

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΜΕΣΟΛΟΓΓΙΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ & ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ

Πτυχιακή εργασία

«Ο ρόλος του μηχανισμού της μετα-μεταγραφικής σίγησης στις αλληλεπιδράσεις της *Nicotiana benthamiana* με φυτοπαθογόνα βακτήρια»

Σιδερέα Ελευθερία

Εισηγήτρια: Δρ. Καραναστάση Ειρήνη

ΜΕΣΟΛΟΓΓΙ 2014

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε από τη φοιτήτρια Σιδερέα Ελευθερία του Τμήματος Θερμοκηπιακών Καλλιεργειών και Ανθοκομίας του Α.Τ.Ε.Ι. Μεσολογγίου.

Το εργαστηριακό κομμάτι της μελέτης πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βακτηριολογίας του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου υπό την επίβλεψη του ερευνητή Δρ. Νικόλαου Σκανδάλη.

Στον κύριο Σκανδάλη οφείλω τις θερμές μου ευχαριστίες για την καθοδήγηση και την υποστήριξη του καθ' όλη τη διάρκεια διεκπεραίωσης της παρούσας πτυχιακής. Η συμβολή του στην εργασία μου ήταν ιδιαιτέρως σημαντική, όχι μόνο λόγω της γνώσης που μου μετέδωσε αλλά και λόγω της αποδοχής και εμπιστοσύνης που μου επέδειξε.

Ευχαριστώ την Δρ. Καραναστάση Ειρήνη που δέχτηκε να επιβλέψει τη συγκεκριμένη εργασία.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην Δρ. Χολέβα Μαρία, προϊσταμένη του εργαστηρίου Βακτηριολογίας, στον Γλυνό Παρασκευά, στην Καράφλα Χαρούλα, Τεχνολόγους Γεωπόνους και στον Δρακούλη Σπύρο, τεχνικό βοηθό, οι οποίοι ήταν πάντα πρόθυμοι να βοηθήσουν με ό,τι προέκυπτε. Τους ευχαριστώ για τον χρόνο που μου διέθεσαν, τις τεχνικές που μου δίδαξαν, αλλά και για την συμπαράσταση τους όλον αυτό τον καιρό.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δημοπούλου Αναστασία, Msc Γεωπόνο, για την πολύτιμη βοήθεια στη συγγραφή της εργασίας αλλά και για την καλή παρέα της εντός και εκτός του εργαστηρίου. Την καθηγήτρια μου, Δρ. Τζίμα Αλίκη, για την παρότρυνσή της προς το Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο και την Παναγιωτίδη Χριστίνα, τεχνικό εργαστηρίου Ιολογίας, για τον χώρο που μου διέθετε στο θερμοκήπιο.

Τέλος, ευχαριστώ από καρδιάς τους γονείς μου, την αδερφή μου, τον Βελισσάριο Κυτρίδη και τους φίλους μου για την συνεχή συμπαράσταση, την αγάπη, την κατανόηση και την υπομονή που έδειξαν όλα αυτόν τον καιρό.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	2
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1.1 Το φυτό <i>Nicotiana benthamiana</i>	7
1.1.2 Η σίγηση μέσω RNA.....	8
1.1.3 RNA σίγηση στα φυτά: το παρελθόν	9
1.1.4 RNA σίγηση στα φυτά: το παρόν.....	10
1.2 Φυτοπαθογόνα βακτήρια.....	13
1.2.3 Σκοπός της εργασίας	16
1.3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	16
1.3.1 Καλλιέργεια των βακτηρίων	16
1.3.2 Τεχνητή μόλυνση φυτών με βακτήρια	18
1.3.3 Φωτομέτρηση.....	18
1.3.4 Διαδικασία μόλυνσης των φυτών.....	19
1.3.5 Πληθυσμιακή ανάλυση	20
1.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	21
1.4.1 Αποτελέσματα παρατήρησης της εξέλιξης της μόλυνσης	21
1.4.2 Αποτελέσματα πληθυσμιακής ανάλυσης της μόλυνσης του <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	23
2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	31
2.1.1 Το φυτό <i>Arabidopsis thaliana</i>	31
2.1.2 Οι πολυαμίνες και ο ρόλος της οξειδάσης των πολυαμινών.....	32
2.1.3 Το βακτήριο <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	33
2.1.4 Σκοπός της εργασίας	35

2.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	35
2.2.1 Καλλιέργεια των βακτηρίων	35
2.2.2 Τεχνητή μόλυνση φυτών με βακτήρια	36
2.2.3 Διαδικασία μόλυνσης των φυτών.....	36
2.2.4 Πληθυσμιακή ανάλυση	37
2.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	38
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	40

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της πτυχιακής αυτής μελέτης είναι ο έλεγχος του ρόλου των βασικών μονοπατιών ρύθμισης του φυτού σε μετα-μεταγραφικό και μετα-μεταφραστικό επίπεδο των οποίων ο ρόλος στην άμυνα του φυτού δεν έχει αποσαφηνιστεί. Για την πρώτη περίπτωση επιλέχθηκε η μελέτη του RNA σίγησης του φυτού στην αλληλεπίδραση μεταξύ ξενιστού-παθογόνου και συγκεκριμένα του φυτού *Nicotiana benthamiana* και του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακά φυτά *Nicotiana benthamiana* στα οποία είχε ανασταλεί ξεχωριστά ή σε συνδυασμό η έκφραση βασικών πρωτεϊνών ρυθμιστών της RNAi. Πραγματοποιήθηκαν μολύνσεις με το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Ακολούθησε φαινοτυπική παρατήρηση της εξέλιξης των συμπτωμάτων της μόλυνσης και σε όποιες διαγονιδιακές σειρές παρουσιάστηκε αυξημένη ευπάθεια σε σύγκριση με το μάρτυρα, πραγματοποιήθηκαν πληθυσμιακές αναλύσεις σε 3 επαναλήψεις και τρία ανεξάρτητα πειράματα. Τα αποτελέσματα των επαναλήψεων ήταν συγκρίσιμα και παρουσίασαν αυξημένους -σε στατιστικά σημαντικό βαθμό - πληθυσμούς βακτηρίων έναντι του μάρτυρα υποδεικνύοντας πως συγκεκριμένες γονιδιακές σιγήσεις σε γονίδια που σχετίζονται με τον ίδιο μηχανισμό της σίγησης έχουν επίδραση στην εκδήλωση της άμυνας του φυτού.

Στη δεύτερη ενότητα ελέγχεται ο ρόλος της οξειδάσης των πολυαμινών που συνθέτει το φυτό, στην αλληλεπίδραση μεταξύ του φυτού-ξενιστή *Arabidopsis thaliana* και του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακά φυτά *A. thaliana*, στα οποία υπερεκφράζεται ή υποεκφράζεται το γονίδιο που κωδικοποιεί την οξειδάση των πολυαμινών. Πραγματοποιήθηκαν μολύνσεις με το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Ακολούθησαν φαινοτυπική παρατήρηση της εξέλιξης των συμπτωμάτων της μόλυνσης, αλλά και πληθυσμιακές αναλύσεις βακτηρίων στα μολυσμένα φυτά. Για την ακρίβεια, πραγματοποιήθηκαν τρία ανεξάρτητα πειράματα, τα οποία αποκάλυψαν ότι οι πληθυσμοί βακτηρίων στα φυτά άγριου τύπου ήταν στατιστικά μεγαλύτεροι από τους πληθυσμούς βακτηρίων στα διαγονιδιακά φυτά που υπερεκφράζουν ή υποεκφράζουν το γονίδιο της οξειδάσης. Στη σύγκριση πληθυσμών μεταξύ των διαγονιδιακών φυτών, υπερισχύουν οι πληθυσμοί βακτηρίων στα φυτά που υπερεκφράζουν το εν λόγω γονίδιο. Τα

αποτελέσματα δείχνουν τη σημασία της οξειδάσης των πολυαμινών στην άμυνα του φυτού έναντι παθογόνων βακτηρίων.

«Μελέτη του ρόλου του μηχανισμού της μετα-μεταγραφικής σίγησης στις αλληλεπιδράσεις της *Nicotiana benthamiana* με το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*».

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1.1 Το φυτό *Nicotiana benthamiana*

Το φυτό *Nicotiana benthamiana* είναι από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα πειραματικά φυτά στη φυτοπαθολογία, κυρίως λόγω του μεγάλου αριθμού των διαφορετικών παθογόνων που μπορούν να το μολύνουν με επιτυχία. Εμφανίζοντας υψηλή ευαισθησία σε μια αρκετά μεγάλη ποικιλία πολλών φυτικών παθογόνων παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των ιών βακτηρίων και μυκήτων, καθιστά αυτού του είδους τα φυτά, τον ακρογωνιαίο λίθο της έρευνας ξενιστή-παθογόνου, ιδιαίτερα στα πλαίσια της ανοσίας και της σηματοδότησης της άμυνας του φυτού.

Επίσης, επειδή είναι ένα φυτό που μπορεί να τροποποιηθεί γενετικά και να αναγεννηθεί με υψηλά ποσοστά απόδοσης, χρησιμοποιείται με ευκολία σε διάφορες μοριακές μεθόδους όπως την RNA σίγηση και την παροδική έκφραση πρωτεϊνών. Η *Nicotiana benthamiana* κερδίζει γρήγορα τη δημοτικότητα στη βιολογία των φυτών, ιδιαίτερα σε μελέτες που απαιτούν εντοπισμό και αλληλεπίδραση πρωτεϊνών ή φυτικά συστήματα για την έκφραση πρωτεϊνών και καθαρισμό αυτών.

Παρά το γεγονός ότι είναι ένα απαραίτητο πλέον ερευνητικό φυτό-μοντέλο, λίγα είναι γνωστά σχετικά με την προέλευση, το γενετικό υπόβαθρο και την οικολογία της *N. benthamiana*, η οποία χρησιμοποιείται σήμερα ευρέως από την ερευνητική κοινότητα. Έτσι λοιπόν, το γένος *Nicotiana* ανήκει στην οικογένεια *Solanaceae* και περιλαμβάνει 76 είδη, κυρίως τροπικά και υποτροπικά τα οποία διανέμονται και στις τέσσερις ηπείρους, με την πλειοψηφία αυτών να εντοπίζονται στη Νότια Αμερική και την Αυστραλία (Goodin *et al.*, 2008).

1.1.2 Η σίγηση μέσω RNA

Η τελευταία δεκαετία έχει γίνει μάρτυρας μιας επανάστασης στο χώρο της μοριακής γενετικής και μοριακής βιολογίας. Μια σειρά επιστημονικών παρατηρήσεων έχει οδηγήσει στο συμπέρασμα πως η αλληλουχία του DNA αυτή καθ' αυτή δε φέρει όλη την πληροφορία που απαιτείται για τον φαινοτυπικό καθορισμό ενός οργανισμού. Ο μονοδιάστατος ρόλος του RNA ως φορέα της γενετικής πληροφορίας, απόρροια του κεντρικού δόγματος το DNA παράγει RNA και το RNA παράγει πρωτεΐνη, αναθεωρήθηκε.

Έτσι, σήμερα έχει πλέον εδραιωθεί ο καταλυτικής σημασίας ρόλος του RNA σε επιγενετικά φαινόμενα, συμπεριλαμβανομένων και αυτών της γονιδιακής ρύθμισης και σίγησης (Brodersen and Voinnet, 2006; Vaucheret, 2006; Baulcombe, 2007; Matzke *et al.*, 2007).

Ο όρος γονιδιακή σίγηση (gene silencing) αναφέρεται σε μια σειρά διεργασιών που οδηγούν στην παρεμπόδιση της γονιδιακής έκφρασης. Όταν αυτές οι διεργασίες είναι RNA-εξαρτώμενες, τότε μιλάμε για RNA silencing ή RNA interference (RNAi) (Baulcombe, 2004; Mello and Conte, 2004). Συνοπτικά, ο μηχανισμός αυτός λαμβάνει χώρα όταν ένα δίκλωνο μόριο RNA (double stranded RNA, dsRNA) κάνει την εμφάνισή του στο εσωτερικό ενός ευκαρυωτικού κυττάρου. Τότε, συγκεκριμένες ενδονουκλεάσες θα το πέσουν σε μικρά (20-26 νουκλεοτίδια) RNA μόρια (small RNAs, sRNAs). Τα τελευταία, σε συνεργασία με διάφορες πρωτεΐνες, θα αναγνωρίσουν ομόλογες περιοχές DNA ή RNA και θα οδηγήσουν σε παρεμπόδιση της γονιδιακής έκφρασης σε 1) μεταγραφικό, 2) μετα-μεταγραφικό και 3) μεταφραστικό επίπεδο. Στο μεταγραφικό επίπεδο (Transcriptional Gene Silencing, TGS), τα sRNAs αναγνωρίζουν και μεθυλιώνουν ομόλογο DNA (και τις ιστόνες του) με αποτέλεσμα τη δημιουργία μεταγραφικά ανενεργής ετεροχρωματινής (Wassenegger, 2005). Στο μετα-μεταγραφικό επίπεδο (Post-Transcriptional Gene Silencing, PTGS), τα sRNAs αναγνωρίζουν ομόλογο RNA και οδηγούν στην αποδόμησή του (Baulcombe, 2004). Τέλος, στο μεταφραστικό επίπεδο, τα sRNAs δεν οδηγούν σε αποδόμηση του στόχου RNA, αλλά παρεμποδίζουν τη μετάφρασή του (Brodersen *et al.*, 2008). Ο μηχανισμός του RNAi είναι συντηρημένος στους ευκαρυώτες. Ωστόσο, τα φυτά σε αντίθεση, μέχρι στιγμής, με τους υπόλοιπους οργανισμούς, κατέχουν και τα τρία επίπεδα ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης και

ως εκ τούτου αποτελούν ένα άρτιο μοντέλο έρευνας των λεπτομερειών του μηχανισμού της RNA σίγησης.

