



ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας
Τμήμα Θερμοκηπιακών Καλλιεργειών και Ανθοκομίας

**Απομόνωση γονιδίων στο βιοσυνθετικό μονοπάτι
τριτερπενοειδών μεταβολιτών και τροποποίηση της
έκφρασής τους στο μοντέλο - Φυτό *L. japonicus*.**

Ηλιάνα Σουλίρα

Πτυχιακή Εργασία

Επιβλέποντες καθηγητές:

**Καβρουλάκης Νεκτάριος
Μαρκόπουλος Κυριάκος**

Καλαμάτα 2006

Περιεχόμενα

Πρόλογος	7
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ:	
A.1 ΑΓΡΟΒΑΚΤΗΡΙΟ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑ DNA	
A.1.1 Γενικά.....	9
A.1.2 Χαρακτηριστικά του <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	10
A.1.3 Ιδιότητες των κυττάρων του κορονωτού κάλλου.....	11
A.1.4 Μολυσματικό πλασμίδιο.....	11
A.1.5 Οπίνες και τύπος πλασμιδίων.....	12
A.1.6 Αλληλεπιδράσεις <i>Agrobacterium</i> – φυτικού κυττάρου.....	12
A.1.7 Γενετικός αποικισμός	12
A.1.8 Αλληλοαναγνώριση βακτηρίου – φυτικού κυττάρου.....	13
A.1.9 Ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων της τοξικότητας	13
A.1.10 Περιοχή τοξικότητας <i>vir</i>	14
A.1.11 Αρχή αντιγραφής του T-DNA.....	16
A.1.12 Διαβακτηριακή σύζευξη του Tι πλασμιδίου.....	17
A.1.13 Σύνδεση περιοχών <i>vir</i> και T-DNA.....	17
A.1.14 Μοντέλο ένθεσης του T-DNA στο φυτό.....	17
A.1.15 Ταυτοποίηση διαγονιδιακών φυτών.....	19
A.2 ΦΟΡΕΙΣ ΚΑΙ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΦΥΤΑ	
A.2.1 Γενικά.....	19
A.2.2 <i>Cis</i> -φορείς (δυναμικό σύστημα μεταφοράς) των <i>A. tumefaciens</i> και <i>A. rhizogenes</i>	20
A.2.3 <i>Trans</i> -φορείς (δυναμικό σύστημα μεταφοράς) των <i>A. tumefaciens</i> και <i>A. rhizogenes</i>	20
A.2.3.1 p.Green.....	21
A.2.3.2 p.Soup.....	23
A.2.3.3 Ο συστατικός προαγωγέας 35S.....	24
A.3 ΥΠΕΡ-ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΣΙΓΑΣΗ.....	24
A.4 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΔΙΠΛΟΕΙΔΟΥΣ ΨΥΧΑΝΘΟΥΣ <i>LOTUS JAPONICUS</i> , ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΑΓΡΟΒΑΚΤΗΡΙΟΥ	
A.4.1 Εισαγωγή.....	25
A.4.2 Γιατί το <i>Lotus japonicus</i> ;.....	26
A.4.3 Γονιδιωματικά χαρακτηριστικά.....	27
A.4.4 Συνθήκες καλλιέργειας <i>in vitro</i> (ιστοκαλλιέργεια).....	27
A.5 ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ.....	27
A.6 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΦΥΤΩΝ.....	29
A.7 ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΦΥΤΩΝ.....	30
ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ:	
A.8 ΓΕΝΙΚΑ.....	30
A.9 ΣΑΠΩΝΙΝΕΣ ΚΑΙ ΦΥΤΙΚΗ ΑΜΥΝΑ.....	31
A.9.1 Η χημική δομή των σαπωνινών.....	31
A.9.2 Τοξικότητα των σαπωνινών στους μύκητες.....	32
A.9.3 Σαπωνίνες και έλεγχος παθογενειών.....	32
A.10 ΤΡΙΤΕΡΠΕΝΙΑ ΚΑΙ ΣΤΕΡΟΛΕΣ.....	33
A.10.1 Η απομόνωση της συνθάσης της β-αμυρίνης.....	35

A.10.2 Το φυλογενετικό δέντρο των OSCs.....	36
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
B.1 ΣΤΕΛΕΧΗ ΚΑΙ ΒΑΚΤΗΡΙΑ	
B.1.1 Βακτηριακά στελέχη και συνθήκες ανάπτυξής τους.....	39
B.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ	
B.2.1 Δημιουργία δεκτικών για μετασχηματισμό κυττάρων <i>E. coli</i> (competent cells).....	40
B.2.2 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i> με πλασμίδια.....	41
B.2.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα.....	41
B.2.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα.....	42
B.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ	
B.3.1 Καθαρισμός νουκλεϊνικών οξέων με χρήση φαινόλης και χλωροφορμίου.....	42
B.3.2 Κατακρήμνιση νουκλεϊνικών οξέων.....	43
B.3.3 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτή αγαρόζης.....	43
B.3.4 Ανάκτηση κλάσματος DNA από πηκτή αγαρόζης.....	43
B.3.5 Προετοιμασία πλασμιδιακών φορέων για ενσωμάτωση ένθετων DNA τμημάτων.....	44
B.3.6 Ενσωμάτωση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακούς φορείς.....	44
B.3.7 Μέθοδος τεμαχισμού διακριτών τμημάτων DNA.....	44
B.3.8 Ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων DNA με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).....	45
B.3.9 Μέθοδος PCR για την ενίσχυση του DNA του γονιδίου της συνθάσης της β-αμυρίνης.....	46
B.3.10 Ενίσχυση ένθετου σε πλασμιδιακό φορέα DNA.....	46
B.3.11 Blue Gels.....	47
B.4 DNA- DNA ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ	
B.4.1 Γενικά.....	47
B.4.2 Σήμανση νουκλεϊνικών οξέων με DIG11-dUTP (PROB).....	48
B.4.3 Υβριδισμός νουκλεϊνικών οξέων.....	48
B.5 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΓΡΟΒΑΚΤΗΡΙΟΥ	
B.5.1 Άμεσος μετασχηματισμός του <i>Agrobacterium</i> με πλασμιδιακές κατασκευές (Freeze-Thaw Method).....	49
B.6 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΦΥΤΩΝ ΜΕ ΤΟ <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	
B.6.1 Αποστείρωση σπόρων <i>Lotus japonicus</i> και βλάστησή τους.....	50
B.6.2 Τραυματισμός φυτών και μόλυνση με το <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	50
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	
Γ.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
Γ.1.2 Συλλογή φυτικού ιστού <i>Lotus japonicus</i> και απομόνωση του γονιδίου της συνθάσης της β-αμυρίνης.....	54
Γ.1.2 Προετοιμασία του πλασμιδιακού φορέα p35S και του ενισχυμένου DNA, για την ενσωμάτωση των δύο τμημάτων.....	54
Γ.1.3 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων και ανάκτηση κλάσματος από πηκτή αγαρόζης.....	55
Γ.1.4 Ενσωμάτωση του γονιδίου της συνθάσης της β-αμυρίνης στον πλασμιδιακό φορέα p35S.....	55
Γ.1.5 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i> με τον μετασχηματισμένο πλασμιδιακό φορέα p35S-AmyII και απομόνωσή του σε μικρή κλίμακα.....	56

Γ.1.6 Προετοιμασία του πλασμιδιακού φορέα pGreenII-0179 και του πλασμιδιακού DNA p35S-AmyII για ενσωμάτωση των δύο τμημάτων.....	57
Γ.1.7 Ενσωμάτωση του ανασυνδιασμένου DNA 35S-AmyII στον πλασμιδιακό φορέα pGreenII-0179.....	57
Γ.1.8 Μετασχηματισμός του <i>Agrobacterium tumefaciens</i> με τους πλασμιδιακούς φορείς pGreen/35S-AmyII και pSoup.....	58
Γ.1.9 Μετασχηματισμός εκφύτων <i>Lotus japonicus</i> με τα μετασχηματισμένα <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	58
Γ.2 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	59
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	67
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	69

Πρόλογος

Η ανάπτυξη της μοριακής βιολογίας έκανε δυνατή την αποκωδικοποίηση του DNA, δηλαδή τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των βάσεων μέσα στο μόριο του νουκλεϊνικού οξέος. Οι βάσεις παίζουν το ρόλο ενός γενετικού αλφάβητου και η αλληλουχία τους προσδιορίζει το είδος των πρωτεϊνών που θα παραχθούν στο κύτταρο και κατ' επέκταση τις ιδιότητες του οργανισμού, φυτικού ή ζωικού. Με την ανάπτυξη της τεχνολογίας είναι σήμερα δυνατό να γίνει τεμαχισμός του DNA, σε συγκεκριμένες θέσεις, με τη βοήθεια ειδικών ενζύμων και εισαγωγή του DNA άλλων οργανισμών. Έχουμε, δηλαδή, τη δυνατότητα ανασυνδιασμού του DNA στο εργαστήριο. Υπάρχουν πολλοί τρόποι μεταφοράς γονιδίων στα φυτά. Όλοι βασίζονται στην τεχνολογία ανασυνδιασμού του DNA, αφενός και στην αναπαραγωγή φυτών από καλλιέργειες ιστών ή φυτικών κυττάρων σε συνθήκες *in vitro*, αφετέρου.

Η δημιουργία γενετικώς τροποποιημένων φυτών χρησιμοποιείται στη βελτίωση των φυτών για τη δημιουργία ποικιλιών, με χαρακτηριστικά αντοχής σε ασθένειες, έντομα, ζιζανιοκτόνα, μετασλλεκτικές αλλοιώσεις, με μεγάλη συσσώρευση πρωτεϊνούχων ουσιών στο σπόρο ή φαρμακευτικών προϊόντων στους ιστούς κλπ.

Το αγροβακτήριο είναι ένα παθογόνο βακτήριο που προκαλεί καρκίνο στα φυτά. Έχει την ιδιότητα, όταν μολύνει τα φυτικά κύτταρα, να μεταφέρει ένα ολόκληρο τμήμα του γενετικού του υλικού στο DNA των φυτών. Τα μεταφερόμενα γονίδια βρίσκονται στο πλασμίδιο ογκογένης T_i του αγροβακτηρίου και συγκεκριμένα στη θέση T του πλασμιδίου, που περικλείεται από συγκεκριμένες αλληλουχίες βάσεων, τα λεγόμενα συνοριακά άκρα της περιοχής T, δηλαδή το T_L (αριστερό συνοριακό) και το T_R (δεξιό συνοριακό). Για τη μεταφορά των γονιδίων στα φυτά, απαραίτητα είναι τα T_L και T_R, καθώς και ορισμένα γονίδια που βρίσκονται στην περιοχή νίγ του πλασμιδίου.

Αν αφαιρέσουμε τα γονίδια της περιοχής T ανάμεσα στα T_L και T_R, το αγροβακτήριο παύει να είναι παθογόνο για τα φυτά, έχουμε δηλαδή μια αποπλισμένη φυλή αγροβακτηρίου. Αν, τέλος, στη θέση των αφαιρεθέντων γονιδίων βάλουμε κάποια άλλα γονίδια, έχουμε ένα σύστημα μεταφοράς γονιδίων στα φυτά. Τα βασικά στάδια τροποποίησης των φυτών μέσω του αγροβακτηρίου είναι:

- Σύνθεση ενός χμαιοτικού, δηλαδή τεχνητού γονιδίου και μεταφορά του σε αποπλισμένη φυλή του αγροβακτηρίου.
- Μόλυνση και τροποποίηση φυτικών κυττάρων με το αγροβακτήριο.
- Αναγέννηση τροποποιημένων φυτών από τα τροποποιημένα κύτταρα και καλλιέργεια των φυτών αυτών σε συνθήκες *in vitro*.
- Σκληραγώγηση και μεταφορά των τροποποιημένων φυτών στο θερμοκήπιο.
- Τεχνητές μολύνσεις για τον έλεγχο της αντοχής των φυτών στο παθογόνο.

Πολλά φυτά περιέχουν μεγάλες ποσότητες τριτερπενίων στις ρίζες τους, με τη μορφή τριτερπενοειδών σαπωνινών. Πολλά γλυκοσιλιωμένα τριτερπενοειδή εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση και παρέχουν προστασία στα φυτά έναντι των παθογόνων.

Υψηλά επίπεδα β-αμυρίνης και άλλων τριτερπενίων μπορεί να αποτελέσουν ένδειξη ενεργούς βιοσύνθεσης σαπωνινών, οι οποίες θεωρούνται πρόδρομα μόρια ανθεκτικότητας στους μύκητες.

Σκοπός αυτής της πειραματικής εργασίας είναι η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων της συνθάσης της β-αμυρίνης, για τη διερεύνηση του ρόλου των γονιδίων αυτών στην ανθεκτικότητα που παρουσιάζουν ορισμένα φυτά έναντι των παθογόνων.

Για το σκοπό αυτό θα γίνει μια απόπειρα σχηματισμού γενετικά τροποποιημένων φυτών *L. japonicus* με το γονίδιο της συνθάσης της β-αμυρίνης. Θα δημιουργηθούν, δηλαδή, φυτά *L. japonicus* με υπερ-έκφραση του γονιδίου της συνθάσης της β-αμυρίνης, το οποίο εμφανίζεται στις ρίζες των φυτών αυτών.

Μία άλλη προσέγγιση είναι η καταστολή της έκφρασης του γονιδίου αυτού στα φυτά, δηλαδή η δημιουργία γενετικά τροποποιημένων φυτών *L. japonicus* με απενεργοποιημένο το γονίδιο της συνθάσης της β-αμυρίνης.

Ο συνδυασμός των δύο παραπάνω μεθόδων θα έδινε μία πλήρη εικόνα του ρόλου της β-αμυρίνης στο φυτικό γονιδίωμα και θα επέτρεπε την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων και για άλλα τριτερπένια, αφού η μία μέθοδος επαληθεύει την άλλη.

Η επιτυχία της γενετικής τροποποίησης εξαρτάται αφενός μεν από το ποσοστό των φυτικών κυττάρων στα οποία θα γίνει μεταφορά γονιδίων από το αγροβακτήριο και αφετέρου από το ποσοστό των τροποποιημένων κυττάρων που θα είναι ικανά για αναγέννηση νέων φυτών. Βέβαια, η τελική επιβεβαίωση της επιτυχούς μεταφοράς των γονιδίων γίνεται με μοριακές μεθόδους εντοπισμού των εισαχθέντων γονιδίων.

Ωστόσο, η έρευνα δε σταματά στο σημείο αυτό. Χρειάζεται πολύ προσεκτική μελέτη των συγκεκριμένων φυτών, καθώς και περαιτέρω έρευνα για τις επιπτώσεις της τροποποίησης τόσο στο ίδιο το φυτό, όσο και σε άλλους οργανισμούς.

Το θέμα της γενετικής τροποποίησης δεν είναι απλό και πριν από την εφαρμογή των εργαστηριακών αποτελεσμάτων στη γεωργική πράξη, θα πρέπει να ερευνηθεί και να κατανοηθεί η αντοχή των φυτών σε μοριακό επίπεδο και να σταθμιστούν προσεκτικά πολλοί παράγοντες καθώς και ενδεχόμενοι κίνδυνοι για το περιβάλλον.

A. Εισαγωγή

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ:

A.1. ΑΓΡΟΒΑΚΤΗΡΙΟ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑ DNA

A.1.1 Γενικά

Η ραγδαία πρόοδος στη μοριακή βιολογία των φυτών έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη αρκετών τεχνικών για την ακριβή και ελεγχόμενη ενσωμάτωση «ξένων» γονιδίων στο γονιδίωμα ενός φυτικού κυττάρου. Η αναγέννηση τέτοιων γενετικά τροποποιημένων κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία διαγενετικών φυτών με καινούργια χαρακτηριστικά, τα οποία καθορίζονται από τη δράση του «ξένου» γονιδίου.

Ωστόσο, λίγες από αυτές τις τεχνικές χρησιμοποιούνται με μεγάλο ποσοστό επιτυχίας στα «φυτά-μοντέλα».

Με την απευθείας γονιδιακή μεταφορά (*direct gene transfer*) επιτυγχάνεται η εισαγωγή «γυμνού» DNA σε πρωτοπλάστες φυτικών κυττάρων, δηλαδή σε κύτταρα των οποίων τα κυτταρικά τοιχώματα έχουν απομακρυνθεί με κατάλληλα ένζυμα. Η μεταφορά του DNA γίνεται μέσω ενός οργανικού πολυμερούς, της πολύ-εθυλενικής γλυκόλης (PEG), που έχει την ικανότητα να διαπερνά την πλασματική μεμβράνη και να μεταφέρει στο εσωτερικό των πρωτοπλαστών το DNA.

Εναλλακτικά χρησιμοποιούνται δόσεις ρεύματος υψηλής τάσης (*electroporation*), που δημιουργούν πόρους στη μεμβράνη των πρωτοπλαστών, μέσω των οποίων το DNA εισέρχεται στα φυτικά κύτταρα.

Επειδή, όμως, η αναγέννηση των φυτών από απομονωμένους, μετασχηματισμένους πρωτοπλάστες εξακολουθεί να είναι προβληματική για ένα σημαντικό αριθμό φυτικών ειδών, αναπτύχθηκε μια άλλη μέθοδος κατά την οποία το «γυμνό» DNA ενύεται μηχανικά (*micro injection*) είτε σε πρωτοπλάστες είτε σε ολόκληρα φυτικά κύτταρα.

Για την καλύτερη αποτελεσματικότητα αυτού του τρόπου μεταφοράς γονιδίων, επινοήθηκε, στη συνέχεια, η βιολιστική μέθοδος ή μέθοδος βομβαρδισμού (*biolistics / gun bombardment*) των φυτικών κυττάρων ή των ιστών με μεταλλικά σωματίδια χρυσού ή βολφραμίου, καλυμμένα από DNA.

Τέλος, η μεταφορά γονιδίων μέσω του *Agrobacterium* αποτελεί μια άλλη, αρκετά αποτελεσματική μέθοδο, που χρησιμοποιείται ευρύτατα και με μεγάλη επιτυχία σε πολλά φυτά. (Ρούσσης, 1996)

A.1.2 Χαρακτηριστικά του *Agrobacterium tumefaciens*

Το *Agrobacterium tumefaciens* είναι ένα Gram-αρνητικό, ραβδόμορφο βακτήριο εδάφους, ανήκει στην οικογένεια Rhizobiaceae και είναι ο μοναδικός παράγοντας που προκαλεί την ευρέως διαδεδομένη ασθένεια της νεοπλασίας των φυτών που ονομάζεται κορονωτός κάλλος. Το σύμπτωμα γίνεται αντιληπτό όταν μολυνθεί κάποιος πληγωμένος φυτικός ιστός από το βακτήριο. Στη φύση, οι κάλλοι αυτοί σχηματίζονται στο υπέργειο τμήμα του φυτού που εφάπτεται του εδάφους. (de la Riva *et al.*, 1998; Χατζόπουλος, 2001)

A.1.3 Ιδιότητες των κυττάρων του κορονωτού κάλλου

Τα κύτταρα του κορονωτού κάλλου είναι καρκινικά και πολλαπλασιάζονται αυτόνομα, χωρίς κάποιο πρότυπο κύτταρο ή ιστό οργάνωσης. Επίσης, τα κύτταρα αυτά δεν παρουσιάζουν τη φυσιολογική διαφοροποίηση των κυττάρων από όπου προήλθαν. Η νέα αυτή ιδιότητα της αυτόνομης αύξησης του κυτταρικού αριθμού του κορονωτού κάλλου δεν εξαρτάται από εξωγενείς προστιθέμενες φυτορμόνες (αυξίνη και κυτοκινίνη), παρόλο που οι αυξητικοί αυτοί παράγοντες απαιτούνται για την ανάπτυξη, αύξηση και διαφοροποίηση των φυτικών κυττάρων. (Χατζόπουλος, 2001)

A.1.4 Μολυσματικό πλασμίδιο



Εικόνα A.1

Τα τοξικά στελέχη του *A. tumefaciens* περιέχουν ένα μεγάλο εξωχρωμοσωμικό στοιχείο, στο οποίο εδράζονται τα γονίδια που εμπλέκονται στην επαγωγή του κορονωτού κάλλου. Το εξωχρωμοσωμικό στοιχείο το οποίο βρέθηκε, αποδείχθηκε ότι είναι ένα πλασμίδιο με εξαιρετικά μεγάλο μέγεθος (ίσο ή μεγαλύτερο από 200 kb). Εξαιτίας του ρόλου του στην επαγωγή του κορονωτού κάλλου, το πλασμίδιο αυτό ονομάστηκε Ti (tumor inducing), όγκο-επαγωγικό πλασμίδιο (Εικόνα A.1). Η τοξικότητα του *Agrobacterium* χάνεται όταν τα πλασμίδια αυτά αποβάλλονται από τα βακτήρια, αλλά με τη επώαση των κυττάρων αυτών στους 37°C αντί για 28°C, που είναι και η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης των βακτηρίων αυτών. Αντίθετα, μη τοξικά στελέχη βακτηρίων επανακτούν την τοξικότητά τους όταν τα πλασμίδια Ti εισάγονται στα συγκεκριμένα στελέχη. Γενικά, τα *Agrobacterium* χωρίζονται σε τρεις βιοποικιλίες οι οποίες προκύπτουν από διαφορές που προκαθορίζονται από γονίδια του μοναδικού κυκλικού χρωμοσώματος. (Χατζόπουλος, 2001; Zhu *et al.*, 2000)

A.1.5 Οπίνες και τύπος πλασμιδίων

Ένα άλλο ουσιαστικό χαρακτηριστικό της φυσιολογίας των κυττάρων του κορονωτού κάλλου είναι ότι παράγουν και εκκρίνουν ασυνήθη αμινοξέα και παράγωγα σακχάρων, που ονομάζονται οπίνες.

Οι οπίνες παράγονται από τα καρκινικά κύτταρα του κορονωτού κάλλου και σχηματίζονται με τη συμπύκνωση αμινοξέων με σάκχαρα ή κετονοξέα. Ο τύπος της οπίνης που παράγεται από τα κύτταρα του κορονωτού κάλλου προκαθορίζεται από το στέλεχος του βακτηρίου και όχι από τα φυτά.

Σήμερα, είναι γνωστές τρεις κύριες ομάδες ογκογενετικών πλασμιδίων T_i:

- Το πλασμίδιο T_i της οκτοπίνης
- Το πλασμίδιο T_i της νοπαλίνης και
- Το πλασμίδιο T_i της αγροπίνης

Γενικά, τα βακτήρια επάγουν τη σύνθεση των οπινών χρησιμοποιώντας τον λειτουργικό μηχανισμό των φυτικών κυττάρων. Τα *Agrobacterium* από τη μεριά τους χρησιμοποιούν αυτά τα παράγωγα αμινοξέων σαν πηγή άνθρακα και αζώτου για τη θρέψη τους. Έτσι, τα βακτήρια που χρησιμοποιούν οκτοπίνη επάγουν όγκους που συνθέτουν οκτοπίνη, ενώ αυτά που καταβολίζουν νοπαλίνη επάγουν όγκους που συνθέτουν νοπαλίνη. (Χατζόπουλος, 2001)

Τα προϊόντα που απαιτούνται για τον καταβολισμό των οπινών, κωδικοποιούνται από γονίδια τα οποία εδράζουν στα αντίστοιχα πλασμίδια T_i. Τα *Agrobacterium* απαιτούν οπίνες για την ανάπτυξή τους, τις οποίες δεν είναι σε θέση να συνθέσουν. Αντί αυτού, μολύνουν ευπαθή, δικότυλα φυτά και μεταφέρουν μέρος του πλασμιδίου T_i μέσα στο φυτικό κύτταρο. Έτσι επάγουν τον πολλαπλασιασμό των φυτικών κυττάρων και τη δημιουργία κορονωτού κάλλου. Το τμήμα αυτό του πλασμιδίου T_i, που μεταφέρεται στο φυτικό κύτταρο φέρει επίσης τις ιδιότητες που απαιτούνται για τη βιοσύνθεση των ασυνήθων αμινοξέων στο μολυσμένο κύτταρο. (Zhu *et al.*, 2000)

A.1.6 Αλληλεπιδράσεις *Agrobacterium* - φυτικού κυττάρου

Οι αλληλεπιδράσεις του *Agrobacterium* με το φυτικό κύτταρο είναι το μόνο γνωστό παράδειγμα στη φύση όπου συμβαίνει μεταφορά του DNA μεταξύ δύο βασιλείων (βακτήρια-φυτά). Κατά τη διεργασία αυτή μεταφέρεται DNA από το *Agrobacterium* άγριου τύπου στο πυρηνικό γονιδίωμα του φυτικού κυττάρου. Η μεταφορά των ονομαζόμενων ογκογενετικών γονιδίων από το *Agrobacterium* στο φυτό, δημιουργεί τη μοριακή βάση της επαγωγής του κορονωτού κάλλου και την ανάπτυξη της τεχνολογίας του ανασυνδιασμού του DNA στα φυτά, καθώς και τη δημιουργία διαγονιδιακών φυτών. (Χατζόπουλος, 2001)

A.1.7 Γενετικός αποικισμός

Η διαδικασία επαγωγής του κορονωτού κάλλου διακρίνεται σε ένα μεγάλο αριθμό ευδιάκριτων και ουσιαστικών σταδίων. Πρώτα, είναι απαραίτητος ο τραυματισμός του φυτού για να επιτραπεί η είσοδος των βακτηρίων, ώστε να γίνουν προσιτά τα συστατικά του φυτού που επάγουν το σύστημα της τοξικότητας του βακτηρίου. Τα βακτήρια πολλαπλασιάζονται μέσα στον τραυματισμένο χυμό και

προσκολλώνται στα τοιχώματα των κυττάρων των φυτών. Στη συνέχεια, γίνεται η μεταφορά και η έκφραση του T-DNA μέσα στο κύτταρο του φυτού, πριν αυτό ενσωματωθεί στο χρωμοσωμικό DNA του φυτού. Αφού, όμως, ενσωματωθεί, η έκφρασή του διατηρείται σε ιδιαίτερα σταθερό επίπεδο, που εξαρτάται από τη θέση της ενσωμάτωσης και άλλους παράγοντες. Ύστερα από κάποιο χρονικό διάστημα, αναπτύσσεται ο όγκος, λόγω της αλόγιστης κυτταρικής διαίρεσης, που διεγείρεται από την συνεχή παραγωγή της αυξίνης και της κυτοκινίνης, μέσω των ενζύμων που κωδικοποιούνται από τα γονίδια που βρίσκονται στο T-DNA.

Ο όγκος που προκύπτει αποτελείται από ένα μίγμα μετασχηματισμένων (που περιέχουν T-DNA) και κανονικών φυτικών κυττάρων. Τα κύτταρα που περιέχουν T-DNA παράγουν και εκκρίνουν οπίνες που καταναλώνονται μόνο από τα μολυσματικά βακτήρια. Τα γονίδια του καταβολισμού των οπινών βρίσκονται πάνω στα πλασμίδια T_i και έξω από την περιοχή T-DNA. Μία οπίνη μπορεί να ενεργεί, όχι μόνο σαν επαγωγέας των γονιδίων που κωδικοποιούν τον καταβολισμό της, αλλά και σαν αφοροδισιακό για να δραστηριοποιήσει το συζευκτικό σύστημα μεταφοράς του πλασμιδίου T_i από ένα πθογόνο βακτήριο σε ένα μη παθογόνο βακτήριο. Αυτός, άλλωστε, είναι και ο λόγος που τα πλασμίδια T_i είναι τόσο ευρέως διαδεδομένα μέσα στους βακτηριακούς πληθυσμούς, στους όγκους των φυτών. Τα μετασχηματισμένα φυτικά κύτταρα επάγονται για συνεχή κυτταροδιαίρεση και παραγωγή ιδιαίτερων συστατικών, όπως οπίνες, που δημιουργούν μια οικολογική φωλιά για το *Agrobacterium*. Έτσι, επειδή μόνο τα *Agrobacterium* επωφελούνται από τον καταβολισμό των υπερπαραγόμενων οπινών, η διαδικασία αυτή έχει ονομαστεί γενετικός αποικισμός. (Χατζόπουλος, 2001)

A.1.8 Αλληλοαναγνώριση βακτηρίου - φυτικού κυττάρου

Το *Agrobacterium* συνήθως βρίσκεται στην περιοχή της ριζόσφαιρας όπου εκεί επιβιώνει με τη χρησιμοποίηση των θρεπτικών ουσιών που διαρρέουν από τους ιστούς της ρίζας. Η μόλυνση συμβαίνει σε τραυματισμένους ιστούς. Στη φύση, τα κύτταρα του *Agrobacterium* κινούνται στις θέσεις τραύματος λόγω χημειόταξης. Η απόκριση αυτή του *Agrobacterium* γίνεται, μερικώς, λόγω της ελευθέρωσης των σακχάρων από τους τραυματισμένους ιστούς του φυτού.

