική μόλυνση ταυτόχρονα με τα ως άνω αναφερθέντα φυτά, έδωσαν έντονα τοπικά και διασυστηματικά συμπτώματα.

¹ 1 φυτό αναμολύνθηκε, αφού δεν εμφάνιζε συμπτώματα, χωρίς να δώσει κανένα σύμπτωμα.

Επίσης, από διασυστηματικά φύλλα των παραπάνω φυτών, που δεν είχαν εμφανίσει συμπτώματα ύστερα από μηχανική μόλυνση αυτών με τη φυλή SYM του TRV, πραγματοποιήθηκαν μηχανικές μολύνσεις, μη τροποποιημένων φυτών καπνού ποικιλίας S53 τα οποία όμως δεν εμφάνισαν κανένα σύμπτωμα.

Όλα τα υπόλοιπα φυτά που μολύνθηκαν μηχανικά με τον TRV-SYM έδωσαν συμπτώματα είτε τοπικά είτε διασυστηματικά ή και τα δύο.

Μηχανικές μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν, με μόλυσμα από την φυλή GR του TRV, στα ακόλουθα φυτά: A#17/2, B#17/3, A#3/10, B#7/11, B#3/13, A#3/17, B#3/18, B#7/21, B#7/24, B#3/26, B#3/27, B#3/28, B#3/29, B#17/33, A#17/35, A#7/37, B#3/41, B#7/42, B#7/43, B#3/48, B#3/49, B#7/50, B#7/51, B#7/52, C#7/53, B#17/54, B#17/55, A#7/58, C#7/60, C#7/61, B#7/62, B#7/63, B#17/73, B#17/74.

Ανθεκτικότητα, στην ελληνική αυτή φυλή του ιού εμφανίστηκε σε ένα φυτό, της σειράς '11', σε δύο φυτά της σειράς '51' και σε τρία φυτά της σειράς '24'. Όλα τα υπόλοιπα φυτά υπέκυψαν στη φυλή GR του TRV, εμφανίζοντας έντονα τοπικά και διασυστηματικά συμπτώματα. Αναλυτικά τα αποτελέσματα των μολύνσεων με τον TRV-GR φαίνονται στον πίνακα 5.4.



Εικόνα 5.4. Τοπικά συμπτώματα σε διαγονιδιακό φυτό καπνού.



Εικόνα 5.5. Έντονα τοπικά και διασυστηματικά συμπτώματα σε τροποποιημένα φυτά καπνού.



Εικόνα 5.6. Τροποποιημένα φυτά καπνού που εμφανίζουν ανθεκτικότητα στη μόλυνση με τη φυλή SYM του TRV.

Πίνακας 5.4.
Αποτελέσματα των μολύνσεων με τον TRV-GR

Μολυνθείσες σειρές καπνού	Αριθμός φυτών	Φυτά με τοπικά συμπτώματα ¹	Φυτά με διασυστηματικά συμπτώματα ²
A ≠ 17/2	1	1	1
B ≠ 17/3	2	2	2
A ≠ 3/10	2	2	2
B ≠ 7/11	2	1	1
B ≠ 3/13	1	1	1
A ≠ 3/17	1	1	1
B ≠ 3/18	2	2	2

¹ Με τον όρο τοπικά συμπτώματα εννοούνται τα συμπτώματα που εμφανίζονται στα φύλλα στα οποία έγινε μηχανική μόλυνση.

² Με τον όρο διασυστηματικά συμπτώματα εννοούνται τα συμπτώματα που εμφανίζονται στο στέλεχος, στους μίσχους των φύλλων ή και στα φύλλα που δεν έγινε μηχανική μόλυνση, λόγω της ανοδικής κίνησης των ισοσωματίων που προκαλούν τη μόλυνση.

Μολυνθείσες σειρές καπνού	Αριθμός φυτών	Φυτά με τοπικά συμπτώματα	Φυτά με διασυστηματικά συμπτώματα
B ≠ 7/21	1	1	1
B ≠ 7/24	3	-	-
B ≠ 3/26	7	7	7
B ≠ 3/27	2	2	2
B ≠ 3/28	4	4	4
B ≠ 3/29	1	1	1
B ≠ 17/33	3	3	3
A ≠ 17/35	2	2	2
A ≠ 7/37	2	2	2
B ≠ 3/41	1	1	1
B ≠ 7/42	2	2	2
B ≠ 7/43	1	1	1
B ≠ 3/48	3	3	3
B ≠ 3/49	2	2	2
B ≠ 7/50	3	3	3
B ≠ 7/51	3	1	1
B ≠ 7/52	4	4	4
C ≠ 7/53	5	5	5
B ≠ 17/54	5	5	5
B ≠ 17/55	5	5	5
A ≠ 7/58	2	2	2
C ≠ 7/60	2	2	2
C ≠ 7/61	4	4	4
B ≠ 7/62	2	2	2
B ≠ 7/63	2	2	2
B ≠ 17/73	1	1	1
B ≠ 17/74	1	1	1

5.5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα αποτελέσματα του πειράματος που πραγματοποιήθηκε με βάση τον αρχικό έλεγχο των φυτών καπνού για την ενσωμάτωση του γονιδίου της 59K πολυμεράσης του ιού TRV, διαπιστώθηκαν τα ακόλουθα στοιχεία.