1.1.3 RNA σίγηση στα φυτά: το παρελθόν

Η σημασία του RNAi για την κατανόηση και επαναξιολόγηση σημαντικού αριθμού βιολογικών φαινομένων οδήγησε και στην απονομή του βραβείου Nobel το 2006 στους Andrew Fire και Craig Mello, πρωτοπόρους της ανακάλυψής του μηχανισμού στο νηματώδη σκόληκα, *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.*, 1998). Παραδόξως, η πρώτη αναφορά σχετιζόμενη με RNAi δημοσιεύτηκε το 1928. Σε εκείνη την εργασία, περιγράφηκε πως σε φυτά *Nicotiana benthamiana* μολυσμένα με τον ιό Tobacco Ringspot Virus (TRV), τα αρχικώς μολυσμένα φύλλα ήταν νεκρωτικά, αλλά τα νεοσχηματισμένα φύλλα δεν εμφάνιζαν συμπτώματα, υποδεικνύοντας πως αποκτούσαν ανοσία στον ιό (Wingard, 1928). Το περίεργο αυτό φαινόμενο ανάρρωσης παρέμεινε ανεξήγητο μέχρι τις αρχές τις δεκαετίας του 1990. Εκείνο το διάστημα, διεξήχθη ένα πείραμα όπου φυτά *Petunia hybrida* υπέστησαν γενετική τροποποίηση (μετασχηματισμό) ώστε να φέρουν επιπλέον αντίγραφα του γονιδίου συνθάση της χαλκόνης (chalcone synthase, CHS), με σκοπό την υπερέκφραση του γονιδίου. Προς έκπληξη όμως των ερευνητών, όχι μόνο τα νεοεισαχθέντα γονίδια (διαγονίδια) CHS είχαν σιγηθεί αλλά επίσης και τα ομόλογα ενδογενή (van der Krol *et al.*, 1990). Το φαινόμενο αυτό ονομάστηκε συγκαταστολή (co - suppression) και παρ' όλη την αδυναμία κατανόησης του μοριακού μηχανισμού που οδηγούσε σε αυτό το αποτέλεσμα, πολλοί επιστήμονες εκδήλωσαν ενδιαφέρον για παρόμοια φαινόμενα σίγησης, με αποτέλεσμα την δημοσίευση πολλών παρόμοιων παρατηρήσεων. Το 1997 κάνει την εμφάνισή της για πρώτη φορά μια συσχέτιση μεταξύ RNA μορίων και σίγησης. Οι Ratcliff και συνεργάτες (Ratcliff *et al.*, 1997) έδειξαν ότι ένα κυτταροπλασματικό RNA μόριο ήταν υπεύθυνο για αντίσταση σε ιική μόλυνση και γονιδιακή σίγηση. Πρότειναν δε ότι η γονιδιακή σίγηση λαμβάνει χώρα όταν το φυτό αντιληφθεί την παρουσία ενός διαγονιδίου (και του mRNA του) ως επιζήμιο για τη φυσιολογία του, και άρα ότι η γονιδιακή σίγηση είναι ένας φυσικός μηχανισμός άμυνας. Υποστηρίζοντας αυτή την άποψη, την ίδια χρονιά αναφέρθηκε ότι RNA μόρια προερχόμενα από διαγονίδια ήταν ικανά να πυροδοτήσουν μηχανισμούς σίγησης (Metzlaff *et al.*, 1997). Ωστόσο, η ακριβής φύση αυτού του RNA - σήματος παρέμενε ακόμη νεφελώδης. Την επόμενη χρονιά,

εργασίες σε φυτά και νηματώδεις έδειξαν ότι η φύση του RNA - σήματος πρέπει να είναι δίκλωνη (Waterhouse *et al.*, 1998; Fire *et al.*, 1998). Μέχρι που το 1999 ήρθε η σημαντική ανακάλυψη των μικρών μορίων RNA, και πιο συγκεκριμένα ότι μικρά (~25 νουκλεοτίδια) δίκλινα RNA μόρια αποτελούν ένδειξη γονιδιακής σίγησης στην *N. benthamiana* (Hamilton and Baulcombe, 1999). Έκτοτε, δημοσιεύτηκε ένας τεράστιος αριθμός αναφορών σίγησης, καθιστώντας τη γονιδιακή σίγηση (ή RNA σίγηση ή RNAi) τον πιο ταχέως αναπτυσσόμενο τομέα της μοριακής βιολογίας.

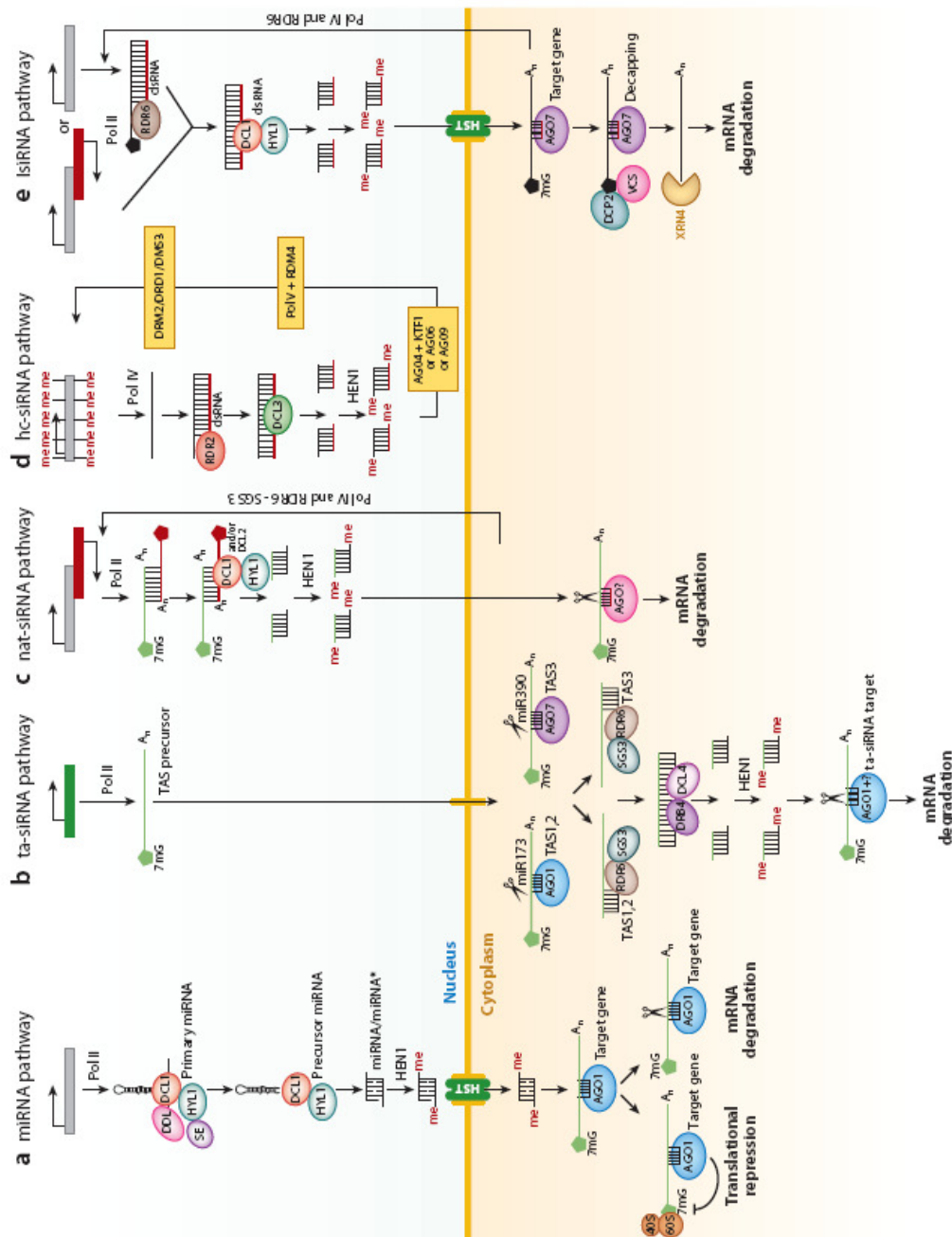
1.1.4 RNA σίγηση στα φυτά: το παρόν

Σήμερα πολλές λεπτομέρειες του μηχανισμού της σίγησης έχουν διαλευκανθεί. Είναι γνωστό ότι έκφραση διαγονιδίων αλλά και ενδογονιδίων, συνθήκες βιοτικής/αβιοτικής καταπόνησης, δραστηριότητα μεταθετών στοιχείων και μολύνσεις από παθογόνα (ιοί, ιοειδή, βακτήρια) έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του RNAi (Vaucheret, 2006 & 2008). Πληθώρα πρωτεϊνών έχουν ταυτοποιηθεί ως οι κύριοι τελεστές του μηχανισμού αυτού μεταξύ των οποίων: α) οι AGO πρωτεΐνες που προσδέουν το μικρό δίκλινο RNA μόριο το οποίο καθοδηγεί το σύμπλοκο RISC στην αλληλουχία στόχο, β) οι RNA-εξαρτώμενες-RNA-πολυμεράσες (RNA-dependent-RNA-polymerases, RDRPs) οι οποίες αντιγράφουν τα μικρά RNA ενισχύοντας το σήμα της σίγησης, γ) Τέσσερα ένζυμα τύπου Dicer, τα οποία διαθέτουν ενεργότητα RNάσης-III. Διαφορετικά μέλη των οικογενειών αυτών κατέχουν διακριτούς ρόλους στα ακόλουθα ενδογενή μικρά RNA μονοπάτια σίγησης (επισκοπούνται στην εικόνα 1.1):

- Το ενδογενές μονοπάτι των μικρών RNAs (microRNAs, miRNAs),
- Το εξωγενές μονοπάτι των «βραχέων» παρεμβαλλόμενων RNAs (short-interfering RNAs, siRNAs),
- Το μονοπάτι της trans δράσης των βραχέων παρεμβαλλόμενων RNAs (trans-acting siRNAs, ta-siRNAs),
- Το μονοπάτι των φυσικών αντινοσηματικών (natural-antisense siRNA nat-siRNAs) βραχέων παρεμβαλλόμενων RNAs και τέλος,
- Το μονοπάτι της RNA-εξαρτώμενης μεθυλίωσης του DNA (RNA-directed DNA Methylation, RdDM).

Εκτός των ενδογενών πρωτεϊνών που έχουν χαρακτηριστεί και συμμετέχουν στην εδραίωση του μηχανισμού, έχουν χαρακτηριστεί και αρκετές πρωτεΐνες που τον στοχεύουν για καταστολή. Έχουν βρεθεί τόσο ενδογενείς όσο και εξωγενείς καταστολείς της σίγησης, με τους δεύτερους να κωδικοποιούνται κυρίως από φυτικούς ιούς που στοχεύονται από τον μηχανισμό. Η ανακάλυψη των ιικών καταστολέων αποδεικνύει το σημαντικό ρόλο που κατέχει η σίγηση τόσο στα φυτά, όπου αποτελεί και αναπόσπαστο τμήμα της άμυνας των φυτικών οργανισμών, αλλά και σε όλους τους ευκαρυώτες.

Εικόνα 1.1: Ενδογενή μικρά RNA μονοπάτια στο φυτό Arabidopsis



Εικόνα 1.1: Ενδογενή μικρά RNA μονοπάτια στο φυτό *Arabidopsis*

(a) *microRNA (miRNA)* μονοπάτι. Τα *miRNAs* δημιουργούνται από την μεταγραφή μη κωδικών *miRNA* γονιδίων από την *RNA II* πολυμεράση. Τα πρώιμα *miRNAs* δημιουργούν δομές φουρκέτας οι οποίες δρουν στο πρωτεϊνικό σύμπλεγμα *DCL1-HYL1-SE*. Η *DDL* πρωτεΐνη είναι γνωστό ότι εμπλέκεται στο σχηματισμό των πρώιμων *miRNA (pre-miRNA)*. Το *DCL1-HYL1* σύμπλεγμα πρωτεϊνών μετατρέπει τα *pre-miRNA* στα τελικά *miRNAs* μεγέθους έως 21 νουκλεοτιδίων. Τα δίκλινα *miRNA (miRNA:miRNA)* μεθυλιώνονται στο 3' άκρο τους από την *HEN1*. Αυτά τα μεθυλιωμένα *miRNAs* μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα από ένα ομόλογο, *HASTY (HST)*. Το ώριμο *miRNA* ενσωματώνεται στο σύμπλεγμα *RISC (RNA-Induced Silencing Complex)*, το οποίο περιλαμβάνει την πρωτεΐνη *AGO1 protein*. Το σύμπλοκο *RISC* προσλαμβάνεται στο γονίδιο-στόχο στη θέση όπου υπάρχει συμπληρωματικότητα αλληλουχίας, στη συνέχεια η πρωτεΐνη *AGO1* καταστέλλει την γονιδιακή έκφραση είτε με αποδόμηση του *mRNA* είτε μέσω καταστολής της μετάφρασης. (b) Το μονοπάτι των μικρών *trans-RNA* παρεμβολής, *ta-siRNA (Small Interfering RNA)*. Με την δημιουργία των πρόδρομων *TAS* ενεργοποιούνται συγκεκριμένα *miRNAs* διάσπασης αυτών. Το αποτέλεσμα της διάσπασης είναι η δημιουργία 5 μικρών κλασμάτων (στην περίπτωση των *TAS1a-c* και των *TAS2*) ή 3 μικρών κλασμάτων (στην περίπτωση του *TAS3*), τα οποία λειτουργούν ως πρότυπο για τον σχηματισμό ενός μεγάλου δίκλινου μορίου *RNA (dsRNA)* μέσω της ταυτόχρονης δράσης της *RDR6* και της *SGS3*. Τα μεγάλα αυτά δίκλινα μόρια, *dsRNAs*, αναγνωρίζονται από το σύμπλοκο *DCL4-DRB4*, τεμαχίζονται (*dice*) σε μικρότερα κομμάτια των 21 νουκλεοτιδίων το καθένα και μεθυλιώνονται από την *HEN1*. Τέλος, τα *ta-siRNAs* ενσωματώνονται με τη σειρά τους στο σύμπλοκο *RISC* και με την δράση πρωτεϊνών όπως η *AGO7* (στην περίπτωση του *TAS3*) ή η *AGO1* (στην περίπτωση των *TAS1* και 2), συμμετέχουν στη αποδόμηση *mRNA*-στόχων. (c) Μονοπάτι της δημιουργίας *siRNA* από φυσικά μεταγραφήματα αντινοήματος, *nat-siRNA (natural antisense transcript-derived siRNA)*. Τα φυσικά μεταγραφήματα αντινοήματος παράγονται αναδιπλωμένες περιοχές των δίκλινων μορίων *RNA (dsRNA)* μέσω της δράσης της πολυμεράσης *II (Pol II)*. Τα *dsRNAs* μετατρέπονται σε μικρά *siRNAs* μέσω της δράσης ενζύμων όπως η *DCL1* και/ή η *DCL2*, τα οποία στοχεύουν μεταγραφήματα αντινοήματος μέσω ενός μη αναγνωρισμένου συστήματος *AGO* πρωτεϊνών οι οποίες περιλαμβάνονται στο σύμπλοκο *RISC*. Η ταυτόχρονη δράση των *RDR6-SGS3*, μαζί με την πολυμεράση *IV (Pol IV)*, σχηματίζουν μια ενισχυμένη λούπα ώστε να δημιουργήσουν περισσότερα *nat-siRNAs*, τα οποία επάγουν την

αποδόμηση των μεταγραφημάτων αντινοήματος. **(d)** Μονοπάτι της δημιουργίας ετεροχρωματινικών siRNA (*hc-siRNA*). Η μεταγραφή περιοχών ετεροχρωματινής ή επαναλαμβανόμενων περιοχών ή και τρασποζονίων από την δράση της πολυμεράσης II και της πολυμεράσης IV έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό μιας μονής αλυσίδας RNA (*ssRNA*), η οποία μετατρέπεται σε δίκλωνο μόριο RNA μέσω της δράσης της RDR2. Τα δίκλιωνα αυτά μόρια μετασχηματίζονται κατά κύριο λόγο σε μεγάλα *hc-siRNAs*, μεγέθους 24 νουκλεοτιδίων μετά τη δράση της DCL3. Στη συνέχεια αυτά τα siRNAs των 24 νουκλεοτιδίων συνδέονται με την AGO4 ή την AGO6 ή την AGO9 μέσω ενός πρωτεϊνικού αντάπτορα, KTF1, με σκοπό τον σχηματισμό συμπλόκου το οποίο άμεσα ή έμμεσα προσλαμβάνει πρωτεΐνες εμπλεκόμενες στον σχηματισμό ετεροχρωματινής όπως είναι οι DRM2, DRD1, and DMS3, με τελικό στόχο συγκεκριμένες *hc-siRNA* περιοχές. **(e)** το μονοπάτι της δημιουργία των μεγάλων siRNA (*lsiRNA*). Τα *lsiRNAs* προέρχονται από την δράση της DCL1 σε κωδικές ή μη κωδικές γονιδιωματικές περιοχές, σε αναδιπλωμένες περιοχές μεταγραφημάτων αντινοήματος, ή δίκλιωνα μόρια RNA μέσω της δράσης της πολυμεράσης IV και των RDRs. Τα *lsiRNAs* μεθυλιώνονται από το HEN1 και καταστέλλουν την έκφραση γονιδίων στόχων καθοδηγώντας τη απομάκρυνση της καλύπτρας στο αγγελιοφόρα RNA από την DCP2 (*decapping 2*) και την VCS (*Varicose*) καθώς και την 5'-3' RNA αποδόμηση που συντελείται από την εξω-ριβονουκλεάση (*exoribonuclease*) XRN4 (Προσαρμογή σε σχέδιο από την ανασκόπησης των Katiyar-Agarwal και Hailing Jin, 2010).