Η σύνδεση του *Agrobacterium* με τα φυτικά κύτταρα είναι προαπαιτούμενη για τη μεταφορά του DNA. Η αναγνώριση και η σύνδεση του *Agrobacterium* στο κύτταρο του φυτού γίνεται σε δύο στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο το βακτήριο συνδέεται χαλαρά με την επιφάνεια του κυττάρου, ενώ κατά το δεύτερο στάδιο τα συνδεδεμένα βακτήρια συνθέτουν ινίδια κυτταρίνης, που σταθεροποιούν πλέον την αρχική σύνδεση. (Χατζόπουλος, 2001)

A.1.9 Ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων της τοξικότητας.

Τα υπαίτια γονίδια για τη μεταφορά του T-DNA από το *Agrobacterium* στο φυτό-ξενιστή, βρίσκονται σε μία περιοχή που ονομάζεται περιοχή τοξικότητας vir. Η περιοχή αυτή βρίσκεται έξω από το T-DNA, αλλά μέσα στο T_i πλασμίδιο. Τουλάχιστον 6 οπερόνια, τα επωνομαζόμενα virA, vir B, vir C, vir D, vir E και vir G κωδικοποιούν για πρωτεΐνες με σημαντικές λειτουργίες για τη μεταφορά του T-DNA (Stachel and Nester, 1986).

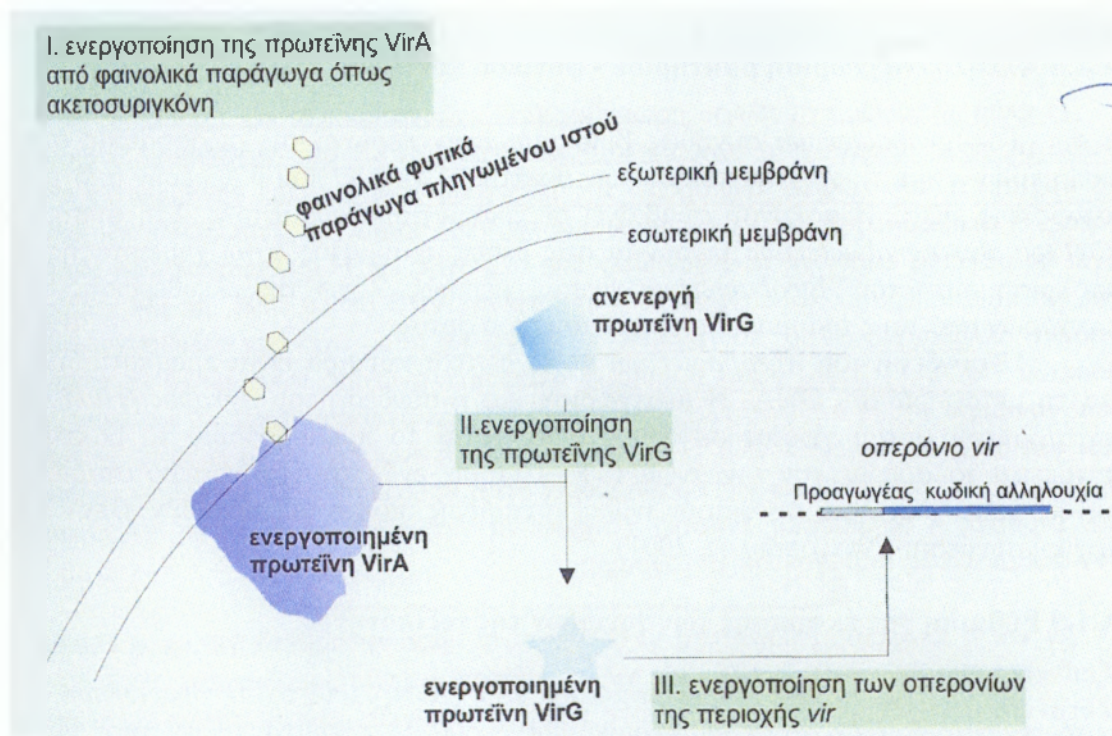
Το *Agrobacterium* για να ρυθμίσει τη μόλυνση των φυτών, εμπλέκει, για τη μεταγωγή του σήματος, ένα ρυθμιστικό σύστημα δύο συστατικών αποτελούμενο από τις πρωτεΐνες τοξικότητας virA και virG. Κατά την παθητική ανάπτυξη του

βακτηρίου μεταγράφονται μόνο τα γονίδια *virA* και *virG*. Στα πρώτα στάδια της επαγωγής του κορονωτού κάλλου, ενεργοποιείται η συνεργιστική δραστηριοποίηση των γονιδίων του συστήματος της τοξικότητας (*vir*), μόνο όταν τα βακτήρια είναι κοντά σε πληγωμένους φυτικούς ιστούς και αντιλαμβάνονται τους εκλυόμενους παράγοντες του φυτικού κυττάρου. Εκτός των δύο οπερονίων που αναφέραμε, τα υπόλοιπα οπερόνια, μέχρι το σημείο αυτό, είναι σιωπηλά και επάγονται από προκαθορισμένους φυτικούς παράγοντες, όπως τα φαινολικά παράγωγα της ακετοσυριγκόνης, με τη διαμεσολάβηση των προϊόντων των γονιδίων *virA* και *virG*.

Η ακετοσυριγκόνη πέρα από συστατικό χημειόταξης παίζει σπουδαίο ρόλο στη διαδικασία μόλυνσης, επειδή σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ενεργοποιεί τα υπόλοιπα γονίδια της περιοχής τοξικότητας. Έτσι, το βακτήριο λόγω της μικρής συγκέντρωσης της ακετοσυριγκόνης, προσελκύεται χημειοτακτικά από την πληγή. Καθώς όμως οδεύει προς την πληγή, η συγκέντρωση της ακετοσυριγκόνης αυξάνει, με συνέπεια την επαγωγή των γονιδίων της τοξικότητας της περιοχής *vir*. Τα γονίδια αυτά συντονίζουν τη διαδικασία της μόλυνσης.

Τα συστατικά αυτά απελευθερώνονται από τους φυτικούς ιστούς, ιδίως όταν αυτοί έχουν τραυματιστεί, ενώ είναι γνωστό ότι είναι προαπαιτούμενα για την ογκογένεση μέσω *Agrobacterium*. Υπάρχουν άλλα μονοκυκλικά φαινολικά παράγωγα που μπορούν να δράσουν σαν επαγωγείς, συμπεριλαμβανομένων και των πρόδρομων μορφών λιγνίνης, όπως και μερικών πρόδρομων φλαβονοειδών. (Χατζόπουλος, 2001)

A.1.10 Περιοχή τοξικότητας *vir*



Εικόνα A.2

Στο πρώτο στάδιο ενεργοποιείται η πρωτεΐνη *virA* από τα φαινολικά φυτικά παράγωγα του πληγωμένου ιστού. Η μετάδοση του σήματος γίνεται από τη φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη *virA*, η οποία μεταφέρει *in vitro* το φώσφορο της σε ένα συντηρητικό αμινοξύ της πρωτεΐνης *virG*. Έτσι, πραγματοποιείται η μεταφορά του

μηνύματος από το εξωτερικό περιβάλλον στο εσωτερικό του βακτηρίου και η ενεργοποίηση του συστήματος τοξικότητας του *Agrobacterium* (Εικόνα Α.2).

Η φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη virG ενεργοποιείται και μπορεί να συνδεθεί με τους προαγωγείς των υπόλοιπων οπερονίων vir του πλασμιδίου T_i, ώστε να αρχίσει η αλυσιδωτή αντίδραση της μεταγραφής όλων των γονιδίων τοξικότητας (Εικόνα Α.2).

Μετά την επαγωγή του συστήματος των οπερονίων της περιοχής τοξικότητας vir, εντοπίζονται στο *Agrobacterium* μονόκλιωνα (single-strand) μόρια που αντιπροσωπεύουν την κάτω αλυσίδα του T-DNA, ενώ με μικρότερη συχνότητα μπορούν να εντοπιστούν και δίκλιωνα (double-strand) μόρια. Ο σχηματισμός των μονόκλωνων και των δίκλωνων μορίων εξαρτάται από τη δραστηριότητα δύο πρωτεϊνών που ονομάζονται virD1 και virD2 και που κωδικοποιούνται από το οπερόνιο virD της περιοχής vir. Οι πρωτεΐνες αυτές μαζί συνιστούν μία ενδονουκλεολυτική δράση, ικανή για μονόκλωνη εγκοπή στα επαναλαμβανόμενα συνοριακά σε συγκεκριμένες και ακριβείς θέσεις. Τέτοιες εγκοπές δημιουργούνται από διάφορες ενδονουκλεάσες που κόβουν σε οποιοδήποτε σημείο μέσα ή έξω από την περιοχή T-DNA (Εικόνα Α.3).

Έχει παρατηρηθεί ότι η έλλειψη του αριστερού συνοριακού οδηγεί σε κάπως μικρότερη συχνότητα μεταφοράς, ενώ η έλλειψη του δεξιού συνοριακού παρεμποδίζει, σχεδόν πλήρως, τη μεταφορά του T-DNA. Αυτή η πολικότητα έχει μεγάλη σημασία στη σύνθεση της νέας αλυσίδας κατά την εκτόπιση από το δεξιό προς το αριστερό συνοριακό, αφού η απουσία του δεξιού μπορεί να είναι θνησιγόνος για το σύστημα. Η πολικότητα αυτή δεν οφείλεται στη διαφορά της αλληλουχίας των συνοριακών, αλλά μάλλον στην ύπαρξη κάποιου ενισχυτή δίπλα στο δεξιό συνοριακό. (Zhu *et al.*, 2000)

Η πρωτεΐνη virC1 λειτουργεί σαν παράγοντας *trans* και συνδέεται ειδικά με την αλληλουχία του ενισχυτή.

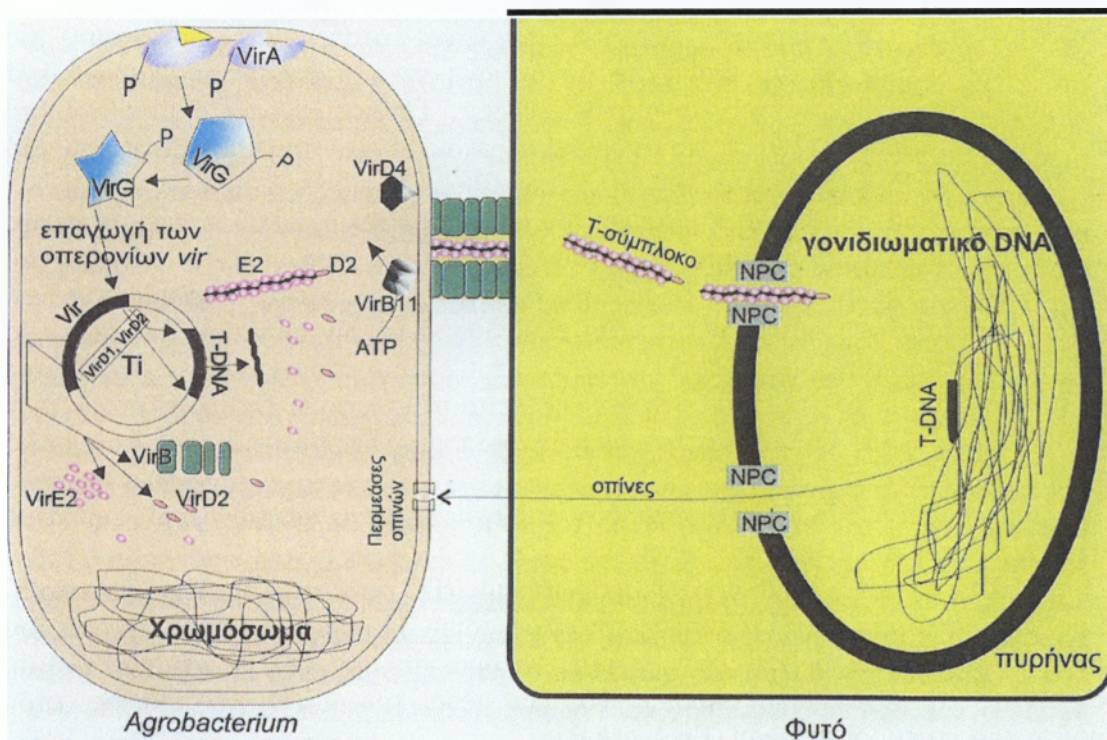
Μετά τη μονόκλωνη εγκοπή, η πρωτεΐνη virD2 συνδέεται ομοιοπολικά στο 5' άκρο της υπόλοιπης κάτω αλυσίδας του πλασμιδίου T_i στη μονόκλωνη εγκοπή του αριστερού συνοριακού. Επιπλέον, μπορεί να δρα και σαν κατευθυντήρια δύναμη, οδηγώντας τη μονόκλωνη αλυσίδα T_a, δια μέσω του κυτταροπλάσματος, στον πυρήνα του κυττάρου-στόχου (Εικόνα Α.3).

Η πρωτεΐνη virE2, που κωδικοποιείται από το δεύτερο ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο του οπερονίου virE, είναι μια πρωτεΐνη που συνδέεται με ssDNA μόρια κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να είναι δυνατό να περικλείει τη μονόκλωνη αλυσίδα T και να σχηματίζει ένα λεπτό νημάτιο νουκλεο-πρωτεΐνης *in vitro*. Ενδεχομένως, όπως και η πρωτεΐνη virD2, έτσι και η virE2 να λειτουργεί σαν κατευθυντήρια δύναμη για τη μεταφορά το μονόκλωνου τμήματος, δια μέσω του βακτηρίου, στο φυτικό κύτταρο και τελικά στον πυρήνα (Εικόνα Α.3).

Η διακυτταρική μεταφορά του DNA απαιτεί την απ' ευθείας δίοδο μεταξύ των κυττάρων του δότη και του δέκτη. Έτσι, πιστεύεται ότι το *Agrobacterium* σχηματίζει κάποιο κανάλι, μέσω του οποίου μεταφέρονται τα σύμπλοκα T στο κυτταρόπλασμα του φυτικού κυττάρου. Η ανάλυση της αλληλουχίας του DNA του οπερονίου virB, του πλασμιδίου T_i, έδειξε ότι περιέχει ένα πολύπλοκο οπερόνιο αποτελούμενο από 11 γονίδια. Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια αυτά φαίνεται να κωδικοποιούν, με τη σειρά τους, πολυπεπίδια των οποίων οι φυσικοχημικές ιδιότητες μοιάζουν με αυτές των πρωτεϊνών που υπεισέρχονται στη συγκρότηση της μεμβράνης των κυττάρων. Όλες αυτές οι πρωτεΐνες μαζί, πιθανώς να συνιστούν κάποιο συζευκτικό πόρο, μέσω του οποίου μεταφέρεται το T-DNA από το βακτήριο στο φυτικό κύτταρο. (Χατζόπουλος, 2001)

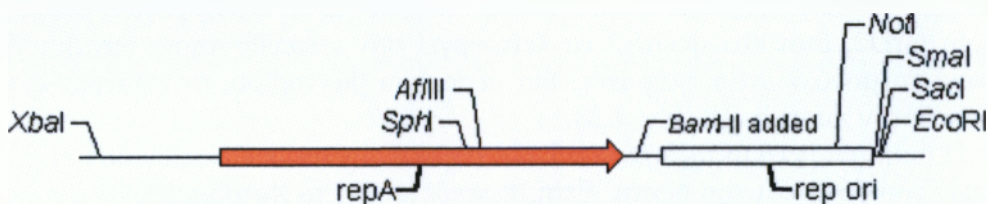
Εκτός από τα γονίδια τοξικότητας *vir*, που βρίσκονται έξω από το T-DNA, υπάρχουν και δύο τύποι γονιδίων που βρίσκονται μέσα στο T-DNA. Αυτά είναι τα ογκοεπαγωγικά γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν για ένζυμα που σχετίζονται με τη σύνθεση αυξινών και κυτοκινινών και είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό κάλλου, καθώς και τα γονίδια που κωδικοποιούν για τη σύνθεση των οπινών. (de la Riva *et al.*, 1998)

Εκτός των συνοριακών του T-DNA, εντοπίζονται ακόμη τα υπεύθυνα γονίδια για τον καταβολισμό των οπινών, τα γονίδια που εμπλέκονται στη μεταφορά του T-DNA από το βακτήριο στο φυτό και τα γονίδια που σχετίζονται με τη συζευκτική μεταφορά μεταξύ βακτηρίων. (de la Riva *et al.*, 1998)



Εικόνα A.3

A.1.11 Αρχή αντιγραφής του T-DNA



Εικόνα A.4

Τα γονίδια που εμπλέκονται στη διαδικασία της αντιγραφής του DNA ονομάζονται γονίδια *rep* (replication genes). Αν και μονάχα το γονίδιο *repC* συνδέεται άμεσα με την αρχή της αντιγραφής, ωστόσο και τα γονίδια *repA* (Εικόνα A.4) και *repB* είναι εξίσου απαραίτητα για τη σταθερή πλασμιδιακή κληρονομικότητα. Δηλαδή, τα γονίδια αυτά διασφαλίζουν ότι κάθε θυγατρικό κύτταρο κληρονομεί τουλάχιστον ένα πλασμιδιακό αντίγραφο κατά την κυτταρική διαίρεση.

A.1.12 Διαβακτηριακή σύζευξη του T_i πλασμιδίου

Το T_i πλασμίδιο της οκτοπίνης περιέχει ένα ολοκληρωμένο σύστημα συζευκτικής μεταφοράς προκειμένου να επιτευχθεί σύζευξη μεταξύ των βακτηρίων. Τα γονίδια που εμπλέκονται στη συζευκτική μεταφορά είναι τα γονίδια *tra*, που απαιτούνται πιθανότατα για τη μεταφορά και μεταγραφή του DNA και τα γονίδια *trb* που βοηθούν στο σχηματισμό ζευγών και καθοδηγούν τη σύνθεση συζευκτικών μαστιγίων. (Zhu *et al.*, 2000)

A.1.13 Σύνδεση περιοχών *vir* και T-DNA

Τα τρία συστατικά που είναι αναγκαία για τη μεταφορά του T-DNA ή οποιουδήποτε DNA μέσω του συστήματος του *Agrobacterium* είναι:

- Τα συνοριακά και ιδίως το δεξί
- Τα γονίδια τοξικότητας της περιοχής *vir*
- Τα γονίδια *chv* πάνω στο χρωμόσωμα του *Agrobacterium*

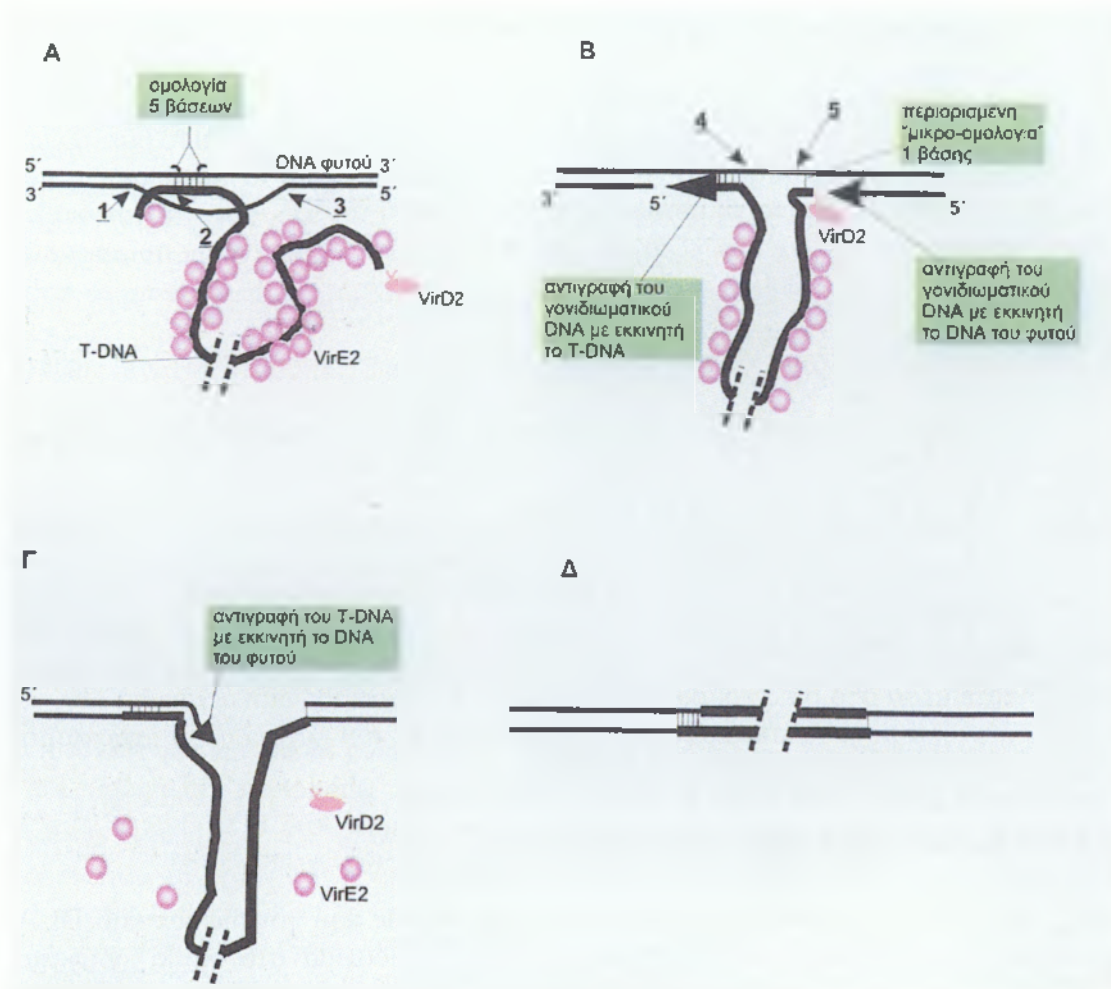
Το T-DNA δεν χρειάζεται να είναι φυσικά συνδεδεμένο με την περιοχή *vir* πάνω στο ίδιο πλασμίδιο. Όμως, η πολυγονιδιακή περιοχή *vir* πρέπει να διατηρείται οπωσδήποτε μέσα στο βακτηριακό κύτταρο μαζί με τα χρωμοσωμικά γονίδια *chv*, για να μπορούν όλα μαζί να συνεισφέρουν στη δημιουργία του κατάλληλου μηχανισμού μεταφοράς του T-DNA. (Χατζόπουλος, 2001)

A.1.14 Μοντέλο ένθεσης του T-DNA στο φυτό

Η ένθεση του T-DNA γίνεται σε τυχαίες θέσεις του γονιδιωματικού DNA, χωρίς να υπάρχει καμία προτίμηση ως προς το χρωμόσωμα στο οποίο εισάγεται. Ωστόσο, μέσα στο χρωμόσωμα, οι ενθέσεις γίνονται σε περιοχές με έντονη μεταγραφική δραστηριότητα, δηλαδή περιοχές του DNA που βρίσκονται παροδικά σε μονόκλωνη διαμόρφωση.

Η ασυμμετρία των ανασυνδιασμών και ο βαθμός ομολογίας του αριστερού και δεξιού συνοριακού του T-DNA με το γονιδιωματικό DNA του φυτού υποδηλώνει ότι τα δύο άκρα ενσωματώνονται με διαφορετικό τρόπο. Ο ανασυνδιασμός του αριστερού 3' άκρου φαίνεται να γίνεται δια μέσω μιας μικρής ομολογίας βάσεων και είναι ένα τυπικό παράδειγμα μη κανονικού ανασυνδιασμού. Αντίθετα, ο ανασυνδιασμός του δεξιού 5' συνοριακού, όπου η ομολογία περιορίζεται σε μία μόνο βάση, δηλώνει έναν εξειδικευμένο τρόπο ενσωμάτωσης.

Η σύναψη μεταξύ του T-DNA και του γονιδιωματικού DNA του φυτού ξεκινά από το 3' άκρο του μονόκλωνου T-DNA (Εικόνα A.5). Το 3' άκρο ή και οι γειτονικές ακολουθίες του μονόκλωνου T-DNA αποκαλύπτουν μικρές περιοχές συμπληρωματικότητας με το γονιδιωματικό DNA, όταν αυτό βρίσκεται σε παροδική μονόκλωνη διαμόρφωση. Αναγκαστικά, εκτοπίζεται η μία από τις δύο αλυσίδες του χρωμοσωμικού DNA, με αποτέλεσμα η αλυσίδα αυτή να υπόκειται σε ενδονουκλεολυτική πέψη, στα άκρα του μονόκλωνου τμήματος (σημεία 1,3). Όταν υπάρχουν επιπλέον βάσεις στο 3' άκρο του μονόκλωνου T-DNA, κόβονται είτε με εξωνουκλεολυτική είτε με ενδονουκλεολυτική δράση (σημείο 2).



Εικόνα Α.5

Το 5' άκρο της μονόκλωνης αλυσίδας T, που συνδέεται με την πρωτεΐνη virD2, σχηματίζει υδρογονικούς δεσμούς με την ίδια μονόκλωνη αλυσίδα του χρωμοσωμικού DNA, στην περιοχή μικρο-ομολογίας. Η ένωση του τελικού νουκλεοτιδίου με το DNA του φυτού γίνεται με την προβολή του υψηλά ενεργειακού δεσμού της φωσφοτυροσίνης στο 3' άκρο του γονιδιωματικού DNA του φυτού. Το 5' άκρο του T-DNA δύναται να ενωθεί, με την αντίδραση της λιγάσης, με το γονιδιωματικό DNA. Η ενέργεια που χρειάζεται για την αντίδραση της λιγάσης, παρέχεται από τον - υψηλής ενέργειας - δεσμό της φωσφοτυροσίνης.

Το 3' άκρο του μονόκλωνου T-DNA χρησιμοποιεί το ελεύθερο υδροξύλιό του σαν εκκινήτη για την αντιγραφή της συμπληρωματικής αλυσίδας. Η πάνω αλυσίδα του DNA του φυτού κόβεται με διπλή εγκοπή (σημεία 4,5), ενώ το 3' ελεύθερο υδροξύλιο χρησιμοποιείται ξανά σαν εκκινήτης για την αντιγραφή του μονόκλωνου T-DNA, χρησιμοποιώντας το διορθωτικό μηχανισμό. Οι βάσεις του γονιδιωματικού DNA του φυτού που βρίσκονται ανάμεσα στις δύο εγκοπές είναι οι ελλείψεις που παρατηρούνται συνήθως στο σημείο ενσωμάτωσης του T-DNA, αφού αναγκαστικά χάνονται.

Τελικά το T-DNA ενσωματώνεται και συνδέεται ομοιοπολικά μέσα στο γονιδιωματικό DNA του φυτού και αποτελεί αναπόσπαστο τμήμα του, το οποίο κληρονομείται με τους νόμους του Mendel. (Χατζόπουλος, 2001)

A.1.15 Ταυτοποίηση διαγονιδιακών φυτών

Το DNA από μόνο του δεν έχει κανένα αποτέλεσμα στην αποδοτικότητα της μεταφοράς και της ένθεσης. Έτσι, μη-ογκογενετικά πλασμίδια T_i, όπου το μεγαλύτερο ποσοστό της εσωτερικής αλληλουχίας του T-DNA έχει αντικατασταθεί με DNA που μας ενδιαφέρει, χρησιμοποιούνται ευρέως σαν φορείς για γενετικό μετασχηματισμό και δημιουργία διαγονιδιακών φυτών. Το πρότυπο ένθεσης είναι γενικά αρκετά απλούστερο, συγκρινόμενο με αυτό που προκύπτει κατά τη μεταφορά γυμνού DNA. Το ένθετο τμήμα αποτελείται από ένα πολύ καθορισμένο μονομερές του DNA που βρίσκεται ανάμεσα στα δύο συνοριακά.