Κατά την έναρξη του πειράματος υπήρχαν στο θάλαμο ανάπτυξης των παραχθέντων με μικροπολλαπλασιασμό, γενετικώς τροποποιημένων, φυτών καπνού 74 σειρές από τις οποίες δεν είχαν ικανοποιητική ανάπτυξη σε διάλυμα ριζοβολίας που περιείχε το αντιβιοτικό Kanamycin 18 σειρές φυτών. Οι σειρές αυτές δεν πρέπει να είχαν τροποποιηθεί επιτυχώς αφού μαζί με το γονίδιο της 59K πολυμεράσης του TRV, είχε τοποθετηθεί και ένα γονίδιο που έδινε ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό Kanamycin. Από τις υπόλοιπες σειρές, οι οποίες μολύνθηκαν μηχανικά με τη φυλή SYM του ιού TRV, δεν εμφανίσθηκαν συμπτώματα σε πέντε από αυτές, όχι όμως σε όλα τα φυτά της κάθε σειράς. Ανθεκτικότητα εμφανίστηκε και σε τρεις σειρές που μολύνθηκαν μηχανικά με τη φυλή GR του TRV χωρίς όμως να εμφανίζεται και στην περίπτωση αυτή, σε όλα τα φυτά της ίδιας σειράς. Η τελευταία παρατήρηση αποτελεί στοιχείο για περαιτέρω διερεύνηση, αφού όλα τα φυτά της κάθε σειράς προήλθαν από ένα αρχικό φυτό και θα έπρεπε να εμφανίζουν την ίδια συμπεριφορά ως προς τη μηχανική μόλυνση με τον ιό. Στην περίπτωση των μολύνσεων των πέντε σειρών με τον TRV-SYM, θεωρήθηκε πιθανό, η μη εμφάνιση συμπτωμάτων να συνδέεται με αραιό μόλυσμα που χρησιμοποιήθηκε. Αυτό όμως διαψεύσθηκε από τους μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τις μολύνσεις οι οποίοι εμφάνισαν έντονα συμπτώματα. Επίσης, οι μολύνσεις που έγιναν με χυμό από διασυστηματικώς μολυσμένα φύλλα των φυτών αυτών σε υγιή, μη

τροποποιημένα φυτά καπνού ποικιλίας S53 δεν έδωσαν συμπτώματα, γεγονός που εξηγήθηκε από τη μη ύπαρξη ιού στα φυτά καπνού από όπου πάρθηκε το μόλυσμα.

Θετική ένδειξη στην αντίδραση PCR πάρθηκε για έξι σειρές καπνού, περιλαμβάνοντας τις πέντε που ήταν ανθεκτικές στην μηχανική μόλυνση με τον TRV-SYM. Στις αντιδράσεις PCR παρατηρήθηκε επίσης το γεγονός της εμφάνισης διαφορετικών αποτελεσμάτων σε φυτά της ίδιας σειράς το οποίο χρήζει περαιτέρω διερεύνηση, αφού όλα τα φυτά προέρχονταν από μικροπολλαπλασιασμό ενός αρχικού φυτού.

Για να διευκρινιστεί αν το βακτήριο *A. tumefaciens* με το οποίο έγινε η τροποποίηση των φυτών, διατηρεί το γονίδιο της 59K πολυμεράσης του TRV στο γένωμά του, μετά από συνεχείς ανακαλλιέργειές του, πραγματοποιήθηκαν υποκαλλιέργειες των αρχικών καλλιεργειών των βακτηρίων, οι οποίες, μέσω μιας αντίδρασης PCR έδειξαν πως διατηρούν το γονίδιο. Συνεπώς το βακτήριο μέσω του οποίου έγινε η τροποποίηση δεν ήταν υπεύθυνο για ενδεχόμενη μη ενσωμάτωση του γονιδίου στα φυτά καπνού.

Μια εξήγηση, για την εμφανιζόμενη ανομοιομορφία στα αποτελέσματα των αντιδράσεων PCR θα μπορούσε να αποτελέσει η ύπαρξη της αφοπλισμένης φυλής του βακτηρίου, η οποία πιθανόν να μην εξοντώθηκε από τα αντιβιοτικά που υπήρχαν στο διάλυμα ριζοβολίας και η οποία συνέχιζε να υπάρχει μέσα στα φυτά καπνού, χωρίς να προκαλεί ασθένεια σ' αυτά. Η περίπτωση αυτή αποκλείστηκε, αφού φύλλα που πάρθηκαν από φυτά καπνού, τα οποία έδιναν θετική ένδειξη στην PCR, ελέγχθηκαν από το Εργαστήριο Βακτηριολογίας του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου, και δεν απομονώθηκε από αυτά το συγκεκριμένο βακτήριο. Εξάλλου, όταν