1.2 Φυτοπαθογόνα βακτήρια

1.2.1 Γενικά

Περισσότερα από 1600 είδη βακτηρίων είναι γνωστά. Η μεγάλη πλειονότητα αυτών είναι αυστηρά σαπροφυτικά. Αρκετά προκαλούν ασθένειες στους ανθρώπους και περίπου 100 είδη προκαλούν ασθένειες στα φυτά. Αρκετά από αυτά είναι ευκαιριακά σαπρόφυτα και μπορούν εύκολα να καλλιεργηθούν σε τεχνητά θρεπτικά μέσα. Όμως μερικά είναι ακόμα δύσκολο να καλλιεργηθούν σε θρεπτικά υλικά και για κάποια αυτό δεν έχει επιτευχθεί ακόμη. Τα βακτήρια ποικίλουν σε σχήμα και μέγεθος, άλλα είναι ευκίνητα (μέσω μαστιγίων) ενώ άλλα είτε μετακινούνται με κινήσεις ολίσθησης (*swarming*), είτε δεν μπορούν να μετακινηθούν μόνα τους (στερούνται μαστιγίων και ινιδίων). Τα περισσότερα πολλαπλασιάζονται με απλή

διαίρεση και μπορούν να αυξήσουν τους πληθυσμούς τους με γεωμετρική κλίμακα. Οι ασθένειες στα φυτά από βακτήρια προκύπτουν σε θερμές και υγρές συνθήκες, παρατεταμένη περίοδος των οποίων μπορεί να οδηγήσει σε επιδημία.

Οι Ψευδομονάδες (*Pseudomonas* sp.) είναι ευθείες ή καμπυλωμένες ράβδοι, από 0.5-1 μέχρι 1.5-4 μικρόμετρα. Κινούνται με την χρήση ενός ή περισσοτέρων μαστιγίων. Πολλά είδη είναι κοινά σε γλυκό σε αλμυρό νερό αλλά και στο έδαφος. Τα περισσότερα παθογόνα είδη προσβάλλουν φυτά, ενώ λίγα προσβάλλουν ζώα ή ανθρώπους. Τα είδη που προσβάλλουν φυτά όταν αναπτυχθούν σε ένα μέσο χαμηλής περιεκτικότητας σε σίδηρο, διαφοροποιούν σιδηροφορείς, οργανίδια για την αποδοτικότερη απορρόφηση σιδήρου, τα οποία περιέχουν κιτρινοπράσινες, διάχυτες φθορίζουσες χρωστικές. Ο κυριότερος εκπρόσωπος του γένους είναι το είδος *Pseudomonas syringae*, του οποίου τα στελέχη εξειδικεύονται σε διαφορετικά φυτικά είδη και ομαδοποιούνται ως παθότυποι (παθοποικιλίες), ενώ περαιτέρω εξειδίκευση ως προς τις ποικιλίες του είδους-ξενιστή τα κατατάσσει σε διαφορετικές (παθογόνες) φυλές.

1.2.2 Το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*

Το παθογόνο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* προκαλεί κηλίδωση των φύλλων (εικόνα 1.2). Το βακτήριο παράγει μία φθορίζουσα χρωστική και μια ισχυρή τοξίνη, την καπνοτοξίνη της οποίας ποσότητα 50μg είναι ικανή να προκαλέσει κηλίδωση σε φύλλο καπνού απουσία βακτηρίου. Η προκαλούμενη ασθένεια, που μπορεί να εκδηλωθεί από το σπορείο, προκαλεί τυπικές χλωρωτικές κηλίδες στο κέντρο των οποίων ο ιστός νεκρώνεται και περιβάλλεται από κίτρινη άλω. Ευνοείται όταν ο καιρός είναι βροχερός, ζεστός και με ανέμους. Προσβάλλει τον καπνό και ορισμένα στελέχη του το φυτό-μοντέλο *Arabidopsis thaliana*. Το παθογόνο επιβιώνει κυρίως στο σπόρο αλλά και στα υπολείμματα καλλιέργειας ή ακόμη και ως σαπρόφυτο σε άλλα φυτά μεγάλης καλλιέργειας. Μετά την επαφή με τον ξενιστή τα βακτήρια επιβιώνουν επιφυτικά στα φύλλα και σε δεύτερο χρόνο εισέρχονται από ασυνέχειες της επιδερμίδας (πληγές ή στομάτια) στον αποπλάστη, τον εξωκυττάριο χώρο που σχηματίζεται μεταξύ των κυτταρικών τοιχωμάτων. Το βακτήριο εισέρχεται σε βιοτροφική φάση αλληλεπιδρώντας με τα φυτικά κύτταρα, με τρεις πιθανές εκβάσεις:

α) Διαμεμβρανικοί υποδοχείς του ξενιστή αναγνωρίζουν συντηρημένα μόρια, κυρίως πρωτεϊνικής φύσεως, του βακτηρίου (PAMPs: Pathogen associated molecular patterns) ενεργοποιώντας ένα μη εξειδικευμένο μηχανισμό άμυνας (PTI: PAMP-triggered-immunity).

β) Ειδικές πρωτεΐνες του παθογόνου, γνωστές ως τελεστές ή πρωτεΐνες παθογένειας (effectors) μεταφέρονται διοργανισμικά μέσω του εκκριτικού συστήματος τύπου III των βακτηρίων και παρεμποδίζουν, ανταγωνίζονται ή καταστέλλουν την αναγνώριση των PAMPs και συνεπώς το πρώτο επίπεδο σηματοδότησης της άμυνας καθιστώντας το βακτήριο μολυσματικό.

γ) Εξειδικευμένες πρωτεΐνες, ανθεκτικότητας (R:Resistance), του ξενιστή αναγνωρίζουν συγκεκριμένες πρωτεΐνη/ες τελεστές σηματοδοτώντας την επαγόμενη από τελεστές ανθεκτικότητα (ETI: effector triggered immunity). Η άμυνα αυτή με τη σειρά της μπορεί να κατασταλεί από φυτοπαθογόνα στελέχη που φέρουν επιπλέον τελεστές οι οποίοι καταστέλλουν την ETI, συνήθως με πολυεπίπεδη δράση. Ένας από τους μηχανισμούς του ξενιστή που στοχεύουν οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες είναι και ο μηχανισμός της RNA σίγησης (Navarro *et al.*, 2014).

Εικόνα 1.2: Κηλιδώσεις στα φύλλα καπνού μετά από προσβολή από το *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*
(πηγή: <http://www.insectimages.org/images/768x512/1440020.jpg>).



1.2.3 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της πρώτης ενότητας της παρούσας μελέτης είναι ο έλεγχος του ρόλου της RNA σίγησης του φυτού στην αλληλεπίδραση μεταξύ ξενιστού-παθογόνου και συγκεκριμένα του φυτού *Nicotiana benthamiana* και του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακά φυτά *Nicotiana benthamiana* στα οποία είχε ανασταλεί ξεχωριστά ή σε συνδυασμό η έκφραση βασικών πρωτεϊνών ρυθμιστών της RNAi. Πραγματοποιήθηκαν μολύνσεις με το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Ακολούθησε φαινοτυπική παρατήρηση της εξέλιξης των συμπτωμάτων της μόλυνσης και σε όποιες διαγονιδιακές σειρές παρουσιάστηκε αυξημένη ευπάθεια σε σύγκριση με το μάρτυρα, πραγματοποιήθηκαν πληθυσμιακές αναλύσεις σε 3 επαναλήψεις και τρία ανεξάρτητα πειράματα. Τα αποτελέσματα των επαναλήψεων ήταν συγκρίσιμα και αποκάλυψαν όχι μόνο αυξημένους -σε στατιστικά σημαντικό βαθμό - πληθυσμούς βακτηρίων έναντι του μάρτυρα, αλλά και πως συγκεκριμένες γονιδιακές σιγήσεις γονιδίων που σχετίζονται με το μηχανισμό της σίγησης έχουν επίδραση στην εκδήλωση της άμυνας του φυτού σε σημείο που να επιδρούν στο εύρος των ξενιστών του.

1.3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1.3.1 Καλλιέργεια των βακτηρίων

Το βακτήριο που χρησιμοποιήθηκε (βλ. Πίνακα 1.1), καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα Luria Broth (LB). Τα θρεπτικά υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν είτε σε υγρή είτε σε στερεά μορφή για τη διατήρηση των καλλιεργειών για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στο ψυγείο. Η διαφορά στην παρασκευή μεταξύ των υγρών και στερεών υποστρωμάτων ήταν η προσθήκη 1.5% άγαρ.

Πίνακας 1.1 Φυτοπαθογόνο βακτήριο που χρησιμοποιήθηκε

Είδος	Στέλεχος	Παραπομπή	Φυτό που μολύνθηκε
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	2124	Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης	<i>Nicotiana benthamiana</i>

Το βακτήριο *Pta* διατηρήθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient agar (NA 2,8%, Nutrient broth 1^l Oxoid Ltd.). Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο, στους 28° C υπό σκοτάδι για 48h. Το θρεπτικό μέσο περιείχε ειδικό μυκητοστατικό, cycloheximide, για την αποφυγή μολύνσεων του θρεπτικού από μύκητες και ζύμες.

Για την διαδικασία της μόλυνσης των φυτών χρησιμοποιήθηκαν υγρές καλλιέργειες του βακτηρίου σε θρεπτικό μέσο LB. Οι υγρές καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο με ανάδευση στους 28° C υπό σκοτάδι, ο/ν (overnight).

Επιπλέον, το βακτήριο αναπτύχθηκε σε στερεό θρεπτικό μέσο King's B ώστε να σιγουρευτούμε πως δουλεύουμε με το σωστό βακτήριο. Όπως ήδη αναφέραμε οι ψευδομονάδες όταν βρεθούν σε περιβάλλον με χαμηλά επίπεδα σιδήρου φθορίζουν. Το θρεπτικό μέσο King's B είναι κατάλληλο για την επαγωγή της φθορίζουσας αυτής ιδιότητας του βακτηρίου καθώς η περιεκτικότητα σε σίδηρο είναι χαμηλή και τα βακτήρια διαφοροποιούν ειδικά οργανίδια (σιδηροφορείς) για την πρόσληψη του τα οποία φθορίζουν σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Ο φθορισμός γίνεται αντιληπτός μετά την έκθεση του τρυβλίου σε λάμπα UV για λίγα δευτερόλεπτα.

Η διαδικασία παρασκευής των θρεπτικών διαλυμάτων είναι η εξής:

- ❖ Ζύγιση της κατάλληλης ποσότητας των συστατικών του κάθε θρεπτικού σύμφωνα με την συνταγή που δίνεται στον πίνακα 1.2.
- ❖ Ακολουθεί ανάδευση με κατάλληλο όγκο απιονισμένου νερού σε beaker του 1 λίτρου.
- ❖ Μετά την ανάδευση, το διάλυμα μοιράζεται σε γυάλινα δοχεία των 200ml τα οποία τοποθετούνται στον κλίβανο για αποστείρωση. Με την αποστείρωση επιτυγχάνεται η αποφυγή ανάπτυξης μικροοργανισμών στο θρεπτικό διάλυμα.

Πίνακας 1.2. Συστατικά θρεπτικών μέσων καλλιέργειας παθογόνων βακτηρίων

King's B pH=7.2	Nutrient Agar	Συνταγή LB
Protease peptone (No 3) 20g	Nutrient broth 8g	LB Broth Base 20g
KH ₂ PO ₄ 1,5g	Bacto-Agar 18g	dH ₂ O μέχρι 1L
MgSO ₄ *7H ₂ O 1,5g	Cycloheximide 2ml	
Glycerol 10 ml	dH ₂ O μέχρι 1L	
Άγαρ 18g		
dH ₂ O μέχρι 1L		

1.3.2 Τεχνητή μόλυνση φυτών με βακτήρια

Για την παραγωγή του μολύσματος ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: Βακτηριακό αιώρημα από υγρή καλλιέργεια στο στάδιο της στατικής φάσης φυγοκεντρήθηκε στις 4000 στροφές ανά λεπτό για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε ίσο όγκο διαλύματος 10mM MgCl₂. Ακολούθησε φυγοκέντρηση του αιωρήματος, απόρριψη του υπερκείμενου και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε ίσο όγκο 10mM MgCl₂. Κατόπιν το αιώρημα αραιώθηκε μέχρι περίπου 0,12 οπτική πυκνότητα (Optical Density –O. D.) στα 600nm, μετρούμενη σε φωτόμετρο (NanoPhotometer® P-Class, P330, IMPLLEN). Το σύνολο της διαδικασίας από τις πλύσεις των βακτηρίων έως και την τελική μόλυνση διήρκησε λιγότερο από 45 λεπτά, για τη μεγιστοποίηση της βιωσιμότητας των βακτηρίων.

1.3.3 Φωτομέτρηση

Για να μετρήσουμε την ένταση μιας επιλεγμένης συχνότητας ακτινοβολίας χρησιμοποιούμε το φωτόμετρο ή φασματοφωτόμετρο. Το πρώτο τμήμα του φασματοφωτόμετρου αποτελείται από την πηγή παραγωγής ακτινοβολίας. Το δεύτερο τμήμα είναι αυτό που διαχωρίζει το επιθυμητό μήκος κύματος (συχνότητα) από τα υπόλοιπα που παράγει η πηγή, παρέχοντας έτσι στο τρίτο μέρος μονοχρωματική ακτινοβολία. Το τρίτο είναι αυτό που τοποθετείται το προς μέτρηση δείγμα και το τελευταίο είναι ο μετρητής της ακτινοβολίας που τελικά «περνά» (δεν απορροφάται) από το δείγμα.