Η πρώτη ταυτοποίηση των διαγονιδιακών φυτών γίνεται στα στάδια της επιλογής των μετασχηματισμένων εκφύτων από τα μη μετασχηματισμένα. Συνήθως, η επιλογή αυτή γίνεται με κάποιο αντιβιοτικό όπως καναμυκίνη, υδρομυκίνη και άλλα. Το T-DNA του πλασμιδίου T_i έχει αντικατασταθεί και εκτός των συνοριακών έχει ενσωματωθεί τουλάχιστον ένα γονίδιο ανθεκτικότητας με προαγωγείς και ληκτικές ακολουθίες που αναγνωρίζονται από τα φυτά. (Χατζόπουλος, 2001)

A.2 ΦΟΡΕΙΣ ΚΑΙ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΦΥΤΑ

A.2.1 Γενικά

Η φυσική ικανότητα του Αγροβακτηρίου να μεταφέρει καθορισμένα τμήματα του γενετικού του υλικού στο φυτικό γονιδίωμα έχει διερευνηθεί σε βάθος και προς την κατεύθυνση ανάπτυξης κατάλληλων, βελτιωμένων φορέων που να αυξάνουν την αποτελεσματικότητα αυτής της διαδικασίας. Η κατασκευή τέτοιων φορέων βασίζεται στις εξής αρχές :

- Η απομάκρυνση των *onc* γονιδίων δεν επηρεάζει ούτε τη μεταφορά, ούτε την ενσωμάτωση του T-DNA.
- Τα *vir* γονίδια είναι λειτουργικά και σε *trans* διάταξη.
- Τα μη ογκογονικά T-DNA που βρίσκονται σε αναγεννημένα φυτά, μεταβιβάζονται στους απογόνους με βάση τους νόμους του Mendel.

Η απομάκρυνση των *onc* γονιδίων σημαίνει ότι οι μετασχηματισμένοι ιστοί δεν αναγνωρίζονται πλέον σαν νεοπλασματικά εξογκώματα, που επιλέγονται με βάση την ανάπτυξή τους σε θρεπτικά υλικά χωρίς φυτορμόνες. Σε αντικατάσταση αυτού του συστήματος επιλογής, τοποθετήθηκαν υπό τον έλεγχο προαγωγέων και μηνυμάτων πολύ-αδενυλίωσης του T-DNA, βακτηριακά γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Έτσι, δημιουργήθηκαν πλασμιδιακοί φορείς, οι οποίοι να διασφαλίζουν ότι μετά τη μεταφορά του T-DNA, η αναπτυξιακή πορεία των φυτών θα είναι κανονική. (Helens *et al.*, 2000)

Οι μη-ογκογονικοί φορείς που χρησιμοποιούνται σήμερα ευρύτατα, χωρίζονται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με το αν το T-DNA που περικλείεται ανάμεσα στις επαναλαμβανόμενες ακολουθίες των 25 bp, βρίσκεται στο ίδιο ή σε διαφορετικά ρεπλικόνια. Στην πρώτη περίπτωση, χαρακτηρίζονται σαν *cis*-φορείς (co-integrative vectors) και στη δεύτερη σαν *trans*-φορείς (binary vectors). Τα κυριότερα χαρακτηριστικά τους περιγράφονται παρακάτω. (Helens *et al.*, 2000)

A.2.2 *Cis*-φορείς (συνεισερχόμενοι φορείς) των *A.tumefaciens* και *A.rhizogenes*.

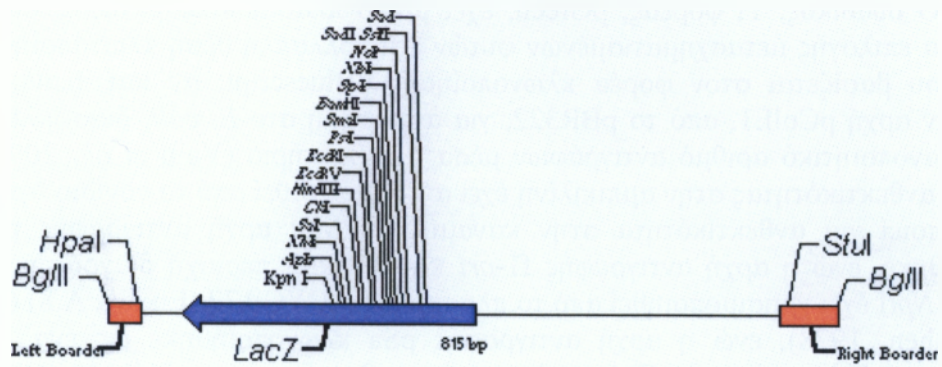
Στους συνεισερχόμενους φορείς, που βασίζονται στο Ti πλασμίδιο του *A.tumefaciens*, τα *onc* γονίδια του T-DNA έχουν αντικατασταθεί με ένα συγκεκριμένο τμήμα DNA, που είναι ομόλογο με μια περιοχή ενός ενδιάμεσου φορέα κλωνοποίησης, ο οποίος μπορεί να διπλασιάζεται μόνο στο *E.coli*. Στον ενδιάμεσο φορέα κλωνοποιείται ένα επιθυμητό τμήμα DNA, το οποίο στη συνέχεια μεταφέρεται και ενσωματώνεται στο Ti πλασμίδιο με ανασυνδιασμό, ανάμεσα στις ομόλογες περιοχές των δύο φορέων. Συνήθως, οι ενδιάμεσοι φορείς διαθέτουν μοναδικές θέσεις πολλαπλής κλωνοποίησης και κάποιο γονίδιο δείκτη, που εκφράζεται στα μετασχηματισμένα φυτικά κύτταρα. Η μεταφορά του στο *A.tumefaciens* επιτυγχάνεται με βακτηριακή σύζευξη και τα στελέχη εκείνα στα οποία έχει ενσωματωθεί το “ξένο” DNA μέσα στο T-DNA, μέσω του ομόλογου ανασυνδιασμού, απομονώνονται με βάση την ανθεκτικότητά τους σε κάποιο αντιβιοτικό. Όποια κι αν είναι η θέση των επαναλαμβανόμενων ακολουθιών και των άκρων του T-DNA στους δύο φορείς, το τελικό αποτέλεσμα είναι η ενσωμάτωση του “ξένου” DNA ανάμεσα στις ακραίες ακολουθίες του T-DNA. Στελέχη του *A.tumefaciens* που περιέχουν τέτοιες κατασκευές μεταφέρονται στο φυτικό γένωμα με την *cis* δράση των *vir* γονιδίων. (Ρούσσης, 1996; Helens *et al.*, 2000)

Ανάλογη μεθοδολογία ακολουθείται και για τους *cis*-φορείς του *A.rhizogenes*. Ο ενδιάμεσος πλασμιδιακός φορέας σε αυτή την περίπτωση περιέχει μια περιοχή του T-DNA του Ri πλασμιδίου. Η εισαγωγή αυτού του φορέα στο *A.rhizogenes* καταλήγει στη σταθεροποίηση των αλληλουχιών του ενδιάμεσου φορέα στο Ri πλασμίδιο, πάλι μέσω ομόλογου ανασυνδιασμού. (Jensen *et al.*, 1986)

A.2.3 *Trans*-φορείς (δυναμικό σύστημα μεταφοράς) των *A.tumefaciens* και *A.rhizogenes*.

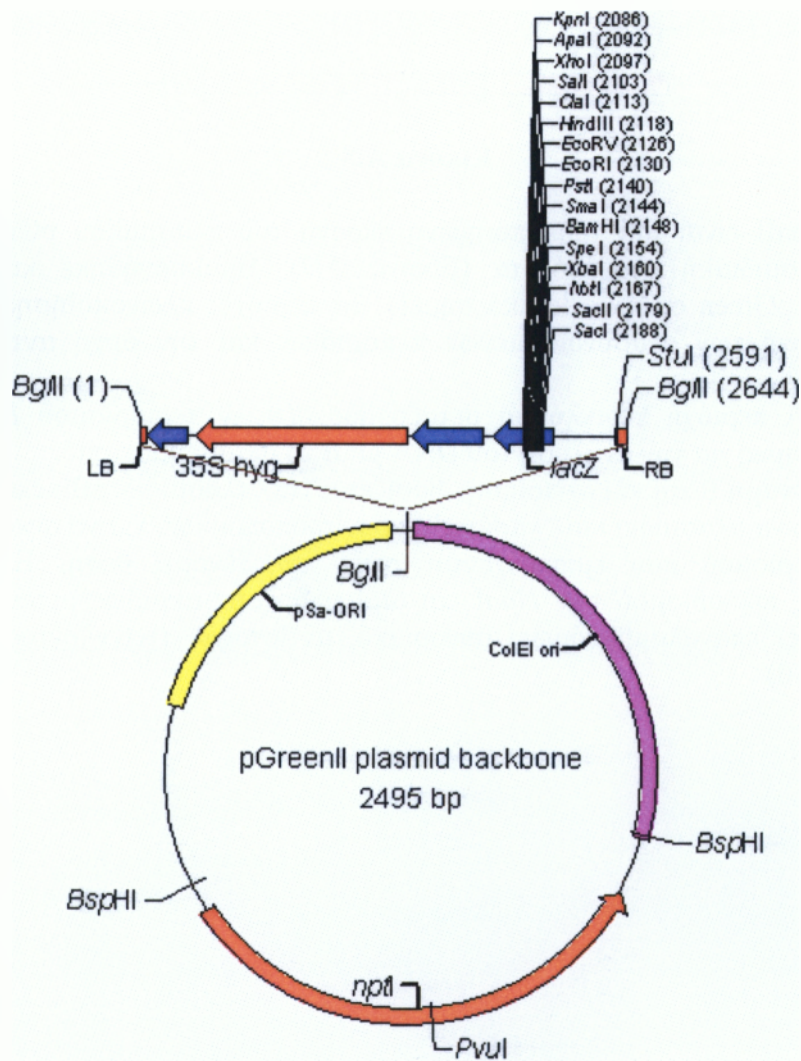
Το δυναμικό σύστημα βασίζεται στο γεγονός ότι η *vir* περιοχή, αν και απαιτείται για τη μεταφορά της περιοχής του T-DNA, δεν χρειάζεται να είναι φυσικά συνδεδεμένη με το T-DNA. Έτσι, αποφεύγοντας όλους τους χειρισμούς που απαιτούν τη χρήση ενδιάμεσων φορέων, αναπτύχθηκαν συστήματα δύο πλασμιδίων, στα οποία το ένα πλασμίδιο (Ti) να εφοδιάζει μόνο τις *vir* λειτουργίες και το άλλο, ο φορέας μεταφοράς, να παρέχει τους δείκτες επιλογής ή ξένα γονίδια, περιβαλλόμενα μόνο από τα T-DNA συνοριακά. Το δυναμικό σύστημα χαρακτηρίζεται από δύο πλασμίδια που συνυπάρχουν ανεξάρτητα και αυτόνομα μέσα στο *Agrobacterium*. Το πλασμίδιο Ti, εκτός από τα γονίδια τοξικότητας *vir*, περιέχει και μία αρχή αντιγραφής (*oriA*), αλλά δεν περιέχει τα T-DNA επαναλαμβανόμενα συνοριακά.

Ένας άλλος τύπος δυναμικών φορέων είναι τα πλασμίδια τύπου pGreen. Τα πλασμίδια αυτά είναι μικρά και έτσι μπορούν να μεταφέρουν και να ενσωματώσουν μεγάλα τμήματα DNA στο φυτικό γονιδίωμα. Εκτός από το βοηθητικό πλασμίδιο Ti, πρέπει να εισαχθούν στο *Agrobacterium* δύο άλλα πλασμίδια. Το pGreen, το οποίο περιέχει τα δύο συνοριακά και μια πολυδύναμη θέση επιλογής ανασυνδιασμένων πλασμιδίων (Εικόνα Α.6) και το pJITs-Rep, το οποίο παρέχει τα αναγκαία συστατικά για την αντιγραφή του pGreen μέσα στο *Agrobacterium*. (Ρούσσης, 1996; Χατζόπουλος, 2001)



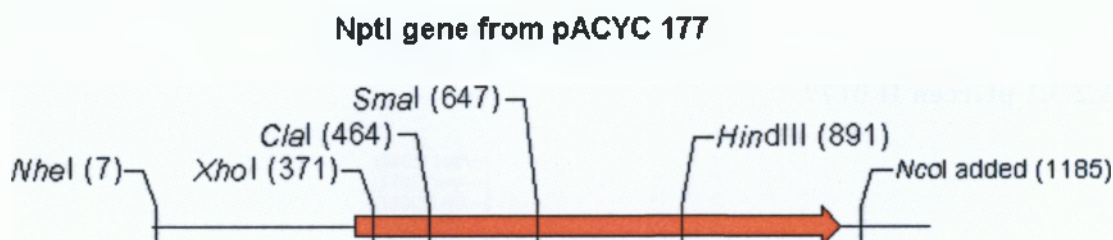
Εικόνα A.6

A.2.3.1_pGreen II 0179



Εικόνα A.7

Ο δυαδικός, T_i φορέας, pGreen, έχει μικρό πλασμιδιακό μέγεθος, ευέλικτο σύστημα επιλογής μετασχηματισμένων φυτών και πολλαπλή θέση κλωνοποίησης. Η δομή του βασίζεται στον φορέα κλωνοποίησης pBluescript, αν και περιέχει μία επιπλέον αρχή pColE1, από το pBR322, για αντιγραφή στο *E. coli*, διασφαλίζοντας έναν ικανοποιητικό αριθμό αντιγράφων μέσα στο βακτήριο (Vain *et al.*, 2003). Το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη έχει αντικατασταθεί από το γονίδιο *NptI*, που κωδικοποιεί για ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη. Μία αρχή αντιγραφής *pSa-ori* προστέθηκε, ενώ η αρχή αντιγραφής *f1-ori* και η *LacZ'* περιοχή διαγράφηκαν. Το γονίδιο *NptI* έχει χρησιμοποιηθεί από το πλασμίδιο pACYC 177 (Εικόνα A.8) (Chang and Cohen, 1978), ενώ η αρχή αντιγραφής *pSa* κλωνοποιήθηκε ως ένα μικρού μεγέθους (1,7kb) τμήμα *SauIII*A, από τον πλασμιδιακό φορέα pGV1122 (Okumura and Kado, 1992).



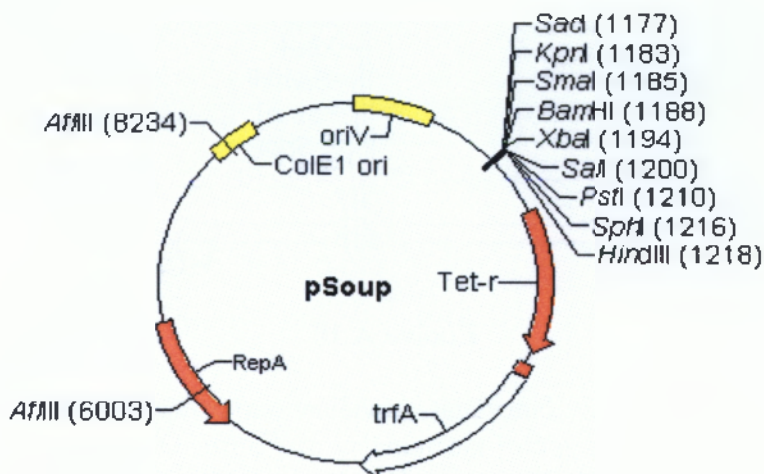
Εικόνα A.8

Το pGreenII είναι μια τροποποιημένη εκδοχή του πλασμιδίου pGreen, με βελτιωμένη πλασμιδιακή σταθερότητα (Εικόνα A.7) Δημιουργήθηκε κατά την αναβάθμιση του pGreen σε τρία βασικά σημεία: τις περιοχές κλωνοποίησης και T-DNA, την επιλογή των ανασυνδιασμένων πλασμιδίων και την αρχή αντιγραφής δυαδικών φορέων.

Η T-DNA περιοχή περικλύεται μεταξύ δύο θέσεων περιορισμού *Bgl*II, οι οποίες είναι χρήσιμες για την ανάλυση του DNA μετά το μετασχηματισμό.

Η πολυδύναμη θέση κλωνοποίησης βασίζεται στο πλασμίδιο pBluescript και όλα τα εμπλεκόμενα πλασμίδια και “κασέτες” έχουν τροποποιηθεί, για να αφαιρεθούν οι θέσεις περιορισμού που εμπεριέχονται στην πολυδύναμη θέση. Επιπλέον, μοναδικές θέσεις περιορισμού των *Hpa*I και *Stu*I υπάρχουν ακριβώς μέσα από το αριστερό και δεξί επαναλαμβανόμενο συνοριακό, αντίστοιχα. (www.pgreen.ac.uk; Helens *et al.*, 2000)

A.2.3.2 pSoup



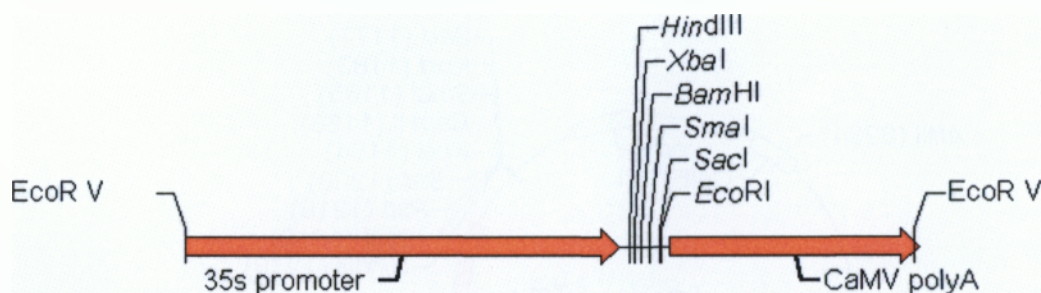
Εικόνα A.9

Για την αντιγραφή στο *Agrobacterium*, η pSa χρωμοσωμική θέση αντιγραφής χρησιμοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pGreen. Η αλληλούχιση του τμήματος *Sau3A*, του πλασμιδίου pGV1122, έδειξε ότι η θέση pSa, περιέχει μία αλληλουχία *ori* κι ένα *repA* γονίδιο αντιγραφής. Πειράματα έχουν αποδείξει ότι το pSa-RepA γονίδιο λειτουργεί *in trans* για την αρχή αλληλουχίας *ori* και ότι η παρουσία του δεν είναι απαραίτητη στον φορέα pGreen. Έτσι, εξοικονομείται αρκετός χώρος στο τελικό μέγεθος του φορέα. (Helens *et al.*, 2000)

Έτσι, το γονίδιο pSa-RepA υποκλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pBIN19, αντικαθιστώντας την T-DNA περιοχή. Επίσης, το γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη *NptII* αντικαταστάθηκε από το γονίδιο ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη, του πλασμιδίου pAlter. Έτσι, δημιουργήθηκε από το πλασμίδιο pBIN19, ο πλασμιδιακός φορέας pSoup (Εικόνα A.9). (www.pgreen.ac.uk; Chang and Cohen, 1978; Helens and Mullineaux, 2000)

A.2.3.3 Ο συστατικός προαγωγέας 35S

35S-CaMV cassette



Εικόνα A.10

Η εκφραστικότητα των διαφόρων γονιδίων επηρεάζεται άμεσα από τα ρυθμιστικά σιγιάλα και από τη χρήση κωδικονίων στα φυτά. Ο προαγωγέας είναι ο κύριος παράγοντας του εκφραστικού προτύπου των εισερχόμενων γονιδίων στα διαγονιδιακά φυτά. Ο συστατικός προαγωγέας είναι αυτός που προκαθορίζει την έκφραση του γονιδίου σε όλους, σχεδόν, τους ιστούς σε παραπλήσια επίπεδα, ανεξάρτητα από τα αναπτυξιακά ή περιβαλλοντικά σιγιάλα.

Τέτοιοι προαγωγείς χρησιμοποιούνται συνήθως για την έκφραση γονιδίων επιλογής. Το γενετικό υλικό του ιού του μωσαϊκού του καπνού CaMV είναι ένα κυκλικό, δίκλωνο μόριο DNA. Ο ισχυρός προαγωγέας που κατευθύνει την αντιγραφή του DNA μέσω μεταγραφής ενός ολόκληρου ενδιάμεσου RNA είναι ο προαγωγέας 35S (Εικόνα A.10). Είναι ο συχνότερα χρησιμοποιούμενος συστατικός προαγωγέας ετερόλογων γονιδίων σε διαγονιδιακά φυτά. Είναι πολύ δραστικός σε σχεδόν όλους τους ιστούς και κάλλους των δικότυλων φυτών, αλλά όχι τόσο πολύ στα μονοκότυλα. Παρά το γεγονός ότι θεωρείται συστατικός, ο προαγωγέας αυτό δεν εκφράζεται σε όλους τους ιστούς στα ίδια επίπεδα.

Άλλοι συστατικοί προαγωγείς είναι ο 19S, επίσης του ιού CaMV, καθώς και οι προαγωγείς που προέρχονται από το *Agrobacterium*, *nos* (συνθάση της νοπαλίνης), *ocs* (συνθάση της οκτοπίνης), *mas* (συνθάση της μανοπίνης). Όλοι οι παραπάνω προαγωγείς έχουν μικρότερη δραστικότητα από τον 35S. (Χατζόπουλος, 2001)

A.3 ΥΠΕΡ-ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΣΙΓΑΣΗ

Ο βασικός στόχος των σύγχρονων προγραμμάτων που σχετίζονται με το γονιδιωματικό DNA των φυτών είναι η ταυτοποίηση της βιολογικής σημασίας του κάθε γονιδίου ξεχωριστά. Σε ορισμένους οργανισμούς έχει επιτευχθεί η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος, παρέχοντας πολύτιμες πληροφορίες. Η ταυτοποίηση του ρόλου του κάθε γονιδίου γίνεται είτε με απευθείας πειράματα για το συγκεκριμένο γονίδιο, είτε συγκρίνοντάς το με ομόλογα γονίδια, γνωστής λειτουργικής σημασίας, σε άλλους οργανισμούς.

Όταν υπάρχουν βάσιμες ενδείξεις ότι μία λειτουργία ή μία ιδιότητα ενός φυτικού ιστού οφείλεται σε ένα συγκεκριμένο γονίδιο, τότε υπάρχουν δύο τρόποι να

αποδειχθεί αν όντως η πρόταση ισχύει. Ο ένας τρόπος είναι η υπέρ-έκφραση του ίδιου γονιδίου μέσα στο φυτό, ενώ ο άλλος είναι η παρεμπόδιση της έκφρασής του. Και στις δύο περιπτώσεις η πειραματική διαδικασία προϋποθέτει το μετασχηματισμό των φυτών με γονίδια που ανήκουν ήδη στο γονιδίωμά τους, αλλά και την προσθήκη γονιδίων επιλογής για την αναγνώριση των ανασυνδιασμένων κυττάρων.

Η υπέρ-έκφραση ενός γονιδίου πραγματοποιείται με την ενίσχυση του ήδη υπάρχοντος γονιδίου μέσα στο φυτικό γονιδίωμα, δηλαδή με την προσθήκη του γονιδίου αυτού περισσότερες φορές στο DNA του φυτού. Αυτό επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας κατάλληλους φορείς, στους οποίους να μπορούν να κλωνοποιηθούν τα ενισχυμένα τμήματα PCR, έτσι ώστε με τη βοήθεια του Αγροβακτηρίου να εισαχθούν στο φυτικό γονιδίωμα, ενώ με τη βοήθεια κατάλληλων προαγωγέων να υπέρ-εκφραστούν μέσα σε αυτό.

Με τη μέθοδο της έγχυσης ή της προσρόφησης του δίκλωνου μορίου RNA στους νηματώδεις πυροδοτείται μια εξειδικευμένη αποδόμηση του RNA, σε μια διαδικασία γνωστή ως RNA-interference (RNAi; Fire *et al.*, 1998). Αυτή η διαδικασία διευκολύνει τη στοχευμένη μεταγραφική γονιδιακή σίγαση (PTGS) (Wesley *et al.*, 2001).

Έχει ανακαλυφθεί ότι τα διαγονίδια (transgenes) που είναι σχεδιασμένα να εκφράζουν δίκλωνο ή μονόκλωνο RNA, που μπορεί να σχηματίσει δομή «φουρκέτας», έχουν παρόμοια επίδραση και στα φυτά (Wang and Waterhouse, 2000 ; Waterhouse *et al.*, 1998). Επίσης, σε δύο τουλάχιστον περιπτώσεις, σχεδόν το 100% των φυτών που μετασχηματίστηκαν με hairpin RNA το οποίο περιείχε ιντρόνια, παρουσίασαν γονιδιακή σίγαση (Smith *et al.*, 2000).

Η γονιδιακή σίγαση πραγματοποιείται με την κλωνοποίηση του συγκεκριμένου γονιδίου σε έναν κατάλληλο (ihrp-RNA) φορέα μέσα στον οποίο θα δημιουργεί sense και anti-sense άκρα. Ο φορέας p.Hannibal και ένας συγγενής φορέας, ο p.Kannibal, σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να μπορεί να εισαχθεί σε αυτούς ένα τμήμα PCR, στη μεν κωδική κατεύθυνση στη θέση *ClaI/KpnI/BamHI/XhoI* και στη δε αντικωδική κατεύθυνση στη θέση *ClaI/KpnI/BamHI/XhoI*. (Wesley *et al.*, 2001; Helliwell and Waterhouse, 2003)

Η εισαγωγή του τμήματος στο φορέα θα μπορούσε να επιτευχθεί είτε με δύο διαφορετικές αντιδράσεις PCR, είτε με μία αντίδραση στην οποία ο κάθε εκκινητής θα εισάγει δύο θέσεις περιορισμού. Το αποτέλεσμα θα έδινε ένα hrRNA με μία «λούπα» 30-50 bp, αναλόγως τις θέσεις περιορισμού που θα χρησιμοποιούνταν για να εισαχθεί η γονιδιακή αλληλουχία-στόχος.

Έπειτα από πειράματα που έγιναν σε κωδικές περιοχές που απομονώθηκαν από το φυτό *Arabidopsis thaliana*, αποδείχθηκε από τους Wesley *et al.*, (2001) ότι περισσότερο από το 90% των μετασχηματισμένων φυτών με το φορέα p.Hannibal παρουσίασαν γονιδιακή σίγαση, σε αντίθεση με τις άλλες μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν (co-suppression, anti-sense construct).

A.4 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΔΙΠΛΟΕΙΔΟΥΣ ΨΥΧΑΝΘΟΥΣ *LOTUS JAPONICUS*, ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΑΓΡΟΒΑΚΤΗΡΙΟΥ

A.4.1 Λίγα λόγια για το *Lotus japonicus*

Το φυτό *Lotus japonicus*, της οικογένειας των ψυχανθών, προτάθηκε από τους Kurt Handberg και Jens Stougaard, το 1992, ως κατάλληλο και αντιπροσωπευτικό του γένους του, για να χρησιμοποιηθεί σε πειράματα

μετασχηματισμού, μέσω του Αγροβακτηρίου, με σκοπό την μελέτη των μοριακών και βιοχημικών μονοπατιών των φυτών.

Είναι διπλοειδές, αυτογονιμοποιούμενο είδος, με βιολογικό κύκλο διάρκειας 3 μηνών περίπου. Το γονιδιώμα του είναι οργανωμένο σε 6 χρωμοσώματα και το μέγεθος του υπολογίζεται ότι ανέρχεται περίπου στα 0,5 pg ανά απλοειδές γονιδιώμα. Επιπλέον, είναι συμβατό με το *Agrobacterium tumefaciens* και μπορούν να αναγεννηθούν διαγενετικά φυτά μετά από επιλογή με υδρομυκίνη ή καναμυκίνη.