τα έκφυτα, που χρησιμοποιούνταν για τον μικροπολλαπλασιασμό των σειρών εκείνων οι οποίες έδιναν θετική ένδειξη στην αντίδραση PCR, τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα ριζοβολίας χωρίς αντιβιοτικό, δεν εμφανίστηκαν συμπτώματα ανάπτυξης βακτηρίων με αποτέλεσμα να μη θεωρείται βάσιμη η παραπάνω υπόθεση. Πιο πιθανή εξήγηση για την ανομοιομορφία αυτή μεταξύ των φυτών της ίδιας σειράς όσον αφορά στις αντιδράσεις της PCR, είναι ότι οι εκκινητές μας (primers) ίσως δεν είναι τόσο αποτελεσματικοί και θα πρέπει να σχεδιασθούν νέοι.

Υπήρχαν επίσης και οι σειρές εκείνες οι οποίες κατάφεραν να ξεπεράσουν την αντίσταση του αντιβιοτικού Kanamycin, όμως δεν εμφάνιζαν ανθεκτικότητα στην προσβολή από τον ιό TRV ύστερα από μηχανική μόλυνσή τους, ούτε είχαν το γονίδιο στο γένωμά τους όπως διαπιστώθηκε με την αντίδραση PCR. Είναι λοιπόν προφανές πως τα φυτά αυτά, που ήταν και τα περισσότερα, είχαν στο γένωμά τους το γονίδιο που τους έδινε ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό, δηλαδή είχε συμβεί η γενετική τροποποίηση των φυτών αυτών. Ο λόγος που δεν ενσωματώθηκε το επιζητούμενο γονίδιο, δεν έγινε γνωστός και πρέπει να εξεταστεί ώστε να εξακριβωθεί.

Συμπερασματικά, όσον αφορά το αρχικό τμήμα του ελέγχου των φυτών καπνού για την ενσωμάτωση του γονιδίου της 59K πολυμεράσης του TRV πρέπει να αναφερθεί πως βρέθηκαν πέντε σειρές φυτών καπνού που είχαν τροποποιηθεί και εμφάνιζαν ανθεκτικότητα στην προσβολή με τον TRV-SYM, ύστερα από μηχανική μόλυνσή τους. Τούτο βέβαια δεν σημαίνει πως πρόκειται για ανθεκτικά φυτά καπνού στον ιό TRV, αφού πρέπει να δοκιμαστούν οι απόγονοι των φυτών αυτών, στη μόλυνση με διάφορες φυλές του ιού και μάλιστα όχι μόνο μηχανικά αλλά και με φορείς-

νηματώδεις του ιού σε ειδικό κλωβό, καθώς και οποιαδήποτε άλλη διαδικασία που έχει καθοριστεί κατά το σχεδιασμό του πειράματος. Υπάρχουν πάντως θετικές ενδείξεις οι οποίες οδηγούν στη δημιουργία, με τη μέθοδο αυτή, φυτών καπνού ανθεκτικών στον TRV.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Boehringer Mannheim Biochemica. *Dig DNA labeling and detection Kit nonradioactive*. Τεχνικό φυλλάδιο.
- Carr, J.P., Zaitlin, M., 1993. Replicase mediated resistance. *Virology* **4**:339-347.
- Gasser, C.S., Fraley, R.T., 1989. Genetically engineering plants for crop improvement. *Science* **244**: 1293-1299.
- Golemboski, D.B., Lomonosoff, G.P., Zaitlin, M., 1990. Plants transformed with tobacco mosaic virus nonstructural gene sequence are resistant to the virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 6311-6315.
- Goodman, R.M., Hauptli, H., Crossway, A., Knauf, V.C., 1987. Gene transfer in crop improvement. *Science* **236**: 48-54.
- Harrison, B.D., Robinson, D.J., 1981. Tobraviruses. In: *Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis*. Kurstak, E., eds, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, pp. 516-540.
- Hull, R., Davies, J.W., 1992. Approaches to nonconventional control of plant virus diseases. *Critical reviews in plant sciences*. **1**: 17-33.
- Κατής, Ν.Ι., 1995. *Ιολογικές ασθένειες φυτών μεγάλης καλλιέργειας*. Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη, σελ. 7-33.
- Lucas, G.B., 1958. *Diseases of tobacco*. The Scarecrow Press Inc. New York, pp. 45-62.
- MacFarlane, S.A., Davies, J.W., 1992. Plants transformed with a region of the 201-kilodalton replicase gene from pea early browning virus RNA-1 are resistant to virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 5829-5833.

- Nejidat, A., Clark G.W., Beach, R.N., 1990. Engineered resistance against plant virus diseases. *Physiol. Plant.* **80**: 662-668.
- Portykus, I., 1991. Gene transfer to plants: Assessment of published approaches and results. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**: 205-225.
- Russel, G.E., 1978. *Plant breeding for pest and disease resistance.* Butterworths pp. 1-41, 209-267.
- Yie, Y., Tien, P., 1993. Plant virus satellite RNA's and their role in engineering resistance to virus diseases. *Virology* **4**: 363-368.