❖ Οδηγίες χρήσης φασματοφωτόμετρου:

1. Μηδενίζουμε το όργανο μετρώντας αέρα.
2. Μετράμε το τυφλό μας διάλυμα. Το τυφλό διάλυμα είναι αυτό που περιέχει όλες τις ουσίες του μετρούμενου διαλύματος (διαλύτη, αντιδραστήρια) εκτός από την μετρούμενη ουσία (δείγμα).
3. Μηδενίζουμε ξανά το όργανο.
4. Μετράμε την απορρόφηση της πρότυπης ουσίας Απροτύπου. Η πρότυπη ουσία είναι δείγμα παρόμοιο με αυτό που θέλουμε να μετρήσουμε και το οποίο περιέχει την ουσία σε συγκεκριμένη γνωστή συγκέντρωση

Σπροτύπου. Η μέτρηση της απορρόφησης του είναι απαραίτητη για τον υπολογισμό της άγνωστης συγκέντρωσης.

5. Μετράμε την απορρόφηση του δείγματος μας $A_{\text{δείγματος}}$.
6. Η άγνωστη συγκέντρωση του δείγματος $C_{\text{δείγματος}}$ υπολογίζεται από τον τύπο:

$$C_{\text{δείγματος}} = A_{\text{δείγματος}} / A_{\text{προτύπου}} * \chi C_{\text{προτύπου}}$$

Τα φυτά παρέμειναν στο θερμοκήπιο καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος υπό ελεγχόμενες συνθήκες (θερμοκρασία περίπου 26°C και υψηλή σχετική υγρασία) που ευνοούν ιδιαίτερα την μόλυνση και την ανάπτυξη των βακτηρίων.

1.3.4 Διαδικασία μόλυνσης των φυτών

Η μόλυνση των φυτών έγινε με έγχυση του εναιωρήματος από την κάτω φυλλική επιφάνεια του φύλλου με χρήση σύριγγας. Για να εξασφαλιστεί ότι όλα τα φύλλα που μολύνθηκαν έλαβαν ισόποσο εναιώρημα, έγινε οριοθέτηση συγκεκριμένης επιφάνειας με μαρκαδόρο η οποία αντιστοιχεί σε συγκεκριμένο όγκο φυλλικού παρεγχύματος. Η ολοκλήρωση της κάλυψης του όγκου αυτού με εναιώρημα έγινε μέσω οπτικής παρατήρησης.

Οι χειρισμοί που έγιναν ήταν 9 συνολικά και είναι οι εξής:

1. Άγριου τύπου *Nicotiana benthamiana* (Wild Type, WT)
2. Γενετική τροποποίηση *Nicotiana benthamiana* 1
3. Γενετική τροποποίηση *Nicotiana benthamiana* 2
4. Γενετική τροποποίηση *Nicotiana benthamiana* 3
5. Γενετική τροποποίηση *Nicotiana benthamiana* 4
6. Γενετική τροποποίηση *Nicotiana benthamiana* 5
7. Γενετική τροποποίηση *Nicotiana benthamiana* 6
8. Γενετική τροποποίηση *Nicotiana benthamiana* 7
9. Γενετική τροποποίηση *Nicotiana benthamiana* 8

Σε κάθε χειρισμό χρησιμοποιήθηκαν 2 φυτά για επανάληψη, και σε κάθε φυτό πραγματοποιήθηκαν μολύνσεις σε 3 πλήρως αναπτυγμένα φύλλα. Έτσι, στο τέλος είχαμε 6 επαναλήψεις για κάθε χειρισμό. Οι μετρήσεις βαθμονομήθηκαν με βάση μια

κλίμακα από 0 μέχρι 10, όπου 0 είναι ένα ασυμπτωματικό φύλλο, 1-2 διαβαθμίσεις είναι ένα ελαφρώς μολυσμένο φύλλο, 3-4 διαβαθμίσεις μετρίως μολυσμένο φύλλο που παρουσιάζει υδαρή κηλίδα, και 5-7 διαβαθμίσεις είναι ένα έντονα μολυσμένο φύλλο σε πρώιμο στάδιο ξήρανσης, ενώ 7-10 διαβαθμίσεις είναι βαρέως μολυσμένο φύλλο σε τελική ξήρανση που παραμένει ξηρό ή αποκόπτεται από το φυτό. Η ένταση των συμπτωμάτων της μόλυνσης και, κατά συνέπεια και η βαθμονόμηση, έγινε με βάση τα οπτικά συμπτώματα και το μεταχρωματισμό των φύλλων. Οι παρατηρήσεις ξεκίνησαν από την μέρα της μόλυνσης, ενώ τα συμπτώματα αναπτύχθηκαν εμφανώς από την τρίτη μέρα μετά την μόλυνση και οι παρατηρήσεις τελείωσαν 2 εβδομάδες αργότερα.

1.3.5 Πληθυσμιακή ανάλυση

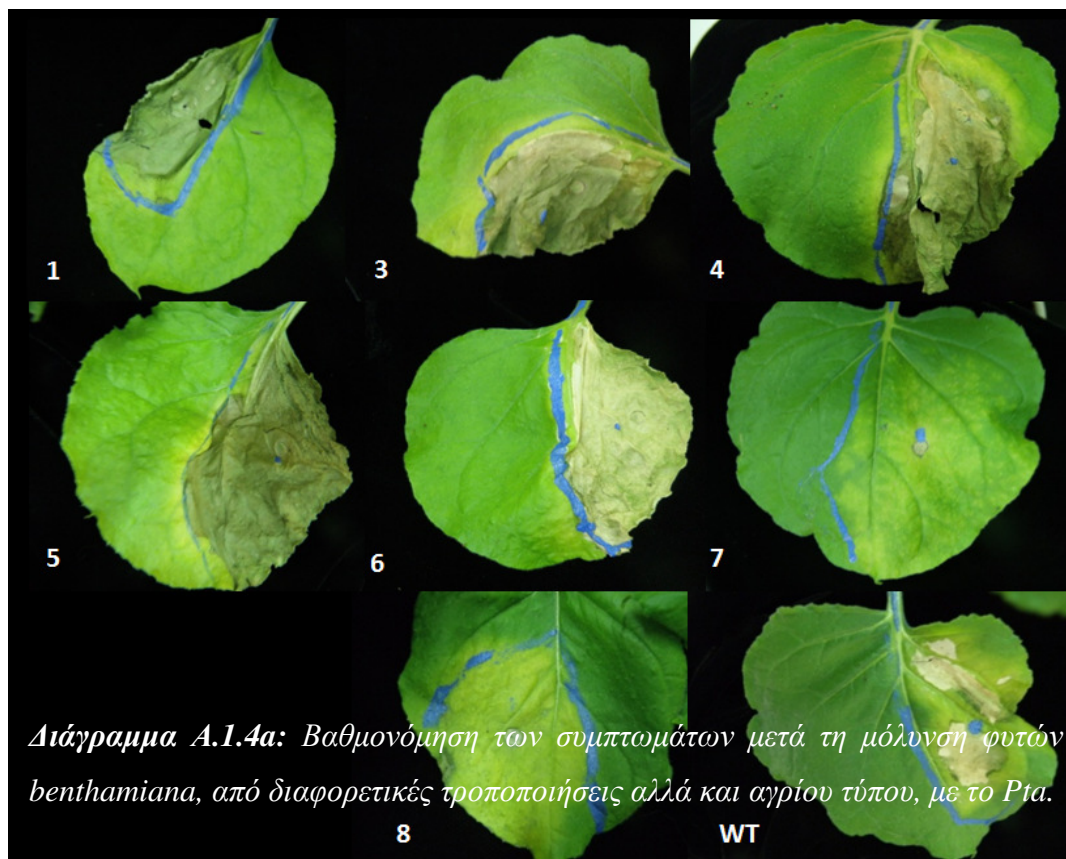
Η πληθυσμιακή ανάλυση είναι μια παράλληλη διαδικασία του παραπάνω πειράματος. Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία μέχρι το σημείο της εφαρμογής του μολύσματος. Η βασική διαφορά είναι στον τρόπο μέτρησης των αποτελεσμάτων. Στη συγκεκριμένη περίπτωση πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις βακτηριακών αποικιών σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε κατάλληλα αντιβιοτικά για την παρεμπόδιση σαπρόφυτων και μυκήτων και επέτρεπε τη μορφολογική αναγνώριση των αποικιών (χαρακτηριστική υπόλευκη εμφάνιση στην περίπτωση της Ψευδομονάδας). Σε κάθε δειγματοληψία παρελήφθησαν 2 φυλλικοί δίσκοι σταθερής διαμέτρου (9mm) από κάθε φύλλο, συνήθως ανά δύο ημέρες. Κάθε δίσκος πολτοποιήθηκε ξεχωριστά σε 1ml αποστειρωμένο, απιονισμένο νερό ή $MgCl_2$. Από αυτό το διάλυμα στην συνέχεια έγιναν δεκαδικές αραιώσεις (10^0 , 10^{-2} , 10^{-4} κτλ.) Από κάθε αραιώση ελήφθησαν 100μl και επιστρώθηκαν σε τρυβλία με Nutrient agar που περιείχαν κυκλοεξαμίδη με γυάλινη ράβδο (plating). Στην συνέχεια τα τρυβλία επώαστηκαν για 48h σε σκοτεινό επωαστήριο στους $28^{\circ}C$ μέχρι να αναπτυχθούν οι βακτηριακές αποικίες.

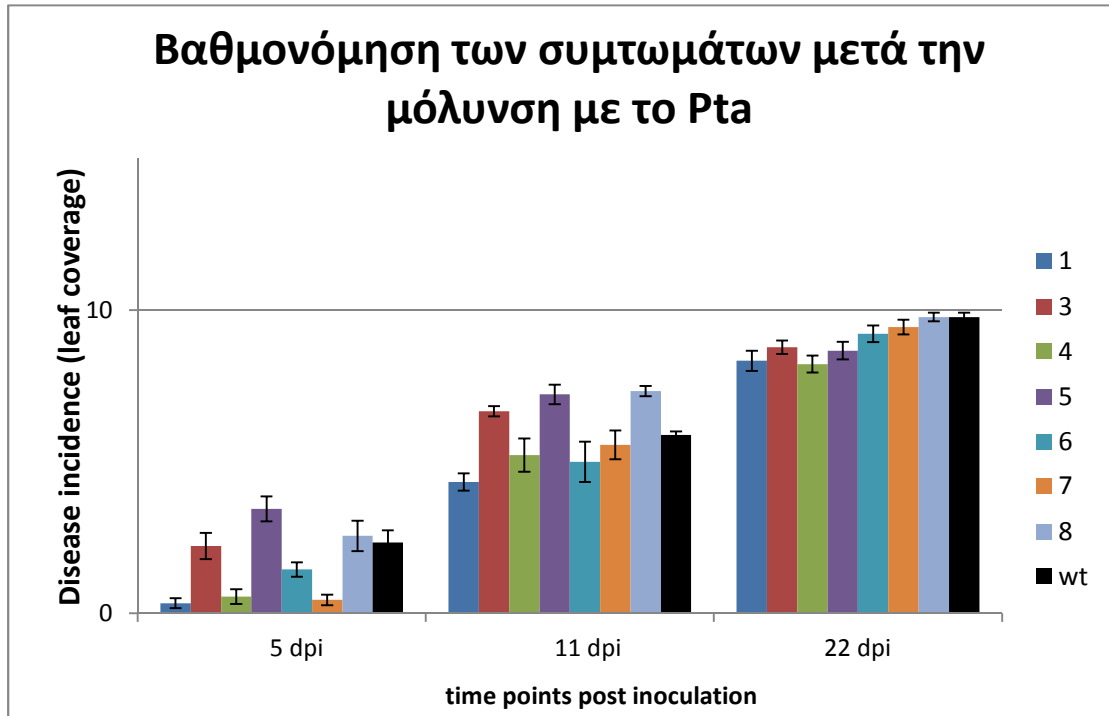
1.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1.4.1 Αποτελέσματα παρατήρησης της εξέλιξης της μόλυνσης

Όπως ήδη έχουμε αναφέρει, στη παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε μόλυνση φυτών *N. benthamiana*, διαφόρων γενετικών τροποποιήσεων και αγρίου τύπου, με το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pta*. Ακολούθησε παρατήρηση της μολυσμένης περιοχής μέχρι και τις 2 εβδομάδες μετά την μόλυνση. Η πρώτη εμφάνιση των συμπτωμάτων έγινε την τρίτη ημέρα μετά την μόλυνση των φυτών. Στην εικόνα 1.3 παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά συμπτώματα για κάθε γενετική τροποποίηση αλλά και το φυτό αγρίου τύπου. Μπορούμε εύκολα να παρατηρήσουμε τα συμπτώματα της μόλυνσης *Pta* στη φυλλική επιφάνεια όπου παρουσιάζεται αρχικά μια υδαρής κηλίδα στην περιοχή μόλυνσης εντός της οποίας ο ιστός προοδευτικά νεκρώνεται. Η περιοχή μόλυνσης περιβάλλεται από χλωρωτικό περιθώριο.

Εικόνα 1.3: Συμπτώματα της μόλυνσης του φυτοπαθογόνου βακτηρίου Pta σε φυτά N. benthamiana διαφόρων γενετικών τροποποιήσεων (1-8) και αγρίου τύπου





Μεταξύ των διαφόρων γενετικών τροποποιήσεων παρατηρείται διαφοροποίηση όσον αφορά την εκδήλωση των συμπτωμάτων της μόλυνσης. Πιο αναλυτικά, δίνονται τα αποτελέσματα της βαθμονόμησης των συμπτωμάτων στα διαγράμματα A.1.4a και A.1.4b, βάση της κλίμακας που αναφέρεται στην παράγραφο 2.2.2.

Σε σχέση με τη βαθμονόμηση των συμπτωμάτων μετά τη μόλυνση με το Pta παρατηρούμε ότι στις 5 μέρες μετά τη μόλυνση, στις σειρές 3 και 8 η εξέλιξη των συμπτωμάτων είναι συγκρίσιμη σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου (wt). Στις σειρές 1, 4 και 7 η εξέλιξη των συμπτωμάτων υστερεί σε σύγκριση με τον μάρτυρα, ενώ στην σειρά 5 η ένταση των συμπτωμάτων είναι πιο έντονη από αυτή του μάρτυρα.

Στις 11 ημέρες μετά την μόλυνση με το παθογόνο τα αποτελέσματα στις σειρές 3 και 8 τροποποιούνται σε σχέση με την 5^η μέρα και παρατηρείται ότι η ένταση των συμπτωμάτων είναι πιο έντονη σε σύγκριση με τον μάρτυρα και είναι συγκρίσιμη με την σειρά 5 που εξακολουθεί να είναι σε πιο υψηλά επίπεδα από αυτά του μάρτυρα. Στις σειρές 1, 4 και 6 τα συμπτώματα εξακολουθούν να υστερούν σε ένταση σε σύγκριση με τον μάρτυρα, σε αντίθεση με την σειρά 7 όπου είναι συγκρίσιμα με αυτά του μάρτυρα. Στις 22 ημέρες μετά την μόλυνση ο ιστός στις περισσότερες περιπτώσεις παρουσιάζει συμπτώματα τελικής νέκρωσης και η βαθμονόμηση δεν ήταν δυνατό να διαφοροποιηθεί σημαντικά στις τροποποιημένες σειρές σε σύγκριση με το μάρτυρα.

Συμπερασματικά, μπορούμε να πούμε ότι η σειρά 5 παρουσιάζει συμπτώματα εντονότερης μόλυνσης σε σύγκριση με τον μάρτυρα κατά την εξέλιξη της ασθένειας. Ενώ στις σειρές 1, 4 και 6 τα συμπτώματα υστερούν σε σύγκριση με τον μάρτυρα.