Οι διαδικασίες και οι συνθήκες μετασχηματισμού και αναγέννησης εκφύτων από κάλλους περιγράφονται παρακάτω.

A.4.2 Γιατί το *Lotus japonicus*;

Ο μετασχηματισμός και η αναγέννηση διαγενετικών φυτών παρουσιάζει αρκετές δυσκολίες με πολλά από τα καλλιεργούμενα είδη. Το μέγεθος, τα γονιδιωματικά χαρακτηριστικά και η μετέπειτα συμπεριφορά του είδους περιορίζουν ακόμη περισσότερο τη χρησιμότητα των καλλιεργούμενων ειδών ως πειραματικά μοντέλα.

Σε παλαιότερες έρευνες, είχε χρησιμοποιηθεί το *Lotus corniculatus* ως πειραματικό μοντέλο – δέκτης γονιδίων σόγιας. Το *Lotus corniculatus*, ωστόσο, είναι ένα φυτό τετραπλοειδές, μη αυτογονιμοποιούμενο και επομένως όχι χρήσιμο για μετασχηματισμό.

Σε αντίθεση, το *Lotus japonicus* φαίνεται να είναι ικανό να ανταποκριθεί στις απαιτήσεις της γενετικής και της βιοτεχνολογίας. Επιλέχθηκε μεταξύ 6 ειδών του γένους *Lotus* (*L. filicaulis*, *L. parviflorus*, *L. angustissimus*, *L. japonicus*, *L. conimbrensis*, *L. castellanus*), επειδή είχε το συντομότερο κύκλο αναπαραγωγής και την εντονότερη άνθιση. Η γονιμοποίηση και η παραγωγή σπόρου γίνεται χωρίς παρέμβαση από εξωγενείς παράγοντες ή ιδιαίτερους χειρισμούς των ανθέων. Το αρχικό φυτό είναι μικρό, επομένως μπορεί εύκολα να αναπτυχθεί σε συνθήκες *in vitro*, σε δοκιμαστικούς σωλήνες.

Ακόμη, η δυνατότητα χρήσης τόσο της υδρομυκίνης όσο και της καναμυκίνης, σαν αντιβιοτικά επιλογής, φαίνεται να επιτρέπει την εφαρμογή της μεθόδου του μετασχηματισμού στους περισσότερους φορείς μεταφοράς γονιδίων που βασίζονται στο Αγροβακτήριο. Σε ότι αφορά στο φαινότυπο των θυγατρικών γενιών, οι F1 γενιές που προέρχονται από κάλλους με ανθεκτικότητα στην υδρομυκίνη, αποτελούνται από μετασχηματισμένα φυτά χωρίς παρέκκλιση στον βαθμό επανάληψης των χρωμοσωμάτων του γονιδιώματός τους. (Handberg and Stougaard, 1992; VandenBosch and Stacey, 2003)

Πίνακας 1. Τα χαρακτηριστικά του *L. japonicus*

Χαρακτηριστικά ανάπτυξης	Μικρό μέγεθος φυτού Περίοδος μεταξύ σποράς και άνθισης, 7 εβδομάδες Διάρκεια αναπαραγωγής 3-4 μήνες Μικροί σπόροι, 1,2 g /1000 σπόρους Αναγέννηση από τμήμα ρίζας ή μίσχου
Αναπαραγωγή	Μεγάλα άνθη Αυτογονιμοποιούμενο Περίπου 20 σπόροι ανά λοβό Περίπου 6000 σπόροι ανά φυτό
Γονιδιωματικά χαρακτηριστικά	Διπλοειδές, 2n=12 0,5 pg DNA ανά απλοειδές γονιδιώμα

Ιστοκαλλιέργεια	Αναγέννηση από κάλλους Μετασχηματισμός με το <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Επιλογή με υδρομυκίνη και καναμυκίνη Αναγέννηση διαγονιδιακών φυτών Διατήρηση της ανθεκτικότητας στην υδρομυκίνη στην F1 γενιά.
Σχηματισμός ριζοβίων	Γοργά αναπτυσσόμενο <i>Rhizobium loti</i> Καθορισμένα ριζόβια

A.4.3 Γονιδιωματικά χαρακτηριστικά

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το απλοειδές γενωματικό υλικό του *Lotus japonicus* είναι οργανωμένο σε 6 χρωμοσώματα, ένα μεγάλο χρωμόσωμα που ξεχωρίζει εύκολα από 3 μεσαίου μεγέθους και 2 μικρότερα. Από αυτά, τα 5 είναι υπομετακεντρικά (submetacentric), ενώ το ένα είναι σχεδόν μετακεντρικό. Ακόμη, το μέγεθος του γονιδιώματός του είναι σχετικά μικρό και εκτιμάται στα 0,5 pg. Αυτή η εκτίμηση βασίζεται σε δύο ξεχωριστούς υπολογισμούς και είναι συγκρινόμενη με το μικρό μέγεθος του γονιδιώματος της *Arabidopsis thaliana*, που χρησιμοποιείται κατά κόρων σε πειράματα βιοτεχνολογίας. (Handberg and Stougaard, 1992)

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, το *Lotus japonicus* φαίνεται να είναι κατάλληλο για ιστοκαλλιέργεια και μετασχηματισμό μέσω του Αγροβακτηρίου.

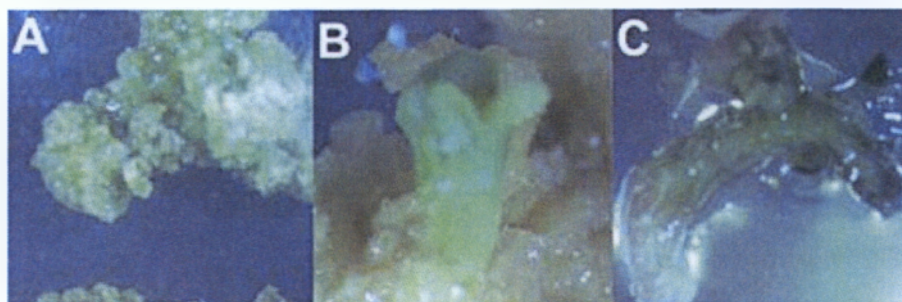
A.4.4 Συνθήκες καλλιέργειας *in vitro* (ιστοκαλλιέργεια)

Οι συνθήκες σχηματισμού κάλλων και αναγέννησης φυτών από έκφυτα *Lotus corniculatus*, *L. tenuis* και *L. pedunculatus* υπέδειξαν τη χρήση θρεπτικού υποστρώματος και φυτορμονών για παρόμοια πειράματα με το *Lotus japonicus*.

Ικανοποιητικός σχηματισμός κάλλων επιτεύχθηκε από έκφυτα υποκοτυλίων, κοτυληδόνων, φύλλων και ριζών με τη χρήση θρεπτικού υλικού B5 ή τη χρήση θρεπτικού υλικού MS, σε συνδυασμό με 2,4διχλωροφαινιλικό οξύ (2,4 D) και κινετίνη σε ίσες συγκεντρώσεις, που κυμαίνονται από 1-3 µg/ml.

Αναγέννηση φυτικού ιστού από κάλλους επιτεύχθηκε, επίσης, με τη χρήση θρεπτικού υλικού B5 που περιείχε 0,2 µg/ml βενζυλαμινοπουρίνη (BAP). (Handberg and Stougaard, 1992)

A.5 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ *in vitro*



Εικόνα A.11

Οι συνθήκες σχηματισμού κάλλων και αναγέννησης εκφύτων από τις ποικιλίες *L.corniculatus* (Swanson *et al.*, 1990), *L.tenius* (Piccirilli *et al.*, 1988), και *L.pedunculatus* (Pupilli *et al.*, 1990), συνέστησαν παρόμοια πειράματα με το *L.japonicus*. Από τον πρώτο κιόλας γύρο πειραμάτων, φάνηκε ότι οι καταλληλότερες συνθήκες για το *L.japonicus* ήταν κοινές με το *L.corniculatus*.

Σύμφωνα με τους Handberg and Stougaard, (1992) ικανοποιητική ανάπτυξη κάλλων παρατηρήθηκε ανάμεσα σε έκφυτα που προέρχονταν από τα υποκοτύλια, τις κοτυληδόνες, τα φύλλα και τη ρίζα. Όλα τα έκφυτα αναπτύσσονταν σε θρεπτικό υπόστρωμα B5 ή , MS εμπλουτισμένα με 2,4-D και κινετίνη, σε ίσες συγκεντρώσεις, που κυμαίνονταν από 1 έως 3 µg/ml. (Εικόνα Α.11)

Αναγέννηση εκφύτων επιτεύχθηκε, επίσης, χρησιμοποιώντας θρεπτικό υπόστρωμα B5, εμπλουτισμένο με 0,2 µg/ml BAP. Παρόλο που το θρεπτικό υπόστρωμα MS είναι πλουσιότερο, ανάπτυξη εκφύτων σε MS εμπλουτισμένο με 0,2 µg/ml BAP, παρατηρήθηκε μονάχα στους κάλλους που προέρχονταν από υποκοτύλια. Έτσι, επιλέχθηκε το θρεπτικό υπόστρωμα B5, ως βασικό μέσο ανάπτυξης των εκφύτων. Ωστόσο, αυξημένη επαγωγή του υπέργειου τμήματος του φυτού σε μικρότερο χρονικό διάστημα επιτεύχθηκε με κάλλους, προερχόμενους από υποκοτύλια, χρησιμοποιώντας θρεπτικό υπόστρωμα B5, εμπλουτισμένο με επιπλέον αμμώνιο. Το ιδανικό εύρος συγκέντρωσης κυμαίνεται μεταξύ 5 και 15 mM αμμωνίου, υπό μορφή $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Η προσθήκη αμμωνίου είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ανάπτυξης των βλαστιδιακών δομών κατά 50-55%, σε μετρήσεις κάλλων έπειτα από 5 εβδομάδες. Υψηλότερα επίπεδα αμμωνίου έχουν ως αποτέλεσμα χαμηλότερα ποσοστά ανάπτυξης της δομής του υπέργειου τμήματος του φυτού. Απουσία προσθήκης αμμωνίου στο βασικό θρεπτικό υπόστρωμα B5 είχε ως συνέπεια την καθυστέρηση της ανάπτυξης της δομής του υπέργειου τμήματος, καθώς και τη μειωμένη εμφάνισή τους σε κάθε κάλλο. Για την επιτάχυνση της διαδικασίας αναγέννησης, χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υπόστρωμα B5 με 10 mM αμμωνίου, ως σταθερό θρεπτικό υπόστρωμα για την επαγωγή του υπέργειου τμήματος του φυτού.

Κατά τη διάρκεια διαδοχικών καλλιιεργιών, παρατηρήθηκε ότι η βλαστιδιακές δομές αναπτύσσοντας ταχύτερα σε θρεπτικό υπόστρωμα, απουσία προσθήκης αμμωνίου. Αυξημένες συγκεντρώσεις αμμωνίου φαίνονταν να εμποδίζουν την ανάπτυξη και επιμήκυνση των βλαστιδίων. Έπειτα από εμβάπτιση των βλαστιδιακών δομών σε 10 mM αμμωνίου, οι κάλλοι μεταφέρονταν σε θρεπτικό υπόστρωμα B5 με προσθήκη 0,2 µg/ml BAP. Για περαιτέρω επιμήκυνση, οι κάλλοι με μικρά βλαστίδια μεταφέρονταν αργότερα σε θρεπτικό μέσο με ορμόνες.

Εκκίνηση της διαμόρφωσης της ρίζας πραγματοποιήθηκε σε μεμονωμένα τμήματα εκφύτων, μήκους 2-4 cm, με μία σύντομη καλλιέργεια στη μισή ποσότητα θρεπτικού μέσου B5, που περιείχε 0,5 µg/ml NAA. Συνεχής ριζική ανάπτυξη επιτεύχθηκε με καλλιέργεια στη μισή ποσότητα θρεπτικού μέσου, χωρίς προσθήκη ορμονών. Κατά τη διαδικασία αυτή, η συχνότητα ριζοβολίας ήταν της τάξης του 85%. Σε γλαστράκια μεταφέρονται, τελικά, τα φυτά με μήκος ρίζας μεγαλύτερο του 1 cm. Αφού καλυφθούν με πλαστικές σακούλες, αναπτύσσονται υπό τις ακόλουθες συνθήκες:

- 18h/6h φωτισμό ημέρας /νύχτας
- 22°C/18°C θερμοκρασία ημέρας /νύχτας
- 70% υγρασία

Οι πλαστικές σακούλες αφαιρούνται σταδιακά για τη σκληραγώγηση των φυτών.

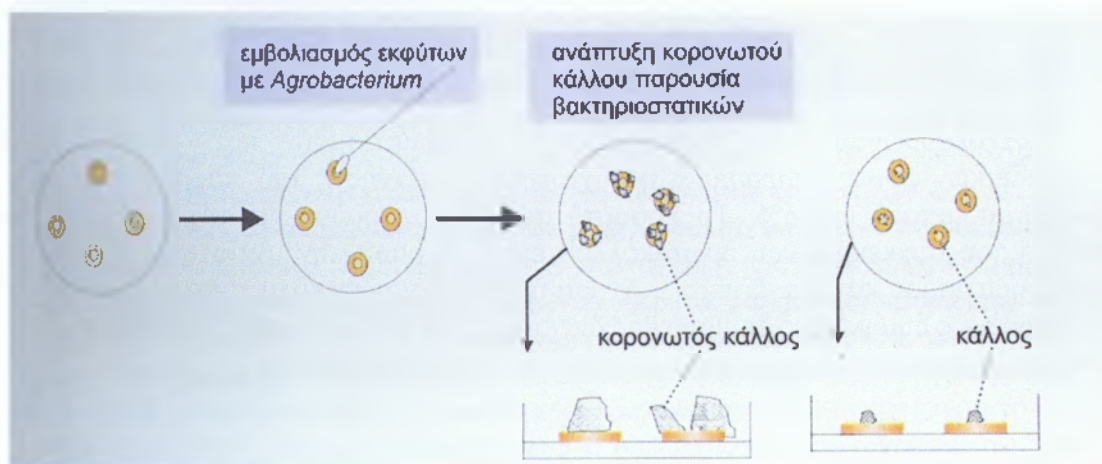
Αναγεννημένα φυτά από κάλλους μπορούν να σχηματιστούν σε διάρκεια 5 μηνών, ακολουθώντας το παραπάνω πρόγραμμα.

Α.6 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΦΥΤΩΝ

Η ευπάθεια του *L.jaronicus* έναντι στο Αγροβακτήριο δοκιμάστηκε για πρώτη φορά, χρησιμοποιώντας το *Agrobacterium rhizogenes* (C58C1pRi15834) για την αύξηση των ριζικών τριχιδίων στα υποκοτύλια, όπως περιγράφεται από τους Petet *et al.* (1987). Παρότι, όμως, η παρατηρούμενη συχνότητα σχηματισμού ριζικών τριχιδίων ήταν ικανοποιητική, η αναγέννηση φυτών από τα ριζικά τριχίδια ήταν απογοητευτική. Για την καθιέρωση μιας σταθερής διαδικασίας μετασχηματισμού, χρησιμοποιήθηκαν «αφοπλισμένες» καλλιέργειες του *Agrobacterium tumefaciens* που περιείχαν δυαδικούς φορείς.

Φυτά *L.jaronicus* αναπτύχθηκαν, σε τρυβλία Petri, που περιείχαν φίλτρα εμποτισμένα με αποστειρωμένο νερό, σε συνθήκες συνεχούς σκότους, στους 25°C, για 4 ημέρες (Εικόνα Α.12)

Στη συνέχεια, τα υποκοτύλια αφαιρέθηκαν και τοποθετήθηκαν σε φίλτρα εμποτισμένα με καλλιέργειες *Agrobacterium* που περιείχαν δυαδικούς φορείς ή τροποποιημένα Τί πλασμίδια.

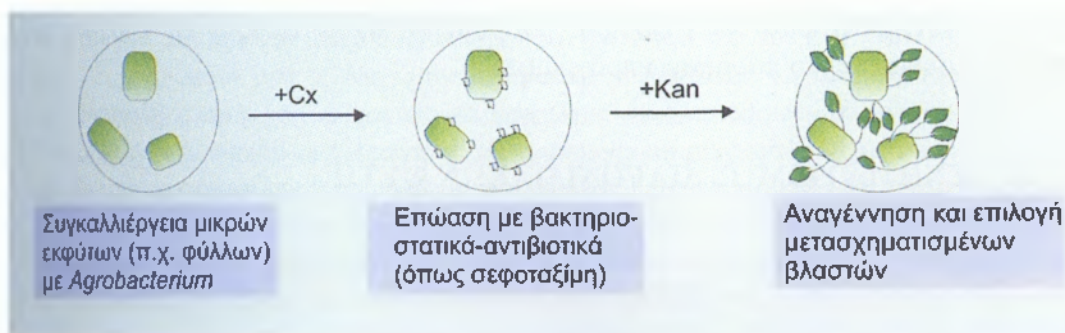


Εικόνα Α.12

Αφού τους έγιναν κατά μήκος τομές, τα έκφυτα μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό μέσο συγκαλλιέργειας φυτών-Αγροβακτηρίου, όπου παρέμειναν για 7 ημέρες. Το Αγροβακτήριο απαλείφθηκε σταδιακά, σε διάστημα 4 εβδομάδων, με την προσθήκη αντιβιοτικών στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης κάλλων (Εικόνα Α.13)

Μετά την πρώτη εβδομάδα επώασης των μετασχηματισμένων κάλλων στο ανάλογο θρεπτικό υπόστρωμα, ξεκίνησε η επιλογή ανθεκτικότητας σε υγρομυκίνη και καναμυκίνη.

Πράσινοι κάλλοι με ανθεκτικότητα στην υγρομυκίνη (20 ή 10 $\mu\text{g/ml}$) ή την καναμυκίνη (100 $\mu\text{g/ml}$) μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα επαγωγής βλαστηδίων.



Εικόνα Α.13

Α.7 ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΦΥΤΩΝ

Διαγονιδιακά φυτά μπορούν να αναγεννηθούν σε 6 μήνες, χρησιμοποιώντας γονίδια ανθεκτικότητας στην υγρομυκίνη. Η διαδικασία του μετασχηματισμού δοκιμάστηκε επίσης σε έκφυτα φύλλων και κοτυληδόνων και αποδείχθηκε ότι μπορούν κι αυτά να αναγεννήσουν διαγονιδιακά φυτά. Ωστόσο, η συχνότητα μετασχηματισμού θα είναι πολύ χαμηλότερη.

Η μεταφορά του T-DNA στο φυτικό γονιδίωμα επιβεβαιώνεται με την ανάλυση κατά Southern.

Η απόσχιση των γονιδίων με ανθεκτικότητα στην υγρομυκίνη, της F1 γενιάς, χρησιμοποιείται για να εκτιμηθεί ο βαθμός επανάληψης των χρωμοσωμάτων και των T-DNA ενθέσεων στα διαγονιδιακά φυτά.

Ακολουθώντας το πρωτόκολλο μετασχηματισμού και αναγέννησης διαγονιδιακών φυτών *L.japonicus*, η συχνότητα αναγέννησης των παραπάνω φυτών κυμαίνεται μεταξύ 50-55%. Το ποσοστό αυτό θα μπορούσε να αυξηθεί, όμως η επιλογή του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου έγινε με βάση την αντίστοιχη ταχύτητα μετασχηματισμού και αναγέννησης. Αν και η διαδικασία δεν είναι τόσο γρήγορη όσο οι αντίστοιχες διαδικασίες δημιουργίας διαγονιδιακών φυτών καπνού, ωστόσο είναι η γρηγορότερη και ταυτόχρονα αποτελεσματική για το *L.japonicus*.

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ:

Α.8 ΓΕΝΙΚΑ

Τα φυτά κατά τη διάρκεια της κανονικής τους ανάπτυξης παράγουν μια μεγάλη γκάμα δευτερογενών μεταβολιτών, πολλοί από τους οποίους μπορούν να ρυθμίσουν την μικροβιακή ανάπτυξη *in vitro*. Μιας και η ικανότητα σύνθεσης συγκεκριμένων ειδών δευτερογενών μεταβολιτών περιορίζεται σε συγκεκριμένα φυτικά είδη, συμπεραίνεται ότι αυτοί οι μεταβολίτες δεν παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη των φυτών.

Παρόλα αυτά, από μελέτες που έχουν γίνει, έχει αποδειχθεί ότι αυτοί οι ανασταλτικοί παράγοντες παρέχουν στα φυτά συγκριτικά πλεονεκτήματα ενάντια στα παθογόνα, στα ακάρεα και σε συνθήκες στρες. Επίσης, αποτελούν μια τεράστια πηγή πολύπλοκων μορίων που χρησιμοποιούνται από τον άνθρωπο για φαρμακευτικές και άλλες χρήσεις [Hostettman, K. & Marston, A. (1995) *Saponins* (Cambridge Univ. Press, Cambridge, U.K.)]

A.9 ΣΑΠΩΝΙΝΕΣ ΚΑΙ ΦΥΤΙΚΗ ΑΜΥΝΑ

Οι σαπωνίνες είναι φυτικά γλυκοσίδια, που απαντώνται σε πολλά φυτικά είδη και θεωρούνται ως πρόδρομα μόρια ανθεκτικότητας στους μύκητες. Αποτελούνται από τριτερπενοειδή, στεροειδή ή στεροειδικά γλυκοαλκαλοειδή μόρια που φέρουν έναν ή περισσότερους γλυκοζιτικούς δεσμούς. Χαρακτηρίζονται από επιφανειακές ιδιότητες και δίνουν σταθερό αφρό όταν αναμιχθούν με νερό. Η απορρυπαντική δράση των σαπωνινών είχε αναγνωριστεί εκατοντάδες χρόνια πριν, όταν εκχυλίσματα από φυτά, όπως η *Saponaria officinalis*, χρησιμοποιούνταν για την παραγωγή σαπουνιών.

A.9.1 Η χημική δομή των σαπωνινών

Οι σαπωνίνες διαθέτουν ένα γλυκοζιτικό δεσμό, συνδεδεμένο στον τρίτο άνθρακα (C-3) του μορίου τους, δια μέσου ενός μορίου οξυγόνου και γι' αυτό αναφέρονται ως μονοδεσμοσιδικές σαπωνίνες (monodesmosidic saponins).

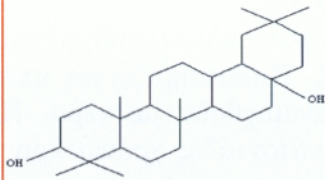
Οι διδεσμοσιδικές σαπωνίνες (bidesmosidic saponins) έχουν δύο γλυκοζιτικούς δεσμούς. Ο ένας βρίσκεται στον C-3 του μορίου και ο άλλος, είτε στον C-27 για τις στεροειδικές σαπωνίνες, είτε στον C-30 για τις τριτερπενοειδείς σαπωνίνες (Σχήμα 1)

Οι τελευταίες υπολείπονται των ιδιοτήτων των μονοδεσμοσιδικών σαπωνινών, αλλά μπορούν να μετατραπούν σε βιολογικά ενεργές μορφές με την απομάκρυνση του σακχάρου από τον C-27 ή τον C-30 του μορίου τους. Η μετατροπή αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί από συγκεκριμένα φυτικά ένζυμα, τις γλυκοσιδάσες (glycosyl hydrolases). Το πιο χαρακτηριστικό από αυτά τα ένζυμα είναι η αβενakoσιδάση, η οποία προέρχεται από τη βρώμη και μετατρέπει στεροειδικές σαπωνίνες που βρίσκονται στα φύλλα του φυτού (τις αβενakoσίδες A και B), σε ενεργώς μονοδεσμοσιδικές μορφές. Σε υγρή ιστό φύλλου βρώμης, το ένζυμο εντοπίζεται στα πλαστίδια και οι σαπωνίνες στα κενοτόπια. Τραυματισμός του ιστού είτε από μηχανική βλάβη, είτε από επίθεση παθογόνου, προκαλεί ρήξη της τμηματοποίησης (διαμερισματοποίησης-χωρισματοποίησης του κυττάρου), με αποτέλεσμα το ένζυμο να μπορεί να έρθει σε επαφή με το σαπωνινικό του υπόστρωμα. Τότε το μόριο του σακχάρου που βρίσκεται στον C-27 απομακρύνεται με υδρόλυση για να παραχθούν οι μονοδεσμοσιδικές 27-αγλυκο αβενakoσίδες A και B, οι οποίες είναι μυκητοτοξικές.

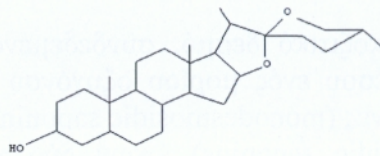
Παρόλο που οι διδεσμοσιδικές σαπωνίνες υπολείπονται αντιμικροβιακής δραστηριότητας, θεωρούνται ως προανασταλτικοί παράγοντες λόγω της ικανότητας μετατροπής τους, η οποία δεν απαιτεί επαγωγή γονιδιακής έκφρασης για την ανταπόκριση στα παθογόνα.

σαπωνίνες

ολιγοσακχαρίδιο + αγλυκόνη:



Τριτερπενοειδή (C-30)



Στεροειδή (C-27)

Σχήμα 1.

A.9.2 Τοξικότητα των σαπωνινών στους μύκητες

Το αρχικό μοντέλο δράσης των σαπωνινών ενάντια στους μύκητες και γενικότερα στα παθογόνα, είναι παρόμοιο με αυτό των αντιβιοτικών πολυενίου και περιλαμβάνει το σχηματισμό συμπλόκων με τις στερόλες των μεμβρανών, τα οποία οδηγούν στο σχηματισμό πόρων και συνεπώς στην έλλειψη της ακεραιότητας της μεμβράνης. Ο ακριβής τρόπος με τον οποίο οι σαπωνίνες ενσωματώνονται στις μεμβράνες είναι άγνωστος, ενώ οι μεμβρανολυτικές τους ιδιότητες φαίνεται να έχουν σχέση με τη φύση των ολιγοσακχαριτών των μορίων τους.

Η πιθανότητα του ότι οι σαπωνίνες είναι δυνατόν να έχουν περισσότερες και πιο περίπλοκες συνέπειες στους μύκητες, επιπρόσθετα με την μεμβρανολυτική τους δράση, δεν μπορεί να απορριφθεί αν και λίγα είναι γνωστά σε αυτόν τον τομέα. Επίσης, δεν είναι ξεκάθαρο ακόμη το πώς τα φυτά προστατεύονται από τις λυτικές συνέπειες των σαπωνινών τους. Ο μηχανισμός δράσης των σαπωνινών δεν είναι εξειδικευμένος, συνεπώς, αναμένεται να επηρεάζει όλους τους ευκαριωτικούς οργανισμούς που έχουν στερόλες στις μεμβράνες τους. Οι τριτερπενοειδείς σαπωνίνες είναι διδεσμοσιδικά μόρια και δεν αποτελούν απειλή για την ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης των φυτών, σε αντίθεση με τα μονοδεσμοσιδικά μόρια τα οποία φαίνεται να εντοπίζονται σε κυτταρικά οργανίδια, των οποίων οι μεμβράνες περιέχουν χαμηλά επίπεδα στερολών.

A.9.3 Σαπωνίνες και έλεγχος παθογενειών

Εάν οι σαπωνίνες και τα ένζυμά τους παίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της παθογένειας από μύκητες, τότε αυτό το φαινόμενο μπορεί να αποτελέσει τη βάση για στρατηγικές προστασίας των καρπών, οι οποίες θα ελέγχουν

ένα ευρύ πλήθος παθογόνων. Ο χειρισμός των βιοσυνθετικών μονοπατιών των φυτικών σαπωνίνων θα μπορούσε να προσφέρει πολλά στον έλεγχο των παθογενειών, αλλά πρωτίστως θα πρέπει να εδραιωθεί ο ρόλος των σαπωνίνων.