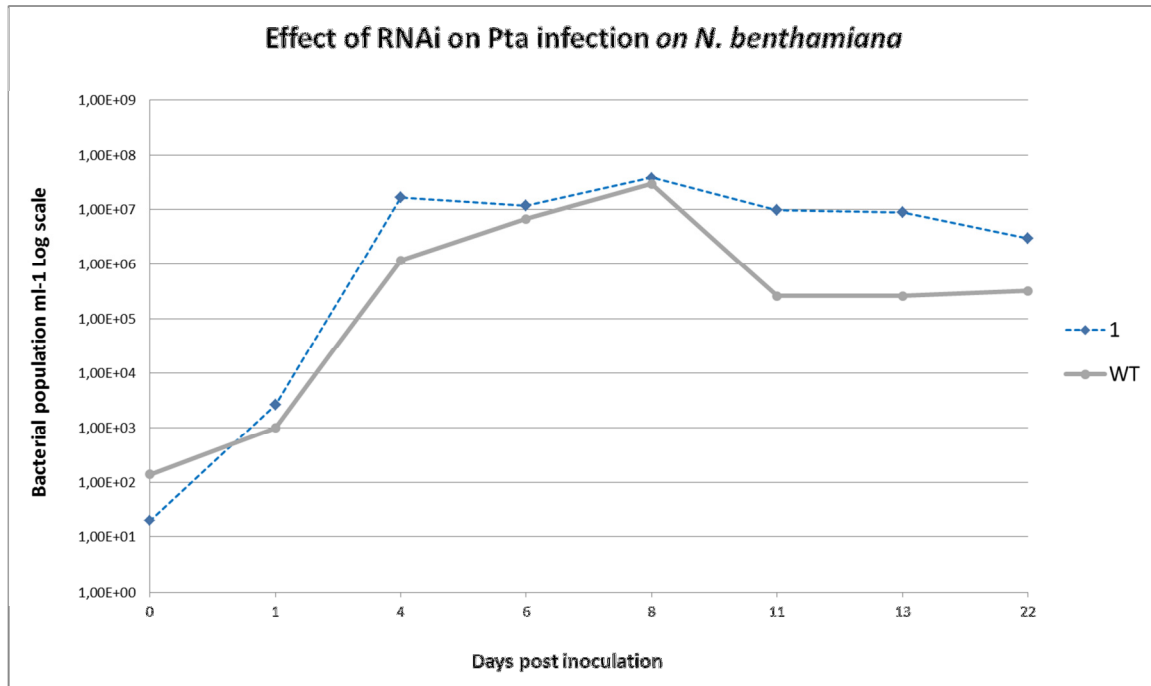
1.4.2 Αποτελέσματα πληθυσμιακής ανάλυσης της μόλυνσης του *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*

Για να διερευνήσουμε αν αυτή η διαφοροποίηση στην εξέλιξη των συμπτωμάτων συνοδεύεται από μια διαφοροποίηση στην ανάπτυξη του παθογόνου στον αποπλαστικό χώρο του φύλλου, πραγματοποιήθηκε πληθυσμιακή ανάλυση κατά την εξέλιξη της μόλυνσης για χρονικό διάστημα 2 εβδομάδων μετά την μόλυνση με δειγματοληψίες στις 0, 1, 4, 6, 8, 11, 13 και 22 ημέρες. Φυλλικοί δίσκοι από την μολυσμένη περιοχή αποκόπηκαν με τη βοήθεια φελλοτρυπητήρα (cork borer) ανά δυο μέρες, πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση σε ρυθμιστικό διάλυμα $MgCl_2$ για την εξαγωγή των βακτηρίων στη συνέχεια μικροποσότητα 100 μl από μια σειρά διαδοχικών αραιώσεων επιστρώθηκε σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο Nutrient agar (§1.3.1, Πίνακας 1.2).

Τα αποτελέσματα της πληθυσμιακής ανάλυσης παρουσιάζονται στα διαγράμματα 1.1 έως 1.8. Συνολικά συμπεραίνουμε πως υπάρχει διαφοροποίηση στην καμπύλη ανάπτυξης του παθογόνου σε κάποιες τροποποιήσεις και σε σχέση με το μάρτυρα καθώς σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία δειγματοληψίας οι πληθυσμοί διαφοροποιούνται. Μάλιστα παρατηρείται μεγάλη διαφοροποίηση κατά την 4^η μέρα μετά τη μόλυνση και μετά την 11^η ημέρα κατά τις οποίες ο πληθυσμός των βακτηρίων είναι σε στατική φάση και η αλληλεπίδραση του βακτηρίου με τον ξενιστή εξελίσσεται από το βιοτροφικό στο νεκροτροφικό στάδιο.

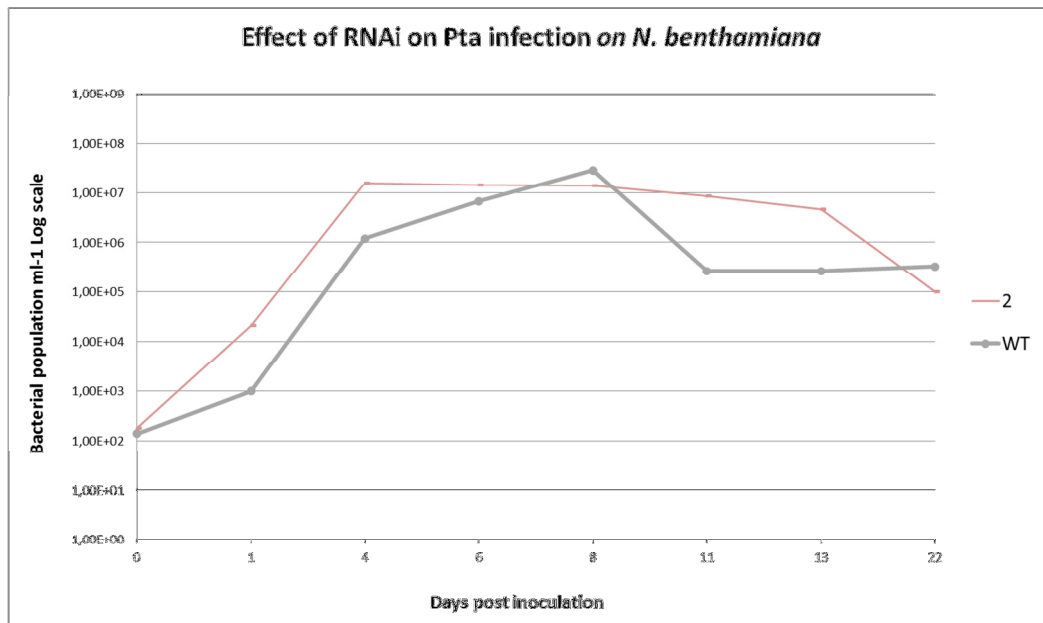
Πιο αναλυτικά, κατά την διάρκεια της εκθετικής φάσης του παθογόνου εντός του αποπλάστη του φυτικού ξενιστή υπάρχει διαφοροποίηση στη γενετική τροποποίηση 1 (διάγραμμα A.1.5) σε σύγκριση με το wt η οποία οδηγεί σε υψηλότερα επίπεδα πληθυσμού του κατά την 4^η μέρα μετά την μόλυνση οπότε και το παθογόνο μπαίνει σε στατική φάση. Στη συνέχεια, φαίνεται πως το παθογόνο συνεχίζει να βρίσκεται στη στατική φάση μέχρι την 11 ημέρα αλλά και μετά από αυτήν σε αντίθεση με την περίπτωση του μάρτυρα όπου ξεκινάει για το παθογόνο η φάση θανάτου και μειώνονται σημαντικά τα επίπεδά του.

Διάγραμμα A.1.5: Πληθυσμιακή ανάλυση της μόλυνσης του *Pta* στην τροποποίηση 1 φυτού *N. benthamiana*



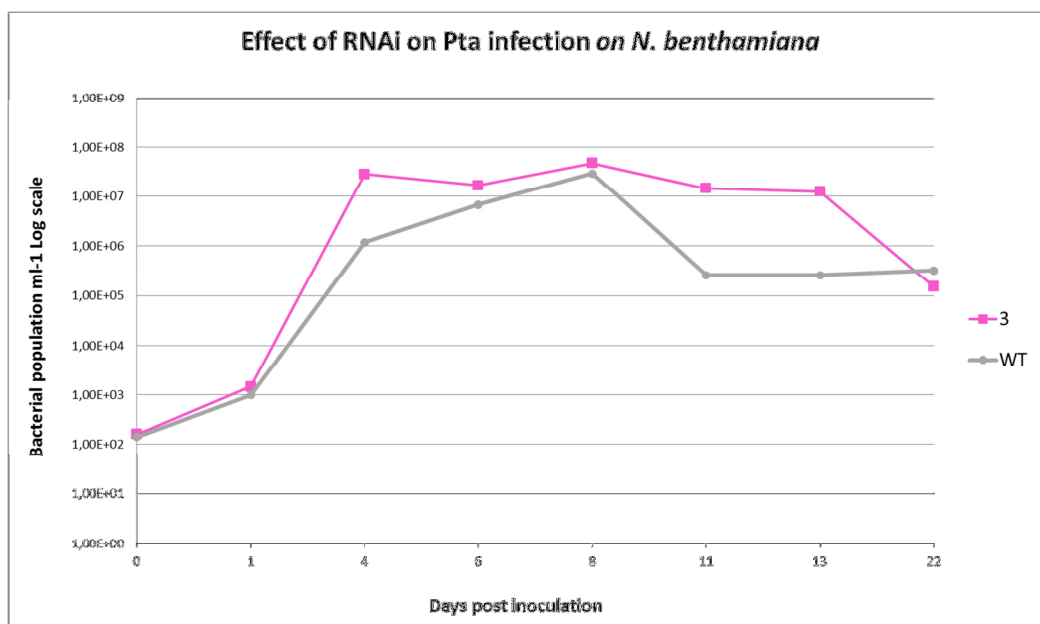
Στη γενετική τροποποίηση 2 (διάγραμμα A.1.6) υπάρχει μια ασαφής διαφοροποίηση κατά την εκθετική ανάπτυξη του παθογόνου στον ξενιστή σε σχέση με τον μάρτυρα με στατιστικά σημαντικότερα υψηλότερους πληθυσμούς τόσο στην ημέρα 1 όσο και στην ημέρα 4 κατά την οποία το παθογόνο μπαίνει στην στατική φάση και στις δυο περιπτώσεις. Στη συνέχεια, παρομοίως με την τροποποίηση 1, η στατική φάση του παθογόνου στην τροποποίηση 2 φαίνεται να διαρκεί περισσότερο χρόνο από αυτή στην περίπτωση του μάρτυρα. Στον μάρτυρα, σύμφωνα με το διάγραμμα πληθυσμιακής ανάλυσης παρατηρείται πως από την 8^η το παθογόνο εξέρχεται από την στατική φάση και εισέρχεται στη φάση θανάτου, όπου τα επίπεδα του πληθυσμού πέφτουν κατακόρυφα.

Διάγραμμα A.1.6: Πληθυσμιακή ανάλυση της μόλυνσης του *Pta* στην τροποποίηση 2 φυτών *N. benthamiana*

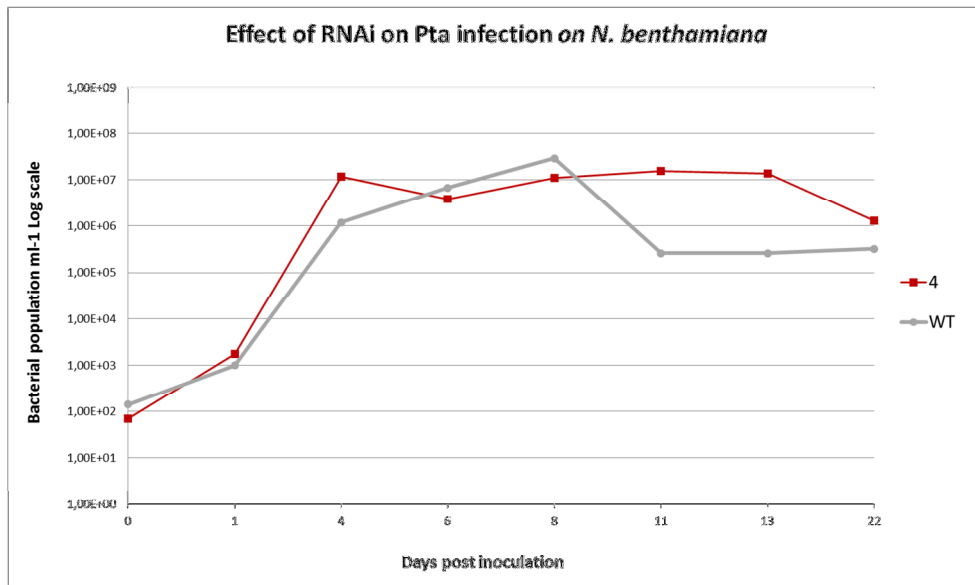


Στην τροποποίηση 3 (διάγραμμα A.1.7) παρομοίως οι πληθυσμοί του παθογόνου είναι υψηλότεροι κατά την 4^η ημέρα μετά την μόλυνση σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Παρατηρείται, επίσης, ότι το παθογόνο παραμένει για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στη στατική φάση σε σύγκριση με το wt και μόνο από την 13^η ημέρα και μετά φαίνεται να μειώνονται τα επίπεδα του πληθυσμού στην τροποποίηση 3 όπου καταλαβαίνουμε πως ξεκινά η φάση θανάτου του παθογόνου.