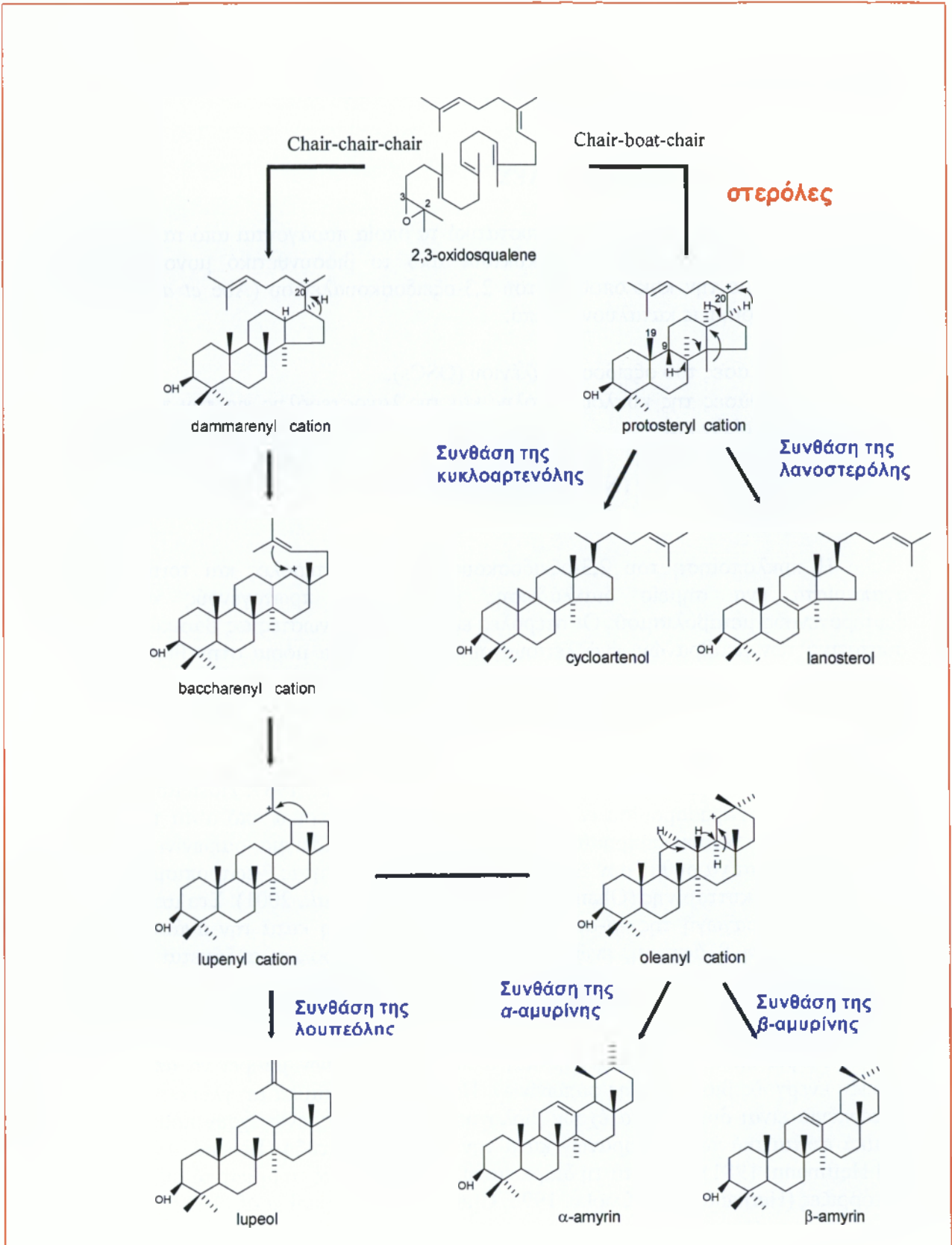
A.10 ΤΡΙΤΕΡΠΕΝΙΑ ΚΑΙ ΣΤΕΡΟΛΕΣ

Τα τριτερπένια είναι φυσικά συστατικά τα οποία παράγονται από τα ανώτερα φυτά. Όπως και οι στερόλες, προκύπτουν από το βιοσυνθετικό μονοπάτι των ισοπρενοειδών με την κυκλοποίηση του 2,3-οξειδοσκουαλένιου (Abe *et al.*, 1993). Όλες οι κυκλοποιήσεις καταλύονται από:

- κυκλάσες του οξειδοσκουαλένιου (OSCs),
- συνθάσες της κυκλοαρτενόλης και της λανοστερόλης για την παραγωγή στερολών και
- τριτερπενοειδείς συνθάσες για την παραγωγή πεντακυκλικών τριτερπενοειδών (Nes and McKean, 1977; Abe *et al.*, 1993) (Σχήμα 2).

Η κυκλοποίηση του 2,3-οξειδοσκουαλένιου σε στερόλες και τριτερπένια, αναπαριστά ένα σημείο διακλάδωσης μεταξύ του πρωτογενούς και του δευτερογενούς μεταβολισμού. Οι στερόλες είναι ευρέως γνωστές ως βασικά δομικά συστατικά των μεμβρανών, ενώ λειτουργούν ως πρόδρομα μόρια στην βιοσύνθεση των ορμονών. Αντίθετα, η βιολογική λειτουργία των τριτερπένιων είναι λιγότερο ξεκάθαρη. Πολλά φυτά συσσωρεύουν άφθονες ποσότητες τριτερπένιων στις ρίζες τους, με τη μορφή γλυκοσιδίων (ή αλλιώς τριτερπενοειδών σαπωνίνων). Πολλά γλυκοσιλιωμένα τριτερπενοειδή παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση και προστατεύουν τα φυτά από επιθέσεις παθογόνων (Price *et al.*, 1987; Hostettmann and Marston, 1991; Papadopoulou *et al.*, 1999). Εν τούτοις, μερικά από αυτά τα μόρια είναι δυνατόν να έχουν επιπρόσθετες λειτουργίες. Για παράδειγμα, σαπωνίνες από το μπιζέλι φαίνονται να ρυθμίζουν τον φυτικό τροπισμό βαρύτητας (γεωτροπισμός?) και τη σύνθεση της κυτταρίνης (Ohana *et al.*, 1998; Rahman *et al.*, 2001). Στο μπιζέλι και το σόργο η παραγωγή της β-αμυρίνης είναι πολύ έντονη κατά την ανάπτυξη και αμέσως μετά τη βλάστηση, ενώ η βιοσύνθεση των στερολών αυξάνεται αρκετές μέρες μετά, γεγονός που υποδεικνύει ότι αυτές οι μεταβολικές αλλαγές είναι ένα κοινό φαινόμενο της φυτικής ανάπτυξης (Baisted, 1971; Palmer and Bowden, 1977; Abe *et al.*, 1988).

Υψηλά επίπεδα β-αμυρίνης και άλλων τριτερπένιων μπορεί να αποτελούν ένδειξη ενεργούς βιοσύνθεσης σαπωνίνων. Παρόλα αυτά, και τα μη γλυκοσιλιωμένα τριτερπένια είναι δυνατόν να έχουν βιολογικές λειτουργίες, ενώ έχουν προταθεί ως δομικά συστατικά των μεμβρανών κατά την φυτική ανάπτυξη (Baisted, 1971; Nes and Heftmann, 1981) και κατά τη διάρκεια της μόλυνσης από συμβιωτικά ριζόβια και μυκόρριζες (Hernandez and Cooke, 1996; Grandmougin-Ferjani *et al.*, 1999).



Σχήμα 2. Το μονοπάτι βιοσύνθεσης των ισοπrenoειδών.

Εφόσον οι κυκλάσες του οξειδοσκουαλενίου (OSCs) εμπλέκονται στη ροή του βιοσυνθετικού μονοπατιού των ισοπρενοειδών, το οποίο οδηγεί στις στερόλες και τα τριτερπενοειδή, τότε μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην αλλαγή ή στη ρύθμιση αυτής της μεταβολικής ροής, ανάμεσα στα δύο μονοπάτια (Baisted, 1971; Threlfall and Whitehead, 1990). Η παραπάνω θεωρία ενισχύθηκε με πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με ανασταλτικά, πρόδρομα μόρια τριτερπενοειδών σαπωνίνων και αποδομητών, τα οποία ρύθμιζαν την δράση των OSCs, όπου και παρατηρήθηκαν ποικίλες μεταβολές στην σύνθεση τριτερπενίων και στερολών (Haralampidis *et al.*, 2001a). Επίσης, τα τελευταία χρόνια πολλές OSCs κλωνοποιήθηκαν και τα προϊόντα τους επιβεβαιώθηκαν με έκφραση σε ζύμες (Haralampidis *et al.*, 2001a).

Πρόκειται για:

- συνθάσες της β-αμυρίνης από το *Panax ginseng* (Kushiro *et al.*, 1998a, b), από τη γλυκύριζα (*Glycyrrhiza glabra*) (Hayashi *et al.*, 2001a) και το μπιζέλι (*Pisum sativum*) (Morita *et al.*, 2000),
- συνθάσες της λουπεόλης από την ελιά (*Olea europea*) (Shibuya *et al.*, 1999), από την πικραλίδα (*Taraxacum officinale*) (Shibuya *et al.*, 1999) και το *Arabodopsis thaliana* (Herrera *et al.*, 1998),
- πολυλειτουργικές συνθάσες, οι οποίες παράγουν α- και β-αμυρίνη, από το μπιζέλι (Morita *et al.*, 2000),
- πολυλειτουργικές συνθάσες, οι οποίες παράγουν α- και β-αμυρίνη συν λουπεόλη, από το *Arabodopsis thaliana* (Kushiro *et al.*, 2000a; Husselstein-Muller *et al.*, 2001),
- μια συνθάση της ισοπολυφλορενόλης από το φυτό *Luffa cylindrica* (Hayashi *et al.*, 2001b)
- και τέλος, μια συνθάση της β-αμυρίνης από τη βρώμη (*Avena sativa*), σαφώς διακριτή από αυτή των δικότυλων (Haralampidis *et al.*, 2001b).

Οι παραπάνω κλωνοποιημένες συνθάσες αποτελούν σημαντικά εργαλεία στην έρευνα της ρύθμισης της σύνθεσης και του φυσιολογικού ρόλου των τριτερπενίων. Σε διαγονιδιακά φυτά, είτε με υπερέκφραση είτε με γονιδιακή σίγαση, θα μπορούσε να ερευνηθεί περαιτέρω η περιεκτικότητα συγκεκριμένων φυτικών ειδών σε στερόλες και τριτερπένια.

A.10.1 Η απομόνωση της συνθάσης της β-αμυρίνης

Το 2003 ο Iturbe-Ormaetxe και οι συνεργάτες του κλωνοποίησαν και χαρακτήρισαν τρεις τριτερπενοειδείς συνθάσες από τα μοντέλα ψυχανθή *Lotus japonicus* και *Medicago truncatula*. Η ανάλυση της έκφρασης αυτών, καθώς και άλλων συνθασών από τη μηδική και το μπιζέλι, έδειξε ότι παρουσιάζουν διαφορετικά μοντέλα έκφρασης, ανάλογα με το φυτικό ιστό, γεγονός που υποδεικνύει ότι διαδραματίζουν ποικίλους ρόλους στη φυτική ανάπτυξη και φυσιολογία.

Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποίησε εκκινητές για να ενισχύσει με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR), σχετικές αλληλουχίες cDNA το οποίο απομόνωσε από τις ρίζες των εν λόγω φυτών. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν βάσει αλληλουχιών της συνθάσης της β-αμυρίνης από το μπιζέλι. Από τα προϊόντα της PCR ελήφθησαν τρεις διακριτές αλληλουχίες:

- η MtAMY1 από τη μηδική,
- η LjAMY1

- και η LjAMY2 από το *Lotus japonicus*, η οποία και χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη.

Το ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο των MtAMY1 και LjAMY2 βρέθηκε ότι αποτελείται από 2286 ζευγάρια βάσεων (bp), που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες 762 αμινοξέων, περίπου 87kDa. Οι αλληλουχίες των MtAMY1, LjAMY1 και LjAMY2 παρουσίασαν υψηλή ομοιότητα με τη συνθάση της β-αμυρίνης από το μπιζέλι, με ομολογία αμινοξέων 97%, 96% και 92% αντίστοιχα. Η MtAMY1 παρουσίασε 91% και 95% ομολογία με τις LjAMY1 και LjAMY2 αντίστοιχα, ενώ η ομολογία των δυο κλώνων του *Lotus japonicus* ήταν 94%. Οι LjAMY1 και LjAMY2 περιέχουν το εξειδικευμένο μοτίβο αμινοξέων DCTAE, το οποίο εμπλέκεται στην δέσμευση υποστρωμάτων (Abe and Prestwich, 1995), καθώς και τα β-strand turn QW μοτίβα, τα οποία είναι χαρακτηριστικά για την υπεροικογένεια των κυκλασών του οξειδοσκουαλένιου (OSCs) (Poralla *et al.*, 1994).

Κατόπιν, τα προϊόντα της LjAMY2 ελέγχθηκαν με έκφραση σε ζύμες, όπου και ανιχνεύθηκε λουπεόλη και β-αμυρίνη σε ισοδύναμες σχεδόν ποσότητες. Έπειτα, η έκφραση της LjAMY2 αναλύθηκε, με μεταφορά κατά Northern, σε φύλλα, ρίζες και φυμάτια του *Lotus japonicus*, αλλά το σήμα ανιχνεύτηκε μόνο στις ρίζες. Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι με τη μεταφορά κατά Northern υβρίδισαν και άλλες αλληλουχίες, οι οποίες πιθανόν να κωδικοποιούν για OSCs που συνθέτουν διάφορα τριτερπενοειδή προϊόντα.

Στο παρελθόν ανιχνεύτηκαν τριτερπενοειδείς σαπωνίνες σε σπόρους του γένους *Lotus* (Jurzysta, 1973), ενώ η περαιτέρω ανίχνευση τριτερπενοειδών σαπωνίνων σε διάφορους φυτικούς ιστούς θα αποτελέσει σημαντικό εργαλείο στην έρευνα της βιοσύνθεσής τους αλλά και των αλληλεπιδράσεών τους με μικροσυμβιωτές και παθογόνα.

A.10.2 Το φυλογενετικό δέντρο των OSCs

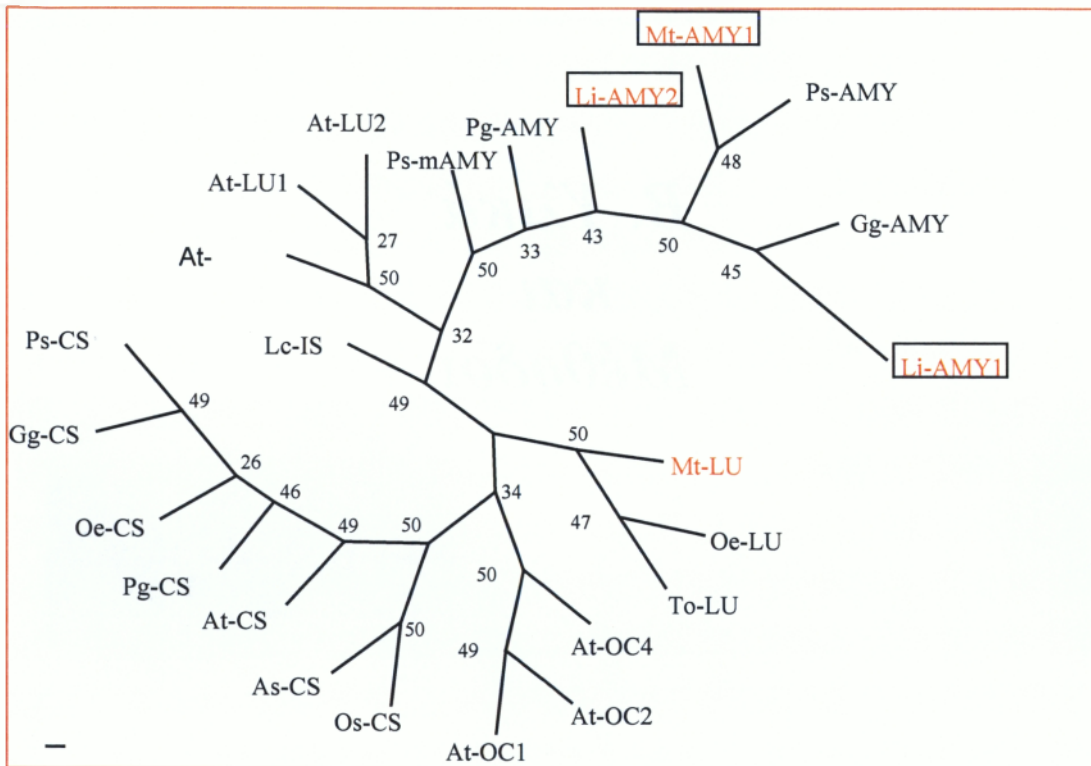
Πολυάριθμες OSCs που καταλύουν τη σύνθεση τριτερπένιων, όπως η β-αμυρίνη, η α-αμυρίνη και η λουπεόλη, κλωνοποιήθηκαν πρόσφατα και τα προϊόντα τους επιβεβαιώθηκαν με έκφραση σε ζύμες. Συγκρίσεις των αλληλουχιών των αμινοξέων τους έδειξαν ότι αυτές οι τριτερπενοειδείς συνθάσες είναι σαφώς διακριτές από τις συνθάσες της κυκλοαρτενόλης (Haralampidis *et al.*; 2001a).

Το 2003 ο Iturbe-Ormaetxe και οι συνεργάτες του σχεδίασαν ένα φυλογενετικό δέντρο βάση αλληλουχιών αμινοξέων 24 διαφορετικών OSCs, συμπεριλαμβανομένης της συνθάσης της β-αμυρίνης καθώς και συνθασών της κυκλοαρτενόλης, της λουπεόλης, πολυλειτουργικών συνθασών της β-αμυρίνης και άλλων ένζυμων δηλωμένων με το γενικό όνομα των τριτερπένιων ή των OSCs.

Παρατήρησε, λοιπόν, ότι οι κλώνοι που απομόνωσε σχετίζονται αμειότερα με τη συνθάση της β-αμυρίνης από το μπιζέλι (Σχήμα 3, Ps-AMY), τη γλυκόριζα (Gg-AMY) και το τζίνσενγκ (Pg-AMY), ενώ είναι πιο κοντά σε μια πολυλειτουργική συνθάση από το μπιζέλι που συνθέτει α- και β-αμυρίνη (Ps-mAMY) (Morita *et al.*, 2000), στη συνθάση της λουπεόλης από το φυτό αραβίδοψη (At-LU1), σε μια άλλη συνθάση, από το ίδιο φυτό, η οποία παράγει α-αμυρίνη, β-αμυρίνη και λουπεόλη σε ποσοστό 55%:30%:15% (At-LU2) (Kushiro *et al.*, 2001a; Husselstein-Muller *et al.*, 2001) και τέλος σε μια συνθάση της οποίας τα προϊόντα είναι ακόμη άγνωστα (At-OC3) (Husselstein-Muller *et al.*, 2001).

Οι συνθάσες της λουπεόλης από την ελιά (Oe-LU) και το *Taraxacum officinale* (To-LU) παράγουν μόνο λουπεόλη αλλά διαφέρουν από την At-LU1 στους

μηχανισμούς αποπρωτεϊνοποίησής τους (Kushiro *et al.*, 1999a b). Έτσι λοιπόν, αυτά τα ένζυμα, αλλά και η συνθάση της λουπεόλης από το *Medicago truncatula*, σχηματίζουν μια ξεχωριστή υποομάδα (Gammas *et al.*, 1996; Shibuya *et al.*, 1999). Επίσης, τρεις συνθάσες από την αραβίδοξη, αγνώστων μέχρι στιγμής προϊόντων, σχηματίζουν μια ακόμη ομάδα στην υπεροικογένεια των κυκλασών του οξειδοσκουαλένιου (At-OC1, At-OC2 και At-OC4) (Husselstein-Muller *et al.*, 2001).



Σχήμα 3. Το φυλογενετικό δέντρο των OSC's

***B. Υλικά
και
Μέθοδοι***

B.1 ΣΤΕΛΕΧΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ

B.1.1 Βακτηριακά στελέχη και συνθήκες ανάπτυξής τους

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε κατάλληλο, για κάθε σκοπό, στέλεχος του εντεροβακτηρίου *E. coli* το οποίο φαίνεται στον πίνακα 2. Χρησιμοποιήθηκε επίσης κατάλληλο είδος και στέλεχος Αγροβακτηρίου (Πίνακας 2) με το οποίο μολύνθηκαν φυτά *Lotus japonicus* αποσκοπώντας στον μετασηματισμό τους. Η ανάπτυξη του στελέχους της *E. coli* γίνεται σε πλήρες θρεπτικό υλικό LB, στους 37°C, ενώ η ανάπτυξη του Αγροβακτηρίου γίνεται σε πλήρες θρεπτικό υλικό YEP, στους 28°C. Τα βακτηριακά στελέχη διατηρούνται σε στερεές καλλιέργειες, στους 4°C, ενώ η ανακαλλιέργειά τους γίνεται περίπου κάθε μήνα.

Στον παρακάτω πίνακα περιγράφονται τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Πίνακας B.1. Θρεπτικά υλικά ανάπτυξης και συντήρησης των βακτηριακών στελεχών τα οποία χρησιμοποιήθηκαν.

LB θρεπτικό υλικό ^{1,2}	πλήρες	1% (w/v) Πεπτόνη, 0,5% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 1% (w/v) NaCl
YEP θρεπτικό υλικό ^{1,3}	πλήρες	1% (w/v) Πεπτόνη, 1% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 0,5% (w/v) NaCl, 5mM/lit MgSO ₄

¹ Για τα στερεά θρεπτικά υλικά προσθέτονταν 1,7% άγαρ.

² Για το στέλεχος DH5a του βακτηρίου *E. coli* χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιβιοτικά, ανάλογα με τον πλασμιδιακό φορέα που περιείχε και την ανθεκτικότητα που αυτός επέφερε στο αρχικό στέλεχος.

Αμπικιλίνη, (αρχικό διάλυμα 100mg/ml σε νερό) σε τελική συγκέντρωση 100μg/ml.

Τετρακυκλίνη, (αρχικό διάλυμα 10mg/ml σε 90% αιθανόλη) σε τελική συγκέντρωση 20μg/ml.

Καναμυκίνη, (αρχικό διάλυμα 50mg/ml σε νερό) σε τελική συγκέντρωση 100μg/ml.

³ Για το στέλεχος AGL-1 του Αγροβακτηρίου χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιβιοτικά, ανάλογα με τον T1 πλασμιδιακό φορέα που έφερε και την ανθεκτικότητα που προσέδιδε στο στέλεχος το χρωμοσωμικό του υπόβαθρο.

Ριφαμπικίνη, (αρχικό διάλυμα 50mg/ml σε MeOH) σε τελική συγκέντρωση 50μg/ml.

Καρμπενικιλίνη, (αρχικό διάλυμα 50mg/ml σε νερό) σε τελική συγκέντρωση 100μg/ml.

Τετρακυκλίνη, (αρχικό διάλυμα 10mg/ml σε 90% αιθανόλη) σε τελική συγκέντρωση 20μg/ml.

Καναμυκίνη, (αρχικό διάλυμα 50mg/ml σε νερό) σε τελική συγκέντρωση 100μg/ml.

Πίνακας B.2. Ανθεκτικότητα βακτηριακού στελέχους DH5a, ανάλογα με τον πλασμιδιακό φορέα που περιείχε.

DH5a-p35S	Αμπικιλίνη
DH5a-pYes/amyII	Αμπικιλίνη
DH5a-pGreenII0179	Καναμυκίνη
DH5a-pSoup	Τετρακυκλίνη

Πίνακας Β.3. Ανθεκτικότητα βακτηριακού στελέχους AGL-1, ανάλογα με τον Τι πλασμιδιακό φορέα που περιείχε.

AGL-1	Ριφαμπικίνη, Καρμπενικυλλίνη
AGL-1 – pGreen	Ριφαμπικίνη, Καρμπενικυλλίνη Καναμυκίνη
AGL-1 – pSoup	Ριφαμπικίνη, Καρμπενικυλλίνη Τετρακυκλίνη
AGL-1 – pGreen, pSoup	Ριφαμπικίνη, Καρμπενικυλλίνη Καναμυκίνη, Τετρακυκλίνη
AGL-1 – pGreen/p35SamyII, pSoup	Ριφαμπικίνη, Καρμπενικυλλίνη Καναμυκίνη, Αμπικιλίνη, Τετρακυκλίνη

Τα βακτηριακά στελέχη μαζί με τα κυριότερα χαρακτηριστικά τους παρουσιάζονται στον πίνακα Β.4.

Πίνακας Β.4. Χαρακτηριστικά βακτηριακών στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν.

DH5a	Στέλεχος του <i>E. coli</i> . Φέρει τη μετάλλαξη <i>RecA1</i> , η οποία εμποδίζει τον ανασυνδιασμό. Η μετάλλαξη <i>φ80lacZΔM15</i> επιτρέπει την α-συμπληρωματικότητα με το αμινοτελικό άκρο της β-γαλακτοσιδάσης που κωδικοποιείται από φορείς του τύπου pUC και την επιλογή των λευκών ανασυνδιασμένων αποικιών.
AGL-1	Στέλεχος του <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Στο χρωμοσωμικό του υπόβαθρο φέρει τη μετάλλαξη <i>C58</i> και τη μετάλλαξη <i>RecA</i> , η οποία εμποδίζει τον ανασυνδιασμό. Φέρει χρωμοσωμικά γονίδια ανθεκτικότητας στη ριφαμπικίνη και την καρμπενικυλλίνη. Ο Τι πλασμιδιακός του φορέας είναι τύπου pTiBo542ΔT-DNA, χωρίς γονίδιο ανθεκτικότητας σε κάποιο αντιβιοτικό (Helens, Mullineaux and Klee, 2000).

B.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ

B.2.1 Δημιουργία δεκτικών για μετασχηματισμό κυττάρων *E. coli* (competent cells)

1. 10 ml LB θρεπτικού υλικού εμβολιάζονται με μια αποικία *E. coli* (στέλεχος DH5a) και επωάζονται, με ανακίνηση, για περίπου 18 ώρες στους 37°C.
2. 2 ml της παραπάνω καλλιέργειας χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό 200 ml αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού LB. Ακολουθεί επώαση με ανακίνηση στους 37°C, για 2 περίπου ώρες (O.D.₆₀₀=0.3-0.4).

Οι χειρισμοί οι οποίοι ακολουθούν παρακάτω γίνονται στους 4°C ή μέσα σε πάγο.

3. Η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 6.000 στρ./λεπτό.
4. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται με ήπια ανάδευση σε 25 ml 0,1M MgCl₂. Ακολουθώς φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 6.000 στρ./λεπτό.

5. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε 25 ml 0,1M CaCl₂ και αφήνεται σε πάγο για 20 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 6.000 στρ./λεπτό.
6. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 10 ml 0,1M CaCl₂ και προστίθεται γλυκερόλη σε τελική συγκέντρωση 20%. Τα κύτταρα αφού μοιραστούν σε σωλήνες erpendorf φυλάσσονται στους -80°C.

B.2.2 Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* με πλασμίδια

1. Περίπου 10 μl απομονωμένου πλασμιδιακού DNA αναμιγνύονται με 100 μl δεκτικών κυττάρων και στη συνέχεια αφήνονται στον πάγο για περίπου μισή ώρα.
2. Το μίγμα κυττάρων – πλασμιδιακού DNA μεταφέρεται απότομα στους 42°C για 1 λεπτό. Στη συνέχεια μεταφέρεται ξανά στον πάγο.
3. Αφού προστεθούν 200 μl LB θρεπτικού μέσου επωάζονται στους 37°C για 1 ώρα.
4. Τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία με το κατάλληλο αντιβιοτικό, ανάλογα με την εφαρμογή και τον πλασμιδιακό φορέα. Στην περίπτωση όπου σκοπός είναι η ανίχνευση των ανασυνδιασμένων πλασμιδίων, στα κύτταρα γίνεται προσθήκη 10 μl διαλύματος IPTG 100 mM και 50μl διαλύματος X-Gal 22% (w/v).
Η επιλογή των ανασυνδιασμένων πλασμιδίων με την προσθήκη IPTG και X-Gal προϋποθέτει την ύπαρξη του γονιδίου *lacZ* στον πλασμιδιακό φορέα, πχ. pGreen.