Διάγραμμα A.1.73: Πληθυσμιακή ανάλυση της μόλυνσης του *Pta* στην τροποποίηση 3 φυτών *N. benthamiana*

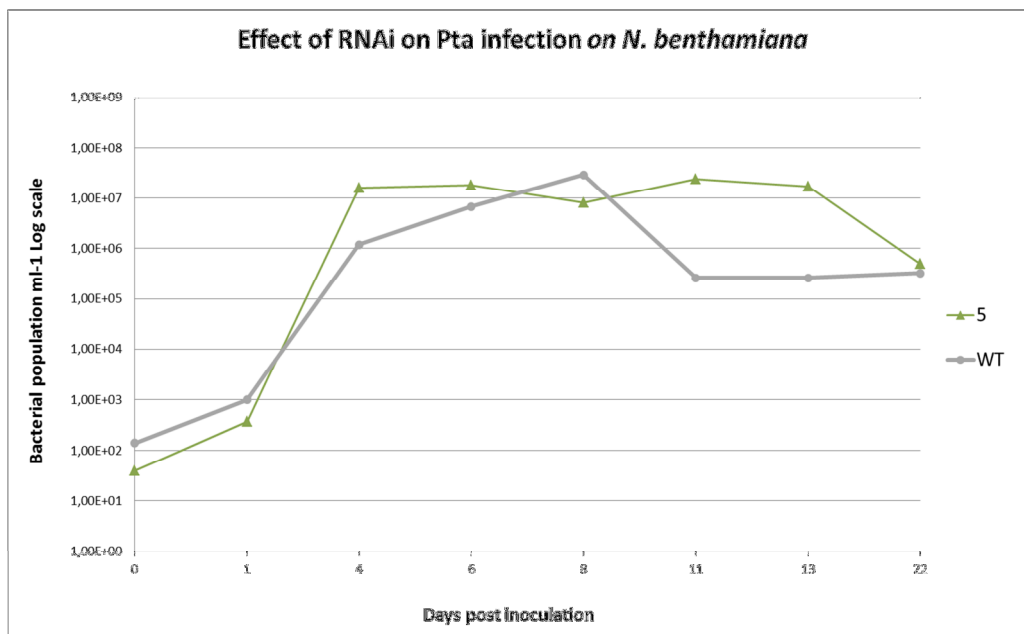


Διάγραμμα A.1.8: Πληθυσμιακή ανάλυση της μόλυνσης του *Pta* στην τροποποίηση 4 φυτών *N. benthamiana*

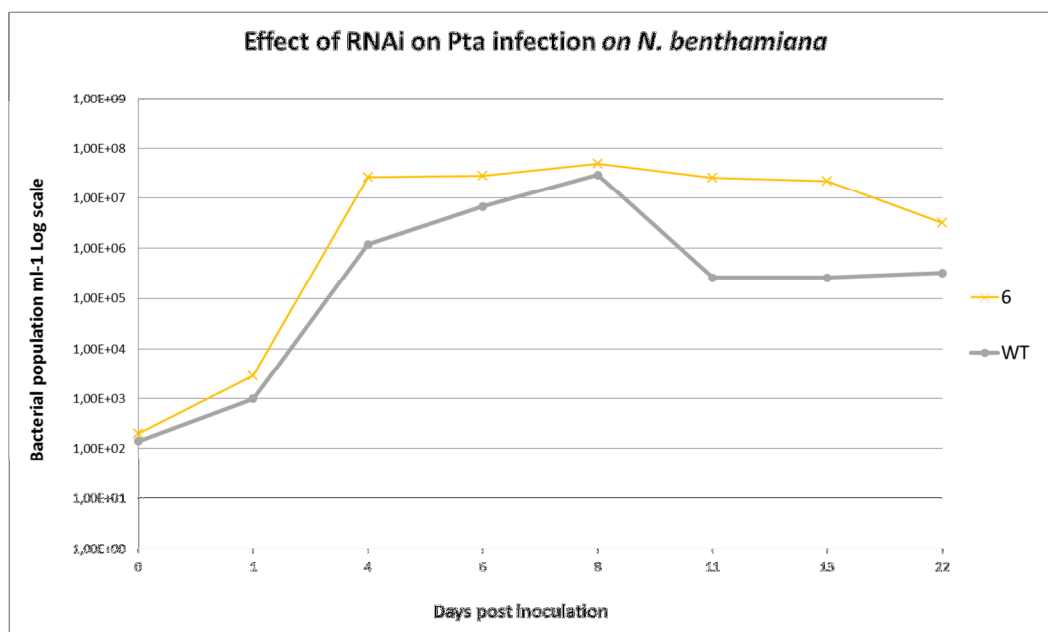


Την ίδια εικόνα με την τροποποίηση 3, όσον αφορά την πορεία της μόλυνσης του *Pta*, παρουσιάζει και η τροποποίηση 4 στο διάγραμμα A.1.8 αλλά και η τροποποίηση 5 στο διάγραμμα A.1.9. Παρατηρείται πως οι πληθυσμοί του παθογόνου και για τις δυο τροποποιήσεις είναι υψηλότεροι την τέταρτη μέρα σε σύγκριση με τον μάρτυρα ενώ το παθογόνο παραμένει στη στατική φάση μεγαλύτερο χρονικό διάστημα μέχρι και την 13^η ημέρα.

Διάγραμμα A.1.9: Πληθυσμιακή ανάλυση της μόλυνσης του *Pta* στην τροποποίηση 5 φυτών *N. benthamiana*



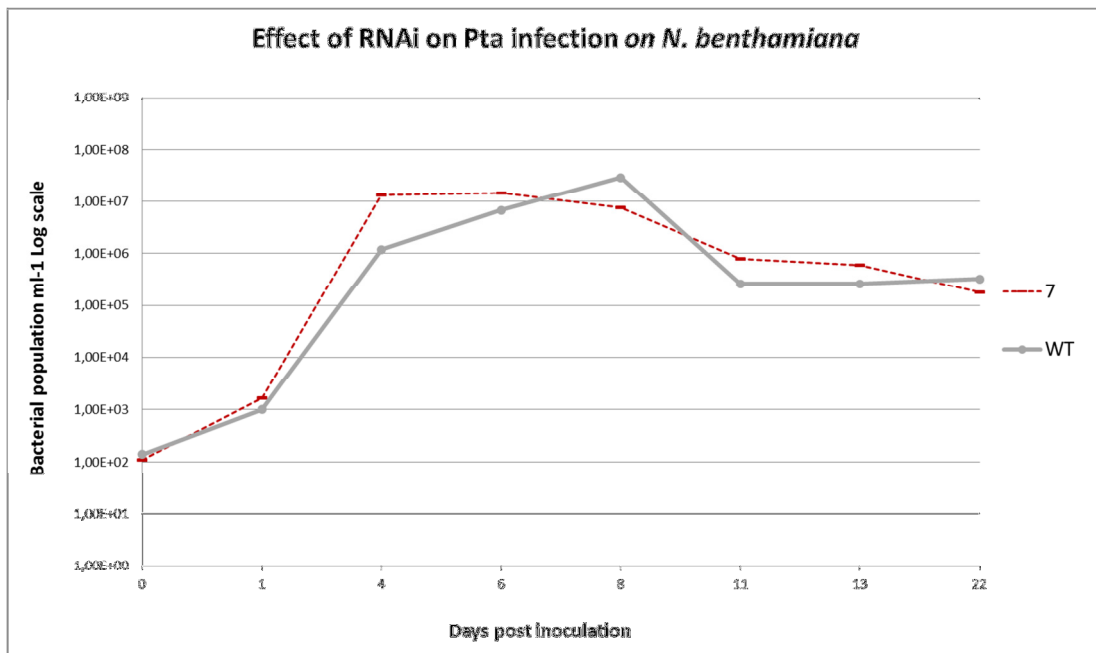
Διάγραμμα A.1.10: Πληθυσμιακή ανάλυση της μόλυνσης του *Pta* στην τροποποίηση 6 φυτών *N. benthamiana*



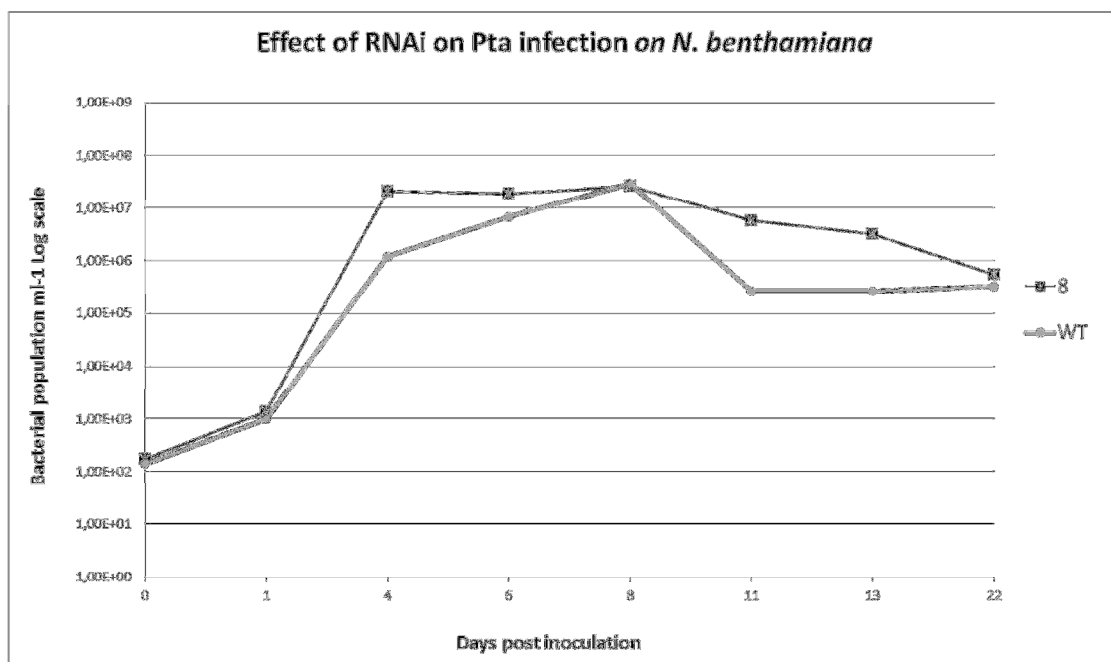
Η καμπύλη ανάπτυξης στην γενετική τροποποίηση 6 (διάγραμμα A.1.10) διαφέρει αισθητά καθ'όλη τη διάρκειά της σε σύγκριση με τον μάρτυρα καθώς τόσο στην εκθετική φάση όσο και σ'όλη τη διάρκεια της στατικής φάσης, οι πληθυσμοί του βακτηρίου είναι σταθερά υψηλότεροι στην τροποποίηση 6 σε σύγκριση με το wt. Αυτό είναι ιδιαίτερος σημαντικό καθώς οι πληθυσμοί των βακτηρίων εντός του φυτικού ιστού δεν συνάδουν με την εξέλιξη των συμπτωμάτων της ασθένειας, όπου σύμφωνα με την εικόνα A.1.3 και το διάγραμμα A.1.4a βλέπουμε πως η εξέλιξη των συμπτωμάτων της ασθένειας στην περίπτωση της τροποποίησης 6 υστερεί σε σύγκριση με αυτή του μάρτυρα παρά τον αυξημένο πληθυσμό των βακτηρίων.

Στην τροποποίηση 7 (διάγραμμα A.1.11) δεν παρατηρούμε σημαντική διαφοροποίηση στην καμπύλη ανάπτυξης του παθογόνου σε σύγκριση με το wt. Σε συνδυασμό με την βαθμονόμηση των συμπτωμάτων του διαγράμματος A.1.4a αλλά και της εικόνα A.1.3 μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η τροποποίηση 7 εμφανίζει τα ηπιότερα συμπτώματα σε σχέση με τις υπόλοιπες τροποποιήσεις αλλά και με το φυτό αγρίου τύπου καθώς όπως φαίνεται και από την πληθυσμιακή ανάλυση ο αριθμός του πληθυσμού του βακτηρίου είναι γενικά χαμηλός. Αντίθετα στην τροποποίηση 8 (διάγραμμα A.1.12) τα συμπτώματα ομοιάζουν με τις τροποποιήσεις 3-5 όπως ακριβώς και ο πληθυσμός του παθογόνου στον φυτικό ιστό αλλά με μικρότερη διαφοροποίηση μεταξύ της τροποποίησης και του μάρτυρα.

Διάγραμμα A.1.11: Πληθυσμιακή ανάλυση της μόλυνσης του *Pta* στην τροποποίηση 7 φυτών *N. benthamiana*



Διάγραμμα A.1.12: Πληθυσμιακή ανάλυση της μόλυνσης του *Pta* στην τροποποίηση 8 φυτών *N. benthamiana*



1.5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Συμπερασματικά και συνδυάζοντας τα αποτελέσματα τόσο των συμπτωμάτων της ασθένειας όσο και της πληθυσμιακής ανάλυσης μπορούμε να πούμε πως υπάρχει σαφής διαφοροποίηση τόσο στην εξέλιξη των συμπτωμάτων μετά τη μόλυνση με το παθογόνο, το οποίο αντανακλά την ασθένεια, όσο και στους πληθυσμούς των παθογόνων στις περιπτώσεις κάποιων τροποποιήσεων και σε σύγκριση με το wt. Τα αποτελέσματα αυτά είναι πιο έντονα για τις περιπτώσεις της τροποποίησης 3 και της τροποποίησης 6 συνολικά και ιδιαίτερα στην τροποποίηση 6 παρατηρούμε ότι υπάρχει μία υστέρηση στην εμφάνιση των συμπτωμάτων.

Η καμπύλη ανάπτυξης στην γενετική τροποποίηση 6 διαφέρει αισθητά καθ' όλη τη διάρκεια της σε σύγκριση με τον μάρτυρα καθώς τόσο στην εκθετική φάση όσο και σε όλη τη διάρκεια της στατικής φάσης, οι πληθυσμοί του βακτηρίου είναι σταθερά υψηλότεροι σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Αυτό είναι ιδιαίτερος σημαντικό καθώς οι πληθυσμοί των βακτηρίων εντός του φυτικού ιστού δεν συνάδουν με την εξέλιξη των συμπτωμάτων της ασθένειας όπου βλέπουμε ότι η εξέλιξη των συμπτωμάτων της ασθένειας στην περίπτωση της τροποποίησης 6 υστερεί σε σύγκριση με αυτή του μάρτυρα. Αυτό καταδεικνύει ότι η γενετική τροποποίηση 6 έχει ένα αποτέλεσμα στη φυσιολογία του φυτού το οποίο του επιτρέπει να παραμένει ο ιστός του σε καλύτερη κατάσταση στην περιοχή μόλυνσης παρ' ότι η αλληλεπίδραση του φυτού με το παθογόνο εξακολουθεί να είναι συμβατή και το παθογόνο αυξάνεται και μάλιστα σε ακόμα υψηλότερα επίπεδα σε σύγκριση με αυτά του μάρτυρα. Είναι πιθανό αυτό να οφείλεται στο ότι το παθογόνο παραμένει για περισσότερο χρονικό διάστημα σε βιοτροφική φάση στο ξενιστή καθώς τα επίπεδα των sRNA που ρυθμίζουν αρνητικά τα επίπεδα της αυξίνης είναι κατεσταλμένα στην περίπτωση της τροποποίησης 6 και η δράση συγκεκριμένων πρωτεϊνών παθογένειας που μεταβάλλουν τα επίπεδα αυτών των sRNA είναι πιο αποτελεσματική. Επίσης, είναι πιθανό τα μειωμένα επίπεδα των sRNA σε κάποιες από τις γενετικές τροποποιήσεις να επηρεάζουν τη ρύθμιση των υποδοχέων των PAMPs (Meyers *et al.*, 2013) και αυτό να οδηγεί σε τροποποίηση της σηματοδότησης πρώτου επιπέδου και της ενεργοποίησης της βασική άμυνα (basal immunity) των φυτών, μεταβάλλοντας κατά συνέπεια την μολυσματικότητα του Pta.

Ιδιαίτερος σημαντικό είναι επίσης ότι το παθογόνο παραμένει, σε όλες τις γενετικές τροποποιήσεις, στη στατική φάση περισσότερες μέρες απ' ότι στην περίπτωση του μάρτυρα όπου μετά την 8η μέρα μπαίνει σε φάση θανάτου, το οποίο μπορεί να αποτελεί συνέπεια της αλλαγής των επιπέδων της αυξίνης στα συγκεκριμένα φυτά.

ΜΕΡΟΣ 2^ο

«Ο ρόλος της οξειδάσης των πολυαμινών στις αλληλεπιδράσεις του φυτού *Arabidopsis thaliana* με το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv *tomato*».