B.2.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα

1. 10 ml θρεπτικού υλικού LB εμβολιάζονται με μοναδική, βακτηριακή αποικία μετασηματισμένων, με πλασμίδιο, κυττάρων *E. coli*. Ταυτόχρονα γίνεται προσθήκη του κατάλληλου αντιβιοτικού. Ακολουθεί επώαση με ανακίνηση στους 37 °C για 18 ώρες.
2. 1,5 ml από την καλλιέργεια μεταφέρεται σε σωλήνα erpendorf και φυγοκεντρείται στις 13.000 στρ./λεπτό, για 1 λεπτό.
3. Το υπερκείμενο απομακρύνεται με τη βοήθεια πιπέτας, προσπαθώντας να μείνει το ίζημα των κυττάρων όσο πιο στεγνό γίνεται.
4. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε 150 μl διαλύματος STEL, παρουσία 2λ λυσοζύμης, σε τελική συγκέντρωση 0,5 mg/ml.
5. Ακολουθεί βρασμός του δείγματος για 45 δευτερόλεπτα και μετά φυγοκέντρηση στις 13.000 στρ./λεπτό, για 20 λεπτά.
6. Μετά τη φυγοκέντρηση απομακρύνονται τα κυτταρικά υπολείμματα τα οποία έχουν τη μορφή ιζήματος. Στο υπερκείμενο γίνεται προσθήκη 180μl ισοπροπανόλης και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 στρ./λεπτό, για 5 λεπτά.
7. Το ίζημα ξεπλένεται με 400 μl. 70% αιθανόλη και φυγοκεντρείται στις 13.000 στρ./λεπτό, για 10 λεπτά.
8. Το ίζημα, αφού στεγνώσει στον αέρα, επαναδιαλύεται σε 30 μl ρυθμιστικού διαλύματος TE.

Διάλυμα STEL: 8% Sucrose
5% Triton X100

50mM Tris-HCl, PH {7}
50mM EDTA
0,5mg/ml Lysozyme

B.2.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα

1. 50 ml υγρού θρεπτικού μέσου LB, που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής, εμβολιάζεται με μοναδική αποικία και η καλλιέργεια επωάζεται για 18 ώρες, στους 37°C, με έντονη ανάδευση.
2. Ύστερα από φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, στις 6.000 στροφές/λεπτο, το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 5 ml διαλύματος PM1 και αφήνεται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Στη συνέχεια, προστίθενται 10 ml διαλύματος PM2 και μετά από ακόμη 10 λεπτά προστίθενται άλλα 7,5 ml διαλύματος PM3.
4. Το τελικό διάλυμα αφήνεται στον πάγο, για 15 λεπτά.
5. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20 λεπτά, στις 12.000 στροφές/λεπτο και το υπερκείμενο φιλτράρεται από διηθητικό χαρτί miracloth.
6. Στο διήθημα προστίθενται 10 ml ισοπροπανόλης και φυγοκεντρείται για 20 λεπτά, στις 12.000 στροφές/λεπτο.
7. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 2 ml αποσταγμένο νερό και 2 ml διαλύματος PM4.
8. Αφού παραμείνει στον πάγο για 30 λεπτά, φυγοκεντρείται ξανά για 10 λεπτά, στις 10.000 στροφές/λεπτο, στους 4°C.
9. Στο υπερκείμενο προστίθενται δύο όγκοι αιθανόλης και φυλάσσεται για 15 λεπτά, στους -80°C.
10. Το πλασμιδιακό DNA κατακρημνίζεται με φυγοκέντρηση για 20 λεπτά, στις 12.000 στροφές/λεπτο και όταν το ίζημα στεγνώσει, επαναιωρείται σε 500μl TE.

Διάλυμα PM1: 25mM Tris-HCl, PH{8}, 3mg/ml Lysozyme.

Διάλυμα PM2: 0,2M NaOH, 1% SDS

Διάλυμα PM3: 3M CH₃COOK, 1,8M CH₃COOH

Διάλυμα PM4: 50mM Tris-HCl, PH {8}, 5M LiCl

B.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥ DNA

B.3.1 Καθαρισμός νουκλεϊνικών οξέων με χρήση φαινόλης και χλωροφορμίου

1. Στο υδατικό διάλυμα του DNA προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης pH:8,0 και ακολουθεί καλή ανάμειξη.
2. Το μίγμα φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 13.000 στρ./λεπτό. Η υδατική υπερκείμενη φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα.
3. Προστίθεται ίσος όγκος μίγματος φαινόλης/χλωροφορμίου (1:1). Ακολουθεί καλή ανάμειξη του νέου μίγματος και φυγοκέντρηση όπως προηγουμένως.
4. Η υπερκείμενη φάση, η οποία προκύπτει από τη φυγοκέντρηση, μεταφέρεται σε νέο σωλήνα όπου αναμειγνύεται με ίσο όγκο χλωροφορμίου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση όπως προηγουμένως.

5. Το καθαρό νουκλεϊνικό οξύ, το οποίο βρίσκεται στην υδατική φάση, κατακρυσμνίζεται όπως περιγράφεται παρακάτω.

B.3.2 Κατακρήμιση νουκλεϊνικών οξέων

Η καθίζηση των νουκλεϊνικών οξέων γίνεται, παρουσία μονοκατιόντων, με προσθήκη είτε αιθανόλης είτε ισοπροπανόλης. Η κατακρήμιση λαμβάνει χώρα στους -20°C για 2-18 ώρες ή στους -70°C για περίπου 30 λεπτά.

Η αιθανόλη χρησιμοποιείται για την κατακρήμιση μικρών σε μήκος νουκλεϊνικών οξέων. Ο όγκος της αιθανόλης που προστίθεται είναι 2,5 φορές ο όγκος του υδατικού διαλύματος των νουκλεϊνικών οξέων. Όσον αφορά την ισοπροπανόλη που προστίθεται, ο όγκος είναι 0,7 φορές ο όγκος του υδατικού διαλύματος DNA.

Η παρουσία μονοκατιόντων επιτυγχάνεται με την προσθήκη διαλύματος οξικού νατρίου 3 M, pH:5,2 (τελική συγκέντρωση 0,3 M). Εναλλακτικά και ανάλογα με το είδος και το μέγεθος του νουκλεϊνικού οξέος χρησιμοποιείται διάλυμα 4 M LiCl (τελική συγκέντρωση 0,01 M) ή διάλυμα 10 M οξικού αμμωνίου (τελική συγκέντρωση 2,5 M).

B.3.3 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτή αγαρόζης

1. Ποσότητα αγαρόζης αναμειγνύεται σε κωνική φιάλη, με ορισμένο όγκο διαλύματος ηλεκτροφόρησης TAE. Η απαιτούμενη ποσότητα αγαρόζης καθορίζεται από τα επιθυμητά χαρακτηριστικά της πηκτής όσον αφορά τη διαχωριστικότητα των νουκλεϊνικών οξέων.
2. Η αγαρόζη και το διάλυμα TAE θερμαίνονται σταδιακά σε φούρνο μικροκυμάτων έως ότου επιτευχθεί η πλήρης ανάμιξή τους.
3. Η θερμοκρασία του διαλύματος αφήνεται να κατέλθει έως τους 60°C και αφού προστεθεί διάλυμα βρωμιούχου αιθυδίου (10mg/ml) σε τελική συγκέντρωση 0,5 $\mu\text{g/ml}$, αφήνεται να στερεοποιηθεί σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης. Στη συσκευή προσαρμόζεται η κατάλληλη χτένα, έτσι ώστε στην πηκτή να σχηματιστούν οι εγκοπές όπου θα τοποθετηθούν τα δείγματα των νουκλεϊνικών οξέων.
 4. Η χτένα απομακρύνεται από την πηκτή. Η συσκευή γεμίζει με διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE έτσι ώστε η πηκτή να παραμένει 1-2 mm κάτω από την επιφάνειά του.
 5. Τα δείγματα των νουκλεϊνικών οξέων, αφού αναμιχθούν με ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης, τοποθετούνται στις εγκοπές της πηκτής. Στη συνέχεια στα άκρα της εφαρμόζεται κατάλληλη τάση.

B.3.4 Ανάκτηση κλάσματος DNA από πηκτή αγαρόζης

1. Από την πηκτή αγαρόζης απομονώνεται, με τη χρήση καθαρού νιστεριού, το τμήμα της αγαρόζης που περιέχει την επιθυμητή ζώνη DNA. Το κομμάτι αυτό τοποθετείται σε σωλήνα erpendorf με τριπλάσιο όγκο διαλύματος QG. Ο σωλήνας αναδεύεται έντονα και τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 50°C για 10 λεπτά, ανακινούμενος ανά 3 λεπτά.
2. Στη συνέχεια προστίθεται ίσος όγκος ισοπροπανόλης, με τον αρχικό και το μίγμα φιλτράρεται, περνώντας από κολώνα καθαρισμού του DNA. Το μίγμα φυγοκεντρείται για 1 λεπτό.

3. Στην κολώνα καθαρισμού προστίθενται 500 μl διαλύματος QG και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό.
4. Στη συνέχεια προστίθενται 750 μl διαλύματος PE (διάλυμα ξεπλύματος) και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό.
5. Τέλος, για να αποκολληθεί το DNA από τη μεμβράνη, προστίθενται 50 μl νερό και η κολώνα φυγοκεντρείται για 1 λεπτό.

Τα διαλύματα QG και PE περιέχονται στο Gel Extraction Kit της QIAGEN.

B.3.5 Προετοιμασία πλασμιδιακών φορέων για ενσωμάτωση ένθετων DNA τμημάτων

1. Ο πλασμιδιακός φορέας υφίσταται πέψη με το επιθυμητό ένζυμο περιορισμού για 1,5 έως 3 ώρες. Η αντίδραση ελέγχεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα.
2. Ο ευθύγραμμος πλέον πλασμιδιακός φορέας καθαρίζεται με φαινόλη και χλωροφόρμιο (παράγραφος A.3.1.). Ο καθαρισμός αυτός αποσκοπεί κυρίως στην απενεργοποίηση του ενζύμου περιορισμού. Ακολουθεί κατακρήμνιση όπως περιγράφεται στην παράγραφο A.3.2.
3. Μετά τη φυγοκέντριση το ίζημα του DNA επαναδιαλύεται στον επιθυμητό όγκο TE ή νερού.

B.3.6 Ενσωμάτωση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακούς φορείς

Στην αντίδραση ενσωμάτωσης (ligation) η αναλογία των μορίων του πλασμιδιακού φορέα και του προς ένθεση τμήματος DNA διαφοροποιείται ανάλογα με το σχετικό μέγεθός τους. Η αραιώση τόσο του φορέα όσο και του ένθετου DNA γίνεται ώστε να διευκολύνεται η επίτευξη της απαιτούμενης αναλογίας.

Το μίγμα της αντίδρασης ενσωμάτωσης έχει ως εξής:

- DNA πλασμιδιακός φορέας 1 μl
- DNA ένθεσης 1 μl
- 10X διάλυμα λιγάσης 1 μl
- Λιγάση 1 μl
- Νερό έως τα 10 μl

Η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 16°C για 18 ώρες.

B.3.7 Μέθοδος τεμαχισμού διακριτών τμημάτων DNA

DNA β-αμυρινη: 15 μl
 TA: 3 μl
 EcoRV: 1 μl
 HindIII: 1 μl
 ddH₂O: 10 μl
 Τελικός όγκος: 30 μl

Βάζουμε σε ένα σωλήνα Eppendorf του 1,5ml τα παραπάνω αντιδραστήρια και τοποθετούμε το μίγμα στο υδατόλουτρο, στους 37°C, για 1,5h.

Στη συνέχεια, επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία για τον πλασμιδιακό φορέα, με σκοπό να χάσει την κυκλική του μορφή και να ευθυγραμμιστεί, για να μπορέσει

στη συνέχεια να ενωθεί με το DNA του γονιδίου της β-αμυρίνης, όπως αυτό προέκυψε από την προηγούμενη πέψη.

Η πέψη του πλασμιδιακού φορέα θα πραγματοποιηθεί σε δύο φάσεις διότι οι δύο διαφορετικές ενδονουκλεάσες περιορισμού (*Hind*III, *Sma*I) δρουν σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

DNA p35S:	15μl
TA:	3μl
<i>Hind</i> III:	1μl
Rnase:	1μl
ddH ₂ O:	9μl
Τελικός όγκος:	30μl

Βάζουμε σε ένα σωλήνα Eppendorf του 1,5ml τα παραπάνω αντιδραστήρια και τοποθετούμε το μίγμα στο υδατόλουτρο, στους 37°C, για 1,5h.

Έπειτα, ακολουθούμε τη διαδικασία της απενεργοποίησης των ενδονουκλεασών περιορισμού (heat inactivation), έτσι ώστε να αποτραπεί τυχόν συνέχιση της δράσης του πρώτου ενζύμου κατά τη διάρκεια δράσης του δεύτερου. Η απενεργοποίηση των ενζύμων γίνεται αφήνοντας το διάλυμα της πέψης στους 65°C, για 20'.

Ένας άλλος τρόπος είναι η κατακρήμνιση νουκλεοξέων, που αναφέρεται παρακάτω και η επαναδιάλυση του DNA σε τελικό όγκο 10 μl. Στη συνέχεια προχωράμε στη δεύτερη φάση της πέψης:

DNA p35S/ <i>Hind</i> III:	10μl
<i>Sma</i> I:	1μl
Ρυθμιστικό δ/μα:	3μl
ddH ₂ O:	16μl
Τελικός όγκος:	30μl

Βάζουμε σε ένα σωλήνα Eppendorf του 1,5ml τα παραπάνω αντιδραστήρια και τοποθετούμε το μίγμα στο ornamental incubator, στους 25°C, για 20'.

Στη συνέχεια κάνουμε κατακρήμνιση νουκλεοξέων και στα δύο DNA, για να πάρουμε καθαρά νουκλεοξέα από τα διαλύματα που προκύπτουν από την πέψη. Τέλος, τα διατηρούμε στους -20oC.

B.3.8 Ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων DNA με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

Με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction) επιτυγχάνεται η ενίσχυση του υπάρχοντος DNA. Όταν είναι γνωστό το γονίδιο που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε, χρειαζόμαστε τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- Ένα γονίδιο-στόχος
- Ίση ποσότητα των τεσσάρων νουκλεοτιδίων (Αδενίνη, Θυμίνη, Γουανίνη, Κυτοσίνη).
- Δύο ολιγονουκλεοτίδια – εκκινητές, οι οποίοι θα είναι συμπληρωματικοί των δύο άκρων των αλυσίδων που θα συντεθούν.
- Πολυμεράση, η οποία, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές, συνθέτει την υπόλοιπη συμπληρωματική αλυσίδα.

- Ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο δημιουργεί κατάλληλες συνθήκες για να δράσει η πολυμεράση.
- Τέλος, συμπληρώνουμε με υπερκάθαρο, αποστειρωμένο νερό έως τον τελικό όγκο.

B.3.9 Μέθοδος PCR για την ενίσχυση του DNA του γονιδίου της συνθάσης της β-αμυρίνης.

DNA β-αμυρίνης:	1μl
Εκκινητής F:	1μl
Εκκινητής R:	1μl
Ρυθμιστικό δ/μα:	1μl
dNTP's:	1μl
πολυμεράση:	1μl
ddH ₂ O:	<u>40μl</u>
Τελικός όγκος:	50μl

Βάζουμε όλα τα αντιδραστήρια σε ένα σωλήνα Eppendorf 250μl και επωάζουμε το διάλυμα στο thermal cycler για 35 κύκλους, στις παρακάτω συνθήκες:

Κύκλος 1 ^{ος} :	94°C για 3´ 54°C για 45´´ 72°C για 1´
Κύκλος 2 ^{ος} -34 ^{ος} :	94°C για 45´ 54°C για 45´´ 72°C για 1´
Κύκλος 35 ^{ος} :	94°C για 45´ 54°C για 45´´ 72°C για 10´

B.3.10 Ενίσχυση ένθετου σε πλασμιδιακό φορέα DNA

Η απομόνωση του ένθετου DNA από ένα απομονωμένο πλασμίδιο γίνονται με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Για την αντίδραση χρησιμοποιείται εναιώρημα πλασμιδίου και οι εκκινητές AF1 και AF2 οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί σε ακολουθίες οι οποίες εδράζουν στα άκρα της κλωνοποίησης του DNA. Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των δύο εκκινητών είναι:

AF1: 5'-d(ATA AGC TTG CAG AAG ATC ATG TGG AAG C)-3´

AF2: 5'-d(TAG ATA TCT CTA TTG ATG TGG CTG TGC C)-3´

Η αντίδραση PCR γίνεται ως εξής:

DNA εκμαγείο	1μl
Εκκινητής AF1	1μl
Εκκινητής AF2	1μl
Μίγμα dNTPs	1μl
10X PCR διάλυμα	5μl
Taq DNA πολυμεράση	1μl
ddH ₂ O	<u>40μl</u>

τελικός όγκος 50μl

Οι κύκλοι της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης ήταν:

1 ^{ος} κύκλος	94°C για 3 λεπτά 54°C για 1 λεπτό 72°C για 1 λεπτό
2 ^{ος} -34 ^{ος} κύκλος	94°C για 1 λεπτό 54°C για 1 λεπτό 72°C για 1 λεπτό
35 ^{ος} κύκλος	94°C για 1 λεπτό 54°C για 1 λεπτό 72°C για 10 λεπτά

B.3.11 Blue – Gels

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των μετασηματισμένων πλασμιδίων και το μεγαλύτερο πλεονέκτημά της είναι η ταχύτητα με την οποία εντοπίζονται οι πλασμιδιακές δομές που φέρουν τις ενθέσεις.

1. Στη συνέχεια, προστίθενται 10 μl Blue Gel Juice και ανακινούνται έντονα.
2. Τοποθετούνται 20 μl TE-Rnase σε κάθε σωλήνα erpendorf και σε κάθε ένα από αυτά προστίθεται μια μοναδιαία αποικία, με τη βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας.
3. Ακολουθεί επώαση στους 65°C, για 30 λεπτά.
4. Τέλος, αφού ανακινήθουν έντονα, ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αγαρόζης 1%, για 1 ώρα και ακολουθεί χρώση της πηκτής με βρωμιούχο αιθύδιο και αυτοραδιογραφία.

Πίνακας B.5 Διαλύματα για τη διαδικασία των Blue Gels

TE-RNase	10mM Tris-HCl pH{8}, 1mM EDTA, 100 μg/ml RNase A
Blue Gel Juice	5% SDS, 0,02 w/v κυανόν του ξυλενίου (bromophenol blue), 25% v/v γλυκερόλη, σε TE

B.4 DNA-DNA ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ

Σαν μοριακός υβριδισμός χαρακτηρίζεται η δημιουργία δίκλωνων μορίων νουκλεϊνικών οξέων με ζευγάρισμα των βάσεων συμπληρωματικών μονόκλωνων αλυσίδων. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση αλληλουχιών DNA ή RNA που είχαν ακινητοποιηθεί σε στερεά υποστρώματα (μεμβράνες νιτροκυτταρίνης ή νάιλον μεμβράνες). Σαν ανιχνευτής αυτών των αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε ένα μόριο νουκλεϊνικού οξέος, σημασμένο είτε ραδιενεργά με 32P-dATP, είτε μη ραδιενεργά με DIG11-dUTP. Η θερμοκρασία υβριδισμού καθορίζεται ανάλογα με τις εκάστοτε απαιτήσεις.

B.4.1 Σήμανση νουκλεϊνικών οξέων με DIG11-dUTP (PROB)

Για τη σήμανση DNA ανιχνευτών με διγοξυγενίνη, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο της Boehringer με τυχαία εξαμερή και ακολουθείται η εξής διαδικασία: 100-200 ng DNA αποδιατάσσονται με βρασμό για 10 λεπτά και αφού ο όγκος του προσαρμοστεί στα 15 μl με ddH₂O, σε σωλήνα erpendorf και πάντα στον πάγο, προστίθενται τα παρακάτω:

- DNA (αποδιαταγμένο): 15 μl
- Μίγμα τυχαίων εξαμερών: 2 μl
- Μίγμα σήμανσης dNTP: 2 μl
- Πολυμεράση: 1 μl

Ύστερα από καλή ανάμιξη των παραπάνω, το μίγμα επωάζεται για 20 ώρες περίπου, στους 37°C και στη συνέχεια προστίθενται τα παρακάτω:

- EDTA (0,2M): 2 μl
- LiCl (4M): 2,5 μl
- Αιθανόλη 100%: 75 μl

Το σημασμένο DNA κατακρυσνίζεται για 20 ώρες, στους -20°C. Στη συνέχεια, φυγοκεντρείται για 20 λεπτά, στις 13.000 στροφές/λεπτό, ξεπλένεται με 70% αιθανόλη και επαναδιαλύεται σε 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος TE.

B.4.2 Υβριδισμός νουκλεϊνικών οξέων

1. Η νάιλον μεμβράνες – θετικά φορτισμένη – κόβονται σε κυκλικό σχήμα και τοποθετούνται μέσα στα τρυβλία που έχουν ανακαλλιεργηθεί για τον υβριδισμό.
2. Αφού έρθουν σε επαφή με το υπόστρωμα για λίγα λεπτά, αφαιρούνται με μία λαβίδα και τοποθετούνται σε χαρτί χρωματογραφίας 3MM, το οποίο έχει διαβρεχτεί με διάλυμα αποδιάταξης.
3. Έπειτα από 5 λεπτά, τοποθετούνται σε νέο χαρτί χρωματογραφίας 3MM, το οποίο έχει διαβρεχτεί αυτή τη φορά με διάλυμα εξουδετέρωσης.
4. Στη συνέχεια, οι μεμβράνες τοποθετούνται σε διάλυμα 2 X SSC και αφήνονται να ξεπλυθούν.
5. Αφού στεγνώσουν, τοποθετούνται ανάμεσα σε 2 φύλλα χαρτί χρωματογραφίας 3MM και αφήνονται στους 80°C, για 1-2 ώρες.
6. Στη συνέχεια, οι μεμβράνες ξεπλένονται σε διάλυμα 2 X SSC + 0,1% SDS, όπου τρίβονται καλά για να αφαιρεθούν τα βακτηριακά κύτταρα και να μείνει μόνο το DNA, ομοιοπολικά συνδεδεμένο με την επιφάνεια.
7. Αφού γίνουν λείες, οι μεμβράνες τοποθετούνται σε διάλυμα υβριδισμού και αφήνονται εν κινήσει, στους 65°C, για 1 ½ ώρα (προϋβριδισμός).
8. Έπειτα, οι μεμβράνες τοποθετούνται σε νέο διάλυμα υβριδισμού, στο οποίο έχουν προστεθεί 25 μl PROB – αφού προηγουμένως έχει αποδιαταχθεί για 10 λεπτά, στους 95°C και έχει τοποθετηθεί ακαριαία στον πάγο. Οι μεμβράνες επωάζονται στις συνθήκες υβριδισμού για περισσότερο από 16 ώρες.
9. Μετά το τέλος του υβριδισμού ακολουθούν ξεπλύματα ως εξής:
Με 2 X SSC + 0,1% SDS δύο φορές από 5 λεπτά, στους 65°C
Με 0,1 X SSC + 0,1% SDS μία φορά για 30 λεπτά, στους 60°C
10. Στη συνέχεια, οι μεμβράνες αφήνονται σε διάλυμα ανίχνευσης I, για 5 λεπτά

11. Κατόπιν, επωάζονται σε διάλυμα ανίχνευσης II, για 45 λεπτά.
12. Για την εμφάνιση του σήματος υβριδισμού, αραιώνεται το αντίσωμα DigAP σε τελική συγκέντρωση 1:5000 σε διάλυμα ανίχνευσης II και σε αυτό επωάζονται οι μεμβράνες για ακόμη 45 λεπτά.
13. Έπειτα, γίνονται δύο ξεπλύματα των 30 λεπτών, με διάλυμα ανίχνευσης I.
14. Στη συνέχεια, οι μεμβράνες τοποθετούνται σε διάλυμα ανίχνευσης III για 5-10 λεπτά.
15. Κατόπιν προστίθεται διάλυμα χρωματικής αντίδρασης και οι μεμβράνες αφήνονται σε σκοτεινό θάλαμο, έως ότου η εμφάνιση του σήματος φτάσει στο επιθυμητό σημείο.
16. Η χρωματική αντίδραση σταματάει με το ξέπλυμα των μεμβρανών με ρυθμιστικό διάλυμα TE.

Πίνακας Β.6. Διαλύματα υβριδισμού

Διάλυμα ανίχνευσης I	100mM Tris, 150mM NaCl, pH{7,5}
Διάλυμα ανίχνευσης II	100mM Tris, 150mM NaCl, pH{7,5}, Blocking reagent (Boeringer)
Διάλυμα ανίχνευσης III	10mM Tris, 100mM NaCl, 50mM MgCl, pH{9,2}
Διάλυμα αποδιάταξης	1,5M NaCl, 0,5M NaOH
Διάλυμα εξουδετέρωσης	1M Tris, 1,5M NaCl, pH{8}
Διάλυμα υβριδισμού	1% BSA, 1mM EDTA, 0,5M Na- phosphate pH{7,2}, 7% SDS
Διάλυμα χρωματικής αντίδρασης	10mM Tris, 100mM NaCl, 50mM MgCl, pH{9,2} και προστίθενται 45 μl διαλύματος NBT και 35 μl διαλύματος X-phosphate <i>Το διάλυμα πρέπει να παρασκευάζεται επιτόπου, στο σκοτάδι.</i>

B.5 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΓΡΟΒΑΚΤΗΡΙΟΥ

B.5.1 Άμεσος μετασχηματισμός του *Agrobacterium* με πλασμιδιακές κατασκευές (Freeze-Thaw Method)

1. 50 ml υγρού θρεπτικού μέσου YEP, που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής, εμβολιάζονται με μοναδική αποικία Αγροβακτηρίου και η καλλιέργεια επωάζεται για 18 ώρες, στους 28°C, με έντονη ανάδευση.
2. 50 ml υγρού θρεπτικού μέσου YEP, που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής, εμβολιάζεται με μοναδική αποικία και η καλλιέργεια επωάζεται για 4-5 ώρες, στους 28°C, με έντονη ανάδευση, έως ότου η απορρόφηση OD₆₀₀ να φτάσει στο 0,6 (σύμφωνα με τη μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο).
3. Η καλλιέργεια τοποθετείται στον πάγο για 10 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκεντρείται για 5 λεπτά, στους 4°C.
4. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 1 ml CaCl 20mM και στη συνέχεια 100 μl από το αιώρημα τοποθετούνται σε ένα, ήδη παγωμένο, σωλήνα Eppendorf.

5. Προστίθεται 1 μl πλασμιδιακού DNA και τα κύτταρα καταψύχονται ακαριαία με υγρό άζωτο.
6. Στη συνέχεια, επωάζονται στο υδατόλουτρο για 5 λεπτά, στους 37°C.
7. Αφού προστεθεί στα κύτταρα 1 μl YEP, επωάζεται για 2-4 ώρες, στους 28 °C, με ελαφριά ανάδευση.
8. Τέλος, τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται για 30 δευτερόλεπτα, το ίζημα επαναιωρείται σε 100 μl YEP και επιστρώνεται σε τρυβλίο με θρεπτικό μέσο YEP, όπου περιέχονται τα κατάλληλα αντιβιοτικά.