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

2.1.1 Το φυτό *Arabidopsis thaliana*

Το φυτό *Arabidopsis thaliana* είναι ένα μικρό φυτό-ζιζάνιο το οποίο ανήκει στα αγγειόσπερμα και συγκεκριμένα στην οικογένεια Brassicaceae όπου ανήκουν επίσης το ραδίκι και το λάχανο. Το συναντάμε σε περιοχές όπως η Ευρώπη, η Ασία και η Βορειοδυτική Αφρική. Είναι ετήσιο (σπάνια διετές φυτό) το οποίο μπορεί να φτάσει σε ύψος μέχρι τα 20-25cm. Δεν παρουσιάζει ιδιαίτερο αγρονομικό ενδιαφέρον αλλά αποτελεί φυτό-μοντέλο και έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα για έρευνα στους τομείς της Γενετικής και της Μοριακής Βιολογίας φυτών. Μερικά από τα χαρακτηριστικά που καθιστούν την *Arabidopsis* ως οργανισμό-μοντέλο είναι τα παρακάτω:

1. Μικρής διάρκειας βιολογικό κύκλο (περίπου έξι εβδομάδες).
2. Μικρό μέγεθος γονιδιώματος: 157 Mbp DNA κατανεμημένα σε πέντε (5) χρωμοσώματα.
3. Διαθέτει 27,000 γονίδια τα οποία κωδικοποιούν για 35,000 πρωτεΐνες.
4. Έχει δυνατότητα μεταλλαξιγένεσης είτε με ακτινοβολία είτε με τη χρήση χημικών.
5. Εύκολη καλλιέργεια στο εργαστήριο σε περιορισμένο χώρο.
6. Μικρό μέγεθος ώριμου φυτού.
7. Παραγωγή μεγάλου αριθμού σπόρων ανά φυτό (περίπου 10,000).



2.1.2 Οι πολυαμίνες και ο ρόλος της οξειδάσης των πολυαμινών

Οι πολυαμίνες (PAs) είναι σημαντικά μόρια για την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των φυτικών κυττάρων, ενώ υπάρχουν συνεχώς αυξανόμενες ενδείξεις και για τη συνεισφορά τους σε διαφόρους τύπους καταπονήσεων. Οι πλέον διαδεδομένες PAs στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς είναι η Put, η Spd και η Spm, οι οποίες μπορεί να απαντούν σε τρεις μορφές, Διαλυτές (S-PAs), Διαλυτές-Συζευγμένες (SH-PAs), και Αδιάλυτες-Συζευγμένες (PH-PAs) ενώ τα επίπεδά τους στα κύτταρα εξαρτώνται από πορείες λεπτής ρύθμισης βασιζόμενες στην πρόσληψη, στη βιοσύνθεση, στη μεταφορά και στο καταβολισμό. Ο καταβολισμός των PAs, πραγματοποιείται από την οξειδάση των διαμινών (DAO), με κύριο υπόστρωμα την Put και την οξειδάση των πολυαμινών (PAO), με υπόστρωμα την Spd και την Spm. Ο ρόλος του καταβολισμού των PAs είναι σχεδόν άγνωστος, ενώ το μονοπάτι φαίνεται να έχει κάποιο αναπτυξιακό ρόλο, είτε μέσω των παραγώγων του όπως το H_2O_2 , είτε μέσω της μείωσης των PAs. Το H_2O_2 έχει σηματοδοτικό ρόλο, επάγοντας είτε αμυντικές αποκρίσεις ή την καταστροφή του κυττάρου. Προκειμένου να διευκρινιστεί ο σηματοδοτικός και ο φυσιολογικός ρόλος του παραγόμενου H_2O_2 , που παράγεται από το αποπλασματικό ένζυμο PAO, η ομάδα του εργαστηρίου Φυσιολογίας, τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, κατασκεύασε γενετικά τροποποιημένα φυτά (ΓΤΦ) *Arabidopsis thaliana*, που υπερεκφράζουν (S-rao) και υποεκφράζουν (A-rao) το γονίδιο rao από τον αραβόσιτο. Τα γενετικώς τροποποιημένα φυτά παρουσιάζουν μειωμένα και αυξημένα επίπεδα, αντίστοιχα, των ανώτερων PAs σπερμιδίνη (Spd) και σπερμίνη (Spm). Παρ' όλα αυτά δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα του H_2O_2 σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου (WT) σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης. Το γεγονός αυτό οφείλεται σε επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων, που επιτελούν την αντιοξειδωτική άμυνα των κυττάρων, ώστε να αποσβεστεί το επί πλέον H_2O_2 , που παράγεται από την οξείδωση των PAs. Αντίθετα, υπό την επίδραση παραγόντων καταπόνησης, που επάγουν την παραγωγή του H_2O_2 , ο προ-επαγμένος αντιοξειδωτικός μηχανισμός στα ΓΤΦ S-rao δεν ήταν σε θέση να αποσβέσει το επί πλέον H_2O_2 , με αποτέλεσμα την επαγωγή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (programmed cell death, PCD) (Moschou, 2006, 2009).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παραπάνω έρευνας δείχθηκε πως η παραγωγή H_2O_2 έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή έκφρασης αμυντικών γονιδίων, των οποίων η επαγωγή εξαρτάται από τα επίπεδα του παραγόμενου H_2O_2 . Πιο

συγκεκριμένα έδειξαν ότι σε βιοτικές καταπονήσεις, τα ΓΤΦ S-rao παρουσιάζουν αυξημένη ανθεκτικότητα απέναντι στα βακτήρια, στους ωομύκητες αλλά όχι στους ιούς. Η αυξημένη ανθεκτικότητα των φυτών αυτών οφείλεται σε δύο παράγοντες:

α) Στην επαγωγή των γονιδίων άμυνας εναντίων των παθογόνων και β) σε τροποποιήσεις του κυτταρικού τοιχώματος, που εξαρτώνται από το H₂O₂, ώστε να είναι τα φυτά λιγότερο ευπρόσβλητα, ενώ φαίνεται ότι το H₂O₂ είναι απευθείας τοξικό για τα βακτήρια και τους ωομύκητες. Η παραγωγή του H₂O₂ εξαρτάται, στην περίπτωση της βιοτικής καταπόνησης, από την έξοδο στον αποπλάστη της Spm και όχι της Spd, όπως συμβαίνει κατά την αβιοτική καταπόνηση. Αντίθετα, τα A-rao δεν παρουσιάζουν ανάλογη αντίδραση και φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητα σε καταπονήσεις από βακτήρια. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας δείχνουν ότι η αποπλασματική οξειδωση των PAs προκαλεί ευαισθησία στις αβιοτικές καταπονήσεις και ανθεκτικότητα στις βιοτικές (Moschou *et al.*, 2006, 2009).

2.1.3 Το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

Το *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* είναι ένα ευρέως διαδεδομένο βακτηριακό παθογόνο που προκαλεί ασθένειες σ' ένα μεγάλο εύρος, οικονομικά σημαντικών, φυτικών ειδών. Υποδιαιρείται σε περίπου 50 παθότυπους, καθένας από τους οποίους προκαλεί χαρακτηριστικά συμπτώματα της ασθένειας και διακριτές εξειδικεύσεις ως προς τον ξενιστή (Young *et al.*, 1996).

Προκαλεί την ασθένεια βακτηριακή στιγματώση της τομάτας (bacterial spot disease). Η συγκεκριμένη ασθένεια αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1929 στην Ταϊβάν και είναι γνωστή στις Η.Π.Α. από το 1933. Στην Ελλάδα διαγνώστηκε για πρώτη φορά το 1971 από το Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο στην περιοχή της Πρέβεζας και μετά σε πολλές περιοχές της Κρήτης. Έγινε οικονομικά σημαντική, σε παγκόσμια κλίμακα, από τα μέσα των 1970 (Jones *et al.*, 1991). Το παθογόνο προσβάλλει τα στελέχη, τα φύλλα, τους μίσχους, τους ποδίσκους, τα σέπαλα και τους καρπούς (εικόνα 1.4). Στους βλαστούς και στους μίσχους των σύνθετων φύλλων εμφανίζονται κυκλικές κηλίδες χρώματος βαθέως καστανού μέχρι μαύρου. Συχνά, ιδιαίτερα επί των νεαρών βλαστών σχηματίζονται μαύρες, νεκρωτικές περιοχές οι οποίες συνενώνονται και εμφανίζονται σαν ενιαίες μολυσμένες περιοχές. Αρχικά

είναι επιφανειακές, αργότερα όμως η προσβολή επεκτείνεται μέσα στους ιστούς του φλοιού και των αγγείων και προκαλείται αποξήρανση. Στους καρπούς προκαλεί κυκλικές κηλίδες, επίπεδες ή ελαφρά βυθισμένες, με σπογγώδη σύσταση, καστανού χρώματος χωρίς άλω οι οποίες μπορούν να καλύψουν το ¼ ή και περισσότερο μέρος της επιφάνειάς τους. Στο έλασμα των φύλλων η μόλυνση εκδηλώνεται με τη μορφή νεκρωτικών, κυκλικών μέχρι γωνιωδών κηλίδων καστανού έως μαύρου χρώματος οι οποίες περιβάλλονται από χλωρωτική άλω. Όπως οι περισσότερες ασθένειες ευνοείται από δροσερό και υγρό καιρό. Προσβάλλει κυρίως την τομάτα, την πιπεριά καθώς και έναν αριθμό ζιζανίων και ορισμένα στελέχη του προσβάλλον το φυτό μοντέλο *Arabidopsis thaliana*. Μεταδίδεται με τον σπόρο και με τα προσβεβλημένα υπολείμματα της καλλιέργειας. Προσφάτως αποδείχτηκε ότι τα συγκεκριμένα βακτήρια πολλαπλασιάζονται στη βάση των τριχών του υγιούς φύλλου τομάτας και στη συνέχεια προκαλεί την ασθένεια (www.usda.gov).

Εικόνα 1.4: Βακτηριακή στιγματώση σε φύλλα τομάτας (α), σε καρπούς (β) και σε Αραβίδωση μετά από προσβολή από το *Psto*(γ).



2.1.4 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της δεύτερης ενότητας της πτυχιακής αυτής μελέτης είναι ο έλεγχος του ρόλου της οξειδάσης των πολυαμινών στις αλληλεπιδράσεις του φυτού *Arabidopsis thaliana* με το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Psto*.

Για την επίτευξη του σκοπού αυτού μολύναμε φυτά *Arabidopsis thaliana* που υπερεκφράζουν (S-PAO) και υποεκφράζουν (A-PAO) το γονίδιο της οξειδάσης των πολυαμινών (PAO) με το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Psto*, ώστε να διαπιστώσουμε την ύπαρξη ή μη ανθεκτικότητας των φυτών αυτών στο συγκεκριμένο βακτήριο και κατά συνέπεια την ενίσχυση ή μη του αμυντικού μηχανισμού των φυτών αυτών.

2.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 Καλλιέργεια των βακτηρίων

Το βακτήριο που χρησιμοποιήθηκε (βλ. Πίνακα 1), καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα Luria Broth (LB). Τα θρεπτικά υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν είτε σε υγρή είτε σε στερεά μορφή για τη διατήρηση των καλλιεργειών για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στο ψυγείο. Η διαφορά στην παρασκευή μεταξύ των υγρών και στερεών υποστρωμάτων ήταν η προσθήκη 1.5% άγαρ.

Πίνακας 1. Φυτοπαθογόνο βακτήριο που χρησιμοποιήθηκε

Είδος	Στέλεχος	Φυτό που μολύνθηκε	Εργαστήριο απομόνωσης/προέλευσης
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	DC 3001	<i>Arabidopsis thaliana</i>	N. Σκανδάλης Προσωπική συλλογή Reference (Cuppels <i>et al.</i> , 1986)

Το *Psto* καλλιεργήθηκε σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα Luria Broth (LB), σε Nutrient Agar (NA)+cycloheximide και σε King's B(σε στερεά μορφή για να διατηρηθούν οι καλλιέργειες μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στο ψυγείο). Οι συνταγές παρασκευής των θρεπτικών υποστρωμάτων εφαρμόστηκαν όπως αναγράφεται στον πίνακα 2 παρακάτω.

Πίνακας 2. Συστατικά θρεπτικών μέσων καλλιέργειας παθογόνων βακτηρίων

King's B pH=7.2	Nutrient Agar	Συνταγή LB
Protease peptone (No 3) 20g	Nutrient broth 8g	LB Broth Base 20g
KH ₂ PO ₄ 1,5g	Bacto-Agar 18g	dH ₂ O μέχρι 1L
MgSO ₄ *7H ₂ O 1,5g	Cycloheximide 2ml	
Glycerol 10 ml	dH ₂ O μέχρι 1L	
Άγαρ 18g		
dH ₂ O μέχρι 1L		

2.2.2 Τεχνητή μόλυνση φυτών με βακτήρια

Για την παραγωγή του μολύσματος ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: Βακτηριακό αιώρημα από υγρή καλλιέργεια στο στάδιο της στατικής φάσης φυγοκεντρήθηκε στις 4000 στροφές ανά λεπτό για 4 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε ίσο όγκο διαλύματος 10 mM MgCl₂. Ακολούθησε φυγοκέντρηση του αιωρήματος, απόρριψη του υπερκείμενου και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε ίσο όγκο 10 mM MgCl₂. Κατόπιν το αιώρημα αραιώθηκε μέχρι περίπου 0,12 οπτική πυκνότητα στα 600 nm, μετρούμενη σε φωτόμετρο. Ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις για να καταλήξει η συγκέντρωση του μολύσματος στην επιθυμητή. Το σύνολο της διαδικασίας από τις πλύσεις των βακτηρίων έως και την τελική μόλυνση διήρκεσε λιγότερο από 45 λεπτά, για τη μεγιστοποίηση της βιωσιμότητας των βακτηρίων.

2.2.3 Διαδικασία μόλυνσης των φυτών

Η μόλυνση των φυτών έγινε με έγχυση του εναιωρήματος από την κάτω φυλλική επιφάνεια του φύλλου με χρήση σύριγγας. Η διάκριση των φύλλων που έχουν μολυνθεί με αυτά που έχουν με εκείνα που δεν μολύνθηκαν έγινε με την χρήση μαρκαδόρου μπλε χρώματος όπως φαίνεται στην εικόνα 1.5. Η ολοκλήρωση της κάλυψης του όγκου αυτού με εναιώρημα έγινε μέσω οπτικής παρατήρησης.

Οι χειρισμοί που έγιναν ήταν 3 συνολικά και είναι οι εξής:

1. Άγριου τύπου *Arabidopsis thaliana* (Wild Type, WT)
2. *Arabidopsis thaliana* με υπερέκφραση του γονιδίου PAO (S-PAO)
3. *Arabidopsis thaliana* με υποέκφραση του γονιδίου PAO (A-PAO)

Εικόνα 1.5: Φυτά *Arabidopsis thaliana* που χρησιμοποιήθηκαν για την μόλυνση με το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Psto*.