B.6 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΦΥΤΩΝ ΜΕ ΤΟ *Agrobacterium tumefaciens*

B.6.1 Αποστείρωση σπόρων *Lotus japonicus* και βλάστησή τους

1. 0,5 g σπόρων *L. japonicus* τοποθετούνται για 5 λεπτά, σε 2-3 ml πυκνό διάλυμα H₂SO₄. Μετά την απομάκρυνση του θειϊκού οξέος, οι σπόροι ξεπλένονται στην αρχή με παγωμένο, αποστειρωμένο, απιονισμένο H₂O και έπειτα με H₂O θερμοκρασίας δωματίου, για τουλάχιστον 6 φορές ακόμη. Έπειτα, οι σπόροι αφήνονται για 5 λεπτά, σε διάλυμα χλωρίνης 10% και ξεπλένονται με τον ίδιο τρόπο.
2. Στη συνέχεια, μεταφέρονται σε τρυβλία με διηθητικό χαρτί, εμποτισμένα με 12-15 ml ddH₂O, τα οποία σφραγίζονται αεροστεγώς, με διαφανή μεμβράνη και καλύπτονται με αλουμινόχαρτο.
3. Τέλος, οι σπόροι επωάζονται στους 28 °C, για 4 ημέρες, σε πλήρες σκοτάδι.

B.6.2 Τραυματισμός φυτών και μόλυνση με το *Agrobacterium tumefaciens*

1. Αποικίες Αγροβακτηρίου, 2 ημερών, απομονώνονται με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα και επαναιωρούνται σε 5 ml υγρό θρεπτικό μέσο YMB, η κάθε μία ξεχωριστά, με ανάδευση έως τελικής πυκνότητας 5X10⁹. Έπειτα, η βακτηριακή καλλιέργεια αφήνεται, υπό γαλακτώδη μορφή, σε θερμοκρασία δωματίου, έως ότου προετοιμαστούν τα τρυβλία συγκαλλιέργειας.
2. Στα τρυβλία συγκαλλιέργειας τοποθετούνται αποστειρωμένα, διηθητικά χαρτάκια, συνολικού πάχους 0,5 cm και προστίθενται 12-15 ml θρεπτικού υποστρώματος συγκαλλιέργειας
3. Έπειτα, προετοιμάζονται νέα τρυβλία, με δύο στρώσεις αποστειρωμένου, διηθητικού χαρτιού, εμποτισμένου με 4 ml διαλύματος *Agrobacterium* σε YMB ή σκέτου YMB, για τα τρυβλία-μάρτυρες.
4. Τα υποκοτύλια αφαιρούνται από τα έκφυτα και μεταφέρονται στα τρυβλία που περιέχουν καλλιέργεια *Agrobacterium*.
5. Εκεί, τα υποκοτύλια τέμνονται κατά μήκος και μεταφέρονται σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο συγκαλλιέργειας.
6. Τα τελευταία τρυβλία επωάζονται για 7 ημέρες, στους 21°C, σε συνεχές σκοτάδι.
7. Για την εξάλειψη του *Agrobacterium*, τα έκφυτα μεταφέρονται σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης κάλλων, με προσθήκη σεφοταζάμης σε συγκέντρωση 300 μg/ml. Τα έκφυτα επωάζονται για 7 ημέρες, στους 26 °C, σε συνεχή φωτισμό.

8. Η επιλογή των μετασχηματισμένων κάλλων ξεκινάει με τη μεταφορά των εκφύτων σε καινούρια τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης κάλλων, σεφοταζάμη, σε συγκέντρωση 300 µg/ml και υδρομυκίνη, σε συγκέντρωση 15 µg/ml. Τα έκφυτα επωάζονται για 5 εβδομάδες, στους 26 °C, σε συνεχή φωτισμό. Μεταφορά των εκφύτων σε καινούρια τρυβλία με το ίδιο θρεπτικό υπόστρωμα, γίνεται κάθε 7 ημέρες.
9. Μετά το πέρας των 5 εβδομάδων, γίνεται ο διαχωρισμός των πράσινων κάλλων από τα υπόλοιπα έκφυτα.
10. Οι μετασχηματισμένοι κάλλοι μεταφέρονται σε θρεπτικό μέσο επαγωγής βλαστηδίων, με προσθήκη σεφοταζάμης σε συγκέντρωση 300 µg/ml. Βλαστηδιακές δομές αναμένεται να αναπτυχθούν στην σκούρα πράσινη ζώνη που εμφανίζεται περιμετρικά από τους κάλλους. Οι κάλλοι πρέπει να διατηρούνται ενιαίοι, ενώ οι κίτρινοι ή καφετί ιστοί πρέπει να απομακρύνονται.
11. Ο πολλαπλασιασμός των μετασχηματισμένων κάλλων συνεχίζεται για 3 εβδομάδες, στους 26 °C, σε συνεχή φωτισμό.
12. Στη συνέχεια, οι μετασχηματισμένοι κάλλοι μεταφέρονται σε θρεπτικό μέσο επαγωγής βλαστιδίων και η ανάπτυξη συνεχίζεται για 2 εβδομάδες, στους 26 °C, σε συνεχή φωτισμό.
13. Για βλαστική επιμήκυνση, οι κάλλοι μεταφέρονται σε θρεπτικό μέσο επιμήκυνσης βλαστιδίων και η επιμήκυνση συνεχίζεται για 2 εβδομάδες, στους 21 °C.
14. Μεμονωμένα βλαστίδια, μήκους 2-4 cm, αποσπώνται και μεταφέρονται σε θρεπτικό μέσο επαγωγής ριζιδίων για 1 εβδομάδα, στους 21 °C.
15. Στη συνέχεια, τα βλαστίδια μεταφέρονται σε θρεπτικό μέσο επιμήκυνσης ριζιδίων, στο οποίο επωάζονται για τουλάχιστον 2 εβδομάδες, στους 21 °C.
16. Τα φυτάρια μεταφέρονται σε γλαστράκια με τύρφη και καλύπτονται με πλαστικές σακούλες.
17. Έπειτα, μεταφέρονται στο θερμοκήπιο, όπου αργότερα αφαιρούνται οι πλαστικές σακούλες για τη σκληραγώγηση των φυτών. Τα φυτά αφήνονται να αυτόνομιμοποιηθούν και μετά από 2 μήνες γίνεται η συλλογή των σπόρων.

Πίνακας Β.7. Θρεπτικά υλικά ανάπτυξης του βακτηριακού στελέχους *Agrobacterium*.

Υγρό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης YMB (για 1 lt)	10 g μανιτόλη, 0,5 g εκχύλισμα ζύμης, 0,5 g K ₂ HPO ₄ , 0,1 g MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0,2 g NaCl, 0,01 g FeCl ₃ , 0,15 g CaCl ₂ , pH{7}.
Στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης YMA	1 lt YMA, 15 g άγαρ.

Πίνακας Β.8. Θρεπτικά υποστρώματα για συγκαλλιέργεια, επιλογή μετασχηματισμένων κάλλων και αναγέννηση φυτών.

Θρεπτικό υπόστρωμα συγκαλλιέργειας	Θρεπτικό μέσο B5 σε συγκέντρωση 1:10, 5mM MES pH{5,2}, 3 µg/ml 2,4-D, 3 µg/ml κινετίνη.
------------------------------------	---

Θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης κάλλων	Θρεπτικό μέσο B5 με σουκρόζη 2%, 0,2% gelrite, 3 $\mu\text{g/ml}$ 2,4-D, 3 $\mu\text{g/ml}$ κινετίνη.
Θρεπτικό υπόστρωμα επαγωγής βλαστιδίων	Θρεπτικό μέσο B5 με σουκρόζη 2%, 0,2% gelrite, 10mM NH_4^+ , 0,2 $\mu\text{g/ml}$ BAP.
Θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης βλαστιδίων	Θρεπτικό μέσο B5 με σουκρόζη 2%, 0,2% gelrite, 0,2 $\mu\text{g/ml}$ BAP.
Θρεπτικό υπόστρωμα επιμήκυνσης βλαστιδίων	Θρεπτικό μέσο B5 με σουκρόζη 2%, 0,2% gelrite.
Θρεπτικό υπόστρωμα επαγωγής ριζιδίων	Θρεπτικό μέσο B5 σε συγκέντρωση 0,5:10 με σουκρόζη 1%, 0,4% gelrite, 0,5 $\mu\text{g/ml}$ NAA.
Θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης ριζιδίων	Θρεπτικό μέσο B5 σε συγκέντρωση 0,5:10 με σουκρόζη 1%, 0,4% gelrite.

Πίνακας Β.9. Συμπυκνωμένα διαλύματα φυτορμονών

Κινετίνη στα 3 mg/ml	75 mg κινετίνη διαλύονται σε 0,5 ml HCl 6M, προστίθενται 20 ml H_2O , το διάλυμα τιτλοδοτείται με KOH 1M σε τελικό pH{2} και προστίθεται H_2O έως τα 25 ml.
2,4-D στα 3 mg/ml	75 mg 2,4-D διαλύονται σε 12 ml 96% αιθανόλη και το διάλυμα συμπληρώνεται με H_2O έως τα 25 ml.
BAP στο 1 mg/ml	25 mg BAP διαλύονται σε 0,5 ml NaOH 1M και το διάλυμα συμπληρώνεται με H_2O έως τα 25 ml.
NAA στο 0,5 mg/ml	12,5 mg NAA διαλύονται σε 12 ml 96% αιθανόλη και το διάλυμα συμπληρώνεται με H_2O έως τα 25 ml.

Όλα τα διαλύματα φιλτράρονται και αποθηκεύονται, ανά 5 ml, στους -20°C .

Για να χρησιμοποιηθούν, ξεπαγώνονται αργά σε φούρνο μικροκυμάτων.

Πίνακας Β.10. Συμπυκνωμένα δλύματα αντιβιοτικών

Υγρομυκίνη στα 10 mg/ml	Αραιώνεται σε H_2O . Αποστειρώνεται με φιλτράρισμα και αποθηκεύεται στους -20°C , ανά 5 ml.
Σεφοταξάμη στα 30 mg/ml	300 mg διαλύονται σε 10 ml H_2O . Αποστειρώνεται με φιλτράρισμα και χρησιμοποιείται την ίδια μέρα.

*Γ. Αποτελέσματα
Συζήτηση*

Γ.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γ.1.1 Συλλογή φυτικού ιστού *Lotus japonicus* και απομόνωση του γονιδίου της συνθάσης της β-αμυρίνης

Φυτά *Lotus japonicus* αναπτύχθηκαν σε γλαστράκια, μέσα στο θερμοκήπιο, σε ελεγχόμενες συνθήκες ανάπτυξης. Η συλλογή των σπόρων έγινε 7-8 εβδομάδες μετά τη φύτευση. Οι καινούριοι σπόροι υπέστησαν προβλάστηση και στη συνέχεια, από το φυτικό ιστό των ριζιδίων, έγινε απομόνωση DNA.

Το γονίδιο της συνθάσης της β-αμυρίνης (LjAmyII), που εντοπίζεται στο φυτικό ιστό της ρίζας του *Lotus japonicus* και του οποίου η αλληλουχία βάσεων είναι γνωστή, ενισχύθηκε, χρησιμοποιώντας τους παρακάτω εκκινητές, που περιείχαν θέσεις εγκοπής *Xho*I και *Kpn*I. Στη συνέχεια, το γονίδιο εισήχθη στον πλασμιδιακό φορέα pYes, μεταξύ των θέσεων *Xho*I και *Kpn*I.

LjAmyII(F).KpnI: 5'-GCATGGTACCGCAGAAGATCATGTGGAAGC-3'

LjAmyII(R).XhoI: 5'-CGTACTCGAGTCTATTGATGTGGCTGTGCC-3'

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης εφαρμόστηκε στις συνθήκες που περιγράφονται στην παράγραφο Α.3.10.

Γ.1.2 Προετοιμασία του πλασμιδιακού φορέα p35S και του ενισχυμένου DNA για ενσωμάτωση των δύο τμημάτων.

Η προετοιμασία των δύο τμημάτων γίνεται με τη μέθοδο της πέψης των νουκλεϊνικών οξέων με ενδονουκλεάσες περιορισμού.

Με τον όρο «πέψη» εννοούμε τον τεμαχισμό διακριτών τμημάτων DNA με τη βοήθεια των ενδονουκλεασών περιορισμού. Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού, ή αλλιώς ένζυμα που χρησιμοποιούνται στη βιοτεχνολογία ανήκουν στην ομάδα II και για τη δράση τους είναι απαραίτητη η παρουσία Mg^{++} . Τα ένζυμα αυτά αναγνωρίζουν μία συγκεκριμένη αλληλουχία βάσεων και κόβουν τη δίκλωνη αλυσίδα είτε μέσα στην αλληλουχία αυτή, είτε πολύ κοντά σε αυτή, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται διακριτά τμήματα DNA ορισμένου μεγέθους και αλληλουχίας των άκρων.

Στην πράξη, η δυνατότητα τεμαχισμού του DNA μας επιτρέπει να απομονώσουμε ένα συγκεκριμένο τμήμα DNA από ένα πλασμίδιο, για να το ενώσουμε στη συνέχεια με κάποιο άλλο, ή απλά να προσαρμόσουμε τα άκρα δύο διαφορετικών αλληλουχιών έτσι ώστε να ενωθούν μεταξύ τους.

Αρχικά, θα επιχειρήσουμε να προσαρμόσουμε τα άκρα του ένθετου DNA, δηλαδή του γονιδίου της συνθάσης της β-αμυρίνης, «κόβοντάς» τα με τα ένζυμα *Hind*III και *Eco*RV ταυτόχρονα.

Το ενισχυμένο, από το PCR, DNA του γονιδίου της συνθάσης της β-αμυρίνης, υφίσταται ταυτόχρονη πέψη με τα ένζυμα περιορισμού *Hind*III και *Eco*RV, για 1 ½ ώρα, στους 37°C, στις παρακάτω συγκεντρώσεις. (Σχήμα Γ.1)

DNA β-αμυρίνη:	15μl
TA:	3μl
<i>Eco</i> RV:	1μl
<i>Hind</i> III:	1μl

ddH₂O: 10μl
Τελικός όγκος: 30μl

Ο πλασμιδιακός φορέας p35S υφίσταται πέψη με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού *Sma*I και *Hind*III, για 1 ½ ώρα με την κάθε μία, στους 25°C και 37°C αντίστοιχα, στις παρακάτω συγκεντρώσεις. (Σχήμα Γ.1)

DNA: 15μl
TA: 3μl
*Sma*I: 2μl
RNase: 2μl
ddH₂O: 8μl
Τελικός όγκος: 30μl

DNA: 15μl
TA: 3μl
*Hind*III: 1μl
ddH₂O: 11μl
Τελικός όγκος: 30μl

Μετά την πρώτη πέψη, ο πλασμιδιακός φορέας κατακρυμνίζεται, όπως περιγράφεται στην παράγραφο Α.3.2. και επαναιωρείται σε 15 μl H₂O. Μετά τη δεύτερη πέψη, το ένζυμο περιορισμού απενεργοποιείται με θέρμανση, στους 65°C για 20 λεπτά.

Γ.1.3 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων και ανάκτηση κλάσματος από πηκτή αγαρόζης.

Τα τελικά προϊόντα των πέψεων, «φορτώνονται» σε πηκτή αγαρόζης 1% και ηλεκτροφορούνται για 1 ώρα περίπου, εφαρμόζοντας στα άκρα της τάση μεγέθους 90 V. Στη συνέχεια, τα δύο τμήματα DNA ανακτούνται από την πηκτή αγαρόζης και ακολουθεί η διαδικασία καθαρισμού των κλασμάτων DNA, σύμφωνα με το αντίστοιχο πρωτόκολλο της QIAGEN, όπως περιγράφεται στην παράγραφο Α.3.4.

Γ.1.4 Ενσωμάτωση του γονιδίου της β-αμυρίνης στον πλασμιδιακό φορέα p35S

Μία μικρή ποσότητα από τα δύο τμήματα DNA ηλεκτροφορείται, εκ νέου, σε πηκτή αγαρόζης για να παρατηρηθεί η αναλογία των συγκεντρώσεων μεταξύ του φορέα και του ένθετου DNA.

Έπειτα, ακολουθεί η διαδικασία της ενσωμάτωσης του ένθετου DNA στον πλασμιδιακό φορέα, όπως περιγράφεται στην παράγραφο Α.3.6., στις παρακάτω αναλογίες.

DNA πλασμιδιακός φορέα p35S	4 μl
DNA ένθετο LjAmyII	4 μl
10X διάλυμα λιγάσης	1 μl
Λιγάση	<u>1</u> μl
Τελικός όγκος	10 μl

Γ.1.5 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* με τον μετασχηματισμένο πλασμιδιακό φορέα p35S-AmyII και απομόνωσή του σε μικρή κλίμακα

Δεκτικά κύτταρα *E. coli* μετασχηματίζονται με 10 μl πλασμιδιακού DNA p35S-AmyII, όπως περιγράφεται στην παράγραφο Α.2.2. Έπειτα, το βακτηριακό διάλυμα επιστρώνεται σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα LB, τα οποία περιέχουν αμπικιλίνη σε συγκέντρωση 100 μg/ml.

Τα τρυβλία αφήνονται στους 37°C, για 18 ώρες και στη συνέχεια ακολουθεί ανακαλλιέργεια σε υγρό θρεπτικό μέσο LB, προσθήκη αμπικιλίνης σε συγκέντρωση 100 μg/ml.

Όλες οι βακτηριακές αποικίες ελέγχονται με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης, στις παρακάτω συνθήκες και σύμφωνα με την παράγραφο Α.3.11.

Master Mix

DNA	0μl
Εκκινητής AF1	1μl
Εκκινητής AF2	1μl
Μίγμα dNTPs	1μl
10X PCR διάλυμα	2,5μl
Taq DNA πολυμεράση	1μl
ddH ₂ O	<u>18,5μl</u>
τελικός όγκος	25μl X τον αριθμό των βακτηριακών αποικιών

Το Master mix χωρίζεται σε μέρη των 25 μl, σε σωλήνες eppendorf, σε κάθε έναν από τους οποίους προστίθεται το DNA από μία αποικία και στη συνέχεια αφήνονται στις αντίστοιχες συνθήκες του PCR.

Εναλλακτικά, οι βακτηριακές αποικίες ελέγχονται με τη μέθοδο των Blue Gels, όπως περιγράφεται στην παράγραφο Α.3.12., ή με τη μέθοδο του DNA-DNA μοριακού υβριδισμού, όπως περιγράφεται στην παράγραφο Α.4. Αφού εντοπιστούν τα πιθανά, ανασυνδυασμένα πλασμίδια, απομονώνονται, όπως περιγράφεται στην παράγραφο Α.2.3. και ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αγαρόζης 1%, για να διαπιστωθεί η επιτυχία της ενσωμάτωσης του γονιδίου της συνθάσης της β-αμυρίνης στον πλασμιδιακό φορέα p35S.

Το πλασμιδιακό DNA έχει μέγεθος περίπου 4.750 bp, δηλαδή το άθροισμα των νουκλεοτιδικών βάσεων του πλασμιδιακού φορέα και του ένθετου DNA.

Γ.1.6 Προετοιμασία του πλασμιδιακού φορέα pGreenII-0179 και του πλασμιδιακού DNA p35S-AmyII για ενσωμάτωση των δύο τμημάτων.

Μετά την ενσωμάτωση του γονιδίου της συνθάσης της β-αμυρίνης στον πλασμιδιακό φορέα p35S, ακολουθεί η, εκ νέου, απομόνωσή του, αυτή τη φορά μαζί με την κασέτα/προαγωγέα 35S-CaMV, μεγέθους 698 bp. Για το σκοπό αυτό, υφίσταται πέψη με το ένζυμο περιορισμού *EcoRV*, το οποίο έχει δύο θέσεις αναγνώρισης στην πολυπεπτιδική αλυσίδα του πλασμιδιακού DNA. Εκτός από τις δύο θέσεις αναγνώρισης, μία σε κάθε άκρο της κασέτας/προαγωγέα 35S-CaMV, υπάρχει και μία πολυδύναμη θέση αναγνώρισης (polylinker), μέσα στην οποία έχει κλωνοποιηθεί το γονίδιο της συνθάσης της β-αμυρίνης. Επομένως, αφαιρώντας την κασέτα/προαγωγέα 35S-CaMV, από τον πλασμιδιακό φορέα p35S, αφαιρείται ταυτόχρονα και το κλωνοποιημένο γονίδιο. Το συνολικό μέγεθος του εν λόγω

τμήματος ανέρχεται στα 2.400 bp και οι συνθήκες πέψης είναι οι ακόλουθες, σύμφωνα με την παράγραφο Α.3.8. (Σχήμα Γ.2)

DNA ένθετο: 30μl
TA: 6μl
EcoRV: 1μl
RNase: 2μl
ddH₂O: 21μl
Τελικός όγκος: 60μl

Ταυτόχρονα, προετοιμάζεται και ο πλασμιδιακός φορέας pGreenII-0179, για να δεχτεί την επικείμενη ενσωμάτωση του παραπάνω τμήματος DNA. Για το σκοπό αυτό, υφίσταται πέψη με την ενδονουκλεάση περιορισμού *SmaI*, στις συνθήκες που περιγράφονται παρακάτω, σύμφωνα πάντα με την παράγραφο Α.3.8. (Σχήμα Γ.2)

DNA φορέα: 15μl
TA: 3μl
SmaI: 1μl
RNase: 1μl
ddH₂O: 10μl
Τελικός όγκος: 30μl

Τέλος, όλη η ποσότητα του ένθετου DNA, καθώς και ένα μικρό δείγμα του πλασμιδιακού φορέα, μετά τις πέψεις, ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αгарόζης 1%. Το μεν ένθετο DNA θα ανακτηθεί, ξεχωρίζοντας έτσι από το υπόλοιπο πλασμίδιο p35S, ενώ στο δε πλασμιδιακό φορέα pGreen θα ελεγχθεί η επιτυχία της πέψης.

Γ.1.7 Ενσωμάτωση της ανασυνδιασμένης κασέτας/προαγωγέα 35S-CaMV/AmyII στον πλασμιδιακό φορέα pGreenII-0179

Τα τελικά διαλύματα των δύο πέψεων ενώνονται σε μία αντίδραση ενσωμάτωσης, στις ακόλουθες αναλογίες, σύμφωνα με την παράγραφο Α.3.6. (Σχήμα Γ.2)

DNA πλασμιδιακός φορέας	1 μl
DNA ένθεσης	1 μl
10X διάλυμα λιγάσης	1 μl
Λιγάση	1 μl
H ₂ O	έως τα 10 μl

Ο πλασμιδιακός φορέας pGreenII, ο οποίος επιλέγεται με καναμυκίνη σε *E. coli*, περιέχει μία πολυδύναμη θέση μέσα στο γονίδιο *LacZ* για επιλογή ανασυνδιασμένων πλασμιδίων, με μπλε/άσπρο χρώμα. Έτσι, προσθέτοντας, κατά τον μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων (σύμφωνα με την παράγραφο Α.2.2.) με το παραπάνω διάλυμα, IPTG και X-Gal σε κάθε τρυβλίο, ενεργοποιείται το γονίδιο της *LacZ*, το οποίο μετατρέπει τις αποικίες σε μπλε. Αν, όμως, η ενσωμάτωση της ανασυνδιασμένης “κασέτας” έχει επιτευχθεί, τότε η ικανότητα αυτή του γονιδίου της *LacZ* καταστρέφεται, με αποτέλεσμα οι αποικίες να φαίνονται άσπρες.

Στη συνέχεια, τα ανασυνδιασμένα πλασμίδια pGreenII/35S/AmyII υπόκεινται σε πέψη με την ενδονουκλεάση περιορισμού *Hind*III, στις παρακάτω αναλογίες, σύμφωνα με τις συνθήκες που περιγράφονται στην παράγραφο Α.3.8.

DNA: 5μl
Ρυθμ/κο δ/μα E: 3μl
*Hind*III: 1μl
ddH₂O: 21μl
Τελικός όγκος: 30μl

Μετά την πέψη, τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αгарόζης 0,8%, για 1 ώρα περίπου, εφαρμόζοντας στα άκρα τάση 90V.

Αφού φανούν στην αυτοραδιογραφία δύο «μπάντες», μεγέθους 2.495 bp (pGreen-backbone) και 3.048 bp (35S/AmyII κασέτα) αντίστοιχα, το πείραμα μπορεί να προχωρήσει στην επόμενη φάση, όπως περιγράφεται παρακάτω.

Γ.1.8 Μετασηματισμός του *Agrobacterium tumefaciens* με τους πλασμιδιακούς φορείς pGreen/35S/AmyII και pSoup

Ο μετασηματισμός επιτυγχάνεται με τη μέθοδο Freeze-Thaw, όπως περιγράφεται στην παράγραφο Α.5. (Σχήμα Γ.3)

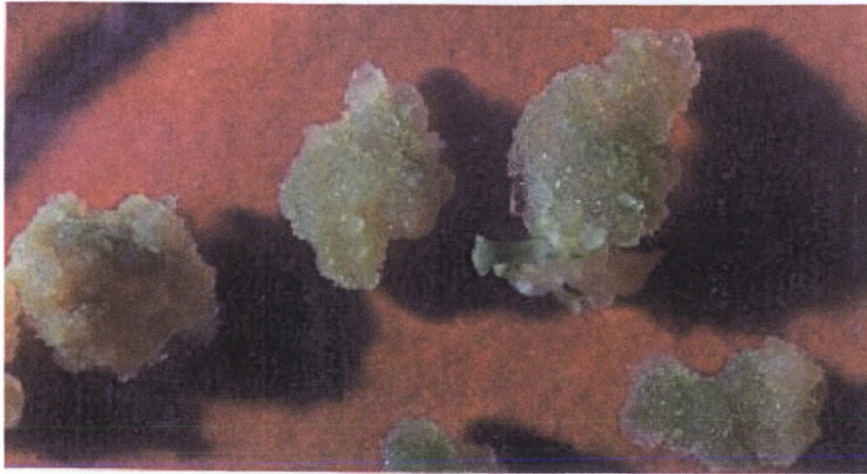
Στο τέλος, το εναιώρημα των βακτηριακών κυττάρων επιστρώνεται σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα YEP, τα οποία περιέχουν καρμπενικλίνη, ριφαμπικίνη, τετρακυκλίνη και καναμικίνη.

Γ.1.9 Μετασηματισμός εκφύτων *Lotus japonicus* με τα μετασηματισμένα *A. tumefaciens*

Ο μετασηματισμός των εκφύτων γίνεται με μόλυνσή τους από το *A. tumefaciens*, όπως περιγράφεται στην παράγραφο Β.6.2.

Αφού γίνει η ανάπτυξη του Αγροβακτηρίου, έως τις κατάλληλες συνθήκες συγκέντρωσης, ακολουθεί η μόλυνση των υποκοτυλίων των εκφύτων με την καλλιέργεια του Αγροβακτηρίου. Στη συνέχεια, γίνεται συγκαλλιέργεια των προσβεβλημένων υποκοτυλίων με το Αγροβακτήριο για 7 ημέρες. Έπειτα, ξεκινάει η διαδικασία εξάλειψης του Αγροβακτηρίου, μεταφέροντας τα υποκοτύλια σε θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης κάλλων, που περιέχει σεφοταξάμη, για ακόμα 7 ημέρες. Ακολουθεί η επιλογή των μετασηματισμένων κάλλων, με τη μεταφορά των εκφύτων σε θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης κάλλων, που περιέχει σεφοταξάμη και υγρομυκίνη (Εικόνα Γ.1). Η διαδικασία της επιλογής διαρκεί 5 εβδομάδες, ενώ η ανανέωση του θρεπτικού υποστρώματος γίνεται κάθε 7 ημέρες.

Την 3^η εβδομάδα της διαδικασίας επιλογής των μετασηματισμένων κάλλων, παρατηρήθηκε μόλυνση των εκφύτων και το πείραμα υπέστη αναγκαστική διακοπή.



Εικόνα Γ.1

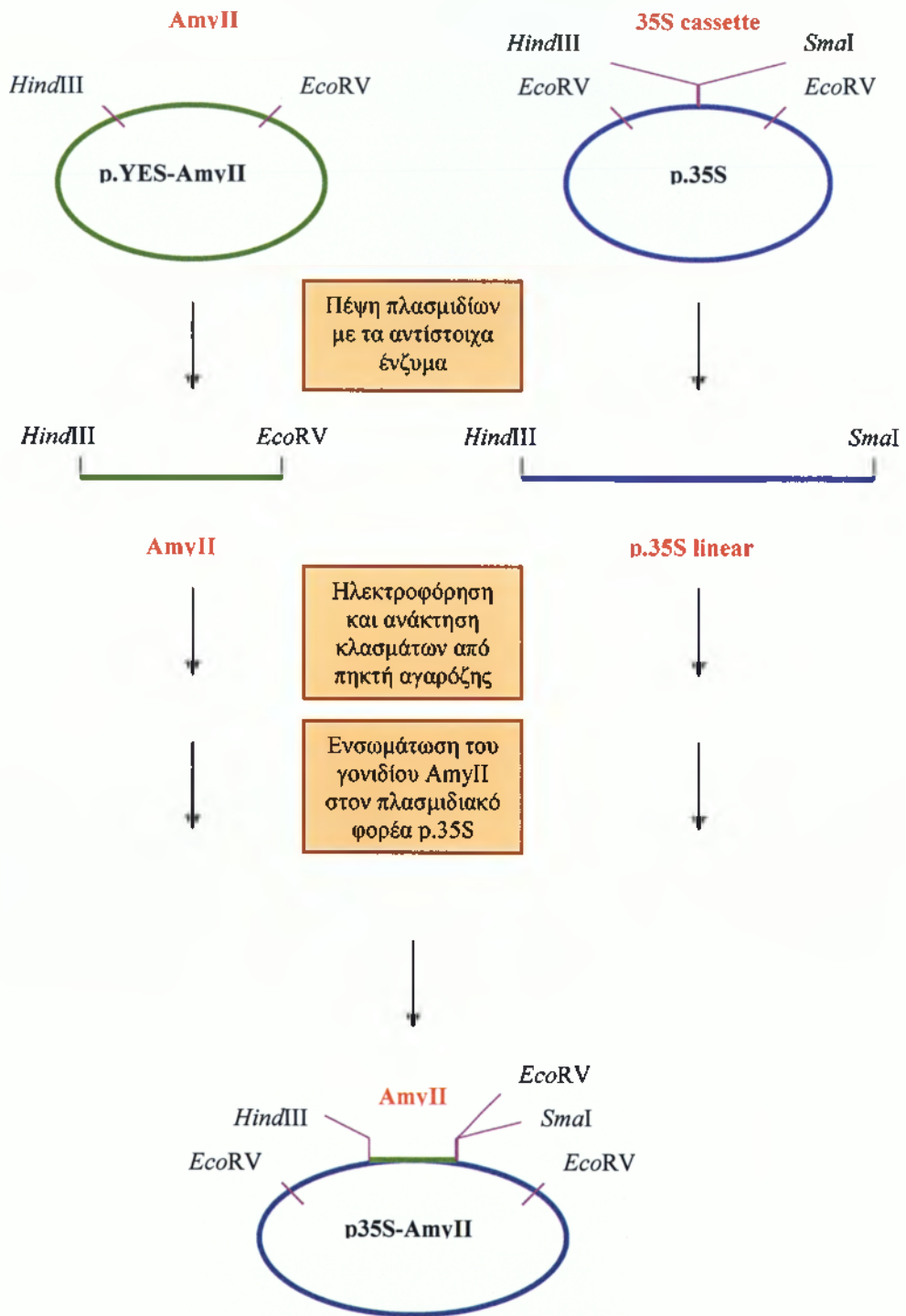
Γ.2 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στο συγκεκριμένο πείραμα δεν είχαμε, τελικά, ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας, εξαιτίας μόλυνσης που παρατηρήθηκε στα έκφυτα κατά την 3^η εβδομάδα επιλογής μετασηματισμένων κάλλων. Η μόλυνση αυτή, πιθανώς να οφείλεται στην ελλιπή δράση της σεφοταξάμης ή τη μη επιτυχημένη αποστείρωση κάποιων από τα υλικά.

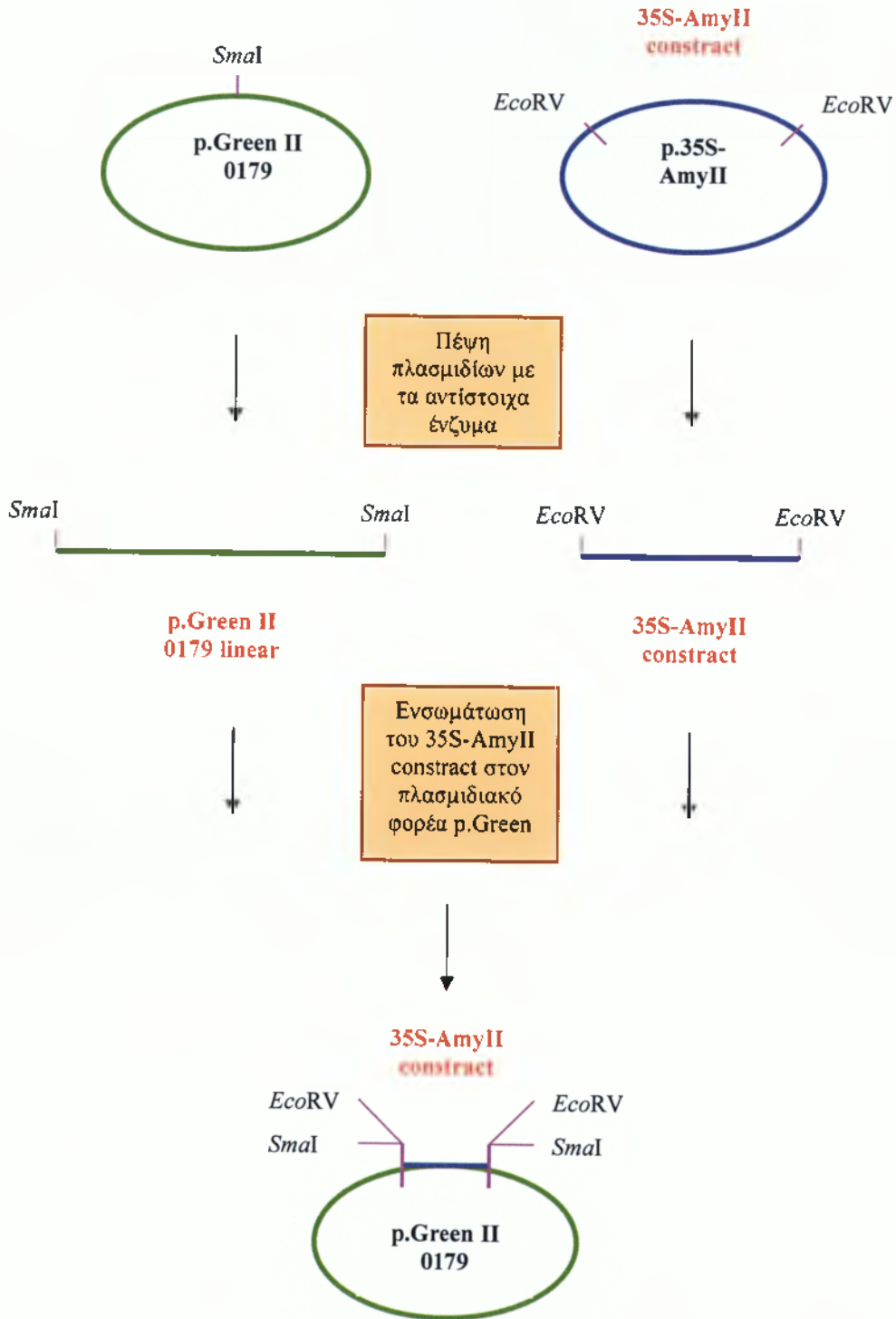
Παρ' όλα αυτά, η διαδικασία της ιστοκαλλιέργειας έφτασε μέχρι το στάδιο του κάλλου, χωρίς, ωστόσο, να προλάβουν να σχηματιστούν πράσινοι κάλλοι, όπως θα αναμενόταν μετά το πέρας των 5 εβδομάδων επιλογής.

Η αναγκαστική διακοπή του πειράματος μας εμποδίζει να βγάλουμε συμπεράσματα τόσο για την αποτελεσματικότητα της πειραματικής διαδικασίας, όσο και για το αρχικό μας ερώτημα. Δηλαδή, την αποσαφήνιση του ρόλου της β-αμυρίνης στη φυσική ανθεκτικότητα του φυτού έναντι των παθογόνων.

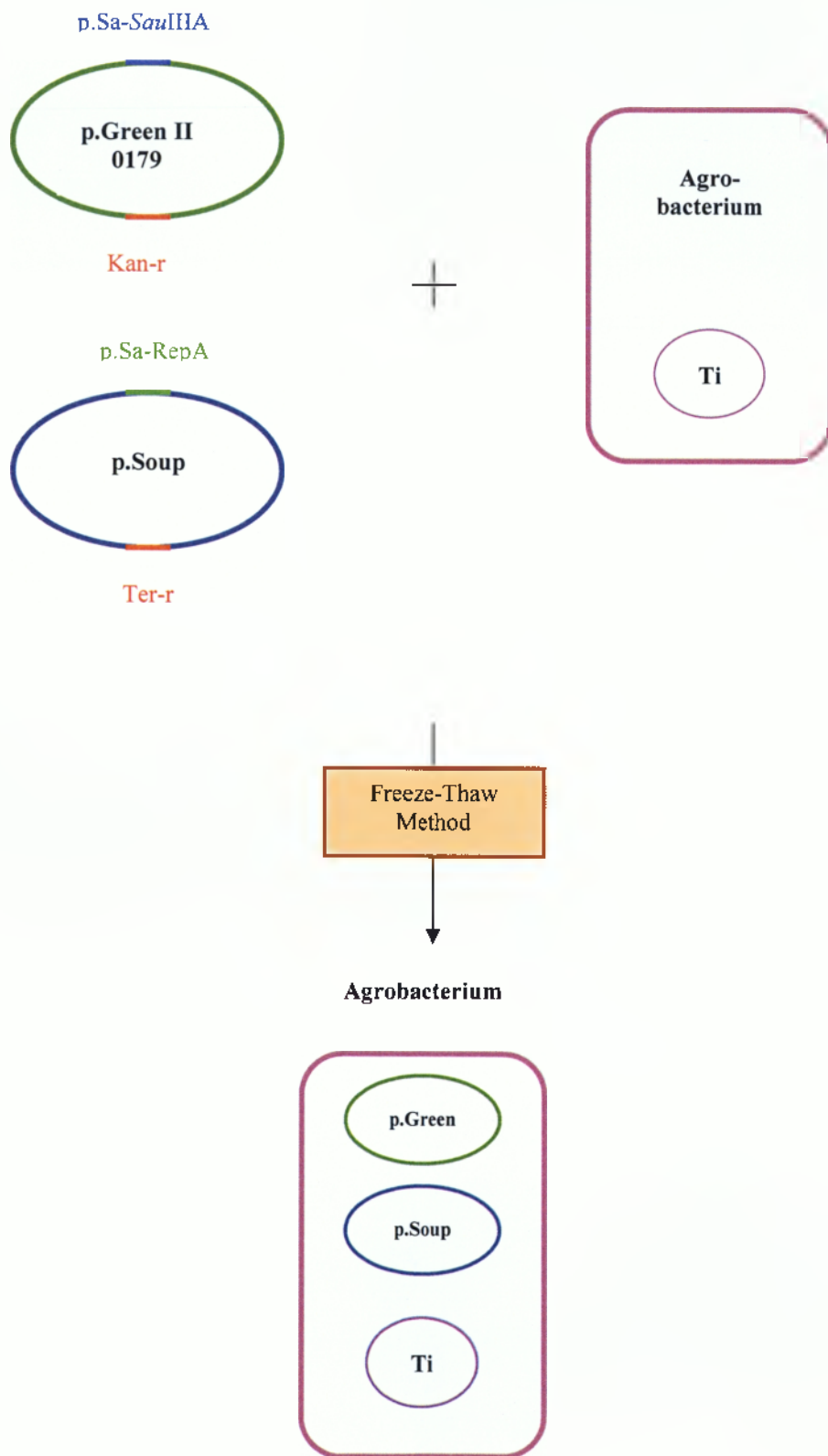




Σχήμα Γ.1



Σχήμα Γ.2



Σχήμα Γ.3

Περίληψη

Το αγροβακτήριο είναι ένα παθογόνο βακτήριο που επάγει σχηματισμό όγκων στα φυτά. Έχει την ιδιότητα, όταν μολύνει τα φυτικά κύτταρα, να μεταφέρει ένα ολόκληρο τμήμα του γενετικού του υλικού στο DNA των φυτών. Τα μεταφερόμενα γονίδια βρίσκονται στο πλασμίδιο ογκογένης T_i του αγροβακτηρίου και συγκεκριμένα στη θέση T του πλασμιδίου. Η θέση αυτή περικλείεται από συγκεκριμένες αλληλουχίες βάσεων, τα λεγόμενα συνοριακά άκρα της περιοχής T, δηλαδή το T_L (αριστερό συνοριακό) και το T_R (δεξιό συνοριακό). Για τη μεταφορά των γονιδίων στα φυτά, απαραίτητα είναι τα T_L και T_R, καθώς και ορισμένα γονίδια που βρίσκονται στην περιοχή *vir* του πλασμιδίου.

Αν αφαιρέσουμε τα γονίδια της περιοχής T ανάμεσα στα T_L και T_R, το αγροβακτήριο παύει να είναι παθογόνο για τα φυτά, έχουμε δηλαδή αποπλισμένα στελέχη αγροβακτηρίου. Αν, τέλος, στη θέση των αφαιρεθέντων γονιδίων βάλουμε κάποια άλλα γονίδια, έχουμε ένα σύστημα μεταφοράς γονιδίων στα φυτά.

Ένα χμαιρικό γονίδιο αποτελείται από στοιχεία διαφορετικής προέλευσης και δεν απαντάται στη φύση. Για να εκφραστεί ένα χμαιρικό γονίδιο μέσα στο φυτικό κύτταρο, εκτός από την κωδικοποιούσα αλληλουχία βάσεων, θα πρέπει να διαθέτει έναν προαγωγέα (*promotor*) για την έναρξη της μεταγραφής του γονιδίου και έναν τερματιστή (*terminator*) για τη λήξη της μεταγραφής.

Στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε να διευκρινισθεί ο ρόλος του γονιδίου της συνθάσης της β-αμυρίνης στο βιοσυνθετικό μονοπάτι των τριτερπενοειδών μεταβολιτών. Για το λόγο αυτό επιχειρήθηκε η υπερέκφραση του γονιδίου αυτού σε φυτά *L. japonicus*. Συγκεκριμένα, η κωδική περιοχή κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pGreen II 0179. Στον φορέα αυτό τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της συνθάσης της β-αμυρίνης θα ελεγχθούν από τον 35S προαγωγέα, ο οποίος κατευθύνει τη μεταγραφή του CaMV ιού στα φυτά και τον τερματιστή του γονιδίου της συνθάσης της νοπαλίνης (*nos*). Μαζί με το γονίδιο της συνθάσης της β-αμυρίνης, στα τροποποιημένα κύτταρα μεταφέρεται και ένα γονίδιο αντοχής στο αντιβιοτικό καναμυκίνη, για να είναι δυνατή η επιλογή των τροποποιημένων κυττάρων.

Το pGreen II είναι ένας διπλός, δισυβατικός φορέας (*dual binary vector*), έχει δηλαδή την ιδιότητα να αναπτύσσεται τόσο στο αγροβακτήριο όσο και στο βακτήριο *Escherichia coli*. Για την αντιγραφή και επιβίωσή του στο Αγροβακτήριο, όμως, εξαρτάται από ένα άλλο πλασμίδιο, το pSoup, το οποίο του παρέχει τα αναγκαία συστατικά, όπως την αρχή αντιγραφής *oriV*, το γονίδιο επιλογής για τετρακυκλίνη (*Tet-r*), τα κινητοποιιά στοιχεία (*trf*) και τον παράγοντα SaRepA.

Η πρώτη κλωνοποίηση των γονιδίων έγινε στο *E. coli*, το οποίο στη συνέχεια συζεύχθηκε με ένα αποπλισμένο στέλεχος αγροβακτηρίου, οπότε προέκυψαν αγροβακτήρια που περιείχαν αφενός μεν το πλασμίδιο T_i με την απαραίτητη, για τη μεταφορά των γονιδίων, περιοχή *vir* και αφετέρου τα πλασμίδια pGreen II και pSoup. Προέκυψαν, δηλαδή, αγροβακτήρια ικανά για τη μεταφορά των χμαιρικών γονιδίων στα φυτικά κύτταρα.

Για τη μεταφορά γονιδίων στα φυτικά κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν υποκοτύλια, τα οποία τοποθετήθηκαν για λίγα λεπτά σε τρυβλία με υγρή καλλιέργεια αγροβακτηρίου, υπό συνεχή ανακίνηση, για να διευκολυνθεί η είσοδος του αγροβακτηρίου στα φυτικά κύτταρα.

Στη συνέχεια, τα υποκοτύλια τοποθετήθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα. Η συγκαλλιέργεια αγροβακτηρίου- φυτικού κυττάρου διαρκεί 7 ημέρες. Στο διάστημα αυτό δίνεται η ευκαιρία στο αγροβακτήριο να μεταφέρει τα χημικά γονίδια στο γονιδίωμα κάποιων φυτικών κυττάρων.

Τα υποκοτύλια, μετά τη συγκαλλιέργεια, μεταφέρθηκαν σε νέα θρεπτικά υποστρώματα, που περιείχαν συνδυασμό φυτορυθμιστικών ουσιών, για την υποκίνηση αναγέννησης νέων φυτών και τα αντιβιοτικά σεφοταζάμη, για την εξάλειψη του αγροβακτηρίου και καναμυκίνη, για την επιλογή των τροποποιημένων φυτών.

Βιβλιογραφία

- Abe, I., Rohmer, M. and Prestwich, G.D.** (1993) Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes. *Chem. Rev.* **93**, 2189-2206.
- Abe, I., Sankawa, U. and Ebizuca, Y.** (1989) Purification of 2,3-Oxidosqualene-beta amyrin cyclase from pea seedlings. *Chem. Pharm. Bull.* **37** (2), 536-538.
- Afolabi, A.S., Worland, B., Snape, J., Vain, P.** (2005) Novel pGreen/pSoup dual-binary vector system in multiple T-DNA co-cultivation as a method of producing marker-free (clean gene) transgenic rice (*Oriza sativa* L) plant. *African Journal of Biotechnology* **4**(6), 531-540.
- Baisted, D.J.** (1971) Sterol and triterpene synthesis in the developing and germinating pea seed. *Biochem. J.* **124**, 375-383.
- Carthew, R.W.** (2001) Gene silencing by double-stranded RNA. *Current Opinion in Cell Biology* **13**, 244-248.
- De La Riva, G.A., Gonzalez-Cabrera, J., Vazquez-Padron, R., Ayra-Pardo, C.** (1998) *Agrobacterium tumefaciens* : a natural tool for plant transformation. *Electronic Journal of Biotechnology* **1**(3), 118-133.
- Gamas, P., Niebel, F.D.C., Lescure, N. and Cullimore, J.V.** (1996) Use of a subtractive hybridization approach to identify new *Medicago truncatula* genes induced during root nodule development. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**, 233-242.
- Grandmougin-Ferjani, A., Dalpe, Y., Hartmann, M.A., Laruelle, F. and Sancholle, M.** (1999) Sterol distribution in arbuscular mycorrhizal fungi. *Phytochemistry* **50**, 1027-1031.
- Handberg, K., Stiller, J., Thykjaer, T., Stougaard, J.** (1994) Transgenic Plants: *Agrobacterium*- mediated transformation of the diploid legume *Lotus japonicus*. In *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, Academic Press: New York, pp 119-127.
- Handberg, K., Stougaard, J.** (1992) *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *Plant Journal*, **2**(4), 487-496.
- Haralampidis, K., Bryan, G., Qi, X., Papadopoulou, K., Bakht, S., Melton, R., Osbourn, A.** (2001) A new class of oxidosqualene cyclases directs synthesis of antimicrobial phytoprotectants in monocots. *PNAS* **98**(23), 13431-13436.
- Hayashi, H., Huang, P.Y., Kiracosyan, A., Inoue, K., Hiraoka, N., Ikeshiro, Y., Kushiro, T., Shibuya, M. and Ebizuka, Y.** (2001a) Cloning and characterization of a cDNA encoding beta-amyrin synthase involved in glycyrrhizin and soyasaponin biosynthesis in liquorice. *Biol. And Pharm. Bull.* **24**, 912-916.

- Helens, R.P., Edwards, A.E., Leyland, N.R., Bean, S., Molineaux, P.M.** (2000) pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Molecular Biology* **42**, 819-832.
- Helens, R.P., Molineaux, P.M., Klee, H.** (2000) A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends in Plant Science* **5**(10), 446-451.
- Helliwell, C., Waterhouse, P.** (2003) Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants. *Academic Press Methods* **30**, 289-295.
- Hernandez, L.E. and Cooke, D.T.** (1996) Lipid composition of symbiosomes from pea root nodules. *Phytochemistry* **42** 341-346.
- Herrera, J.B.R., Bartel, B., Wilson, W.K. and Matsuda, S.P.T.** (1998) Cloning and characterization of the *Arabidopsis thaliana* lupeol synthase gene. *Phytochemistry* **49**, 1905-1911.
- Hostettman, K., & Marston, A.** (1995) Saponins (Cambridge Univ. Press, Cambridge, U.K.)
- Husselstein-Muller, T., Schaller, H. and Benveniste, P.** (2001) Molecular cloning and expression in yeast of 2,3-oxidosqualene-triterpenoid cyclases from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol.Biol.* **45**, 75-92.
- Iturbe-Ormaetxe, I., Haralampidis, K., Papadopoulou, K., Osbourn, A.E.** (2003) Molecular cloning and characterization of triterpene synthases from *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant Molecular Biology* **51**,731-743.
- Jurzyska, M., Burda, S., Oleszek, W., Ploszynski, M., Small, E. and Nozzolillo, C.** (1992) Chemical-composition of seed saponins as a guide to the classification of *Medicago* species. *Can. J. Bot.* **70**, 1384-1387.
- Komari, T., Ishida, Y., Hiei, Y.** (2004) Plant transformation technology: *Agrobacterium*-mediated transformation. In *Handbook of plant biotechnology*. (Christou P., Klee H.) John Wiley & Sons, Ltd., pp 233-259.
- Kumagai, H., Kouchi, H.** (2003) Gene silencing by expression of hairpin RNA in *Lotus japonicus* roots and root nodules. *MPMI* **16**(8), 663-668.
- Kushiro, T., Shibuya, M. and Ebizuka, Y.** (1998a) Beta-amyrin synthase – Cloning of oxidosqualene cyclase that catalyzes the formation of the most popular triterpene among higher plants. *Eur. J. Biochem.* **256**, 238-244.
- Kushiro, T., Shibuya, M. and Ebizuka, Y.** (1998b) Molecular cloning of oxidosqualene cyclase cDNA from *Panax ginseng*. The isogene that encodes β -amyrin synthase. *Towards Natural Medicine Research in the 21st Century, Excerpta Medica International Congress Series 1157* (Ageta, H., Aimi, N., Ebizuka, Y., Fujita, T & Honda, G., eds.), pp. 421-427. Elsevier Science BV, Amsterdam, the Netherlands.

Lombardi, P., Ercolano, E., Alaoui, H.E., Chiurazzi, M. (2003) A new transformation-regeneration procedure in the model legume *Lotus japonicus*: root explants as a source of large numbers of cells susceptible to *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Rep* **21**, 771-777.

Matthew, L. (2004) RNAi for plant functional genomics. *Comparative and Functional Genomics* **5**, 240-244.

Morita, M., Shibuya, M., Kushiro, T., Masuda, K. and Ebizuka, Y. (2000) Molecular cloning and functional expression of triterpene synthases from pea (*Pisum sativum*) – New alpha-amyrin-producing enzyme is a multifunctional triterpene synthase. *Eur. J. Biochem.* **267** (12), 3453-3460.

Nes, W.D. and Heftmann, E. (1981) A comparison of triterpenoids with steroids as membrane components. *J. Nat. Prod.* **44**, 377-400.

Nes, W.D. and McKean, M.L. (1977) Biochemistry of steroids and other isoprenoids. University Park Press, Baltimore.

Ohana, P., Delmer, D.P., Carlson, R.W., Glushka, J., Azadi, P., Bacic, T. and Benziman, M. (1998) Identification of a novel triterpenoid saponin from *Pisum sativum* as a specific inhibitor of the diguanylate cyclase of *Acetobacter xylinum*. *Plant and Cell Physiol.* **39**, 144-152.

Palmer, M.A. and Bowden, B.N. (1977) Variation in sterol and triterpene content of developing *Sorghum bicolor* grain. *Phytochemistry*, **16**, 459-463.

Papadopoulou, K., Melton, R.E., Leggett, M., Daniels, M.J. and Osbourn, A.E. (1999) Compromised disease resistance in saponin –deficient plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 12923-12928.

Poralla, K., Hewelt, A., Prestwich, G.D., Abe, I., Reipen, I. and Sprenger, G. (1994) A specific amino acid repeat in squalene and oxidosqualene cyclases. *Trends Biochem. Sci.* **19** 157-8.

Price, K.R., Johnson, I.T. and Fenwick, G.R. (1987) The chemistry and biological significance of saponins in food and feeding stuffs. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **26**, 27-135.

Rahman, A., Ahamed, A., Amakawa, T., Goto, N. and Tsurumi, S. (2001) Chromosaponin I specifically interacts with AUX1 protein in regulating the gravitropic response of *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol.* **125**, 990-1000.

Schattat, M.H., Klosgen, R.B., Marques, J.P. (2004) A novel vector for efficient gene silencing in plants. *Plant Molecular Biology Reporter* **22**, 145-153.

Shibuya, M., Zhang, H., Endo, A., Shishikura, K., Kushiro, T. and Ebizuka, Y. (1999) Two branches of the lupeol synthase gene in the molecular evolution of plant oxidosqualene cyclases. *Eur. J. Biochem.* **266**, 302-307.

Slater, A., Scott, N.W., Fowler, M.R. (2003) *Plant Biotechnology: the genetic manipulation of plants.* (Oxford University Press).

Threlfall, D. and Whitehead, I.M. (1990) Redirection of terpenoid biosynthesis in elicitor-treated plant cell suspension cultures. In *Plant Lipid Biochemistry* (P.J. Quinn and J.L. Harwood, eds.), Portland Press, London, pp. 344-346.

Vain, P., Afolabi, A.S., Worland, B., Snape, J.W. (2003) Transgene behaviour in populations of rice plants transformed using a new dual-binary vector system: pGreen/pSoup. *Theor Appl Genet* **107**, 210-217.

VandenBosch, K.A., Stacey, G., Monitoring Editors (2003) Summaries of legume genomic projects from around the globe. Community resources for crops and models. *Plant Physiology* **131**, 840-846.

Wesley, V.S., Helliwell, C.A., Smith, N.A., Wang, M., Rouse, D.T., Liu, Q., Gooding, P.S., Singh, S.P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P.A., Robinson, S.P., Gleave, A.P., Green, A.G., Waterhouse, P.M. (2001) Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *The Plant Journal* **27**(6), 581-590.

Zhu J., Oger, P.M., Schrammeijer, B., Hooykaas, P.J.J., Farrand, S.K., Winans, S.C. (2000) The bases of crown gall tumourigenesis. *Journal of Bacteriology* **182**(14), 3885-3895.

Παπαδοπούλου, Κ. (1995) Μελέτη της γονιδιακής δομής και έκφρασης των φυματινών στη σόγια και το φασόλι. (Διδακτορική διατριβή, Γ.Π.Α., Αθήνα)

Ρούσσης, Α. (1996) Ανάλυση της ρύθμισης της έκφρασης των φυματινών στη σόγια και το φασόλι. (Διδακτορική διατριβή, Γ.Π.Α., Αθήνα)

Χατζόπουλος, Π. (2001) Βιοτεχνολογία Φυτών (Γ.Π.Α., Αθήνα)

www.pgreen.ac.uk