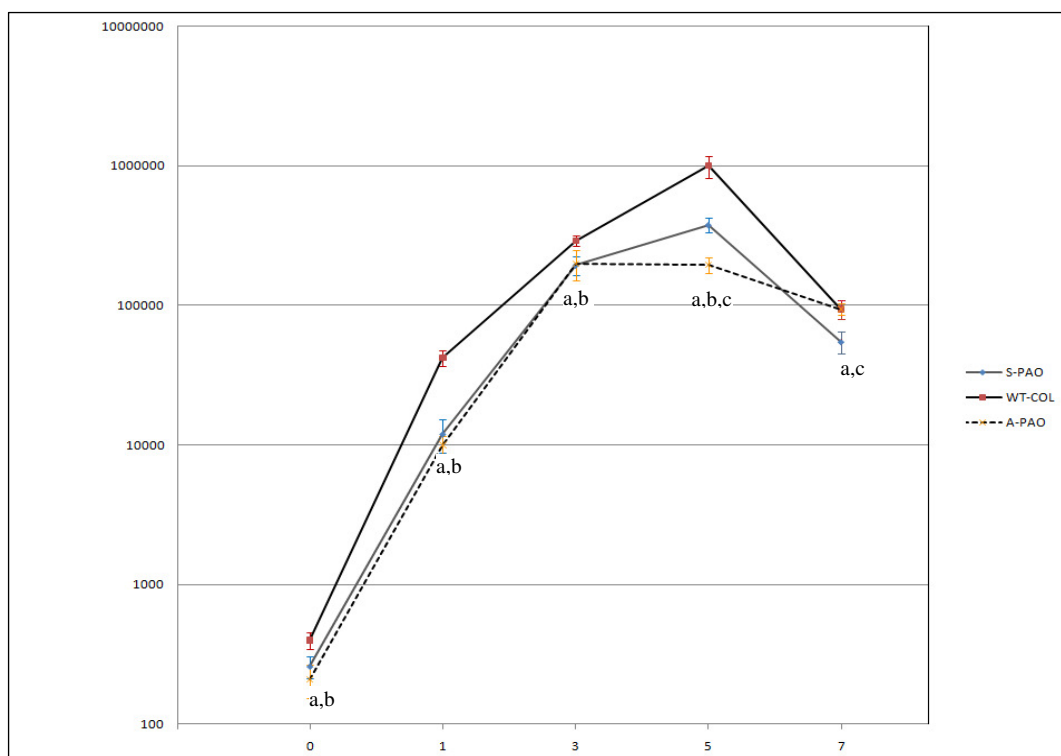
2.2.4 Πληθυσμιακή ανάλυση

Η πληθυσμιακή ανάλυση είναι μια παράλληλη διαδικασία του παραπάνω πειράματος. Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία μέχρι το σημείο της εφαρμογής του μολύσματος. Η βασική διαφορά είναι στον τρόπο μέτρησης των αποτελεσμάτων. Αυτήν τη φορά έγιναν μετρήσεις βακτηριακών αποικιών σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε κατάλληλα αντιβιοτικά και συγκεκριμένα το αντιβιοτικό κυκλοεξαμίδη, για την παρεμπόδιση σαπρόφυτων και μυκήτων και επέτρεπε τη μορφολογική αναγνώριση των αποικιών (χαρακτηριστική υπόλευκη εμφάνιση στην περίπτωση της Ψευδομονάδας). Σε κάθε δειγματοληψία παρελήφθησαν 2 φυλλικοί δίσκοι σταθερής διαμέτρου (9mm) από κάθε φύλλο, συνήθως ανά δύο ημέρες. Κάθε δίσκος πολτοποιήθηκε ξεχωριστά σε 1ml αποστειρωμένο, απιονισμένο νερό ή $MgCl_2$. Από αυτό το διάλυμα στην συνέχεια έγιναν δεκαδικές αραιώσεις (10^0 , 10^{-2} , 10^{-4} κτλ.). Από κάθε αραιώση ελήφθησαν 100μl και επιστρώθηκαν σε τρυβλία με Nutrient agar που περιείχαν κυκλοεξαμίδη με την τεχνική του plating. Στην συνέχεια τα τρυβλία επώαστηκαν σε σκοτεινό επωαστήριο στους $28^{\circ}C$ μέχρι να αναπτυχθούν οι βακτηριακές αποικίες (48 ώρες).

2.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η πληθυσμιακή ανάλυση του βακτηρίου *Psto* σε φυτά *Arabidopsis thaliana* αγρίου τύπου αλλά και γενετικά τροποποιημένων φυτών ως προς την έκφραση του γονιδίου της οξειδάσης των πολυαμινών έγινε με τον ίδιο τρόπο όπως περιγράφηκε στο μέρος Α στην παράγραφο 2.2.2. Τα αποτελέσματα της πληθυσμιακής ανάλυσης φαίνονται στο διάγραμμα Β.3.1. Τα δεδομένα αποτελούν μέσους όρους από τρία ανεξάρτητα πειράματα και δίνουν τον αριθμό των βακτηριακών κυττάρων ανά δείγμα. Κάθε δείγμα αποτελείται από τρεις φυλλικούς δίσκους από τρία διαφορετικά φυτά. Τα γράμματα αντιστοιχούν στην στατιστική ανάλυση των διαφορών στον πληθυσμό του *Psto* (a: WT-col και S-PAO, b: WT-Col and A-PAO και c: S-PAO and A-PAO).

Διάγραμμα Β.3.1: Πληθυσμιακή ανάλυση της μόλυνσης του *Psto* σε φυτά *Arabidopsis thaliana*. Οι καμπύλες αντιπροσωπεύουν τον πληθυσμό του βακτηρίου *Psto* στις 0,1,3,5 και 7 ημέρες μετά την μόλυνση των φύλλων φυτών αγρίου τύπου, οικότυπου *Columbia* (WT-col) και των μεταλλαγμένων σειρών S-PAO και A-PAO.



Σύμφωνα με τα δεδομένα του διαγράμματος Β.3.1 παρατηρούμε πως από τις πρώτες κιάλας μέρες υπάρχει μια διαφοροποίηση στα φυτά S-PAO σε σχέση με το φυτό αγρίου τύπου (WT-Col). Ωστόσο το μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζεται

κατά την πέμπτη ημέρα όπου παρατηρείται σημαντική μείωση του πληθυσμού του βακτηρίου στις γενετικές τροποποιήσεις σε σχέση με το φυτό αγρίου τύπου. Πιο συγκεκριμένα την πέμπτη μέρα το φυτό το οποίο υπερεκφράζει (S-PAO) το γονίδιο της οξειδάσης των πολυαμινών φαίνεται να έχει μικρότερο πληθυσμό βακτηρίων από το φυτό αγρίου τύπου. το ίδιο συμβαίνει και για το φυτό το οποίο υποεκφράζει (A-PAO) το συγκεκριμένο γονίδιο. Από την άλλη στο διάγραμμα φαίνεται πως μεταξύ των δύο τροποποιήσεων, το S-PAO φαίνεται να έχει υψηλότερο πληθυσμό σε σύγκριση με το A-PAO. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με τις φαινοτυπικές παρατηρήσεις στα αντίστοιχα χρονικά σημεία μετά τη μόλυνση, όπου ο ιστός στην περιοχή της μόλυνσης αναπτύσσει συμπτώματα ταχύτερα και σε μεγαλύτερο βαθμό στη περίπτωση των φυτών αγρίου τύπου σε σχέση με τα φυτά που υπερεκφράζουν την οξειδάση των πολυαμινών.

Συμπερασματικά και σύμφωνα με την έρευνα που έχει ήδη γίνει (Moschou *et al.*, 2009) μπορούμε να πούμε πως τα φυτά S-PAO και A-PAO παρουσιάζουν ενδείξεις ανθεκτικότητας έναντι του φυτοπαθογόνου *Psto* καθώς η ανάπτυξη του βακτηρίου στα φυτά φαίνεται να περιορίζεται σε σχέση με το φυτό αγρίου τύπου σε επίπεδο παρόμοιο με εκείνα των μη μολυσματικών ψευδομονάδων σε φυτά *Arabidopsis thaliana* και *Nicotiana benthamiana* (Collmer *et al.*, 2007). Τα αποτελέσματα αυτά συμπίπτουν με τα αποτελέσματα της έρευνας των Moschou *et al.*, 2009 ο οποίος αναφέρει ανθεκτικότητα που υπερεκφράζεται των PAO έναντι των βακτηρίων. Μπορούμε να καταλήξουμε στο συμπέρασμα πως η οξειδάση των πολυαμινών εμπλέκεται σημαντικά και με ενεργό ρόλο στην ενεργοποίηση του αμυντικού μηχανισμού των φυτών *Arabidopsis thaliana*.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Baulcombe, D. C.** "Amplified Silencing". *Science* 12 January 2007: Vol. 315 no. 5809 pp. 199-200. DOI: 10.1126/science.1138030.
- Baulcombe, D. C.** "RNA silencing in plants". *Nature* 431, Sep 16 2004; p. 356-363. DOI:10.1038/nature02874. PubMed - indexed for MEDLINE.
- Boccaro, M., Sarazin, A., Thiébeauld, O., Jay F., Voinnet, O., Navarro, L.** " The Arabidopsis miR472-RDR6 Silencing pathway modulates PAMP- and Effector-Triggered Immunity through the post-transcriptional control of disease resistance genes". *PLOS Pathogens*, January 16 2014. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003883.
- Brodersen, P., Chapman, E., Carrington, J.** "The role of small RNAs". Genetic modification of plants: agriculture, horticulture and forestry; Gene silencing in plants: Transgenes as targets and effectors, §5.2.1. Editors: Kempken F. and Jung C. Published by Springer.
- Brodersen, P., Voinnet, O.** "The diversity of RNA silencing pathways in plants". Vol. 22, Issue 5, p. 268-280. (2006)
- Collmer, A., Wei, C. F., Kvitko, B. H., Shimizu, R., Crabill, E., Alfano, J. R., Lin, N. C., Martin, G. B., Huang, H. C.** "A *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 mutant lacking the type III effector HopQ1-1 is able to cause disease in the model plant *Nicotiana benthamiana*". *Plant Journal*, July 2007;51(1):32-46. Epub 2007 Jun 8.
- Cuppels, D. A. (1986).** "Generation and characterization of Tn5 insertion mutations in *Pseudomonas syringae* pv. tomato". *Appl Environ Microbiol* 51, 323-327.
- Fei, Q., Xia, R., Meyers, B. C.** "Phased, Secondary, Small Interfering RNAs in Posttranscriptional Regulatory Networks". © 2013 American Society of Plant Biologists. *The Plant Cell* July 2013 vol. 25 no.7 2400-241.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M., Kostas, S., Driver, S., Mello, C.** "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*". *Nature* 391, p. 806-811. Feb 19 1998. DOI:10.1038/3588

- Goodin, M., Zaitlin, D., Naidu, R. and Lommel, S.** "Nicotiana benthamiana: Its history and future as a model for plant-pathogen interactions". *MPMI* Vol. 21, No. 8, 2008, pp. 1015–1026. DOI:10.1094 / *MPMI* -21-8-1015. © 2008 The American Phytopathological Society.
- Hamilton, A. J., and Baulcombe, D. C.** " A species of small antisense RNA in post-transcriptional gene silencing in plants". *Science* 29 October 1999, Vol. 286, No. 5441 pp. 950-952. DOI: 10.1126/science.286.5441.950.
- Jones, J. B., McCarter, S. M., and Gitaitis, R.** "Association of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* with a leaf spot disease of tomato transplants in Southern Georgia". *Phytopathology* 71, p. 1281-1285, 1981.
- Matzke, M., Kanno, T., Huettel, B., Daxinger, L., Matzke, A. J. M.** " Targets of RNA-directed DNA methylation". *Current Opinion in Plant Biology* 2007, 10:512–519. © 2007 Elsevier Ltd. DOI 10.1016/j.pbi.2007.06.007.
- Mello, C., Conte, D.** " Revealing the world of RNA interference". *Nature* 431, Sep 16 2004; p. 338-342. DOI: 10.1038/nature02872.
- Metzlaff, M., O'Dell, M., Cluster, P. D., and Flavell, R. B.** "RNA-mediated RNA degradation and chalcone synthase A silencing in petunia". *Cell* 88, 845–854, March 1997. © 1997 Cell Press. Published by Elsevier Inc.
- Moschou, P., Sanmartin, M., Andriopoulou, A., Rojo, E., Sanchez-Serrano, J. J., and Roubelakis-Angelakis, K.** " Bridging the gap between plant and mammalian polyamine catabolism: A novel peroxisomal polyamine oxidase responsible for a full back-conversion pathway in Arabidopsis". *Plant Physiology*, August 2008, Vol. 147, pp. 1845-1857, www.plantphysiol.org © 2008 American Society of Plant Biologists.
- Moschou, P., Sarris, P., Skandalis, N., Andriopoulou, A., Paschalidis, A., Panopoulos, N., and Roubelakis-Angelakis, K.** " Engineered polyamine Catabolism preinduces tolerance of tobacco to bacteria and oomycetes". *Plant Physiology*, April 2009, Vol. 149, no. 4, pp.1970-1981 © American Society Of Plant Biologists.

- Ratcliff, F., Harrison, B. D., and Baulcombe, D. C.** "A similarity between viral defense and gene silencing in plants". *Science* 276, June 1997, 1558–1560.
- Ratcliff, F., MacFarlane, S., Baulcombe, D. C.** "Gene Silencing without DNA: RNA-Mediated Cross-Protection between viruses". *The Plant Cell*, Vol. 11, 1207-1215, July 1999. © 1999 American Society of Plant Physiologists.
- Surekha Katiyar-Agarwal and Hailing Jin** "Role of Small RNAs in Host-Microbe Interactions". *Annual Review of Phytopathology* 2010, Vol. 48: 225-246.
- van der Krol, A., Mur, L., Beld, M., Mol, J., Stuitje, A.** "Flavonoid Genes in Petunia: Addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression". *The Plant Cell*, Vol. 2, 291-299, April 1990 © 1990 American Society of Plant Physiologists.
- Vaucheret, H.** " Plant ARGONAUTES". *Trends Plants Sci.* 2008 July; 13(7):350-8. doi: 10.1016/j.tplants.2008.04.007. Epub 2008 May 26.
- Vaucheret, H.** "Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations". *GENES & DEVELOPMENT* 20:759–771 © 2006 by Cold Spring Harbor Laboratory Press ISSN 0890-9369/06; www.genesdev.org
- Voinnet, O., Jay, F., Nomura, K., He, S. Y., Navarro, L.** "Suppression of the microRNA pathway by bacterial effector proteins". *Science*. 2008 August 15; 321(5891): 964–967. DOI:10.1126/science.1159505.
- Wassenegger, M.,** "The role of the RNAi machinery in heterochromatin formation". *Cell* Jul 15 2005; 122(1) p. 13-16. PubMed - indexed for MEDLINE.
- Waterhouse, P., Graham, M., Wang, M.** "Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 95, pp. 13959-13964, November 1998, *Plant Biology*. © 1998 by The National Academy of Sciences.
- Wingard, S. A.** "Hosts and symptoms of ring spot, a virus disease of plants. *J.Agric. Res.* 37, p. 127-153. (1928)

Young, J. M., Saddler, G. S., Takikawa, Y., De Boer, S. H., Vauterin, L., Gvozdyak, R. I. & Stead, D. E. (1996). "Names of plantpathogenic bacteria 1864-1995". Rev Plant Pathol 75, 721-763.

Παναγόπουλος Χ. Γ. " Ασθένειες κηπευτικών καλλιεργειών". Β' έκδοση, Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης.