

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ & ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ	
Αριθ. Πρωτοκόλλου	103
Ημερομηνία	9-3-1999

**Αντιμετώπιση του ιού TRV
στον καπνό, με τη δημιουργία ανθεκτικών
διαγονιδιακών φυτών**

Πτυχιακή μελέτη
του φοιτητή του τμήματος Γεωπονίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ Γ. ΣΑΛΕΜΗ

Εκτελεσθείσα
στο
Εργαστήριο Ιολογίας του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού
Ινστιτούτου υπό την άμεση επίβλεψη
του Δρ Φρειδερίκου Μπεμ

ΒΟΛΟΣ
Φεβρουάριος 1999



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 9/4

Ημερ. Εισ.: 31-07-2003

Δωρεά: _____

Ταξιδετικός Κωδικός: ΠΤ - ΓΦΖΠ

1999

ΣΑΛ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000070075

Εισηγητική Επιτροπή

- 1) Α . Χ . Παππάς (εισηγητής)
- 2) Χ . Γούλας (μέλος)
- 3) Ι . Γούναρης (μέλος)

Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στον προϊστάμενο του Εργαστηρίου Ιολογίας του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου Δρ Φρειδερίκο Μπεμ , για τις πολύτιμες υποδείξεις του τόσο κατά τη διάρκεια πραγματοποίησης της πειραματικής αυτής εργασίας , όσο και κατά τη διάρκεια της συγγραφής της .

Επίσης , θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου Δρ Αθανάσιο . Χ. Παππά , τόσο για το ερέθισμα πραγματοποίησης της πειραματικής αυτής εργασίας , καθώς και για τις υποδείξεις του ώστε να συγγραφεί σωστά η μελέτη αυτή .

Ευχαριστώ επίσης όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Ιολογίας του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου και ιδιαίτερα την Δρ Βασιλεία Πλαστήρα , για την πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχαν καθ' όλη την διάρκεια πραγματοποίησης της πειραματικής αυτής εργασίας .

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
1. Ο ΙΟΣ ΤΟΥ " ΚΡΟΤΑΛΙΣΜΑΤΟΣ " ΤΟΥ ΚΑΪΝΟΥ	
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΙΟΥ TRV	2
1.3 Μ ΚΑΙ ΝΜ ΤΥΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΙΣ ΤΟΥ ΙΟΥ	5
1.4 ΟΡΟΤΥΠΟΙ ΤΟΥ ΙΟΥ TRV	6
1.5 ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗΣ ΣΕ ΦΥΣΙΚΩΣ ΜΟΛΥΣΜΕΝΟΥΣ ΞΕΝΙΣΤΕΣ	8
1.6 ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΤΟΥ ΙΟΥ TRV	
α) Μετάδοση μέσω εμβολιασμού	10
β) Μετάδοση μέσω κουσκούτας	10
γ) Μετάδοση μέσω μηχανικής μόλυνσης με παρασκευάσματα που περιέχουν τον ιό TRV	11
δ) Μετάδοση μέσω του σπόρου	11
ε) Μετάδοση μέσω νηματωδών	12
στ) Εμβολιασμός των πρωτοπλαστών του μεσοφύλλου	13
1.7 ΜΗΧΑΝΙΚΩΣ ΜΟΛΥΣΜΕΝΟΙ ΞΕΝΙΣΤΕΣ	
α) Εύρος ξενιστών	13
β) Ξενιστές για τη διάγνωση του TRV	14
γ) Ξενιστές πολλαπλασιασμού, διατήρησης και διάγνωσης του TRV	16
δ) Συμπτωματολογικές διαφορές μεταξύ διαφόρων φυλών του TRV	16
1.8 ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΜΟΛΥΣΜΑΤΟΣ	17

2.	ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΙΟΥ TRV	
2.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	18
2.2	ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΣΥΜΒΑΤΙΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ	18
2.3	ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΣΤΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΠΝΟΥ	19
2.3.1	ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΦΥΤΑ	19
2.3.2	ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕΣΩ ΤΟΥ <i>Agrobacterium</i> <i>Tumefaciens</i>	21
2.3.3	ΑΛΛΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	27
2.3.4	ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ	35
3.	Η ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΣΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΠΙΖΗΤΟΥΜΕΝΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ	
3.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	46
3.2	ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	46
3.3	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ PCR	49
4.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
4.1	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	52
4.2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	55
4.3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	75
4.4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	84
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	

1. ΙΟΣ ΤΟΥ "ΚΡΟΤΑΛΙΣΜΑΤΟΣ" ΤΟΥ ΚΑΠΝΟΥ (TOBACCO RATTLE TOBRAVIRUS, TRV)

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο ιός του "κροταλισματος" του καπνού (tobacco rattle tobravirus, TRV), αποτελεί ένα από τα δύο αναγνωρισμένα μέλη της ομάδας των tobraviruses, της οποίας το άλλο μέλος είναι ο ree-early browning tobravirus (PEBV). Κάθε ένας, από τους παραπάνω ιούς, περιλαμβάνει έναν αριθμό ορολογικά διακρινόμενων φυλών.

Ο TRV προσβάλλει πολλά είδη καλλιεργούμενων φυτών σε διαφορετικά μέρη του κόσμου. Έχει βρεθεί σε πολλές χώρες της Ευρώπης, στη Βόρεια Αμερική, στη Βραζιλία στην Ιαπωνία και στη Νέα Ζηλανδία, όπου προκαλεί σοβαρές ζημίες κυρίως στην πατάτα, καπνό, γλαδίολο και λοιπά καλλωπιστικά φυτά. (Harrison, B.D. and Robinson, D.J., 1981 / AAB Description, 1989)

1.2. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΙΟΥ TRV

Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο τα σωματίδια του ιού, τα οποία αποτελούνται από νουκλεοπρωτεΐνη, εμφανίζονται σαν άκαμπτα ραβδία με ελικοειδή συμμετρία και διάμετρο 21-23 nm, τα οποία φέρουν ένα κεντρικό κανάλι, κατά μήκος του άξονα τους διαμέτρου περίπου 5nm. Ο αριθμός των υπομονάδων πρωτεΐνης για κάθε στροφή της έλικας είναι $n+1/3$. Οι εναλλακτικές τιμές που προτίθενται για το n είναι 25 ή περίπου 32, ενώ το βήμα της έλικας είναι 2,5 nm. Η πρωτεϊνικές υπομονάδες που καλύπτουν την ελικοειδή αυτή διάταξη, αποτελούν το 95% περίπου του βάρους του σωματιδίου και έχουν μια απλή κατασκευή με μοριακό βάρος περίπου 22.000. (Harrison, B.D. and Robinson D.J., 1981)

Τα σωματίδια αυτά του ιού εμφανίζονται σε δύο επικρατέστερα μήκη, χαρακτηριστικά για κάθε απομόνωση του ιού. Αυτά είναι τα " μακριά " (L) και τα " κοντά " (S) σωματίδια. Βέβαια κάποιες απομονώσεις του ιού έχουν δώσει ένα ακόμα μικρότερου μεγέθους ιοσωμάτιο το οποίο όμως δεν έχει μελετηθεί επακριβώς. Τα S σωματίδια του ιού, έχουν μήκος από 50 -115 nm ανάλογα με την απομόνωση του ιού και είναι συνήθως δύο έως πέντε φορές περισσότερα σε σχέση με τα L σωματίδια, των οποίων το μήκος κυμαίνεται μεταξύ 185-197 nm. (Harrison, B.D. and Robinson, D.J., 1981).

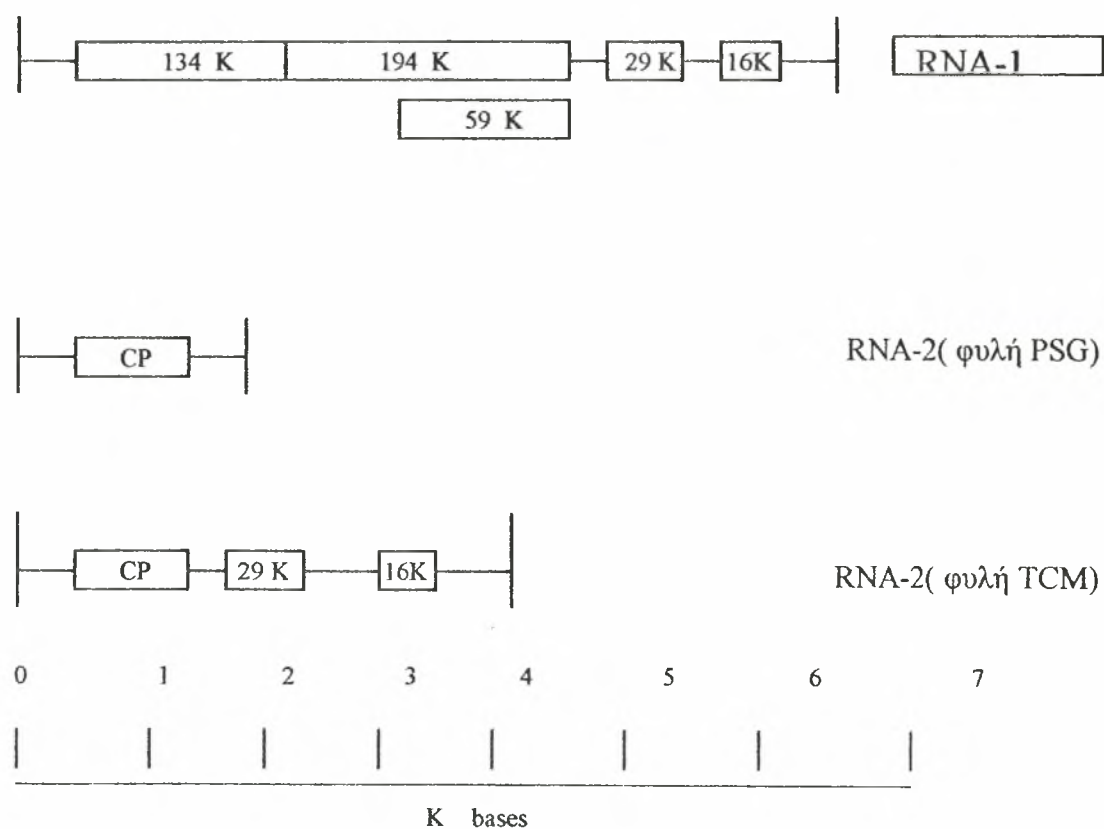
Τα σωματίδια του ιού περιέχουν 5% περίπου RNA το οποίο αποτελείται από δύο είδη μονόκλωνων αλυσίδων RNA, την RNA-1 και RNA-2, οι οποίες αναλογούν στα L και S νουκλεοπρωτεϊνικά ιοσωμάτια αντιστοίχως. Το μοριακό βάρος του RNA-1 είναι

περίπου $2,4 \times 10^6$ ενώ του RNA-2 κυμαίνεται από $0,6 \times 10^6$ έως $1,4 \times 10^6$ ανάλογα με την απομόνωση του ιού .

Η μολυσματικότητα συνδέεται με την ύπαρξη L ισωματίων και ειδικότερα με το RNA-1 αυτών . Το RNA-1 περιέχει τις γενετικές πληροφορίες για την αντιγραφή του ιού και για την από κύτταρο σε κύτταρο μετακίνηση του (εικ.1.1) . Περιέχει τέσσερα ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης για την κωδικοποίηση των πολυμερασών, μιας 134K πρωτεΐνης, μιας 194K πρωτεΐνης που έχει ομόλογες περιοχές με την υποθετική ρεπλικάση 59K του TMV , μια 29K πρωτεΐνη η οποία έχει ομολογία με την 30K υποθετική πρωτεΐνη του TMV, που είναι υπεύθυνη για την μετακίνηση του ιού από κύτταρο σε κύτταρο και μία 16K πρωτεΐνη με άγνωστη λειτουργία . Αντίθετα τα S ισωμάτια δεν είναι μολυσματικά, αλλά περιέχουν τις γενετικές πληροφορίες για τη σύνθεση της καψιδιακής πρωτεΐνης του ιού. Συγκεκριμένα, φυτικός ιστός μολυσμένος μόνο με τα L σωματίδια του TRV περιέχει μόνο το μολυσματικό RNA (RNA-1) χωρίς σωματίδια νουκλεοπρωτεΐνης , ενώ φυτικός ιστός μολυσμένος με μίγμα L και S σωματιδίων του ιού περιέχει L και S νουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια, δηλαδή RNA καλυμμένο με την πρωτεϊνική κάψα του ιού. (Harrison, B.D. and Robinson, D.J. , 1981)

Η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του RNA-1 είναι ισχυρά συντηρημένη μεταξύ των διαφόρων απομονώσεων του ιού .Αντίθετα, περισσότερη γενετική παραλλακτικότητα βρίσκεται στο RNA-2 .Σε ορισμένες απομονώσεις του ιού ,το RNA-2 περιέχει εκτός του γονιδίου που κωδικοποιεί την καψιδιακή πρωτεΐνη και αντίγραφα από ένα η δύο γονίδια που βρίσκονται στο RNA-1 και πρόσθετα γονίδια άγνωστης λειτουργίας ,όπως για παράδειγμα η φυλή του TRV (TCM) . Επιπλέον , αν και το RNA-2 πάντα περιέχει το γονίδιο που

κωδικοποιεί την καψιδιακή πρωτεΐνη ,η αλληλουχία των βάσεων αυτού του γονιδίου και ως εκ τούτου η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί , παρουσιάζει υψηλό βαθμό παραλλακτικότητας , τόσο ώστε να μην είναι ασφαλής η ανίχνευση του ιού με ορολογικές μεθόδους που χρησιμοποιούν πολυκλωνικά αντισώματα . (Harrison, B.D. and Robinson, D.J. , 1981 / AAB Description , 1989)



Εικόνα 1.1

Γενετικός χάρτης από τυπικό RNA γένωμα ενός tobnavirus

RNA-1: περιέχει γονίδια για την αντιγραφή του RNA (134K και 194K) ,για την από κύτταρο σε κύτταρο κίνηση του ιού (29K) και ενός γονιδίου αγνώστου λειτουργίας (16K) .

RNA-2 : περιέχει το γονίδιο για την παρασκευή της καψιδιακής πρωτεΐνης (CP) .

1.3 Μ ΚΑΙ ΝΜ ΤΥΠΟΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΤΟΥ ΙΟΥ TRV

Οι απομονώσεις του ιού TRV ανήκουν σε δύο βασικές κατηγορίες. Αυτές που ανήκουν στην πρώτη κατηγορία, Μ τύπου απομονώσεις είναι σχετικά σταθερές στον κυτταρικό χυμό και εύκολα μεταδίδονται κατά την μόλυνση με αυτόν. Για αυτό το λόγο αποκαλούνται και ως σταθερές, πλήρεις ή κανονικές απομονώσεις. Οι απομονώσεις στην δεύτερη κατηγορία ΝΜ τύπου απομονώσεις, είναι εύκολα μεταδιδόμενες μόνο όταν ειδικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται και είναι μάλλον ασταθείς στον κυτταρικό χυμό. Αυτές οι απομονώσεις αποκαλούνται και ως ασταθείς ή ελλιπείς. Οι ιδιότητες των Μ και ΝΜ τύπων απομονώσεων παραβάλλονται στον πίνακα 1.1.

Πίνακας 1.1

Ιδιότητες των Μ και ΝΜ τύπων απομονώσεων του TRV

Ιδιότητα	Μ-τύπος	ΝΜ-τύπος
Νουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια σε μολυσμένους ιστούς	κοντά και μακριά σωματίδια	κανένα
Τελική αραίωση χυμού που παραμένει μολυσματικός	10^{-5} – 10^{-6}	10^0 – 10^{-1}
Διάρκεια ζωής στο χυμό του ιού (20° C)	> 6 εβδομάδες	< 1 ώρας
Σημείο θερμικής αδρανοποίησης στο χυμό του ιού(στα 10 λεπτά)	80 –85 °C	< 50 °C
Κατακρήμνιση μολυσματικών υλικών στα 10 λεπτά στις 9.000	μικρή	περισσότερη

Οι NM τύπου απομονώσεις του ιού περιέχουν μόνο το RNA-1 χωρίς την καψιδιακή πρωτεΐνη . Οι M τύπου απομονώσεις περιέχουν και τα δυο είδη RNA (RNA-1 , RNA-2), με την μορφή νουκλεοπρωτεϊνικών σωματιδίων . Οι NM τύπου απομονώσεις βρίσκονται συνήθως στη φύση , μπορούν όμως να προκύψουν επίσης από τις μεταλλάξεις M τύπου απομονώσεων, μετά από χειρισμούς με περιοριστικά ένζυμα . Η μετατροπή από τις M τύπου στις NM τύπου απομονώσεις είναι μη αναστρέψιμη . (Harrison, B.D. and Robinson, D.J. , 1981)

Και οι δύο τύποι μπορούν να προκαλέσουν διασυστηματικά συμπτώματα στους κατάλληλους ξενιστές , αλλά αυτά των NM απομονώσεων εκδηλώνονται συνήθως αργότερα και είναι περισσότερο νεκρωτικά και επίμονα από ότι τα συμπτώματα M τύπου απομονώσεων . Η εκδήλωση των συμπτωμάτων ανεξάρτητα από τον τύπο των απομονώσεων επηρεάζεται από τις συνθήκες του περιβάλλοντος . (Harrison, B.D. and Robinson, D.J. , 1981)

1.4. ΟΡΟΤΥΠΟΙ ΤΟΥ ΙΟΥ TRV

Ένα χαρακτηριστικό των M απομονώσεων του TRV είναι η ποικιλία στην δομή των αντιγόνων τους . Οι απομονώσεις του TRV παλιότερα διαχωρίζονταν σε τρεις κατηγορίες οροτύπων (I , II , III), ανάλογα με την ορολογική τους συγγένεια . Σήμερα όμως οι γνωστοί ορότυποι είναι οι εξής :

	Ορρότυποι	απομονώσεις του ιού
1)	PRN	PRN , PSG , PLB N2P πολλές απομονώσεις μεταδίδονται με τον νηματώδη <i>Paratrichodorusachidermus</i>
2)	Oregon	ORE , M , S , Y μεταδίδονται με τον <i>Paratrichodorus . teres</i>
3)	SYM	SYM δεν έχει γνωστό νηματώδη φορέα
4)	RQ	RQ , RH , ASH μεταδίδονται μέσω διαφορετικών πληθυσμών <i>Trichodorus . primitivus</i>
5)	B2--8	B2--8 και άλλες απομ/σεις με <i>T. cylindricus</i>
6)	Greek	Greek με τον <i>T . similis</i>
7)	TJ	TJ
8)	N 20 N 50	N 20 , N 50 άγνωστος φορέας

1.5. ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗΣ ΣΕ ΦΥΣΙΚΩΣ ΜΟΛΥΣΜΕΝΟΥΣ ΞΕΝΙΣΤΕΣ

Η ομάδα των *Tobraviruses* έχει ένα μεγάλο εύρος ξενιστών . Στη φύση υπάρχουν περισσότερο από 100 είδη τα οποία είναι γνωστό ότι προσβάλλονται από τον ιό TRV .

Φυτά καπνού τα οποία αναπτύσσονται στον αγρό και τα οποία έχουν προσβληθεί από τον ιό TRV, εμφανίζουν διασυστηματικά νεκρωτικά συμπτώματα ,τα οποία περιλαμβάνουν νεκρωτικές κηλίδες και γραμμές πάνω στα φύλλα και καφέ νεκρωτικές ραβδώσεις πάνω στους μίσχους των φύλλων και στο στέλεχος του φυτού . Συχνά οι νεκρώσεις αφορούν και τμήματα του κύριου νεύρου των φύλλων ,με αποτέλεσμα τα φύλλα να κατσαρώνουν και να σχίζονται . Παρ' όλα αυτά η πατάτα (*Solanum tuberosum*), παρουσιάζει την μεγαλύτερη οικονομική σημασία από τους ξενιστές που προσβάλλει ο TRV . Συγκεκριμένα προκαλεί συμπτώματα στον κόνδυλο της πατάτας , τα οποία αφορούν κατεστραμμένα τμήματα , μαύρου φελλώδους ιστού στην σάρκα του, γνωστά ως φελλώδεις δακτυλιωτές κηλιδώσεις και εξωτερικά συμπτώματα στα σημεία που φελλώδεις ιστός φτάνει στην επιφάνεια του κονδύλου . Σε κονδύλους οι οποίοι εμφανίζουν συμπτώματα και οι οποίοι φυτεύονται , οι περισσότεροι από τους απόγονους τους δεν εμφανίζουν συμπτώματα και δεν θα περιέχουν καθόλου τον ιό . Στα λίγα φυτά στα οποία θα εμφανισθούν συμπτώματα αυτά, περιορίζονται σε ένα η δυο βλαστούς οι οποίοι εμφανίζουν ποικιλοχρώσεις (stem—mottle) και φέρουν φύλλα με

ελαφρύ μωσαϊκό ή εμφανίζουν μικρές, κιτρινωπές, δακτυλιωτές περιοχές (μορφή τύπου aucuba) . Η δυνατότητα του ιού να μεταδοθεί από τους κονδύλους στους απογόνους, εξαρτάται από την φυλή του ιού .Οι κόνδυλοι που παράγονται από μολυσμένα μητρικά φυτά, είναι δυνατό να περιέχουν μικρές διασκορπισμένες καφέ κηλίδες ή φελλώδεις περιοχές που βρίσκονται κυρίως στο στόλωνα ή ακόμα μπορεί να είναι ελεύθερες ιών και συμπτωμάτων . Οι αντιδράσεις των φυτών πατάτας στον TRV ομοιάζουν με τα συμπτώματα του (Potato mop-top virus) αλλά και με άλλων εδαφογενών ιών .(Harrison, B.D. and Robinson, D.J. ,1981)

Τα διάφορα καλλωπιστικά βολβώδη (τουλίπα , υάκινθος , νάρκισσος , γλαδίολος , Liliium και κρόκος) προσβάλλονται από τον ιό TRV ο οποίος προκαλεί ελαφρύ μωσαϊκό στα περισσότερα από αυτά , ενώ στα φύλλα του γλαδίολου εμφανίζονται συμπτώματα υπό την μορφή κυματισμού του ελάσματος . Οι βολβοί του υάκινθου, εμφανίζουν νεκρωτικές κηλιδώσεις , ενώ τα πέταλα της τουλίπας εμφανίζουν ραβδώσεις σκουρότερου χρωματισμού .

Τα συμπτώματα του TRV σε άλλα φυσικώς μολυσμένα φυτά είναι διαφόρων τύπων , όμως σε πολλές περιπτώσεις περιλαμβάνουν κίτρινες κηλίδες στα φύλλα τους : κηλίδες στα ζαχαρότευτλα , διάστικτα σημάδια στο σπανάκι , μωσαϊκό στην ορτανσία και δακτυλιωτές κηλίδες στο 'Aster' .

Βραζιλιάνικες απομονώσεις του TRV είναι συνδεδεμένες με τις ασθένειες αυτού του γενικού τύπου , οι οποίες αναφέρονται στο πιπέρι , τομάτα και αγκινάρα . (Harrison, B.D. and Robinson, D.J. , 1981)

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

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

Σε καλλιέργειες που βρίσκονται σε αγρούς μολυσμένους με τους νηματώδεις – φορείς του ιού τα συμπτώματα εμφανίζονται με την μορφή κηλίδων διασκορπισμένων στον αγρό . (Harrison, B.D. and Robinson, D.J. , 1981)

1.6. ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΤΟΥ ΙΟΥ TRV

α) Μετάδοση μέσω εμβολιασμού

Ο TRV μπορεί να μεταδοθεί με τον εμβολιασμό , για παράδειγμα από φυσικώς μολυσμένα φυτά πατάτας σε φυτά πατάτας η τομάτας και από φυτά τομάτας σε φυτά πατάτας . Παρ'όλα αυτά η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί πολύ λίγο για τον TRV και είναι πιθανώς λιγότερο αξιόπιστη , σε σχέση με άλλους φυτικούς ιούς διότι ο TRV τείνει να κινείται μερικώς διασυστηματικά σε φυσικώς μολυσμένα φυτά .

Οι NM απομονώσεις μεταδίδονται επίσης με τον εμβολιασμό σε κατάλληλους ξενιστές , αλλά τα συμπτώματα εμφανίζονται αργότερα σε σχέση με αυτά που προκαλούνται από τις M απομονώσεις . (Harrison, B.D. and Robinson, D.J. , 1981)

β) Μετάδοση μέσω κουσκούτας

Έχει βρεθεί πως ο TRV μπορεί να μεταδοθεί εύκολα από φυτά καπνού σε φυτά καπνού μέσω 6 ειδών του γένους *Cuscuta spp.* Ο

ιός μολύνει τα ζιζάνια και μπορεί να προκαλέσει τοπικές νεκρώσεις πάνω στους βλαστούς τους . (Harrison, B.D.and Robinson, D.J., 1981)

γ) Μετάδοση μέσω μηχανικής μόλυνσης με παρασκευάσματα που περιέχουν τον ιό TRV

Γενικά οι Μ τύπου απομονώσεις είναι πολύ η λίγο εύκολα μεταδιδόμενες κατά την μόλυνση με φυτικό χυμό , ανάλογα βέβαια με την συγκέντρωση των σωματιδίων του ιού στους ιστούς, από τους οποίους προέκυψε το μόλυσμα , ενώ οι NM τύπου απομονώσεις μεταδίδονται πολύ λίγο με τη μέθοδο αυτή , ιδίως όταν χρησιμοποιούνται φυτά με μέτρια ευαισθησία στον ιό TRV . Ο τύπος αυτός της μόλυνσης, αφορά στην εφαρμογή του μολυσμένου φυτικού χυμού , δια ελαφριάς τριβής πάνω στα φύλλα του φυτού-δείκτη .

Είναι καλό να σκονίζονται τα φυτά δείκτες με ένα αποξεστικό, όπως το carborundum ή το corundum (600 mesh) ακόμα και όταν μεταδίδονται Μ τύπου απομονώσεις , διότι έτσι διευκολύνεται η είσοδος του ιού στα κύτταρα μέσω των πληγών που δημιουργούνται στα κυτταρικά τους τοιχώματα . (Harrison, B.D. and Robinson, D.J. , 1981)

δ) Μετάδοση μέσω του σπόρου

Ο TRV σπάνια μεταδίδεται μέσω του σπόρου πειραματικώς μολυσμένων φυτών , όμως μετάδοση μέσω του σπόρου ανιχνεύτηκε σε 5 από τα 15 φυσικώς μολυσμένα είδη ζιζανίων , πράγμα το

οποίο θεωρείται ότι παίζει κάποιο ρόλο στη μετάδοση του ιού σε νέες θέσεις . (Harrison, B.D. and Robinson, D.J. , 1981)

ε) Μετάδοση μέσω νηματώδων

Ο TRV μεταδίδεται από διάφορα είδη φυτοпараσιτικών νηματώδων εδάφους , που ανήκουν στην οικογένεια Trichodoridae των γενών *Paratrichodorus* και *Trichodorus* .

Οι φορείς νηματώδεις είναι σχετικά μικρού μήκους μέχρι περίπου 2 mm , τείνουν να συγκεντρώνονται κάτω από το επίπεδο του καλλιεργούμενου στρώματος του εδάφους ή στο επίπεδο αυτό κάποιες περιόδους του έτους και επηρεάζονται πολύ από τις αλλαγές των εδαφικών συνθηκών .

Οι νηματώδεις που φέρουν τον ιό, μπορούν να μολύνουν με τον TRV φυτά ξενιστές, όταν έρθουν σε επαφή με την ρίζα τους για μια ώρα, ενώ μακρύτερες περιόδους επαφής είναι αποτελεσματικότερες .

Τα σωματίδια του ιού προσκολλώνται στην εσωτερική επιφάνεια του οισοφάγου του νηματώδη και εξέρχονται μαζί με τα στοματικά υγρά για να προσβάλλουν τα κύτταρα της ρίζας , που έχουν διατρυπηθεί από το στίλετο του νηματώδη .

Ο ιός πιστεύεται ότι δεν πολλαπλασιάζεται στους φορείς νηματώδεις , αλλά μπορεί η μολυσματικότητα των νηματώδων να διατηρηθεί για μήνες ή χρόνια . (Harrison, B.D. and Robinson, D.J. , 1981)

Οι νηματώδεις φορείς του TRV μπορεί να ανιχνευτούν σε δείγματα εδάφους αγρού , όπου αναπτύσσονται φυτά δολώματα για

4-6 εβδομάδες και κατόπιν εμβολιασμό με εκχύλισμα από τις ρίζες των φυτών αυτών σε φυτά δείκτες .

Η μολυσματικότητα εδαφών μολυσμένων με νηματώδεις φορείς του ιού , καταστρέφεται με ξηρό αέρα σε αντίθεση με έδαφος που περιέχει ιούς όπως , ο mop-top της πατάτας (ο ιός αυτός έχει φορείς μύκητες , οι οποίοι διατηρούνται σε μορφή ανθεκτικών σπορίων) .

Αρκετά είδη του *Trichodorus* μπορούν να ολοκληρώσουν τον κύκλο ζωής σε 3-6 εβδομάδες στους 15 -25 °C, αλλά μόνο λίγα από αυτά πολλαπλασιάζονται καλά σε καλλιέργεια . Παρθενογενετικά είδη φαίνεται να πολλαπλασιάζονται πιο γρήγορα από αυτά που πολλαπλασιάζονται φυλετικά . (Harrison, B.D. and Robinson, D.J. , 1981)

στ) Εμβολιασμός των πρωτοπλαστών του μεσοφύλλου .

Παρ'όλο που δεν έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση ή διάγνωση του TRV , οι πρωτοπλάστες του μεσοφύλλου του καπνού έχουν αποδειχθεί πολύ χρήσιμοι για την μελέτη της συμπεριφοράς του TRV σε κυτταρικό επίπεδο . (Harrison, B.D. and Robinson, D.J. , 1981)

1.7. ΜΗΧΑΝΙΚΩΣ ΜΟΛΥΣΜΕΝΟΙ ΞΕΝΙΣΤΕΣ

α) Εύρος ξενιστών

Περισσότερα από 400 φυτικά είδη που ανήκουν σε περισσότερες από 50 οικογένειες, μπορούν να μολυνθούν με Μ απομονώσεις του TRV , μηχανικά με φυτικό χυμό και περίπου τα μισά από αυτά προσβάλλονται διασυστηματικά . Το εύρος των ξενιστών των NM

απομονώσεων του TRV έχει μελετηθεί λιγότερο, όμως φαίνεται να είναι ίδιο με εκείνο των M απομονώσεων . (Harrison, B.D. and Robinson, D.J. , 1981)

β) Ξενιστές για την διάγνωση του TRV.

Οι αντιδράσεις από 6 είδη φυτών- δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν για να διαχωρίσουν τις M απομονώσεις του TRV από άλλους ιούς, δίνονται στον πίνακα 1.2

Ο TRV διακρίνεται ευκολότερα από την ικανότητα του να προσβάλλει τα είδη *Pisum sativum* και *Vicia faba* διασυστηματικά και από τον τύπο των τοπικών πληγών, που παράγει στο είδος *Phaseolus vulgaris* .

Οι NM απομονώσεις παράγουν συμπτώματα σε γενικές γραμμές όμοια με αυτά των M απομονώσεων , αλλά υπάρχουν και κάποιες διαφορές . Οι NM απομονώσεις του TRV προκαλούν κατά κάποιο τρόπο μεγαλύτερες τοπικές πληγές στα φύλλα του είδους *Chenopodium amaranticolor*, σε σχέση με τις M απομονώσεις του ιού. Καθυστερούν επίσης να προκαλέσουν διασυστηματική προσβολή σε κάποια είδη σολανωδών ,όπως τα είδη *Nicotiana glauca* και *Petunia hybrida* όμως , προκαλούν περισσότερο έντονα συμπτώματα.

Οι NM απομονώσεις του TRV της φυλής SYM , αντίθετα με τις απομονώσεις της φυλής αυτής του ιού αποτυγχάνουν να μολύνουν διασυστηματικά το είδος *Chenopodium amaranticolor*. (Harrison, B.D. and Robinson, D.J. , 1981)

Πίνακας 1.2

Συμπτώματα του ιού TRV σε φυτά -- δείκτες

Φυτικά είδη	Συμπτώματα του TRV
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	I ¹ νεκρωτικές κηλίδες διαμέτρου 2-6 mm S ² δεν προκαλεί μόλυνση
<i>Cucumis sativus</i>	I χλωρωτικές , νεκρωτικές κηλίδες διαμέτρου 2-3 mm S δεν προκαλεί μόλυνση
<i>Nicotiana tabacum</i> cv . samsun--NN	I νεκρωτικές κηλίδες και δακτυλίους S νεκρωτικές κηλίδες , δακτυλίους και σχέδια ³
<i>Phaseolus vulgaris</i> cv . the prince	I νεκρωτικές κηλίδες , μεγέθους κεφαλής καρφίτσας S δεν προκαλεί μόλυνση
<i>Pisum sativum</i> cv . onward	I πολύ μικρές νεκρωτικές κηλίδες S δεν προκαλεί μόλυνση
<i>Vicia faba</i> cv . the sutton	I μικρές νεκρωτικές κηλίδες S δεν μολύνονται ,ή δίνουν νέκρωση κορυφής ³

I¹ : μηχανικά μολυσμένα φύλλα (τοπικά συμπτώματα)

S² : όχι μηχανικά μολυσμένα φύλλα (διασυστηματικά συμπτώματα)

3 : εμφανίζονται από απομονώσεις που προκαλούν μη τυπικά συμπτώματα

γ) Ξενιστές πολλαπλασιασμού, διατήρησης και διάγνωσης του TRV

Το είδος *Nicotiana glauca* είναι πιθανώς ο καλύτερος ξενιστής για να διατηρηθούν καλλιέργειες του TRV , καθώς και η πηγή για τον καθαρισμό του ιού αυτού . Το είδος *Chenopodium amaranticolor* και τα πρωταρχικά φύλλα του είδους *Phaseolus vulgaris* ,είναι κατάλληλα για δοκιμές διότι αντιδρούν με τοπικές κηλίδες στην μόλυνση με τον ιό TRV , ενώ και τα είδη *Nicotiana glutinosa* και *Nicotiana tabacum* , μπορούν να χρησιμοποιηθούν για πολλαπλασιασμό απομονώσεων του ιού TRV . (Harrison, B.D. and Robinson, D.J. , 1981)

δ) Συμπτωματολογικές διαφορές μεταξύ διαφόρων φυλών του TRV

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

- 1) TRV (φυλή CAM) μολύνει την ποικιλία white burley του καπνού χωρίς να προκαλεί νεκρωτικές τοπικές κηλίδες .
- 2) TRV (φυλή Oregon Yellow) προκαλεί χρυσοκίτρινες δακτυλιωτές κηλιδώσεις και γραμμώσεις (line patterns) σε διάφορα είδη σολανωδών .

3) TRV (φυλή SYM) προκαλεί διασυστηματική παραμόρφωση και νέκρωση στο είδος *Chenopodium amaranticolor* εκτός και αν χρησιμοποιηθεί αραιό μόλυσμα . (Harrison, B.D. and Robinson, D.J. , 1981)

1.8. ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΜΟΛΥΣΜΑΤΟΣ

Οι Μ απομονώσεις μπορούν να συντηρηθούν σε κατεψυγμένα εκχυλίσματα φύλλων , αλλά η μολυσματικότητα μοιάζει να διατηρείται καλύτερα (για τουλάχιστον 10 χρόνια) , σε κατεψυγμένο χυμό αποθηκευμένο στους -20°C .Οι ΝΜ απομονώσεις μπορούν να αποθηκευθούν σαν RNA από μολυσμένους ιστούς, κάτω από αιθανόλη στους -20 °C . (Harrison, B.D. and Robinson, D.J. , 1981)

2. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΙΟΥ TRV

2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Όσον αφορά την αντιμετώπιση του TRV, γίνεται προσπάθεια για την πρόληψη της εμφάνισης νηματωδών φορέων του ιού, στα εδάφη που πρόκειται να εγκατασταθεί καλλιέργεια ευαίσθητη στον ιό. Για την καταπολέμηση των νηματωδών φορέων του ιού χρησιμοποιούνται διάφορα χημικά μέσα (διχλωροπροπάνιο—διχλωροπροπένιο, βρωμιούχο μεθύλιο, oxamyl, κ.α)

Η μέθοδος όμως αυτή δεν ενδείκνυται γιατί, είναι αφ' ενός αρκετά δαπανηρή και καθιστά ασύμφορη οικονομικά την καλλιέργεια του καπνού, και αφ' ετέρου η συνεχής χρήση τέτοιων χημικών μέσων τα οποία είναι αρκετά τοξικά, προκαλεί σοβαρή επιβάρυνση του περιβάλλοντος με όλες τις γνωστές συνέπειες (π.χ μόλυνση υπόγειων υδάτων κ.α). Εξαιτίας λοιπόν των παραπάνω ο πιο αποτελεσματικός και οικονομικός τρόπος για την αντιμετώπιση του TRV, είναι η προσπάθεια για δημιουργία ανθεκτικών ποικιλιών απέναντι στον ιό. Η δημιουργία ανθεκτικών ποικιλιών στηρίζεται α) στην συμβατική γενετική και β) στην γενετική μηχανική.

2.2. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΣΥΜΒΑΤΙΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

Υπάρχουν 4 στάδια για την δημιουργία ανθεκτικών ποικιλιών έναντι των ασθενειών στον καπνό με την χρήση της γενετικής βελτίωσης φυτών, αυτά είναι τα εξής :

- 1) Η απόκτηση πηγής ανθεκτικότητας
- 2) Η μεταφορά της ανθεκτικότητας αυτής στην υπό βελτίωση σειρά
- 3) Η εκτίμηση της ανθεκτικότητας αυτής που εμφανίζει η σειρά ως προς την απόδοση της και την ποιότητα .
- 4) Η εισαγωγή της ανθεκτικής ποικιλίας στη γεωργική πράξη

Επειδή , η εξεύρεση πηγών ανθεκτικότητας στον ιό TRV, τόσο μέσα στο είδος *Nicotiana tabacum* όσο και σε άλλα είδη του ίδιου γένους είναι παρά πολύ δύσκολη , και επιπλέον η μεταφορά της ανθεκτικότητας αυτής στην υπό βελτίωση σειρά , αλλά και η εκτίμηση της ανθεκτικότητας που εμφανίζει η σειρά ως προς την απόδοση και την ποιότητα των προϊόντων της, διαρκεί για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα , η μέθοδος αυτή δημιουργίας ποικιλιών δεν είναι και η πλέον κατάλληλη . Για το λόγο αυτό καταφεύγουμε στην χρήση της μοριακής γενετικής , για τη δημιουργία ανθεκτικών στους ιούς ποικιλιών φυτών .

2.3. ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΣΤΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΠΝΟΥ

2.3.1 ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΦΥΤΑ

Με τον όρο διαγονιδιακά φυτά (transgenic plants), αναφερόμαστε σε φυτά γενετικώς τροποποιημένα , δηλαδή φυτά στα οποία έχει μεταφερθεί κάποιο (ή κάποια) γονίδιο με σκοπό να εκφραστούν σε αυτά κάποια συγκεκριμένα χαρακτηριστικά . Από τη στιγμή που δημιουργήθηκε το πρώτο διαγονιδιακό φυτό έχει συντελεσθεί σημαντική πρόοδος , προς την αξιοποίηση της συγκεκριμένης αυτής

τεχνικής . Η δυνατότητα να μεταφέρονται ξένα γονίδια στο γένωμα των φυτικών κυττάρων ,και η αναγέννηση στην συνέχεια ολόκληρων φυτών από τα κύτταρα αυτά ή από ιστούς , έδωσε την δυνατότητα να κατανοηθούν σε σημαντικό βαθμό οι βιολογικές λειτουργίες των φυτών και την ευκαιρία να τροποποιηθούν και να βελτιωθούν τα καλλιεργούμενα φυτά .(Gasser,C.S , Fraley,R.T , 1989)

Τα κυριότερα πλεονεκτήματα που προσέφερε η μεταφορά των γονιδίων στην γεωργική τεχνολογία , αφορούσαν στην παραγωγή νέων πλέον παραγωγικών ποικιλιών των φυτών , στην παραγωγή σπόρων υβριδίων , καθώς και στην παραγωγή θρεπτικών στοιχείων και στην αντιμετώπιση των παθογόνων των φυτών . Με την χρήση των πρώτων γενετικώς τροποποιημένων φυτών επιτεύχθηκε , αφ'ενός μεν η βελτίωση της αποδοτικότητας της παραγωγής , καθώς και η αύξηση του εύρους των προϊόντων που διατίθεντο στην αγορά , αφ'ετέρου δε δόθηκε η δυνατότητα της προστασίας του περιβάλλοντος με τον περιορισμό χρήσης φυτοφαρμάκων . Η χρήση της γενετικής συνεισφέρει στις προσπάθειες βελτίωσης των φυτών μέσω της αύξησης της ποικιλίας των γονιδίων , που είναι διαθέσιμα για ενσωμάτωση στο γένωμα των καλλιεργούμενων φυτών , καθώς και μέσω της μείωσης του χρονικού διαστήματος που απαιτείται για την παραγωγή νέων ποικιλιών και υβριδίων .

Τα πρώτα διαγονιδιακά φυτά στα οποία ενσωματώθηκαν και εκφράστηκαν ξένα γονίδια ήταν φυτά καπνού , τα οποία είχαν τροποποιηθεί με το βακτήριο *Agrobacterium tumefaciens* . Η τροποποίηση επιβεβαιώθηκε πρώτον , από την παρουσία ξένων αλληλουχιών DNA τόσο στα τροποποιηθέντα φυτά, όσο και στους απογόνους τους και δεύτερον από την ανθεκτικότητα που εμφάνιζαν τα φυτά αυτά στο αντιβιοτικό kanamycin, και η οποία

οφείλονταν στο χιμαιρικό γονίδιο της φωσφοτρανσφεράσης της νεομυκίνης (neomycin phosphotransferase gene) . Στα πρώτα πειράματα δημιουργίας τροποποιημένων φυτών χρησιμοποιούνταν κυρίως πρωτοπλάστες . Η ακόλουθη ανάπτυξη των μεθόδων της τροποποίησης, που βασίστηκε σε έκφυτα, που είχαν την δυνατότητα να αναγεννηθούν όπως φύλλα , βλαστοί και ρίζες συνέβαλε σημαντικά στην πραγματοποίηση εύκολων μεθόδων τροποποίησης , οι οποίες χρησιμοποιούνται σήμερα σε πολλά φυτικά είδη δικότυλων και μονοκότυλων . (Kara, D. ,et al ,1994)

2.3.2 ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΕΠΙΤΥΓΧΑΝΕΤΑΙ ΜΕΣΩ ΤΟΥ *Agrobacterium tumefaciens* (*Agrobacterium mediate gene transfer*)

Η μεταφορά γονιδίων που επιτυγχάνεται μέσω του *A. tumefaciens*, εκμεταλλεύεται την φυσική ικανότητα του βακτηρίου αυτού , να μεταφέρει DNA αλληλουχίες στα χρωμοσώματα των φυτών . Το *A. tumefaciens* είναι φυτοπαθογόνο βακτήριο, το οποίο προκαλεί την ασθένεια του " καρκίνου " (crown gall) , στα ανώτερα φυτά . Η ασθένεια εμφανίζεται όταν μια πληγή στο βλαστό του φυτού, επιτρέπει στο βακτήριο να εισχωρήσει σε αυτό. Αμέσως μετά την μόλυνση το βακτήριο προκαλεί ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων στους ιστούς του βλαστού ,και συγκεκριμένα στην περιοχή του λαιμού , στην βάση του φυτού . Εφόσον ξεκινήσει η ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων, μπορεί να συνεχιστεί χωρίς να είναι παρών το βακτήριο , άρα είναι δυνατή η ανάπτυξη των κυττάρων σε υλικό που χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια ιστών

υπό συνθήκες "in vitro". Τα καρκινικά κύτταρα παράγουν ένα μείγμα ουσιών τις οπίνες, οι οποίες είναι ασυνήθεις μεταβολίτες, παράγωγα αμινοξέων και χρησιμοποιούνται ως πηγές ενέργειας για αυτά. Το είδος των οπινών που παράγει μια ομάδα καρκινικών κυττάρων εξαρτάται από τον βióτυπο του βακτηρίου που την προκάλεσε. Οι πιο συνηθισμένοι τύποι οπινών είναι η οκτοπίνη και η νοπαλίνη. (Παναγόπουλος, Χ.Γ., 1993)

Η δημιουργία καρκινικών κυττάρων καθώς και η σύνθεση των οπινών, είναι συνδεδεμένες με την ύπαρξη ενός πλασμιδίου παραγωγής καρκινικών κυττάρων (Tumour inducing plasmid, Ti plasmid), το οποίο φέρει το *A. tumefaciens*. Αυτό είναι ένα μεγάλο πλασμίδιο (μεγαλύτερο από 200kb), το οποίο περιέχει γονίδια που εμπλέκονται στην διαδικασία της μόλυνσης. Αμέσως μετά την μόλυνση του φυτικού κύτταρου, μέρος του πλασμιδίου το οποίο καλείται T-DNA, ενσωματώνεται στο χρωμοσωμικό DNA του φυτού. Το T-DNA είναι σταθερό μέσα στο γένωμα του φυτού και μεταδίδεται στους απογόνους του χωρίς σημαντικές μεταβολές της ακολουθίας του DNA. Σε κάθε φυτικό κύτταρο θα υπάρχουν ένα ή περισσότερα αντίγραφα, ενώ όσον αφορά το σημείο της εισαγωγής της αλληλουχίας του DNA στο γένωμα του φυτού, αυτή είναι προφανώς τυχαία. Η δυνατότητα του βακτηρίου να προκαλεί ασθένεια του καρκίνου των φυτών μπορεί να αφαιρεθεί με την εξάλειψη των κατάλληλων γονιδίων στο T-DNA, χωρίς να χαθεί η ικανότητα της μεταφοράς και ενσωμάτωσης του DNA. Έχει δημιουργηθεί δηλαδή ένα στέλεχος του βακτηρίου που δεν προκαλεί ασθένεια και το οποίο ονομάζεται μη ογκογόνο (disarmed). Στο Ti-πλασμίδιο αυτού του στελέχους, έχουν προσκολληθεί στα άκρα του T-DNA, αλληλουχίες περιορισμού που να επιτρέπουν την κατά

βούληση αφαίρεση μιας ζώνης από το T-DNA . Επίσης το Ti - πλασμίδιο συνδέεται με ένα γονίδιο που προσφέρει ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό όπως η kanamycin, η οποία παρεμποδίζει την ανάπτυξη του φυτού . Αυτό γίνεται για να είναι δυνατή η επιλογή , αναγνώριση και ανάπτυξη των μεταμορφωμένων κυττάρων , αφού μόνο αυτά τα κύτταρα επιβιώνουν , διαιρούνται και αναπτύσσονται υπό την παρουσία του αντιβιοτικού , καθόσον είναι εκείνα που περιέχουν το κατασκευασμένο T-DNA . Αφού λοιπόν όλα τα γονίδια που περιέχονται στο T-DNA μεταφέρονται κατά την μεταμόρφωση των κυττάρων , τα κύτταρα που είναι ανθεκτικά στο αντιβιοτικό πρέπει να περιέχουν και οποιαδήποτε άλλο γονίδιο που έχουμε παρεμβάλει στο T-DNA.

Ένα από τα προβλήματα που προκύπτουν από το χειρισμό του Ti- πλασμιδίου του *A. tumefaciens*, είναι το μέγεθος του . Εφόσον το πλασμίδιο είναι μεγαλύτερο από 200 kb είναι, ουσιαστικά αδύνατον να βρεθούν μοναδικές θέσεις περιορισμού, όπου θα μπορεί να κοπεί το T-DNA για να παρεμβληθεί το επιθυμητό γονίδιο. Το πρόβλημα αυτό μπορεί να ξεπερασθεί με έναν από τους παρακάτω τρόπους :

α) Χρησιμοποιώντας έναν δίδυμο φορέα

Δίδυμοι φορείς, που είναι ικανοί να ανταλλάσσουν μεταξύ τους πλασμίδια είναι οι, *E.coli* και το *Agrobacterium* . Το σύστημα περιλαμβάνει δυο συμβατά πλασμίδια , ένα από τα οποία έχει μια μειωμένη ή διεγραμμένη ζώνη στο T-DNA , αλλά μια άθικτη ' vir ' ζώνη (Ti- πλασμίδιο στο *Agrobacterium tumefaciens*) και το άλλο , το οποίο έχει μια μετασκευασμένη T-DNA ακολουθία , αλλά όχι "vir" ζώνη . Η μετασκευασμένη αυτή αλληλουχία του T-DNA περιέχει μοναδικές θέσεις περιορισμού (polylinker) , όπου μπορούμε

να κόψουμε το T-DNA και να παρεμβάλουμε το επιθυμητό γονίδιο που θέλουμε να μεταφέραμε στο φυτικό κύτταρο . Το πλασμίδιο που περιέχει τις αλληλουχίες του T-DNA βρίσκεται στην *E. Coli*, όπου γίνονται όλες οι παρεμβάσεις και μπορεί να μεταφερθεί δια μέσω συζυγίας στο *Agrobacterium* , το οποίο περιέχει το κατασκευασμένο Ti-πλασμίδιο που φέρει μόνο τη "vir" ζώνη .Οι μετασχηματισμένες αλληλουχίες του T-DNA θα μεταφερθούν στα κύτταρα του φυτού με την ενέργεια μεταφοράς του Ti-πλασμιδίου που περιέχει την "vir" ζώνη. (Kara, D. ,et al ,1994)

β) Χρησιμοποιώντας ένα ολοκληρωμένο σύστημα .

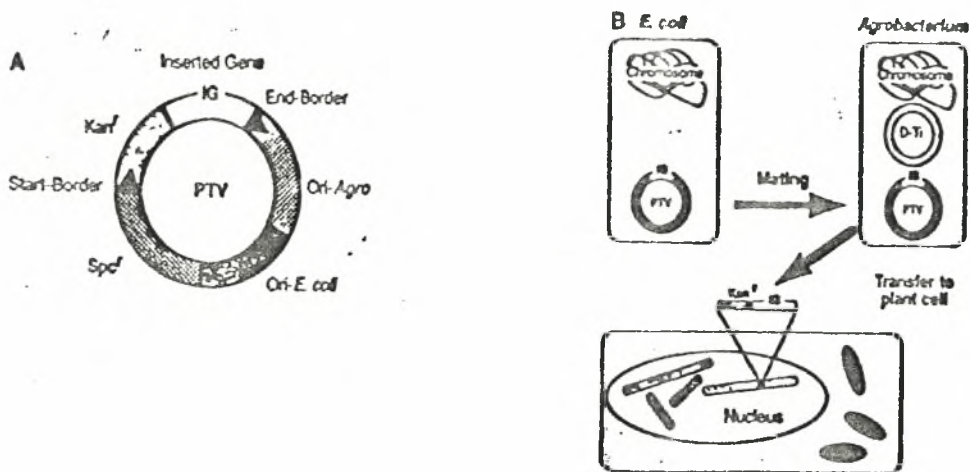
Το σύστημα αυτό εξαρτάται από την ολοκλήρωση στο *Agrobacterium* , του τροποποιημένου Ti-πλασμιδίου ('vir' ζώνη) και ενός μικρού πλασμιδίου για κλωνοποίηση γονιδίων, στο φορέα *E. Coli* , με τη βοήθεια ενός άλλου επιλεγμένου πλασμιδίου της *E. Coli* . Η επιλογή του συστήματος φορέων εξαρτάται από πολλούς παράγοντες και κανείς από τους φορείς αυτούς δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για όλες τις καταστάσεις . Παρ'όλα αυτά ο πιο συνηθισμένος τρόπος είναι ο πρώτος . (Kara, D. ,et al ,1994)

Μια σχηματική παράσταση της μεταφοράς γονιδίων σε φυτά , μέσω του *Agrobacterium* , φαίνεται στην εικόνα 2.1

Η μεταφορά γονιδίων μέσω τροποποιημένων στελεχών του *Agrobacterium* έχει γίνει ρουτίνα για φυτά όπως, ο καπνός , τομάτα , πετούνια σε πολλά εργαστήρια . Διεύρυνση των πειραματικών εργασιών σε άλλα ίσως και περισσότερο σημαντικά από οικονομική άποψη λαχανοκομικά φυτά ήταν πολύ δύσκολη , όμως έχει γίνει κάποια πρόοδος ειδικά σε ορισμένες οικογένειες

δικοτυλήδονων . Όσον αφορά τα μονοκοτυλήδονα, παρ'όλο που στην αρχή υπήρξαν προβλήματα στη μόλυνση μέσω του *Agrobacterium* , ωστόσο πρόσφατα το πρόβλημα ξεπεράστηκε και ήδη έχουν παραχθεί διαγονιδιακά φυτά καλαμποκιού , με το σύστημα του *Agrobacterium* .

Στα χρόνια στα οποία η μέθοδος αυτή είναι γνωστή για την παρασκευή διαγονιδιακών φυτών, έχει επιτευχθεί σημαντική πρόοδος όσον αφορά την μεταφορά χρήσιμων στη γεωργία γονιδίων . Στα γονίδια αυτά περιλαμβάνονται και κάποια που προσφέρουν στα φυτά ανθεκτικότητα σε έντομα , ασθένειες , η ακόμα σε κάποια ζιζανιοκτόνα . Μέχρι σήμερα είναι γνωστό ότι χημικές μέθοδοι προστασίας ή καταπολέμησης των ιολογικών μολύνσεων ήταν ανεπιτυχείς , με αποτέλεσμα η γενετική τροποποίηση των φυτών με κατάλληλα γονίδια να θεωρείται σημαντικό εργαλείο για την αντιμετώπιση τους . (Goodman, R.M. , et al , 1987)



Εικόνα 2.1 (Α) Γενικευμένη μορφή ενός φορέα γενετικής τροποποίησης φυτών (PTV). Το πλασμιδίο περιέχει ένα γονίδιο που του επιτρέπει να αντιγράφεται στο *Agrobacterium* (Ori-Agro) και έναν υψηλό αριθμό αντιγράφων ενός γονιδίου για την αντιγραφή του στο βακτήριο *Escherichia coli* (Ori- *E. coli*). Με τον τρόπο αυτό γίνεται εφικτό να δημιουργηθούν και να ελεγχθούν τα τροποποιημένα πλασμιδία στο *E. coli*, πριν μεταφερθούν στο *Agrobacterium* και στη συνέχεια στα φυτά. Μαζί με τα παραπάνω γονίδια, στο πλασμιδίο υπάρχουν συνήθως και δύο γονίδια ανθεκτικότητας, ένα για να υπάρχει επιλογή στα βακτήρια, στην περίπτωση αυτή το γονίδιο για ανθεκτικότητα στη Spectinomycin (Spc^r) και ένα για να υπάρχει επιλογή στα φυτά. Στο παράδειγμα αυτό είναι το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην Kanamycin (Kan^r). Παρούσες είναι επίσης και θέσεις υποδοχής για κάποιο (ή κάποια) γονίδια (IG) καθώς και για τις οριακές αλληλουχίες του T-DNA οι οποίες καθορίζουν τα όρια της περιοχής του πλασμιδίου που θα μεταφερθεί στο φυτό. Για να μεταφερθεί το T-DNA στο φυτό, είναι φυσικά απαραίτητο, οι οριακές αλληλουχίες του, να αναγνωριστούν από τους μηχανισμούς μεταφοράς του *Agrobacterium*. (Β) Διάγραμμα της διαδικασίας τροποποίησης των φυτικών κυττάρων. Ο PTV που κατασκευάστηκε στο *E. coli* μεταφέρεται σε μία τροποποιημένη φυλή του *Agrobacterium*, από την οποία έχουν αφαιρεθεί τα γονίδια της παθογένειας (αφοπλισμένο Ti πλασμιδίο, D-Ti). Οι μηχανισμοί της μολυσματικότητας στο D-Ti του *Agrobacterium* επιδρούν, στις οριακές αλληλουχίες του PTV κατευθύνοντας την περιοχή εντός αυτών, των οριακών αλληλουχιών δηλαδή, στο φυτικό κύτταρο, ενσωματώνοντας την σε ένα από τα χρωμοσώματα στον πυρήνα του κυττάρου. Η επιλογή των τροποποιημένων φυτικών κυττάρων, γίνεται μέσω του γονιδίου ανθεκτικότητας στην Kanamycin κατά τη διάρκεια της αναγέννησης των φυτών.

2.3.3 ΑΛΛΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Μόλυνση ολόκληρων φυτών με Agrobacterium (Agroinfection)

Με την μέθοδο αυτή , μια αλληλουχία cDNA ενός ιού, ενσωματώνεται στο T-DNA ενός πλασμιδίου, που προκαλεί καρκινικούς όγκους , σύμφωνα με την διαδικασία που περιγράφηκε προηγουμένως για το *Agrobacterium* . Όταν το T-DNA εισέλθει και ενσωματωθεί στα μολυνθέντα κύτταρα του φυτού , το ενσωματωμένο γονίδιο του ιού, αντιγράφεται και μεταφέρεται διασυστηματικά στα διπλανά κύτταρα που δεν έχουν μολυνθεί . Συνεπώς μέσω της μόλυνσης με το *Agrobacterium* , μπορεί να μεταφερθεί ένα γονίδιο του ιού και να παραχθούν διαγονιδιακά φυτά , τα οποία θα περιέχουν το επιθυμητό γονίδιο του ιού όχι μόνο στα προσβεβλημένα , αλλά και σε γειτονικά κύτταρα .

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για να τροποποιηθούν δημητριακά , διότι θεωρείται πως θα ήταν δυνατό να ξεπεράσουν προβλήματα, που υπήρχαν στην τροποποίηση μονοκότυλων φυτών μέσω του *Agrobacterium tumefaciens* . Όμως και η μέθοδος αυτή εμφανίζει προβλήματα , αφού το cDNA του ιού δεν ενσωματώνεται στο γένωμα των φυτικών κυττάρων . Ακόμα όμως και αν ενσωματωθεί δεν θα είχε καμιά συνέπεια , αφού τα γειτονικά κύτταρα των προσβεβλημένων από το ογκογόνο στέλεχος του *A. tumefaciens* καταστρέφονται . Συνεπώς η μέθοδος αυτή δεν εμφανίζει περισσότερες πιθανότητες να παράγει διαγονιδιακά φυτά , σε σχέση με την τροποποίηση μεμονωμένων κυττάρων , μέσω του μη

παθογόνου στελέχους του *Agrobacterium tumefaciens*. Ωστόσο μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη μελέτη της βιολογίας των ιών, μέσω της μεταφοράς καταστροφικών μεταλλαγμένων γονιδίων, η απλών γονιδίων τους. (Portykus, I., 1991)

Χρήση ιών - φορέων (viral – vectors)

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

Με την ανακάλυψη των RNA ιών, οι οποίοι μπορούν μέσω της αντίστροφης αντιγραφής, να μετατραπούν σε κλώνους συμπληρωματικού DNA (cDNA), ανοίχθηκαν νέοι δρόμοι στην τροποποίηση φυτών μέσω των RNA ιών. Όμως το γεγονός ότι οι DNA ιοί, δεν ενσωματώνονται στο γένωμα των φυτών που προσβάλλουν, ενώ δεν εμφανίζονται και στα μεριστώματα και στους απογόνους τους, καθιστά δύσκολο να φανταστεί κανείς πως οι ιοί-φορείς μπορούν να δώσουν διαγονιδιακά φυτά. (Portykus, I., 1991)

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

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

Δυστυχώς η μέθοδος αυτή παρουσιάζει σημαντικά προβλήματα, που αφορούν την αναγέννηση φυτών από τους πρωτοπλάστες.

Παρ'όλο που έχει πραγματοποιηθεί σημαντική πρόοδος , με μεγάλες δυνατότητες εξέλιξης, μια και θεωρείται από τις πιο ευαίσθητες διαδικασίες , η αναγέννηση φυτών από πρωτοπλάστες εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από παραμέτρους που δεν ελέγχονται πειραματικά . Πρέπει όμως να σημειωθεί , πως έχουν αναγεννηθεί πρόσφατα διαγονιδιακά φυτά από πρωτοπλάστες, τα οποία δεν μπορούσαν να τροποποιηθούν μέσω του *Agrobacterium* . (Portykus, I . , 1991)

Όπλο εκτόξευσης DNA (*Particle gun of biolistics*)

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

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

Η μεγάλη επένδυση που έχει γίνει στη μέθοδο αυτή έχει αποδώσει , αφού έχει γίνει κατορθωτό να αναγεννηθούν φυτά που

δεν ήταν δυνατόν να παραχθούν από άλλες μεθόδους . Είναι χαρακτηριστικό ότι τα πρώτα διαγονιδιακά φυτά σόγιας, παρήχθησαν μέσω της μεταφοράς γονιδίων με φορέα το *Agrobacterium* , και μέσω της χρήσης του όπλου εκτόξευσης DNA . Επίσης μέσω του όπλου εκτόξευσης , έγινε δυνατή η αναγέννηση γόνιμων διαγονιδιακών φυτών αραβοσίτου σε πάρα πολλά εργαστήρια . Παρ'ολη όμως την επιτυχία της μεθόδου αυτής στην επίτευξη διαγονιδιακών φυτών αραβοσίτου , ένα σημαντικό ερώτημα παραμένει . Γιατί η τεχνική αυτή , παρ'ολα τα πλεονεκτήματα της , εμφανίζεται μάλλον αναποτελεσματική για την σταθερή ενσωμάτωση των γονιδίων στα φυτικά κύτταρα ; (Portykus, I . , 1991)

Μικροένεση (Microinjection)

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

περισσότερη ικανότητα και οργάνωση. Εμφανίζει όμως και πλεονεκτήματα, τα κυριότερα εκ των οποίων είναι:

- 1) Η βελτιστοποίηση της ποσότητας του DNA που φτάνει στο κύτταρο που τροποποιείται.
- 2) Η επιλογή του κυττάρου στο οποίο θα αποδοθεί το DNA.
- 3) Η ακριβής και προβλέψιμη, ακόμα και μέσα στον πυρήνα του κυττάρου, απόδοση του DNA, μάλιστα κάτω από οπτικό έλεγχο.
- 4) Η τροποποίηση κυττάρων μικρών κατασκευών (μικροσπόρια) τα οποία δεν υπάρχουν σε μεγάλες ποσότητες ώστε να χρησιμοποιηθεί το όπλο εκτόξευσης.

Τέσσερις από τις μεθόδους που αναφέρθηκαν παραπάνω, έχουν δώσει διαγονιδιακά φυτά (μεταφορά γονιδίων μέσω του *Agrobacterium tumefaciens*, απευθείας μεταφορά γονιδίων σε πρωτοπλάστες, όπλο εκτόξευσης και μικροένεση), ενώ δυο δεν έχουν δώσει (μόλυνση με *Agrobacterium* και χρήση ιών-φορέων). Βασικό στοιχείο, στην τροποποίηση, αποτελεί το ξεπέραςμα του κυτταρικού τοιχώματος που αποτελεί και βασικό στόχο κάποιων άλλων μεθόδων, οι οποίες δεν έχουν δώσει μέχρι σήμερα επιτυχή αποτελέσματα. (Portykus, I., 1991)

Επώαση αποξηραμένων σπόρων η εμβρύων σε DNA (incubation in DNA of dry seeds or embryos)

Η μέθοδος αυτή αφορά την επώαση αποξηραμένων σπόρων και εμβρύων , κυρίως δημητριακών και όσπριων , μαζί με DNA ιού η άλλου μικροοργανισμού . Παρ'όλες τις ιδιαίτερα ενθαρρυντικές προβλέψεις , δεν έχει δώσει πρακτικά αποτελέσματα στην τροποποίηση φυτικών κυττάρων . (Portykus, I. , 1991)

Επώαση διογκωμένων ιστών η κυττάρων σε DNA (incubation in DNA turgescent cells)

Με τη μέθοδο αυτή , σπορόφυτα , φυτικά όργανα , έκφυτα ιστών, κυτταροκαλιέργειες και κύτταρα έρχονται σε επαφή με το DNA και με καθορισμένα γονίδια - δείκτες , χωρίς όμως να καταφέρει το DNA να διαπεράσει το κυτταρικό τοίχωμα , με συνέπεια να μην υπάρχει περίπτωση τροποποίησης . (Portykus, I. , 1991)

Τροποποίηση γύρης (Pollen transformation)

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην προσπάθεια απορρόφησης του DNA από τη βλαστανούσα γύρη , με σκοπό να ενσωματωθεί στο σπερματικό πυρήνα ή μέσω του γυρεοσωλήνα να φτάσει στο ζυγωτό κύτταρο . (Portykus, I. , 1991)

Μακροένεση (Macroinjection)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί βελόνες , με διάμετρο μεγαλύτερη από αυτή του κυττάρου . Στην περίπτωση όμως αυτή , τα κύτταρα στόχοι συνήθως καταστρέφονται . Συνεπώς το DNA πρέπει να μεταφερθεί σε γειτονικά κύτταρα , ώστε να ενσωματωθεί , πράγμα που ήταν ακατόρθωτο μέχρι σήμερα . (Portykus, I . , 1991)

Ηλεκτροπόρωση (Electroporation)

Αφορά , την τοποθέτηση ενός αγωγού μικρής ποσότητας ρεύματος σε κάποιο πληθυσμό κυττάρων , με σκοπό την δημιουργία παροδικών ανοιγμάτων στην πρωτοπλασματική μεμβράνη . Με τον τρόπο αυτό , διευκολύνεται η είσοδος του DNA το οποίο πρέπει να βρίσκεται σε άμεση επαφή με την μεμβράνη . Το σύστημα αυτό χρησιμοποιείται ήδη για τροποποίηση πρωτοπλαστών, χωρίς όμως επιτυχία στην τροποποίηση κυττάρων με κυτταρικό τοίχωμα . (Portykus, I . , 1991)

Ηλεκτροφόρηση (Electrophoresis)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την μεταφορά γονιδίων μέσα σε κύτταρα με τη βοήθεια ηλεκτρικού ρεύματος , χωρίς όμως επιτυχία , μάλλον λόγω του κυτταρικού τοιχώματος . (Portykus, I . , 1991)

Μικρολείζερ (Microlaser)

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

2.3.4 ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ

2.3.4.1 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ (Pathogen - derived - resistance , PDR)

Μετασηματισμός των φυτών με τμήματα του γενώματος των ιών , δίνει συχνά σειρές φυτών, τα οποία παρουσιάζουν έναν βαθμό ανθεκτικότητας εναντίον του ιού από τον οποίο η αλληλουχία προέρχεται . Το φαινόμενο αυτό έχει χαρακτηριστεί ανθεκτικότητα που προέρχεται μέσω του παθογόνου . Η μέθοδος αυτή έχει εφαρμοστεί επιτυχώς για αρκετούς ιούς . Η πλειοψηφία των ιών εναντίον των οποίων η μέθοδος έχει επιτυχώς εφαρμοστεί , έχουν γένωμα που αποτελείται από θετική αλυσίδα RNA . Στους ιούς αυτούς περιλαμβάνονται μέλη από τις ομάδες tobamo- , cucumo- , potex- , poty- , luteo- , carla- , ilar- , tobra- , nepo- και

alfalfa mosaic virus , ενώ τελευταία η ιδέα αυτή έχει εφαρμοσθεί σε RNA ιούς της ομάδας των tospovirus . Υπάρχει επίσης μια πρόσφατη αναφορά από επιτυχή εφαρμογή της μεθόδου αυτής , σε μέλος των gemini virus με απλή αλυσίδα DNA . (Lomonossoff, G. P. , 1995)

Ανάλογα με την αλληλουχία του γενώματος του ιού που χρησιμοποιούμε για να δημιουργήσουμε ανθεκτικά στους ιούς φυτά , διακρίνουμε διάφορους επιμέρους τύπους ανθεκτικότητας όπως οι παρακάτω :

Ανθεκτικότητα που επιτυγχάνεται μέσω της καψιδιακής πρωτεΐνης του ιού (coat - protein mediated resistance)

Από το 1986 η έρευνα έχει δείξει ότι , φυτά που εκφράζουν το γονίδιο της καψιδιακής πρωτεΐνης ενός φυτικού ιού , εμφανίζουν βαθμούς αντίστασης η προστασίας , όταν εμβολιάζονται με τον ιό αυτό ή απομονώσεις αυτού με στενή συγγένεια . Το φαινόμενο αυτό καλείται ανθεκτικότητα που επιτυγχάνεται μέσω της καψιδιακής πρωτεΐνης και έδωσε το έναυσμα σε προσπάθειες να αναπτυχθούν διαγονιδιακά φυτά , ανθεκτικά σε μολύνσεις έναντι ορισμένων φυτικών ιών . Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση του ιού του μωσαϊκού του καπνού (tobacco mosaic virus ,TMV) , όπου η έκφραση της καψιδιακής πρωτεΐνης του ιού καθυστέρησε την ανάπτυξη της ιολογικής ασθένειας . Πρέπει να σημειωθεί πως από την στιγμή που έγινε γνωστή η εμφάνιση προστασίας μέσω της καψιδιακής πρωτεΐνης για τον TMV , παρόμοια εμφάνιση ανθεκτικότητας δημοσιεύθηκε και για τουλάχιστον 20 ακόμα

φυτικούς ιούς .(Gonsalves, D. and Slightom, J. L., 1993 / Neijdat, A. , et al , 1990)

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

Η προστασία που αποδίδεται στην καψιδιακή πρωτεΐνη αναπτύχθηκε, πριν γίνει γνωστός και κατανοητός ο τρόπος λειτουργίας του μηχανισμού αυτού . Η παρεμπόδιση του ιού συμβαίνει σε πρωταρχικό στάδιο της μόλυνσης , το οποίο πιθανώς να είναι το αρχικό στάδιο της αποκάλυψης του γενώματος του ιού . Υπάρχουν δύο δυνατές εξηγήσεις για την παραπάνω εκτίμηση .α) Η πρώτη , υποστηρίζει ότι υπάρχουν θέσεις υποδοχής για να λάβει χώρα η αποκάλυψη του ιού , οι οποίες θέσεις καταλαμβάνονται από την καψιδιακή πρωτεΐνη , με αποτέλεσμα να υπάρχει παρεμπόδιση της δράσης τους . β) Η δεύτερη προτείνει πως η εκφρασμένη καψιδιακή πρωτεΐνη αλλοιώνει την ισορροπία μεταξύ των σωματιδίων του ιού , που αποκαλύπτονται για να δώσουν μόρια πρωτεΐνης και νουκλειικών οξέων , και των μορίων νουκλειικού οξέως , που επικαλύπτονται για την παραγωγή σωματιδίων του ιού . Ωστόσο είναι πιθανό μια ποσότητα του ιού να αποκαλυφθεί η ακόμα και να πολλαπλασιασθεί . (Lomonossoff, G. P. , 1995)

Η προστασία που προσφέρει η καψιδιακή πρωτεΐνη , φυσικά δεν είναι ολοκληρωτική και βασικά έχει 3 επιδράσεις . α) Μειώνει τον

αριθμό των θέσεων επί του μολυσμένου φύλλου , στις οποίες αναπτύσσονται μολύνσεις , όπως αυτό εκτιμάται από μείωση του αριθμού των κηλίδων , οι οποίες εμφανίζονται πάνω στα μολυσμένα φύλλα κατόπιν μηχανικής μόλυνσης . Μολύνσεις μέσω φυτικών φορέων όπως έντομα , νηματώδεις, σε διαγονιδιακά φυτά δεν έχουν μελετηθεί εκτεταμένα , με αποτέλεσμα να μην μπορούν να πραγματοποιηθούν γενικεύσεις πάνω στα αποτελέσματα της έκφρασης των πρωτεϊνών των καψιδίων των ιών , σε φυσικώς μολυσμένες θέσεις . Για παράδειγμα , σε ένα πείραμα με μια σειρά διαγονιδιακών φυτών καπνού Samsun NN , που εξέφραζαν την πρωτεΐνη του καψιδίου του ιού TRV και η οποία ήταν ανθεκτική στην μηχανική μόλυνση με τον ιό , εμφάνιζε διαφορετική συμπεριφορά στην μόλυνση μέσω νηματωδών , δηλαδή δεν ήταν ανθεκτική . Το παραπάνω αποδεικνύει την σπουδαιότητα του ελέγχου της ανθεκτικότητας που προσδίδει η πρωτεΐνη του καψιδίου του ιού , σε φυσικώς μολυσμένα διαγονιδιακά φυτά . (Ploeg , A.T. , et al , 1993)

β) Η μορφή αυτή της προστασίας έχει ποικίλες επιδράσεις στην έκταση της διασυστηματικής μόλυνσης , διαβαθμιζόμενη από πλήρη προστασία σε μια τέτοια προσβολή έως την επιβράδυνση της εμφάνισής της . Υπάρχει βέβαια, διαφοροποίηση στη διασυστηματική προσβολή από φυτό σε φυτό ακόμα και μέσα σε μια ομάδα μιας σειράς διαγονιδιακών φυτών .

γ) Στα διασυστηματικά μολυσμένα διαγονιδιακά φυτά , η ποσότητα του ιού που εντοπίζεται είναι αισθητά μειωμένη .

Η ανθεκτικότητα που αποδίδεται στην καψιδιακή πρωτεΐνη , λειτουργεί μέχρι μιας συγκεκριμένης ποσότητας μολύσματος η οποία εξαρτάται από τον ιό , και η οποία ανθεκτικότητα μπορεί να

ξεπεραστεί με μεγαλύτερες ποσότητες μολύσματος . Για παράδειγμα για τον ιό TMV (1μg / ml ιού) ενώ για τον ιό CMV (25-50 μg /ml ιού) . Ακόμη διαφορετικά κατασκευάσματα από την ίδια καψιδιακή πρωτεΐνη , μπορούν να δώσουν διαφορετικά επίπεδα προστασίας . (Lomonossoff, G. P. , 1995)

Η ανθεκτικότητα , που επιτυγχάνεται μέσω της καψιδιακής πρωτεΐνης στην προστασία των φυτών εναντίον του ιού , είναι επίσης ευμετάβλητη . Για παράδειγμα , διαγονιδιακά φυτά εκφράζοντα την καψιδιακή πρωτεΐνη του ιού TMV, δεν ανθίστανται σε μολύνσεις με το RNA του ιού . Το ίδιο ισχύει με τον ιό TRV που είναι και το αντικείμενο και της εργασίας αυτής. Σε αντίθεση με αυτούς τους ιούς, υπάρχουν διαγονιδιακά φυτά εκφράζοντα την καψιδιακή πρωτεΐνη ιών όπως , PVX και PVS , αλλά και άλλων τα οποία είναι εξίσου ανθεκτικά σε μολύνσεις με το αντίστοιχο RNA των ιών αυτών . Επίσης το μέγεθος της προστασίας από ιολογικές μολύνσεις , εξαρτάται από την συγγένεια της καψιδιακής πρωτεΐνης του ιού που προκαλεί την ασθένεια , με αυτή του προστατευόμενου ιού . Για παράδειγμα, διαγονιδιακά φυτά καπνού που εξέφραζαν τον γόνο της καψιδιακής πρωτεΐνης του ιού TRV των φυλών , PLB και TCM , τα οποία έδειχναν ανθεκτικότητα έναντι της ομόλογης φυλής , αλλά ήταν ευαίσθητα στην προσβολή με ετερόλογες φυλές . Σύμφωνα με αυτά ,για να υπάρχει προστασία θα πρέπει να υπάρχει υψηλό ποσοστό ομολογίας , μεταξύ της καψιδιακής πρωτεΐνης του ιού ,που εκφράζεται από το φυτό και εκείνης των φυλών που το προσβάλλουν .Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η ομολογία μεταξύ των καψιδιακών πρωτεϊνών των διαφόρων φυλών του TRV είναι περίπου 39% , γι'αυτό και δεν παρουσιάζεται

ανθεκτικότητα όταν το φυτό εκφράζει, πχ την καψιδιακή πρωτεΐνη της φυλής PLB έναντι της φυλής TCM και αντιστρόφως.

Η μέθοδος αυτή έχει όπως είδαμε και προηγουμένως, εφαρμοστεί και για τον ιό TRV σε φυτά καπνού, αλλά όπως έχει αποδειχθεί είναι χωρίς αξία για την αντιμετώπιση του ιού. Αυτό οφείλεται στο εξής γεγονός: Τα φυτά που εκφράζουν το γονίδιο της καψιδιακής πρωτεΐνης μιας φυλής του ιού, είναι ανθεκτικά μόνο σ'αυτή τη φυλή και στις πολύ συγγενικές μ'αυτή, ενώ δεν δείχνουν ανθεκτικότητα στις ετερόλογες φυλές του ιού. Αλλά και στο ότι διαγονιδιακά φυτά εκφράζοντα το γονίδιο της καψιδιακής πρωτεΐνης του ιού και ήταν ανθεκτικά σε μηχανικές μολύνσεις, αποδείχθηκαν ευαίσθητα στην μόλυνση μέσω νηματωδών - φορέων του ιού που είναι και ο κύριος τρόπος φυσικής μετάδοσης του ιού στο αγρό. (Lomonossoff, G. P., 1995 / Gonsalves, D. and Slightom, J. L., 1993 / Ploeg, A.T., et al, 1993 / Angement, C.G., et al, 1990)

Ανθεκτικότητα που επιτυγχάνεται μέσω δορυφορικού RNA (satellite RNA – mediated resistance)

Οι δορυφόροι των ιών, είναι μικρές αλληλουχίες RNA, οι οποίες βασίζονται στο μητρικό μόριο του ιού για να αναπαραχθούν. Μερικά δορυφορικά RNA, ελαττώνουν την ένταση των συμπτωμάτων και την αναπαραγωγή των ιών, άλλα αυξάνουν την ένταση των συμπτωμάτων και άλλα δεν έχουν καμία επίδραση. Διαγονιδιακά φυτά καπνού τροποποιημένα με αντίγραφα DNA, δορυφόρου RNA ήπιων φυλών του ιού CMV, εμφάνισαν μείωση της έντασης των συμπτωμάτων που προκαλεί ο ιός. Παρόμοια αντίδραση εμφανίστηκε και σε άλλους ιούς, μεταξύ των οποίων

και ο tomato aspermy virus (TAV) , χωρίς όμως να υπάρχει η δυνατότητα πλήρους επεξήγησης των αποτελεσμάτων . Είναι ωστόσο δυνατόν , να υφίσταται παρεμπόδιση , μέσω του δορυφορικού RNA , ο πολλαπλασιασμός του ιού και η συσσώρευση του , χωρίς να παρεμποδίζεται η αντιγραφή του ιού , ώστε να μειωθεί η παραγωγή συμπτωμάτων .

Η στρατηγική της χρησιμοποίησης του δορυφορικού RNA είναι περιορισμένη , λόγω του γεγονότος ότι ελάχιστοι ιοί εμφανίζουν τέτοιας μορφής RNA , ενώ υπάρχει και η πιθανότητα κάποιοι συνδυασμοί δορυφορικού RNA - ιού, να αποδώσουν περισσότερο έντονα συμπτώματα με καταστροφικά αποτελέσματα σε αλλά είδη φυτών . Αυτό μπορεί να συμβεί σε διαγονιδιακά φυτά, τα οποία όμως προσβάλλονται από διαφορετικό ιό σε σχέση με τον δορυφόρο ή σε φυτά που λειτουργούν σαν πηγές παραγωγής δορυφορικού RNA το οποίο εν συνεχεία μπορεί να μεταφερθεί σε αλλά φυτά . Επίσης είναι δυνατόν, να προκύψουν μεταλλάξεις στα δορυφορικά RNA , οι οποίες πιθανόν να εμφανίζουν θανατηφόρα αποτελέσματα στα φυτά αφού η διαφορά μεταξύ, ήπιας και δριμείας μορφής δορυφορικού RNA έγκειται σε ένα - δυο νουκλεοτίδια .

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

Φυσικά οι τεχνικές των δορυφορικών RNA , καθώς και οι άλλες, οι οποίες βασίζονται στην αντίστροφη αντιγραφή των νουκλεϊκών οξέων , συνεχώς επεξεργάζονται και βελτιώνονται . Άλλα μόρια τα οποία πιθανώς να εμπλέκονται με την αντιγραφή , είναι τα τεχνητά δορυφορικά RNA , κάποια τμήματα γονιδίων υπεύθυνα για την αντιγραφή ή και τα αποκαλούμενα ελλιπή εμπλεκόμενα μόρια . (Yie, Y., Tien, P., 1993)

Ανθεκτικότητα που επιτυγχάνεται μέσω ελλιπών μορίων νουκλεϊκού οξέως (Defective interfering molecules ,Dis , mediated resistance)

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

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

Μια διαφορετική προσέγγιση , από εκείνη της αναζήτησης φυσικών "Dis" , αποτελεί η δημιουργία τους με μεταλλάξεις γονιδίων, που εμπλέκονται στην αντιγραφή του ιού . Πειράματα που έγιναν με

τον ιό brome mosaic bromovirus (BMV), έδειξαν πως μεταλλαγμένες μορφές RNA του ιού, μείωσαν ή ελαχιστοποίησαν την αντιγραφή των αλληλουχιών του RNA , που ήταν υπεύθυνες για την αντιγραφή του ιού . Αυτή λοιπόν η προσέγγιση, θεωρείται πως έπειτα από κατάλληλη επεξεργασία , μπορεί να επεκταθεί για την προστασία απέναντι σε πολλούς φυτικούς ιούς .

Μείωση των συμπτωμάτων καθώς και της αντιγραφής του ιού στα φυτά , εμφανίστηκε και σε διαγονιδιακά φυτά , που είχαν τροποποιηθεί με ένα γονίδιο για την παραγωγή "Dí" σωματιδίων του ιού African casava mosaic virus (ACMV) . Μάλιστα η μείωση των συμπτωμάτων ήταν συνδυασμένη με την ποσότητα και την αντιγραφή του υπογενωμικού (ελλιπούς) μορίου DNA , με το οποίο είχε γίνει η τροποποίηση . Το φαινόμενο αυτό αφορά ειδικά τον ιό ACMV και κάποιους άλλους ιούς της ομάδας των geminivirus και δεν επιδέχεται διεύρυνση σε άλλους ιούς . (Hull, R., Davis, J.W., 1992)

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

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

Σε διαγονιδιακά φυτά, τα οποία είχαν τροποποιηθεί με κάποιο γονίδιο , που κωδικοποιεί την παραγωγή μιας μη δομικής πρωτεΐνης , εμφανιζόταν πρόβλημα ανίχνευσης της πρωτεΐνης αυτής. Αυτό

οφειλόταν είτε σε κάποιο λάθος της υπεύθυνης αλληλουχίας στο ενσωματωμένο γονίδιο , είτε στην ενσωμάτωση του γονιδίου της πρωτεΐνης σε μη ενεργή ζώνη του γενώματος του φυτού . Συνεπώς αδυναμία εντοπισμού της μη δομικής πρωτεΐνης , δεν σημαίνει αυτόματα πλήρη απόρριψη της μεθόδου αυτής . Είναι απαραίτητο λοιπόν για την καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού , μέσω του οποίου λειτουργεί η ανθεκτικότητα που αποδίδεται σε αλληλουχίες που κωδικοποιούν μη δομικές πρωτεΐνες, να πραγματοποιηθούν πειράματα με αναπαραγωγή ιών σε συνθήκες "in vitro" .

Ικανοποιητικά αποτελέσματα είχε ο μετασχηματισμός των φυτών, με αλληλουχίες DNA , προερχόμενες από γονίδια που κωδικοποιούν μια μη δομική πρωτεΐνη ιού , η οποία παρεμπόδιζε την αντιγραφή του ιού και εξασφάλιζε υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας των φυτών αυτών έναντι του αντίστοιχου ιού. Σήμερα έχουν παραχθεί με τη μέθοδο αυτή φυτά ανθεκτικά στους ιούς ,tobacco mosaic virus (TMV) , pea early browning (PEB) , cucumber mosaic virus (CMV) και potato virus X (PVX) . Χαρακτηριστική τέτοια περίπτωση αποτελεί αυτή του tobacco mosaic virus (TMV) , όπου διαγονιδιακά φυτά που είχαν τροποποιηθεί με τον γονίδιο που κωδικοποιεί την 54K πρωτεΐνη συγκεκριμένης φυλής του ιού (U 1), ανέπτυσαν ανθεκτικότητα όχι μόνο σ' αυτήν την φυλή του ιού , αλλά και σε μια συγγενική της φυλή (YSI/1). Μάλιστα, σε αντίθεση με γονίδια που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη του καψιδίου του ιού TMV , η ανθεκτικότητα δεν υπερνικούνταν από υψηλές συγκεντρώσεις μολύσματος . Ανάλογα αποτελέσματα έδωσε και η τροποποίηση φυτών *Nicotiana benthamiana* με αλληλουχία RNA , για ανάπτυξη ανθεκτικότητας στον ιό PEBV . (Hull, R., Davis, J.W., 1992 / Carr, J.P. and Zaitlin, M., 1993)

Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων εμφανίστηκε παρεμπόδιση της αντιγραφής των ιών , από γονίδια που κωδικοποιούν μη δομικές πρωτεΐνες δεν είναι ακόμα κατανοητοί . Παρ'όλα αυτά , υπάρχουν δυο βασικά μοντέλα που δίνουν πιθανόν την εξήγηση της ανθεκτικότητας , εφόσον βέβαια η μη δομική πρωτεΐνη είναι υπεύθυνη για την παρεμπόδιση . α) Η πρωτεΐνη που επιδρά στην αντιγραφή του ιού, πιθανώς να είναι αυτή που λειτουργεί ως ρυθμιστική πρωτεΐνη , σε μια φυσική προσβολή από τον ιό . Έτσι , η έκφρασή της στα διαγονιδιακά φυτά , πιθανώς να ρυθμίζει σε χαμηλά επίπεδα την αντιγραφή , μέσω της αλλοίωσης της ισορροπίας μεταξύ , της θετικής και της αρνητικής αλυσίδας της αντιγραφής . Αυτό το μοντέλο μπορεί να αποδοθεί στην ανάπτυξη της ανθεκτικότητας που εμφανίζεται έναντι των ιών TMV και PEBV , από διαγονιδιακά φυτά που εκφράζουν το γονίδιο της 54K πρωτεΐνης του κάθε ιού .

β) Η πρωτεΐνη πιθανόν να επιδρά στην αντιγραφή , είτε μέσω του τρόπου έκφρασής της σε μια μεταλλαγμένη η ελλιπή μορφή , είτε μέσω της έκφρασής της συνεχώς η σε ακατάλληλες συγκεντρώσεις στο κύτταρο του φυτού , αναμειγνύεται στην αντιγραφή , ανταγωνιζόμενη την φυσική μορφή της πρωτεΐνης που παράγεται κατά την αντιγραφή του ιού . Ο συναγωνισμός αυτός αφορά , είτε κάποιους παράγοντες είτε κάποια συστατικά που επιδρούν πάνω στην αντιγραφή του ιού . Αυτό το δεύτερο μοντέλο και μάλιστα η δεύτερη περίπτωση του συναγωνισμού φαίνεται πως δικαιολογεί περισσότερο , τις περιπτώσεις ανάπτυξης ανθεκτικότητας σε ιούς , λόγω του παρεμποδισμού της αντιγραφής του . (Lomonossoff, G. P. , 1995 / Carr, J.P. and Zaitlin, M., 1993)

3.Η ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR) ΣΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΠΙΖΗΤΟΥΜΕΝΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η τεχνική της PCR ή Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης πρωτοεφαρμόστηκε από την ομάδα των ερευνητών Mullis , Fallona και Saiki της εταιρείας Cetus και αποτελεί αναμφίβολα επανάσταση στην βιοιατρική έρευνα , με ευρύτατο φάσμα εφαρμογών. (Μαρκουλάτος , Π., κ.α. , 1996)

3.2 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Με την PCR επιτυγχάνεται η αντιγραφή και πολλαπλασιασμός “ in vitro ” ενός τμήματος DNA , ανεξαρτήτου προελεύσεως . Σε χρονικό διάστημα ολίγων ωρών , η συγκεκριμένη περιοχή του DNA (στόχου) , πολλαπλασιάζεται σε ένα μεγάλο αριθμό αντιγράφων , σε σημείο που να είναι ανιχνεύσιμο . Ο αριθμός των αντιγράφων εξαρτάται από τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης . Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην κινητική της επανασύνδεσης των αποδιαταγμένων συμπληρωματικών αλύσεων δίκλωνου νουκλεϊκού οξέως , που ανέπτυξαν οι Britten και Kohne στα τέλη της δεκαετίας του 60 .

Εκεί όπου τεχνικές υψηλής ευαισθησίας , όπως διάφορες τεχνικές μοριακού υβριδισμού (Southern , Northern) αποδεικνύονται ανεπαρκείς , με την PCR επιτυγχάνεται αύξηση της συγκέντρωσης του DNA στόχου , σε σημείο που να γίνεται ευχερώς ανιχνεύσιμο . Το DNA στόχος αποτελεί το πρότυπο DNA στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης . Ως αφετηρίες για τη σύνθεση, χρησιμοποιούνται 2 συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (15-25 βάσεων)

που έχουν δομή συμπληρωματική προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA στόχου, το καθένα αντίστοιχα προς τον ένα κλώνο του στόχου και με αντίθετη κατεύθυνση. Το πρώτο στάδιο της PCR είναι η «μετουσίωση» του DNA στόχου, κατά την οποία αποχωρίζονται μεταξύ τους οι δυο αλυσίδες του δίκλωνου DNA πρότυπου. Εν συνεχεία συνδέονται «υβριδίζονται» τα δυο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, τα οποία καλούνται εκκινητές (primers) στις δυο πλευρές του DNA στόχου, στους αντίστοιχους κλώνους DNA (2^ο στάδιο). Με τη δράση του ενζύμου Taq DNA πολυμεράσης προστίθενται συμπληρωματικές βάσεις δεοξυριβονουκλεοτιδίων στο 3' άκρο κάθε εκκινητού και η αλυσος επεκτείνεται (3^ο στάδιο). Έτσι σχηματίζονται δυο καινούργιες αλυσος ή κλώνοι DNA συμπληρωματικές προς αυτές των δυο κλώνων του πρότυπου DNA με αποτέλεσμα το διπλασιασμό του DNA στόχου. Η σειρά των τριών σταδίων, μετουσίωση, υβριδισμού των εκκινητών και επέκτασης των εκκινητών για την σύνθεση καινούργιου κλώνου, αποτελούν τον 1 κύκλο της αντίδρασης PCR. (Μαρκουλάτος, Π., κ.α., 1996)

Όλη η αντίδραση PCR ολοκληρώνεται στο ίδιο μείγμα αντιδραστηρίων, για το οποίο απαιτούνται: DNA στόχος, εκκινητές, τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια, ένζυμο Taq DNA πολυμεράση, ιόντα Mg απαραίτητα για την ενζυμική δράση και κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα pH 8,2 για την δράση του ενζύμου. Το ένζυμο Taq DNA είναι μια θερμοάντοχη πολυμεράση η οποία απομονώθηκε από το βακτηρίδιο *Thermus aquaticus* (Taq) και έχει την ιδιότητα να είναι ενεργό ακόμη και στους + 95°C, θερμοκρασία η οποία απαιτείται για την «μετουσίωση» του DNA στόχου, επί 40 τουλάχιστον λεπτά.

Στο τέλος του πρώτου κύκλου της αντίδρασης οι κλώνοι του DNA στόχου είναι πλέον 4 και αποτελούν τα πρότυπα για την σύνθεση νέων κλώνων DNA στον δεύτερο κύκλο. Στο τέλος του δεύτερου κύκλου οι κλώνοι θα είναι 8 και αυξάνοντας τον αριθμό των κύκλων, αυξάνει εκθετικά ο αριθμός των αντιγράφων του DNA στόχου, διότι οι κλώνοι που σχηματίζονται χρησιμοποιούνται ως πρότυπο στον επόμενο κύκλο. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται πολλαπλασιασμός του DNA στόχου $\times 2^a$, όπου a ο αριθμός των κύκλων. (Μαρκουλάτος, Π., κ.α., 1996)

Κάθε κύκλος PCR περιλαμβάνει τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες για τα τρία στάδια. Η «μετουσίωση» του DNA επιτυγχάνεται συνήθως σε θερμοκρασίες 92-95°C για 30 sec περίπου, ο υβριδισμός ανάλογα με τη σύνθεση των βάσεων των εκκινήτων σε θερμοκρασία 50-65°C επί 30-60 sec και τέλος η επέκταση των εκκινήτων και σύνθεση της αλυσίδας σε θερμοκρασία 70-78°C επί 1-2 min. Οι εναλλαγές της θερμοκρασίας ανάμεσα σε κάθε κύκλο επιτυγχάνονται με αυτόματες συσκευές, τους θερμοκυκλοποιητές (thermocyclers), οι οποίοι έχουν την ικανότητα να αυξομειώνουν τη θερμοκρασία μεταξύ των τριών προαναφερομένων θερμοκρασιών, σε λιγότερο από 1 min, για αυξομείωση θερμοκρασίας 40°C. Προϋπόθεση για τον πολλαπλασιασμό του DNA στόχου είναι η ακεραιότητα του. Η αλληλουχία βάσεων του DNA στόχου είναι δυνατόν να είναι άγνωστη θα πρέπει όμως η αλληλουχία βάσεων των πλευρικών περιοχών του DNA στόχου να είναι γνωστή ώστε να κατασκευασθούν τα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (primers).

Η PCR μπορεί επίσης να εφαρμοσθεί και για πολλαπλασιασμό περιοχών του RNA, αφού πρώτα το RNA μετατραπεί με την δράση

του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφή σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) και εν συνεχεία εφαρμοσθεί η τεχνική της PCR .

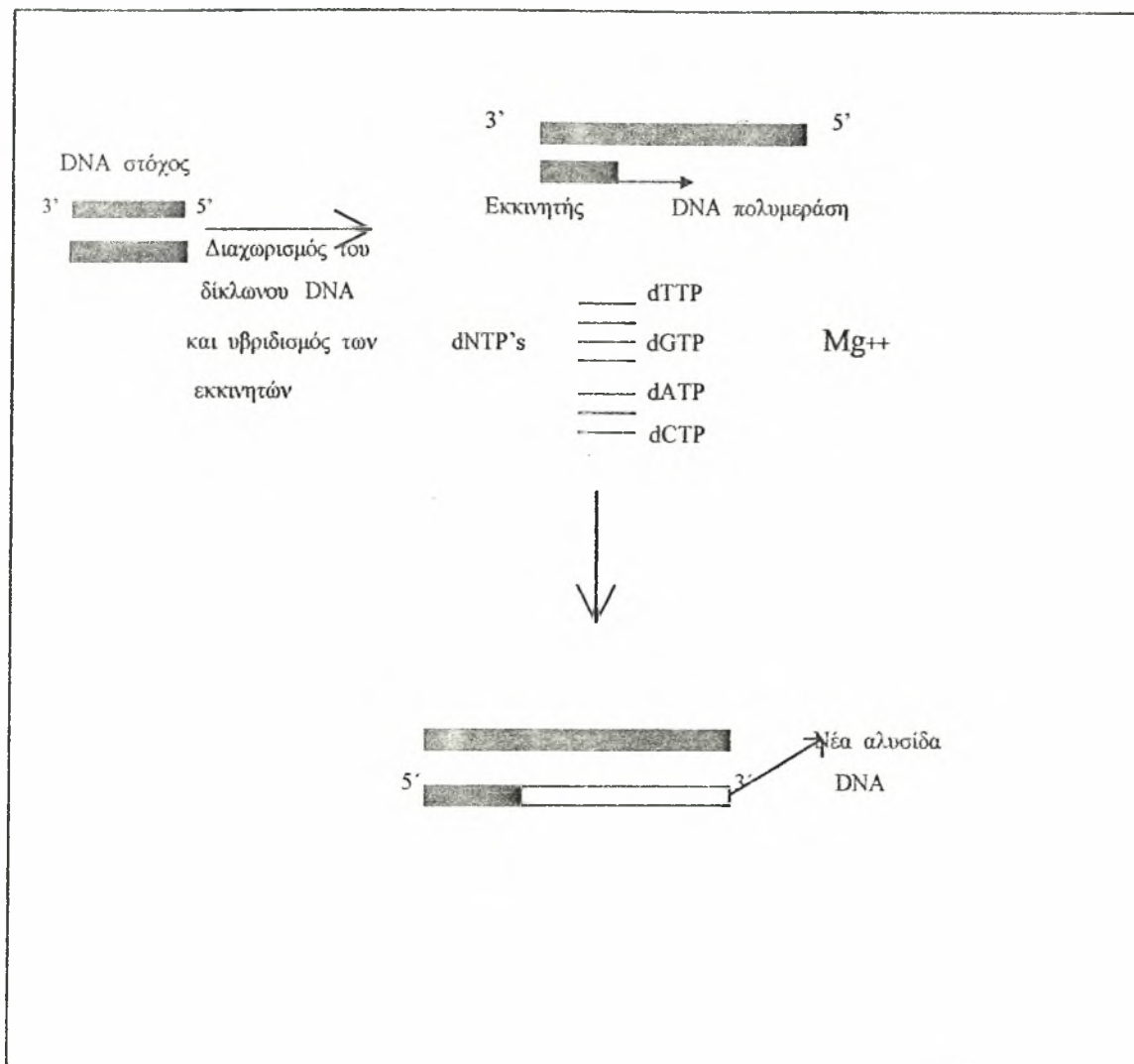
Η παρασκευή των εκκινητών γίνεται σε αυτόματες συσκευές τους DNA συνθετητές .

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης συνήθως πραγματοποιείται επί 25-40 κύκλους οπότε το τμήμα του DNA στόχου πολλαπλασιάζεται $\times 2$ (όπου $n=40$ ο αριθμός των κύκλων). Υπερβολικός αριθμός κύκλων οδηγεί σε αύξηση μη ειδικών προϊόντων (μικρότερες αλυσίδες) , ενώ μικρότερος από τον απαιτούμενο στη μη ανίχνευση του DNA στόχου . Το κύριο προϊόν της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης είναι δίκλωνο DNA το οποίο οριοθετείται από τους εκκινητές , των οποίων τα 5' άκρα είναι και τα άκρα του προϊόντος της PCR . (Μαρκουλάτος , Π., κ.α. , 1996 / Κατινάκης , Π., 1994)

3.3 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ PCR

Η εξειδίκευση της PCR εξαρτάται από την ειδική σύνδεση των εκκινητών (συμπληρωματικότητα με τα άκρα του DNA στόχου) . Επίσης, εξαρτάται επίσης από τη συγκέντρωση ιόντων Mg^{2+} , τον αριθμό των κύκλων, τη θερμοκρασία υβριδισμού , τη συγκέντρωση του ενζύμου Taq πολυμεράση καθώς και από τη συγκέντρωση των εκκινητών και του DNA στόχου . Η εξειδίκευση του προϊόντος της αντίδρασης PCR , σε βέλτιστες συνθήκες εκτέλεσης, επιβεβαιώνεται σαν ένα ομοιογενές προϊόν (μοναδική ζώνη) σε ηλεκτοφόρηση πηκτής αγαρόζης , το μέγεθος του οποίου ταυτίζεται με το μέγεθος του DNA στόχου . Το ομοιογενές προϊόν της PCR συνήθως προσδιορίζεται με ηλεκτοφόρηση σε πηκτή αγαρόζη, παρουσία

βρωμιούχου εθιδίου (ethidium bromide) . Το βρωμιούχο εθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων των νουκλεοτιδίων και φθορίζει παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας αποκαλύπτοντας το προϊόν της PCR. Για να προσδιοριστεί η εξειδίκευση του προϊόντος της PCR πολλές φορές είναι αναγκαίο να υποβληθεί το προϊόν αυτό , σε μια από τις πολλές πλέον διαθέσιμες τεχνικές μοριακού υβριδισμού . Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται ένα συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο 15-25 βάσεων , το οποίο παίζει το ρόλο του μοριακού ανιχνευτή (probe) και το οποίο έχει επιλεγεί να ευρίσκεται σε σταθερή περιοχή του DNA στόχου και μεταξύ των 2 εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR . Η μεγάλη ευαισθησία της PCR έχει το μειονέκτημα της πιθανής επιμόλυνσης των προϊόντων της , που μπορεί να οδηγήσει σε λάθος θετικά αποτελέσματα . Η μείωση των επιμολύνσεων είναι δυνατό να επιτευχθεί με προσεκτική προετοιμασία και εκτέλεση της PCR . (Μαρκουλάτος , Π. , κ.α. , 1996)



Διαγρ 3.1 . Γονιδιακή επέκταση DNA στοχου . Επιμήκυνση μέσω εκκινητών . Η DNA πολυμεράση προεκτείνει έναν εκκινητή χρησιμοποιώντας την συμπληρωματική αλυσίδα σαν μήτρα

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η εργασία που ακολουθήθηκε και περιγράφεται στο πειραματικό μέρος της πτυχιακής μου μελέτης , αποτέλεσε μέρος ενός ερευνητικού προγράμματος που πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ιολογίας του Μπενακείου Φυτοποθολογικού Ινστιτούτου , σε συνεργασία με το Scottish Crop Research Institute και είχε σαν στόχο την δημιουργία φυτών καπνού ανθεκτικών στον ιό TRV , χρησιμοποιώντας τις μεθόδους της γενετικής μηχανικής .

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την πραγματοποίηση του στόχου, του προγράμματος αυτού αναφέρεται εν περιλήψη παρακάτω:

Αρχικά δημιουργήθηκαν τροποποιημένα κύτταρα καπνού της σειράς S 53 , μετά από ενσωμάτωση του γονιδίου της 59 K πολυμεράσης του ιού , στο γένωμα των κυττάρων . Για τον μετασχηματισμό χρησιμοποιήθηκε ένα κατασκευασμένο (μη ογκογόνο) στέλεχος του βακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens* , στο πλασμίδιο της οποίας είχε τοποθετηθεί ένα αντίγραφο συμπληρωματικού DNA (c DNA) του γονιδίου της 59 K πολυμεράσης του TRV , συνδεδεμένου με c DNA ενός γονιδίου επιλογής (npt II) . Το τελευταίο αυτό γονίδιο , καθιστά τα τροποποιημένα κύτταρα ανθεκτικά στο αντιβιοτικό kanamycin και χρησιμοποιείται για την επιλογή των τροποποιημένων κυττάρων από τα υπόλοιπα .

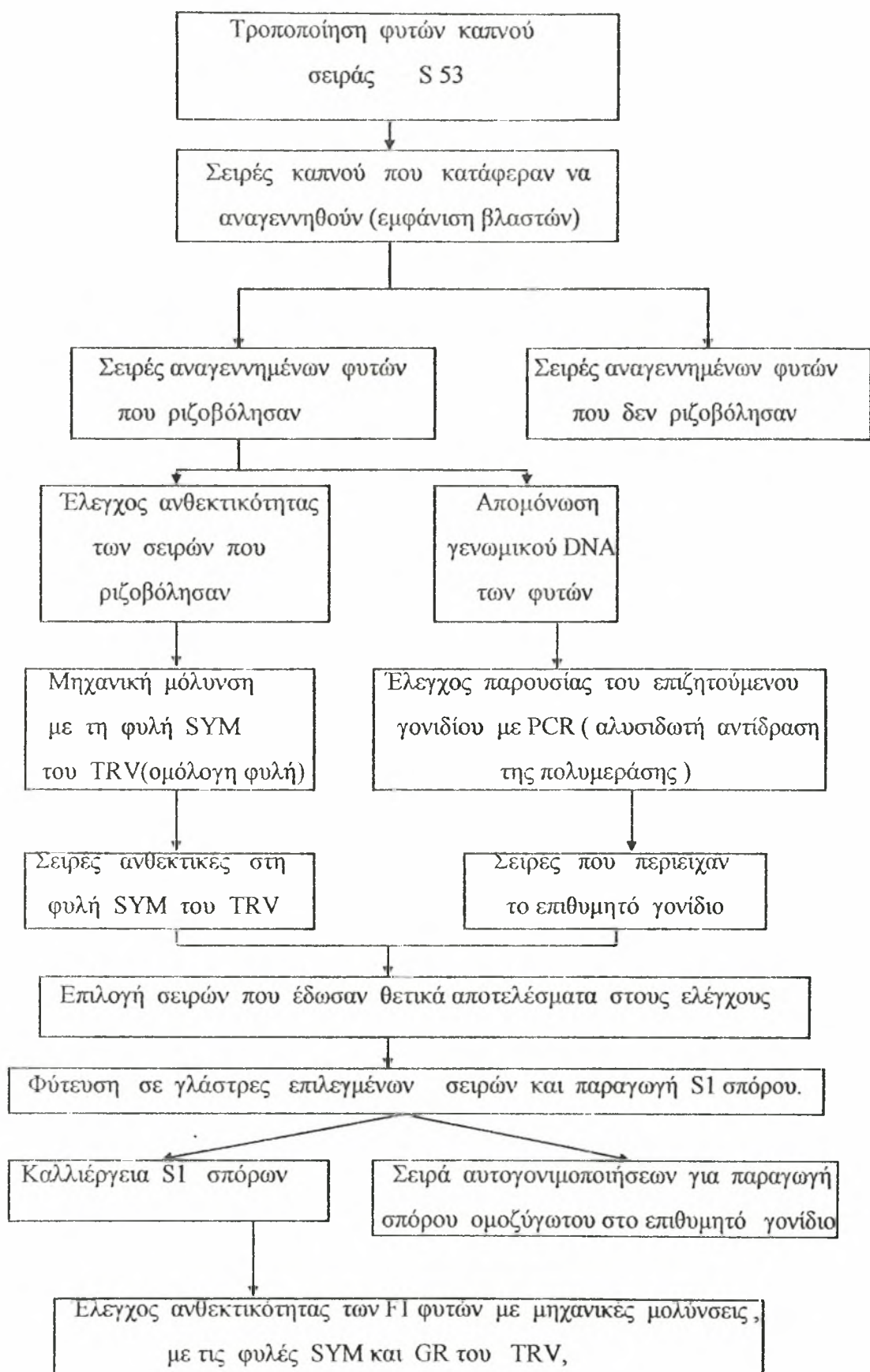
Εν συνεχεία , από τα μετασχηματισμένα κύτταρα έγινε "in vitro" αναγέννηση βλαστών , οι οποίοι πολλαπλασιάστηκαν αγενώς και έδωσαν τροποποιημένα φυτά καπνού .

Τα φυτά αυτά υποβλήθηκαν σε μια σειρά από ελέγχους , για την ανίχνευση στο γένωμα τους του επιθυμητού γονιδίου της

59 K πολυμεράσης του TRV(με PCR) και την διαπίστωση τυχόν ανθεκτικότητας στον ιό αυτό (μηχανικές μολύνσεις με τον TRV).

Από τις 74 σειρές που είχαν τροποποιηθεί γενετικά , οι 18 δεν είχαν ικανοποιητική ανάπτυξη σε υπόστρωμα που περιείχε το αντιβιοτικό kanamycin , ενώ μόνον έξι σειρές περιείχαν το επιθυμητό γονίδιο της 59 K πολυμεράσης . Οι σειρές αυτές που περιείχαν το επιθυμητό γονίδιο , δοκιμάστηκαν με μηχανικές μολύνσεις , για την ανθεκτικότητά τους σε διάφορες φυλές του TRV . Ένα σχεδιάγραμμα της εργασίας δίνεται στο σχήμα 4.1 .

ΣΧΗΜΑ 4.1



Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα , ανεξάρτητα από το ότι δεν έχει εξακριβωθεί ακόμη ο μηχανισμός λειτουργίας του συγκεκριμένου γονιδίου για την δημιουργία ανθεκτικότητας , ήταν πολύ θετικά .

4.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ



Τροποποίηση του καπνού

1) Επιφανειακή απολύμανση σπόρων και αναπαραγωγή φυτών “ in vitro ”

Είναι το πρώτο στάδιο της διαδικασίας τροποποίησης , όπου έχουμε την απολύμανση σπόρων και την αναπαραγωγή “ in vitro ” υγιών φυτών καπνού , της ποικιλίας Samsun S53 , τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για την τροποποίηση .

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής παρακάτω :

Εμβαπτίστηκαν οι σπόροι σε 60 ml διαλύματος χλωρίνης 10% , σε αποστειρωμένα δοχεία για 15 λεπτά , βάζοντας τα πάνω σε παλινδρομικό τραπέζι για να κρατά τους σπόρους σε κίνηση , πετυχαίνοντας έτσι καλύτερη απολύμανση . Στη συνέχεια το μείγμα σπόρων - χλωρίνης , τοποθετήθηκε μέσα σε αποστειρωμένο κόσκινο (38μm) και ξεπλύθηκε με αποστειρωμένο νερό στήλης , με ποσότητα 400 ml το λιγότερο . Στη συνέχεια οι σπόροι τοποθετήθηκαν σε δοχεία που περιείχαν αποστειρωμένο θρεπτικό διάλυμα MS-30 (πιν 4.1) , με τη χρησιμοποίηση μιας καμένης σπάτουλας, για ομοιόμορφη

εξάπλωση του σπόρου στο δοχείο, το πόμα του οποίου τελικά σφραγίστηκε με παραφίλμ .

Εντός 2 με 3 εβδομάδων , τα σπορόφυτα ήταν αρκετά μεγάλα και μπόρεσαν να μεταφερθούν σε γυάλες με διάλυμα BGS (πιν 4.2) . Τοποθετήθηκε ένα σπορόφυτο ανά δοχείο . Τα φυτά καπνού υποκαλλιεργήθηκαν για περισσότερες από δυο φορές , πριν χρησιμοποιηθούν για τη μεταφορά του γονιδίου . Τα καλύτερα φύλλα για την τροποποίηση είναι τα νεώτερα και πλήρως αναπτυγμένα , που δεν ακουμπούν στις πλευρές του δοχείου .

Όλη η διαδικασία, της απολύμανσης των σπόρων και της καλλιέργειας των φυτών καπνού έγινε σε θάλαμο νηματικής ροής (laminar flow cabinet) , που είχε τεθεί σε λειτουργία, τουλάχιστο 20 λεπτά πριν τη χρησιμοποίησή του και είχε ψεκαστεί με αλκοόλη 70% , τα δε εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν καίγονταν σε λύχνο , προκειμένου να εξασφαλισθούν ασηπτικές συνθήκες και να αποφευχθούν διάφορες μολύνσεις από μικροοργανισμούς . Επίσης πριν από κάθε εργασία στο laminar flow , προηγούνταν καλό πλύσιμο των χεριών και απομάκρυνση μη απαραίτητων υλικών, που εμπόδιζαν το ρεύμα αέρα και αύξαναν έτσι την πιθανότητα μόλυνσης . (Kara, D. ,et al ,1994)

πίνακας 4.1

Θρεπτικό διάλυμα MS - 30

Απεσταγμένο νερό 1000 ml

Σκόνη διαλύματος αλάτων και βιταμινών για 1 lt. διαλύματος
(Murashige and Skoog salts)

Σακχαρόζη 30 g

διόρθωση pH στο 5,8 με NaOH

Αγαρ (Difco Bacto Agar) 0,7%

Το διάλυμα αποστειρώνεται σε κλίβανο , στους 121 °C για μια ώρα και ψύχεται στους 55 °C , πριν την προσθήκη ορμονών η αντιβιοτικών η άλλων συμπληρωμάτων

Πίνακας 4.2

Διάλυμα ριζοβολίας BGS

Στο βασικό διάλυμα MS-30 προστίθενται :

	+ 0,00875	mg./ ml	IAA
MS-30	+ 0,03	mg./ ml	kinetine
	+ 0,001	mg./ ml	folic acid

2) Μετασχηματισμός του καπνού

Είναι το σημαντικότερο και μεγαλύτερης προσοχής στάδιο , όπου έχουμε την προσπάθεια εισαγωγής και ενσωμάτωσης του γονιδίου της 59K πολυμεράσης , με τη χρήση τροποποιημένου με το επιθυμητό γονίδιο *A. tumefaciens*, σε υγιή φυτά καπνού της ποικιλίας Samsun σειράς S 53 , ευαίσθητα στον ιό TRV . Η διαδικασία αυτή διήρκεσε για διάστημα 7-8 εβδομάδων και περιγράφεται ακολούθως .

Την πρώτη ημέρα εμβολιάστηκε το τροποποιημένο *A . tumefaciens* μέσα σε 10 ml YEB (πιν 4.3) , όπου είχαν προστεθεί και 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kanamycin και επώασθηκε σε παλινδρομικό ανακινητή για όλη νύκτα στους 28 °C . Αν η ανάπτυξη ήταν πτωχή , τότε έμενε να επωασθεί για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 24 ωρών . (Kara, D. ,et al ,1994)

πίνακας 4.3

Διάλυμα YEB

Εκχύλισμα μαγιάς (Yeast extract)	1 g
Εκχύλισμα βοδινού (Beef extract)	5 g
Πεπτόνη (Peptone)	5 g
Σακχαρόζη	5 g
Θειικό μαγνήσιο (7 H ₂ O)	0,5 g
Απεσταγμένο νερό	1000 ml

Προσθέτουμε 15 g/l agar και αποστειρώνουμε στους 121 °C για 1 ώρα . Το ψύχουμε στους 55 °C και προσθέτουμε τα συμπληρώματα .Το αντιβιοτικό kanamycin χρησιμοποιείται για να εξοντωθούν τα βακτήρια που δεν έχουν το γόνο της 59K πολυμεράσης και επομένως το γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη .

Την δεύτερη ημέρα , μέσα σε laminar flow για να εξασφαλισθούν ασηπτικές συνθήκες , αφαιρέθηκαν τα 2 νεώτερα φύλλα , αυτά που μόλις ακουμπούν τις πλευρές του δοχείου , από τα φυτά που βρίσκονται σε "in vitro" καλλιέργεια , και τα τοποθετήσαμε ανεστραμμένα σε ένα τριβλίο petri , με 10 ml υγρό MS -30 . Τα φύλλα παρέμειναν στο υγρό μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Στην συνέχεια αφαιρέθηκαν οι έξω πλευρές του φύλλου , χρησιμοποιώντας ένα αποστειρωμένο νυστέρι . Έγινε μια τομή στην κεντρική νεύρωση των φύλλων , ούτως ώστε να διαιρεθεί το φύλλο σε δυο μισά . Εν συνέχεια κόπηκε το κάθε μισό σε τετράγωνα τμήματα πλευράς 1 cm . Με αυτόν τον τρόπο, όλες οι πλευρές των φυλλικών δίσκων έχουν πληγωθεί ώστε να διευκολύνουν τη μόλυνση με το *A. tumefaciens* . Στη συνέχεια , προστέθηκαν στο υγρό MS-30 2 ml από την καλλιέργεια του *Agrobacterium* και αναμίχθηκαν . Ακολούθως σφραγίστηκε το καπάκι του δοχείου με ταινία και αφέθηκε να κινείται σε ένα περιστροφικό τραπέζι για 30 λεπτά . Αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία αυτή , μεταφέρθηκαν 5 ή 6 τεμάχια φύλλου σε βαζάκια με θρεπτικό διάλυμα MS-30 ,στο οποίο είχαν προστεθεί οι ορμόνες , ναφθαυλοξικό οξύ (NAA) και βενζυλοαμυλοπουρίνη (BAP) (πιν 4.4), σφραγίστηκε με κάλυμμα το δοχείο , αφήνοντας το να επωασθεί για 5 ημέρες , σε χαμηλής τάσης φωτισμό ~ 200 Lux . (Kara, D. ,et al ,1994)

Πίνακας 4.4

Στο θρεπτικό διάλυμα MS-30 είχαν προστεθεί :

MS-30	+	0,1 mg/ml	NAA
	+	1,0 mg/ml	6BAP

Την έβδομη ημέρα , μέσα σε laminar flow , μεταφέρθηκαν τα τεμάχια φύλλου, σε δοχεία που περιείχαν MS-30 , τις ορμόνες NAA και 6BAP και τα αντιβιοτικά , kanamycin και cefotaxime , σε αναλογίες που φαίνονται στον πίνακα 4.5 . Είναι πολύ σημαντικό να μην προστεθούν περισσότερα από 5 ή 6 φυλλικοί δίσκοι σε κάθε δοχείο . Σφραγίστηκαν στην συνέχεια τα δοχεία με κάλυμμα και αφέθηκαν στο θάλαμο ανάπτυξης , με 16 ώρες φωτισμό την ημέρα (περίπου 800-1000 Lux) στους 21 °C .Οι φυλλικοί αυτοί δίσκοι μεταφέρονταν σε φρέσκο διάλυμα, κάθε 10-14 ημέρες , μέχρις ότου οι βλαστοί άρχισαν να φαίνονται . Η διαδικασία αυτή γίνονταν πάντα μέσα σε laminar flow για αποφυγή μολύνσεων . (Kara, D. ,et al ,1994)

Πίνακας 4.5

Δοχείο με MS -30 (1 δοχείο για 5-6 φυλλικούς δίσκους)

- + 40 μg / ml kanamycin (αντιβιοτικό για επιλογή των τροποποιημένων κυττάρων του φυλλικού δίσκου .)
- + 250 μg / ml cefotaxime(αντιβιοτικό για θανάτωση του βακτηρίου)
- + 100 μg / ml NAA
- + 1000 μg / ml 6BAP

Το MS-30 αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο κλίβανο και ψύχθηκε στους 55 °C , πριν την προσθήκη των συμπληρωμάτων . Η προσθήκη γίνονταν πάντα στο laminar flow .

Μετά από 4-6 εβδομάδες περίπου , όταν οι βλαστοί στους κάλλους ήταν καλά αναπτυγμένοι, αφαιρέθηκαν και μεταμοσχεύτηκαν ανά 4 σε κάθε βαζάκι , που περιείχε διάλυμα MS-30, στο οποίο είχαν προστεθεί τα αντιβιοτικά kanamycin , cefotaxime και οι ορμόνες, NAA και 6BAP στις αναλογίες πίνακα 4.5 . Επώασθησαν υπό κανονικές συνθήκες φωτισμού , μέχρι οι βλαστοί να είναι αρκετά μεγάλοι να υποδιαιρεθούν σε 3 η 4 κόμβους . Μερικές φορές οι μετασχηματισμένοι βλαστοί δεν μεγάλωναν φυσιολογικά και έτσι γινόταν μια πρώτη διαλογή σ' αυτό το στάδιο . (Kara, D. ,et al ,1994)

Μετά από 7-8 εβδομάδες , όταν οι βλαστοί ήταν αρκετά μεγάλοι να υποκαλλιεργηθούν για δεύτερη φορά , διαιρέθηκαν σε 3 ή 4 κόμβους και μεταφυτεύθηκαν σε γυάλα , που περιείχε διάλυμα MS-30 με τα αντιβιοτικά , kanamycin και cefotaxime και τις ορμόνες IAA , kinetine , folic acid σε αναλογίες που φαίνονται στον πίνακα 4.6 . Αφέθηκαν να μεγαλώσουν , μέχρι οι ρίζες να αναπτυχθούν (2-3 εβδομάδες περίπου) , συνήθως αυτό είναι ένα σημάδι ότι αυτά μπορεί να έχουν μετασχηματισθεί . Όταν τα φυτά αυτά ήταν αρκετά μεγάλα , πολλαπλασιάστηκαν αλλά και ελέγχθηκαν στο θερμοκήπιο . (Kara, D. ,et al ,1994)

Πίνακας 4.6

Δοχείο με MS-30 (250 ml):

+ 8,75	μg / l	IAA
+ 30	μg / l	kinetine
+ 1	μg / l	folic acid
+ 250	μg / ml	cefotaxime
+ 40	μg / ml	kanamycin

Το MS-30 αποστειρώθηκε στον κλίβανο και ψύχθηκε στους 55 °C .

Πολλαπλασιασμός των διαγονιδιακών φυτών

Ύστερα από την αναγέννηση των βλαστών, όπως είδαμε από τα μετασχηματισμένα κύτταρα, άρχισε ο πολλαπλασιασμός τους, ούτως ώστε να έχουμε αρκετή ποσότητα φυτικού υλικού, για να μπορέσουμε να πραγματοποιήσουμε τους ελέγχους μας, δηλαδή εάν όντως είχαμε τον μετασχηματισμό των φυτικών κυττάρων και αν τα μετασχηματισμένα φυτά ήταν ανθεκτικά στον ιό TRV.

Ο πολλαπλασιασμός των φυτών έγινε με τη διαδικασία του μικροπολλαπλασιασμού. Ως έκφυτα χρησιμοποιήθηκαν τα γόνυα των αναγεννημένων βλαστών, τα οποία τοποθετήθηκαν σε γυάλιες με διάλυμα ριζοβολίας BGS (πίνακα 4.2). Στο διάλυμα είχαν προστεθεί 40 µg/ml kanamycin και 250 µg/ml cefotaxime. Η kanamycin χρησιμοποιήθηκε ως μια ουσία για την επιλογή των μετασχηματισμένων φυτών, αφού μαζί με το γονίδιο της 59 K πολυμεράσης, στο κατασκευασμένο στέλεχος του *Agrobacterium tumefaciens*, είχε τοποθετηθεί και το γονίδιο npt II που προσδίδει ανθεκτικότητα στην kanamycin. Επομένως τα φυτά, που επιβίωσαν στο διάλυμα αυτό που περιείχε το αντιβιοτικό, ήταν πιθανώς αυτά που έχουν το γονίδιο της ανθεκτικότητας. Το αντιβιοτικό cefotaxime, χρησιμοποιήθηκε στο διάλυμα ριζοβολίας, με σκοπό να παρεμποδίσει την εξάπλωση εντός των φυτών του *A. tumefaciens*, με το οποίο πραγματοποιήθηκε η τροποποίηση των κυττάρων του καπνού. Έτσι επιτυγχάνεται, κατά την εφαρμογή διαφόρων μεθόδων ανίχνευσης του επιζητούμενου γονιδίου, η αποφυγή τυχόν θετικών αντιδράσεων, οι οποίες οφείλονται στην παρουσία του τροποποιημένου βακτηρίου και όχι στο γονίδιο που βρίσκεται στο γένωμα του φυτού. (Kara, D., et al, 1994)

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον πολλαπλασιασμό των τροποποιημένων φυτών περιγράφεται παρακάτω . Μέσα στον θάλαμο laminar flow , διαλέχτηκε το καλύτερο φυτό από κάθε βαζάκι , της κάθε σειράς τροποποιημένων φυτών και του αφαιρέθηκε η ρίζα και τα φύλλα, αφήνοντας τους μίσχους πάνω στο βλαστό . Εν συνεχεία τεμαχίστηκε ο βλαστός σε 4 ή 5 τμήματα , ανάλογα με το μήκος του , στα σημεία των γονάτων . Τα έκφυτα που προέκυψαν, τοποθετήθηκαν στα βαζάκια με το θρεπτικό διάλυμα, σε αναλογία 2 έως 3 έκφυτα ανά βαζάκι και καλύφθηκαν με ειδικές ζελατίνες με φίλτρο , ώστε να γίνεται η ανταλλαγή των αερίων χωρίς προβλήματα μόλυνσης των φυτών . Τα βαζάκια , οι ζελατίνες όπως και τα λοιπά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό των φυτών του καπνού, ήταν αποστειρωμένα στους 121 °C . Οι γυάλες με τα φυτά τοποθετήθηκαν σε ειδικό θάλαμο , όπου η θερμοκρασία διατηρείτο στους 21 °C και υπήρχε φωτοπερίοδος 16 ωρών . Όλα τα φυτά , τα οποία είχαν δημιουργηθεί από ένα αρχικό κύτταρο το καθένα , είχαν και από ένα χαρακτηριστικό κωδικό αριθμό , που τα συνόδευε καθ'όλη την διάρκεια του έλεγχου και αποτελείτο , από ένα γράμμα που αντιστοιχούσε στην κάθε προσπάθεια για την τροποποίηση των φυλλικών δίσκων καπνού (ένα εκ των A, B, C, D) , από τον κλώνο του βακτηρίου που χρησιμοποιήθηκε για την τροποποίηση (ένας εκ των #3, #7, #17) και από έναν αύξοντα αριθμό που χαρακτήριζε τα φυτά που κατάφεραν να αναγεννηθούν. Όσα από τα φυτά δεν χρησιμοποιήθηκαν για τον μικροπολλαπλασιασμό , μεταφυτεύθηκαν σε γλαστράκια με χώμα στο χώρο του θερμοκηπίου , αφού διατηρούνταν για μερικές ημέρες σε ειδικό θάλαμο (25 °C , 16 ώρες φωτοπερίοδο) , ώστε να

ξεπεράσουν το σοκ της μεταφύτευσης . Τα φυτά αυτά χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο ανθεκτικότητας και όσα ήταν ανθεκτικά και περιείχαν το γονίδιο της 59 K πολυμεράσης , αυτογονιμοποιήθηκαν για παραγωγή σπόρου S1 γενεάς . (Kara, D. ,et al ,1994)

Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων

Η μέθοδος απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων έχει μεγάλη σημασία , διότι σ' αυτήν στηρίχθηκαν όλες οι μέθοδοι ανίχνευσης του επιζητούμενου γονιδίου 59K πολυμεράση . Απομόνωση τόσο του DNA , όσο και του RNA , έγινε από φύλλα τα οποία πάρθηκαν από φυτά καπνού κατά το στάδιο του μικροπολλαπλασιασμού και από φυτά που βρίσκονταν στο θερμοκήπιο , παίρνοντας πάντα τα φύλλα που ήταν κοντύτερα στην κορυφή , καθόσον περιέχουν μεγαλύτερη ποσότητα νουκλεϊκών οξέων , ανά g νωπού βάρους .

α) Απομόνωση DNA

Η απομόνωση DNA, πραγματοποιήθηκε από φύλλα υγιών τροποποιημένων φυτών καπνού (μάρτυρες) , καθώς και μολυσμένων με τον ιό TRV . Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος περιγράφεται παρακάτω και ολοκληρώνεται σε δύο ημέρες . Την πρώτη ημέρα , αρχικά ομογενοποιήθηκαν 700 mg φύλλου καπνού, σε 1 ml διαλύματος εξαγωγής DNA (DNA extraction buffer , πιν 4.7) , σε γουδιά . Ο χυμός από την ομογενοποίηση, τοποθετήθηκε σε πλαστικό σωλήνα φυγοκέντρησης , που περιείχε 1 ml κορεσμένης με νερό φαινόλης και ανακατεύτηκε καλά . Στη συνέχεια, ο σωλήνας

τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 56 °C για 10 λεπτά , αναδεύοντας περιστασιακά . Μετά το υδατόλουτρο , το παρασκεύασμα φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στις 6.000 στροφές ανά λεπτό (rpm) και συλλέχθηκε η επάνω φάση (υδάτινη) του περιεχομένου του σωλήνα που περιείχε το DNA . Στη συνέχεια, ακολούθησαν δυο πλύσεις της υδάτινης αυτής φάσης , μία με ίσο όγκο μείγματος φαινόλης : χλωροφορμίου (1:1) και μία με ίσο όγκο μείγματος χλωροφορμίου : ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) , ακολουθούμενες από φυγοκεντρήσεις των 10 λεπτών στις 6.000 στροφές ανά λεπτό , παίρνοντας την πάνω φάση του περιεχομένου του σωλήνα κάθε φορά . Τα νουκλεϊκά οξέα που υπήρχαν στην φάση αυτή, κατακρημνίστηκαν με την προσθήκη 0,1 όγκου οξικού νατρίου 3M (sodium acetate 3M) pH 5,5 και δυο όγκων απολύτου αλκοόλης (αιθανόλης) και αφέθηκαν στους -20 °C για όλη νύκτα . Την δεύτερη ημέρα, οι σωλήνες που αφέθηκαν για όλη νύκτα , φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά στις 6.000 στροφές ανά λεπτό , ώστε να κατακρημνιστούν τα νουκλεϊκά οξέα σαν ίζημα . Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο υγρό, κρατήθηκε το ίζημα και στεγνώθηκαν οι σωλήνες σε κενό αέρος για 15 λεπτά περίπου , ώστε να εξατμιστεί εντελώς η αιθανόλη . Εν συνεχεία, το ίζημα αναδιαλύθηκε με 100μl διαλύματος RN-ασης (200μg/ml RN-ασης σε TE buffer , πιν 4.7) , μεταφέρθηκε το παρασκεύασμα σε σωλήνα erpendorf και τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο 37 °C για μια ώρα , ώστε να καταστραφεί το υπάρχον RNA . Το καθαρό DNA που παρέμεινε, κατακρημνίστηκε με 0,1 όγκους οξικού νατρίου 3M και δύο όγκους απόλυτου αιθανόλης και τοποθετήθηκε για 25 λεπτά στους --75 °C . Ακολούθησε φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στις 8.000 στροφές ανά λεπτό και κράτηση του ιζήματος , το οποίο αναδιαλύθηκε με

100 μl TE buffer και κατακρήμνιση του DNA με 20μl οξικού νατρίου 3M και 250 μl απόλυτης αιθανόλης και ψύξη του για 25 λεπτά στους -75°C . Στη συνέχεια, ακολούθησε φυγοκέντριση στις 8.000 στροφές ανά λεπτό για 8 λεπτά και απομάκρυνση του υγρού και κράτηση του ιζήματος, το οποίο στεγνώθηκε σε κενό αέρος, ώστε να απομακρυνθούν πλήρως τα υπολείμματα αλκοόλης.

Τέλος, αναδιαλύθηκε το ίζημα μετά το στέγνωμα, με 100 μl TE buffer και υπολογίστηκε η συγκέντρωση του DNA στο φασματοφωτόμετρο για δυο μήκη κύματος, 280 nm και 260 nm, κάνοντας αραιώση του DNA 50 φορές. (Maniatis, 1989)

Η συγκέντρωση του DNA υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\text{DNA σε } \mu\text{g} / \mu\text{l} = \frac{A_{260} \times \text{αραιώση}}{25}$$

A: Ένδειξη φασματοφωτομέτρου για τα μήκη 260 nm

Ο λόγος $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ δείχνει το βαθμό καθαρότητας του παρασκευάσματος DNA και πρέπει να είναι ίσο με 2 ή να πλησιάζει προς το 2 (1,7 - 1,9)

Πιν 4.7

TE buffer

10 mM tris pH 8
1 mM EDTA

DNA extraction buffer

50 mM tris pH 8 (διόρθωση με HCl)
0,7 M NaCl
10 mM EDTA
1% CTAB
1% mercaptoethanol

β) Απομόνωση RNA

Η απομόνωση RNA πραγματοποιήθηκε μόνο από φύλλα υγιών φυτών, ώστε να μην υπάρχει RNA του ιού αναμεμειγμένο με το φυτικό RNA. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η ακόλουθη παρακάτω και ολοκληρώθηκε σε δύο ημέρες.

Αρχικά ομογενοποιήθηκαν 700 mg φυτικού υλικού (φύλλου), με 1ml διαλύματος εξαγωγής RNA (RNA extraction buffer, πιν 4.8) σε γουδιά, που βρίσκονταν πριν την ομογενοποίηση στην κατάψυξη και ο χυμός τοποθετήθηκε σε σωλήνα φυγοκέντρησης, που περιείχε 1 ml φαινόλης κορεσμένης. Το περιεχόμενο του σωλήνα ανακατεύτηκε και επώασθηκε στο υδατόλουτρο, στους 80 °C για 5 λεπτά. Εν συνεχεία προστέθηκε 1ml μείγματος χλωροφορμίου : ισοαμυλικής αλκοόλης (24 : 1), αφού πρώτα αφέθηκε να κατεβεί η θερμοκρασία κάτω από τους 55 °C και ανακατεύτηκε καλά. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε για 7 λεπτά στις 5.000 στροφές ανά λεπτό και πάρθηκε η επάνω φάση (υδάτινη) σε καθαρό σωλήνα φυγοκέντρησης, που βρίσκονταν σε πάγο. Προστέθηκε ίσος όγκος με την φάση αυτή LiCl 4M, ανακατεύτηκε καλά και αφέθηκε στο ψυγείο για όλη νύκτα. Την δεύτερη ημέρα, φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στις 6.000 στροφές ανά λεπτό και κρατήθηκε το ίζημα, απομακρύνοντας την υγρή φάση. Όλη η διαδικασία από εδώ όπως και πριν πραγματοποιήθηκε σε πάγο, λόγω της μεγάλης ευαισθησίας του RNA. Το ίζημα που κατακρατήθηκε, αναδιαλύθηκε με 250 μl TE buffer και μεταφέρθηκε σε σωλήνες erpendorff. Σε αυτό προστέθηκαν 0,1 όγκοι οξικού νατρίου 3M και 2 όγκοι απόλυτης αιθανόλης, προκειμένου να κατακρημνιστεί το RNA. Εν συνεχεία το υλικό καταψύχθηκε στους -75 °C για 25

λεπτά και κατόπιν φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στις 8.000 στροφές ανά λεπτό . Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο υγρό και κρατήθηκε το ίζημα , στο οποίο προστέθηκαν 400 μl 70% αιθανόλης για ξέπλυμα και εν συνεχεία φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στις 8.000 στροφές ανά λεπτό . Απομακρύνθηκε το διάλυμα και κρατήθηκε το ίζημα , το οποίο στεγνώθηκε σε αντλία κενού για 10 λεπτά περίπου , χωρίς να ξεραθεί , αλλά μόνο μέχρι να απομακρυνθούν τα υπολείμματα της αλκοόλης τελείως . Το ίζημα αναδιαλύθηκε με 100 μl TE buffer , και ακολούθησε μέτρηση της συγκέντρωσης του RNA στο φασματοφωτόμετρο . Τέλος προστέθηκαν στο διάλυμα 0,1 όγκοι οξικού νατρίου 3M και 2 όγκοι απόλυτης αιθανόλης , και το παρασκεύασμα καταψύχθηκε στους -30°C μέχρι την χρησιμοποίησή του . (Maniatis, 1989)

Πιν 4.8

RNA EXTRACTION BUFFER

100	mM	Lithium Chloride
100	mM	Tris pH 8 (διορθωση με HCl)
10	mM	EDTA
1%		SDS

Μέθοδος ανίχνευσης του επιζητούμενου γονιδίου

Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase chain reaction , PCR)

Η αντίδραση αυτή αποτέλεσε το βασικό εργαλείο για την ανίχνευση του επιζητούμενου γονιδίου . Τα φυτά που επιλέχθηκαν ήταν εκείνα , τα οποία κατάφεραν να ξεπεράσουν την δράση του αντιβιοτικού kanamycin , αλλά και φυτά τα οποία έδειχναν ανθεκτικότητα στις μηχανικές μολύνσεις , με διάφορες φυλές του ιού TRV .

Για να μπορέσει να πραγματοποιηθεί η αλυσιδωτή αντίδραση θα πρέπει πρώτα να γίνει απομόνωση , καθαρισμός και υπολογισμός της συγκέντρωσης των νουκλεϊκών οξέων των φυτών , που πρόκειται να ελεγχθούν για το αν έχουν η όχι το επιζητούμενο γονίδιο .

Σε όλες τις περιπτώσεις η αντίδραση της PCR έγινε σε όγκο 50 μ l , ενώ το μείγμα PCR περιείχε : PCR buffer x 10 5 μ l , MgCl₂ (25mM) 4 μ l (προσθήκη MgCl₂ μόνο στην περίπτωση που η Tag polymerase δεν το περιέχει) , dNTP's (2mM) 5 μ l , εκκινητές A, B συγκέντρωσης 1 mg/ml 0,5 μ l , Taq polymerase (2,5 Units) 0,25 μ l, ποσότητα DNA τόση, ώστε η συγκέντρωση του να είναι 8 mg/ 50 μ l . Ανάλογα με την ποσότητα του κάθε δείγματος , που θα προστίθεται στην αντίδραση , ρυθμίζονταν και η ποσότητα του νερού millipore - αποστειρωμένο , που θα έπρεπε να προστεθεί για να συμπληρώσει τον όγκο 50 μ l για την αντίδραση . Αφού γινόταν η ανάμειξη της ποσότητας του μείγματος και της ποσότητας του δείγματος , όπου ο συνολικός όγκος ήταν 50 μ l , ακολουθούσε

τοποθέτηση του στον θερμικό ανακυκλωτή , όπου επιλέγονταν το κατάλληλο θερμικό πρόγραμμα για τον ιό TRV. Με τη μέθοδο αυτή πολλαπλασιαζόταν το επιζητούμενο γονίδιο σε πολλά αντίγραφα . Το πρόγραμμα πραγματοποιούσε διαχωρισμό των αλυσίδων DNA , στους 95 °C για 1 λεπτό , ενώ έπονταν 5 κύκλοι αποτελούμενοι ο καθένας από 1 λεπτό στους 94 °C και 30 δευτερόλεπτα στους 55 °C . Ακολουθούσαν 25 κύκλοι αποτελούμενοι ο καθένας από 30 δευτερόλεπτα στους 94 °C , 30 δευτερόλεπτα στους 55 °C και 30 δευτερόλεπτα στους 72 °C και φύλαξη των δειγμάτων στους 4 °C , μέχρι την χρησιμοποίησή τους . Στους 94 °C γίνονταν ο διαχωρισμός των αλυσίδων DNA και ευθυγράμμιση αυτών , στους 55 °C ο υβριδισμός των εκκινητών στα σημεία του DNA , όπου υπήρχε το ενσωματωμένο γονίδιο του TRV και στους 72 °C η σύνθεση των νέων αλυσίδων. Αφού τελείωνε η αντίδραση της PCR , ακολουθούσε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της στα 180 V και 70 mA , η οποία γινόταν ως εξής : Μέσα σε φιάλη κωνική , προστέθηκαν 0,5 g αγαρόζης (Agarose electrophoresis grade) και TBE (Tris - Borate - EDTA) x1 buffer μέχρι τα 50 ml και το παρασκεύασμα αυτό το τοποθετήθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων, μέχρι να λιώσει πλήρως η αγαρόζη και εν συνεχεία προστέθηκε 1 ml βρωμιούχο αιθύδιο (ethidium - bromide) , προκειμένου να γίνει η χρώση του DNA και να μπορέσουμε να αναγνώσουμε τις μπάντες . Στη συνέχεια τοποθετήθηκε το παρασκεύασμα στο δίσκο της συσκευής ηλεκτροφόρησης , σε πλήρης οριζοντίωση , για να στερεοποιηθεί και να έχει ομοιόμορφο πάχος το gel . Αφού στερεοποιήθηκε , σε κάθε κυψελίδα του gel βάλθηκαν 20 μl από τα προϊόντα της PCR , στα οποία πριν είχε προστεθεί χρωστική bromophenol blue

σε ποσότητα 8 μl/ 50μl προϊόντος . Εκτός από τα δείγματα που θέλαμε να ηλεκτροφορήσουμε , τοποθετήσαμε έναν μάρτυρα (marker) μοριακού βάρους , που μας δίνει ζώνες με συγκεκριμένα μοριακά βάρη , ώστε να μπορέσουμε να συγκρίνουμε τη ζώνη που θα δώσουν τα προϊόντα της PCR με το μέγεθος που περιμένουμε , μια κυψελίδα με νερό για να είμαστε σίγουροι ότι η αντίδραση έγινε χωρίς προβλήματα (δεν έδωσε ψευδείς ζώνες) , και τέλος μια κυψελίδα με έναν αρνητικό μάρτυρα . Αφού έγινε η τοποθέτηση στις κυψελίδες των δειγμάτων , διοχετεύθηκε ρεύμα τάσης 180V και έντασης 70mA , για διάστημα περίπου μιας ώρας και ακολούθησε ανάγνωση του gel σε υπεριώδης ακτινοβολία . (Τεχνικό φυλλάδιο Εργαστηρίου Ιολογίας , Μ.Φ.Ι.)

Καλλιέργεια S1 σπόρων τροποποιημένων φυτών

Είναι το στάδιο εκείνο της έρευνας , όπου έχουμε την καλλιέργεια σπόρων S1 γενεάς (θα δώσουν την F1 γενεά φυτών), που προήλθαν από αυτογονιμοποίηση τροποποιημένων φυτών , τα οποία όπως αποδείχθηκε τόσο με μηχανικές μολύνσεις , όσο και μεθόδους ανίχνευσης του επιζητούμενου γονιδίου , ότι ήταν ανθεκτικά στον TRV και περιείχαν το γονίδιο της 59K πολυμεράσης . Η διαδικασία αυτή είχε σαν σκοπό την επιλογή των φυτών F1 , με τις διάφορες μεθόδους ελέγχου , τα οποία ήταν ανθεκτικά στον ιό και περιείχαν το επιζητούμενο γονίδιο , προκειμένου να προχωρήσουμε σε αυτογονιμοποιήσεις αυτών , μέχρις ότου επιτευχθεί παραγωγή σπόρων που θα περιέχουν το γονίδιο 59K πολυμεράση σε ομοζύγωτη μορφή . Επιτυχάνοντας

έτσι το μεγάλο βήμα για την παραγωγή ομοζύγωτων ανθεκτικών διαγονιδιακών φυτών .

Η καλλιέργεια των σπόρων έγινε " in vitro " . Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε σε laminar flow προκειμένου να εξασφαλισθούν ασηπτικές συνθήκες , καθώς επίσης και όλα τα εργαλεία και υλικά ήταν αποστειρωμένα . Η διαδικασία ξεκίνησε με την απολύμανση των σπόρων . Αρχικά εμβαπτίστηκαν σε αλκοόλη 70% για 1 λεπτό και εν συνεχεία αφού στραγγίστηκαν , τοποθετήθηκαν σε διάλυμα χλωρίνης 20% (20 ml χλωρίνης + 80 ml νερό + 1 σταγόνα twin) για 12 λεπτά . Τέλος αφού στραγγίστηκαν , ξεπλύθηκαν με αποστειρωμένο νερό για 15 λεπτά προκειμένου να απομακρυνθεί τελείως η χλωρίνη . Οι σπόροι στην συνέχεια τοποθετήθηκαν σε γυάλες με θρεπτικό διάλυμα MS-30 (πιν .4.1) .

Στο διάλυμα είχαν προστεθεί 40 mg /ml του αντιβιοτικού kanamycin και οι ορμόνες folic acid , IAA , kinetine στις αναλογίες 0,1 mg / 100ml , 0,875 mg / 100ml , 1mg / 100ml αντίστοιχα . Η καναμυκίνη όπως αναφέρθηκε και πριν , χρησιμοποιήθηκε ως μία ουσία για την επιλογή των μετασχηματισμένων σπόρων και την απομάκρυνση των μη τροποποιημένων , αφού μαζί με το γονίδιο της πολυμεράσης είναι συνδεδεμένο και το γονίδιο npt II που προσέδιδε ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη .

Αφού οι σπόροι τοποθετήθηκαν στις αποστειρωμένες γυάλες με το διάλυμα , καλύφθηκαν με τις ειδικές ζελατίνες με φίλτρο, ώστε να γίνεται η ανταλλαγή των αερίων , χωρίς να υπάρχουν προβλήματα μόλυνσης και τοποθετήθηκαν σε ειδικό θάλαμο όπου η θερμοκρασία διατηρείτο στους 21 °C και υπήρχε φωτοπερίοδος 16 ωρών . Επάνω σε κάθε γυάλα αναγράφονταν ο κωδικός της

σειράς από την οποία προήλθαν οι σπόροι και η ημερομηνία καλλιέργειας .

Τα φυτά που προήλθαν από την βλάστηση των σπόρων , μεταφέρθηκαν στο θερμοκήπιο προκειμένου να επιλεγούν εκείνα , τα οποία είναι ανθεκτικά στις μολύνσεις με τον ιό και περιέχουν το επιθυμητό γονίδιο ανθεκτικότητας στο γένωμα τους . Για να προχωρήσουμε έτσι στην αυτογονιμοποίηση τους για την παραγωγή ομοζύγωτου σπόρου όπως είδαμε στην αρχή .

Μηχανικές μολύνσεις φυτών

Οι μηχανικές μολύνσεις των φυτών καπνού , με διάφορες φυλές του TRV , χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση ανθεκτικών φυτών , από αυτά που ήταν γενετικά τροποποιημένα . Η διαδικασία αυτή αφορούσε φυτά καπνού S 53 υγιά ,γενετικά τροποποιημένα, που προέρχονταν από μικροπολλαπλασιασμό . Τα φυτά αυτά , βρίσκονταν σε γλάστρες με τύρφη στον χώρο του θερμοκηπίου , αφού πρώτα είχαν εγκλιματισθεί για μερικές ημέρες στους 25 °C με φωτοπερίοδο 16 ωρών . Οι μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν σε 3-6 φύλλα για κάθε φυτό , τα οποία είχαν επιπασθεί με carborundum , σκόνη που δημιουργεί όταν τριφτεί ρωγμές στο κυτταρικό τοίχωμα και διευκολύνει την είσοδο του ιού . Για να παρασκευασθεί το μόλυσμα , χρησιμοποιήθηκαν περίπου 500 mg φύλλων , τα οποία ομογενοποιήθηκαν με 10 ml νερού . Τα φύλλα που χρησιμοποιήθηκαν για το μόλυσμα πάρθηκαν από φυτά που εμφάνιζαν τυπικά συμπτώματα προσβολής από τον ιό . Το ομογενοποιημένο παρασκεύασμα απλώθηκε προσεκτικά με το χέρι ,

στα φύλλα των προς έλεγχο φυταρίων , ώστε να μην προκληθούν σοβαρές μηχανικές ζημιές στο φύλλα . Οι μολύνσεις έγιναν σε φύλλα που δεν ήταν κορυφαία , ώστε να μπορεί να διαπιστωθεί η διασυστηματική προσβολή με την πάροδο του χρόνου . Αφού τελείωσε η μόλυνση τα φυτά ξεπλύθηκαν με νερό , για να απομακρυνθεί το carbohydrate από τα φύλλα , καθώς και τα ένζυμα που βρίσκονται στην επιφάνεια και παρεμποδίζουν την διείσδυση του ιού . Μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν με δυο φυλές του ιού TRV , την φυλή SYM από την οποία είχε ληφθεί το γονίδιο της 59 K πολυμεράσης (ομόλογος φυλή) και τη φυλή GR του ιού , η οποία είναι η φυλή που συναντάται στην Ελλάδα και αποτελεί ιδιαίτερο ορότυπο .

4.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μικροπολλαπλασιασμός των φυτών καπνού

Από τα φυτά καπνού που έγινε προσπάθεια τροποποίησης , αναγεννήθηκαν 72 σειρές , εκ των οποίων 54 σειρές ριζοβόλησαν, σε διάλυμα που περιείχε το αντιβιοτικό kanamycin και 18 σειρές απέτυχαν να ριζοβολήσουν . Οι τελευταίες αυτές σειρές , πιθανώς να μην είχαν τροποποιηθεί γενετικά με το γονίδιο του ιού . Τα αποτελέσματα της ριζοβολίας , των αναγεννημένων τροποποιημένων φυτών παρατίθενται στον πίνακα 4.9

Πιν. 4.9. Αποτελέσματα της ριζοβολίας των γενετικώς τροποποιημένων φυτών καπνού , που κατάφεραν να αναγεννηθούν

προσπάθεια τροποποίησης φυλλικών δίσκων καπνού	Κλώνος βακτηρίου	Σειρά αναγεν/νων φυτών	Συνολικός κωδικός αναγεν/νων φυτών	Αποτέλεσμα ριζοβολίας
A	# 3	7	A# 3/7	-
A	# 3	8	A# 3/8	-
A	# 3	10	A# 3/10	+
A	# 3	17	A# 3/17	+
A	# 3	38	A# 3/38	+
A	# 7	1	A# 7/1	-
A	# 7	36	A# 7/36	-
A	# 7	37	A# 7/37	+
A	# 7	45	A# 7/45	-

προσπάθεια τροποποίησης φυλλικών δίσκων καλνού	Κλώνος βακτηρίου	Σειρά αναγεν/νων φυτών	Συνολικός κωδικός αναγεν/νων φυτών	Αποτέλεσμα ριζοβολίας
A	#7	46	A# 7/46	-
A	# 7	47	A# 7/47	-
A	# 7	58	A# 7/58	+
A	# 17	2	A#17/2	+
A	# 17	4	A#17/4	-
A	# 17	35	A#17/35	+
B	# 3	13	B# 3/13	+
B	# 3	18	B# 3/18	+
B	# 3	26	B# 3/26	+
B	# 3	27	B# 3/27	+
B	# 3	28	B# 3/28	+
B	# 3	29	B# 3/29	+
B	# 3	39	B# 3/39	-
B	# 3	40	B# 3/40	-
B	# 3	41	B# 3/41	+
B	# 3	48	B# 3/48	+
B	# 3	49	B# 3/49	+
B	# 7	11	B# 7/11	+
B	# 7	21	B# 7/21	+
B	# 7	23	B# 7/23	-
B	# 7	24	B# 7/24	+
B	# 7	43	B# 7/43	+
B	# 7	44	B# 7/44	-
B	# 7	50	B# 7/50	+

προσπάθεια τροποποίησης φυλλικών δίσκων καπνού	Κλώνος βακτηρίου	Σειρά αναγεν/νων φυτών	Συνολικός κωδικός αναγεν/νων φυτών	Αποτέλεσμα ριζοβολίας
B	# 7	51	B# 7/51	+
B	# 7	52	B# 7/52	+
B	# 7	62	B# 7/62	+
B	# 7	63	B# 7/63	+
B	# 7	68	B# 7/68	+
B	# 7	79	B# 7/79	+
B	# 7	82	B# 7/82	+
B	# 17	3	B# 17/3	+
B	# 17	30	B# 17/30	-
B	# 17	31	B# 17/31	-
B	# 17	32	B# 17/32	-
B	# 17	33	B# 17/33	+
B	# 17	34	B# 17/34	-
B	# 17	54	B# 17/54	+
B	# 17	55	B# 17/55	+
B	# 17	70	B# 17/70	+
B	# 17	80	B# 17/80	+
B	# 17	84	B# 17/84	+
B	# 17	85	B# 17/85	-
C	# 3	75	C# 3/75	+
C	# 3	76	C# 3/76	+
C	# 3	77	C# 3/77	+
C	# 3	78	C# 3/78	+
C	# 3	81	C# 3/81	+

προσπάθεια τροποποίησης φυλλικών δίσκων καπνού	Κλώνος βακτηρίου	Σειρά αναγεν/νων φυτών	Συνολικός κωδικός αναγεν/νων φυτών	Αποτέλεσμα ριζοβολίας
C	# 7	53	C# 7/53	+
C	# 7	60	C# 7/60	+
C	# 7	61	C# 7/61	+
C	# 7	64	C# 7/64	+
C	# 7	65	C# 7/65	+
C	# 7	66	C# 7/66	+
C	# 7	69	C# 7/69	+
D	# 3	71	D# 3/71	+
D	# 3	83	D# 3/83	+
D	# 7	86	D# 7/86	+
D	# 7	87	D# 7/87	+
D	# 7	89	D# 7/89	+
D	# 17	67	D# 17/67	+
D ¹	# 17 ²	88 ³	D# 17/88	+

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

² Τα σύμβολα # 3, # 7, # 17 , αντιστοιχούν σε κάθε ένα από τους κλώνους του βακτηρίου *A.tumefaciens* με το οποίο έγινε η τροποποίηση .

³ Το κάθε ένα από τα νούμερα αυτά , συμβολίζει κάθε μια από τις σειρές που κατάφεραν να αναγεννηθούν .

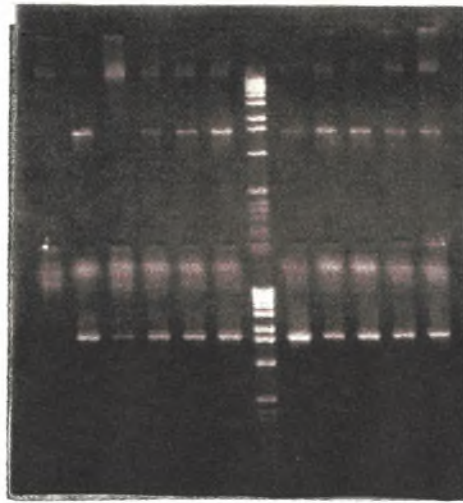
Οι σειρές που δεν κατάφεραν να ριζοβολήσουν , σε διάλυμα που περιείχε το αντιβιοτικό kanamycin και στις οποίες προφανώς δεν είχε επιτευχθεί η γενετική τροποποίηση με το γονίδιο του ιού,

απορρίφθηκαν . Οι σειρές αυτές ήταν οι εξής : A# 7/1 , A# 17/4 , A# 17/6 , A# 3/7 , A# 3/8 , B# 7/23 , B# 17/30 , B# 17/31 , B# 17/32 , B# 17/34 , A# 7/36 , B# 3/39 , B# 3/40 , B# 7/44 , A# 7/45 , A# 7/46 , A# 7/47 , B# 17/85 .

Τα φυτά που προέκυψαν από τον πολλαπλασιασμό ορισμένων σειρών , ελέγχθηκαν με αντιδράσεις PCR , μηχανικές μολύνσεις και Southern blotting(δεν αποτέλεσαν μέρος της εργασίας μου , αλλά τα αποτελέσματα ήταν απαραίτητα για την συνέχιση της) , ώστε να διατηρηθούν εκείνα τα οποία περιείχαν το γονίδιο του ιού και ήταν ανθεκτικά στη μόλυνση με τον ιό .

Έλεγχος παρουσίας του επιθυμητού γονιδίου με τη μέθοδο PCR

Τα τροποποιημένα φυτά που ριζοβόλησαν , ελέγχθηκαν με PCR, για να διαπιστωθεί η ενσωμάτωση ή όχι του επιζητούμενου γονιδίου στο γένωμα τους . Οι σειρές που ελέγχθηκαν ήταν : A# 7/1 , A# 17/2 , A# 3/10 , B# 3/13 , B# 3/19 , B# 7/23 , B#3/26 , B# 3/27 , B# 3/28 , A# 7/37 , B# 7/44 , B# 7/51 , B# 7/52 , B#17/54 , B# 17/55 , D# 3/71 , C# 3/78 , B# 7/24 , C# 3/75 , C# 3/77 , C# 3/81 , D# 7/89 και το φυτό original S53 ,ως αρνητικός μάρτυρας . Τα αποτελέσματα της PCR , ήταν θετικά ως προς την ύπαρξη του επιζητούμενου γονιδίου στις ακόλουθες σειρές : 1 φυτό της σειράς B# 7/51 , 2 φυτά της B# 7/24(α,β) , 1 φυτό της C# 3/75 , 2 από τη σειρά C# 3/77 (α,β), 4 από τη σειρά C# 3/81(α,β,γ,δ) και τέλος 1 φυτό από τη σειρά D# 7/89 . Από το φυτό original S53 (υγιές μη τροποποιημένο φυτό καπνού) πάρθηκαν πάντα αρνητικά αποτελέσματα, ενώ ο θετικός μάρτυρας (τροποποιημένο βακτήριο E. coli) έδωσε πάντα θετικά αποτελέσματα στην PCR (εικονα 4.1).



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Εικόνα 4.1 . Θετική ένδειξη στην αντίδραση της PCR για τις σειρές 51, 24, 75, 77, 81, 89 , που βρίσκονται στις γραμμές 4,5,6,8,9,10 .

Αποτελέσματα της μεθόδου Southern blotting

Η μέθοδος αυτή , η οποία δεν αποτέλεσε μέρος της πειραματικής μου εργασίας , αλλά τα αποτελέσματα της είναι σημαντικά για τη συνέχιση της εργασίας , χρησιμοποιήθηκε συμπληρωματικά ώστε να διασταυρωθούν τα αποτελέσματα της PCR , για κάποια θετικά δείγματα .

Αποτελέσματα μηχανικών μολύνσεων με τον ιό TRV.

Οι μηχανικές μολύνσεις , δεν αποτέλεσαν μέρος της εργασίας μου , αλλά τα αποτελέσματα είναι απαραίτητο να αναφερθούν , για να γίνει κατανοητό ποιά φυτά χρησιμοποιήθηκαν για τη συνέχιση της εργασίας . Οι μολύνσεις έγιναν με δυο φυλές του ιού , την TRV-SYM και TRV-GR . Ανθεκτικότητα στη φυλή SYM του ιού εμφανίστηκε στις ακόλουθες περιπτώσεις . Στη σειρά "24" σε ένα φυτό , στη σειρά "51" σε ένα φυτό , στη σειρά "75" σε τρία φυτά (α,β,γ) , στην "77" σε ένα φυτό , 4 φυτά της σειράς "81"(α,β,γ,δ)

και ένα από τη σειρά "89". Δυστυχώς, όλες οι σειρές ήταν ευαίσθητες στην ελληνική φυλή TRV-GR. .

Από τον έλεγχο με τις παραπάνω μεθόδους, οι τροποποιημένες σειρές καπνού που έδωσαν θετικά αποτελέσματα, δηλαδή περιείχαν το γονίδιο του ιού και ήταν ανθεκτικές στις μολύνσεις με τον ιό ήταν B# 7/24, B# 7/51, C# 3/75, C# 3/77, C# 3/81, D# 7/89.

Οι έξι σειρές των τροποποιημένων φυτών που έδωσαν θετικά αποτελέσματα, αυτογονιμοποιήθηκαν για την παραγωγή S1 σπόρου.

Αποτελέσματα μηχανικών μολύνσεων F1 φυτών

Για την πραγματοποίηση των μηχανικών μολύνσεων, χρησιμοποιήθηκαν F1 φυτά, που προήλθαν από S1 σπόρο των σειρών, που έδωσαν θετικά αποτελέσματα και προκρίθηκαν από τους προηγούμενους ελέγχους. Αυτές ήταν οι εξής: "24", "51", "75", "77", και "81". Φυτά F1 της σειράς "89" δεν χρησιμοποιήθηκαν, γιατί δεν υπήρξε σπόρος S1 της σειράς αυτής. Για τις μολύνσεις χρησιμοποιήθηκαν δυο φυλές του ιού, η TRV-SYM και TRV-GR.. Μολύνσεις με τη φυλή SYM πραγματοποιήθηκαν σε φυτά και των 5 σειρών. Τα στοιχεία των μολύνσεων με τη φυλή SYM δίνονται στον πίνακα 4.10

Πιν. 4.10. Αποτελέσματα των μολύνσεων με τον TRV-SYM

Μολυνθείσες σειρές καπνού	Αριθμός φυτών	Φυτά με τοπικά συμπτώματα ¹	Φυτά με διασυστηματικά συμπτώματα ²
B# 7/24	38	38	33
B# 7/51	30	30	28
C# 3/75	6	6	5
C# 3/81	19	19	15
C# 3/77	21	21	17

¹Με τον όρο τοπικά συμπτώματα εννοούνται τα συμπτώματα που εμφανίζονται στα φύλλα στα οποία έγινε η μηχανική μόλυνση (Νεκρωτικές κηλίδες και σχέδια)

²Με τον όρο διασυστηματικά συμπτώματα ,εννοούνται τα συμπτώματα που εμφανίζονται στο στέλεχος ,στους μίσχους των φύλλων η και στα φύλλα που δεν έγινε μηχανική μόλυνση , λόγω της διασυστηματικής κίνησης των ισοσωματίων εντός του φυτού (νεκρωτικές κηλίδες , σχέδια , μωσαϊκό , κατσάρωμα) .

Ανθεκτικότητα στη φυλή SYM του ιού TRV εμφανίστηκε στις ακόλουθες περιπτώσεις . Στη σειρά "24" όπου 5 από τα F1 φυτά που μολύνθηκαν , εμφάνισαν μόνο τοπικά συμπτώματα με μέτριες

κηλίδες , ενώ τα υπόλοιπα μολύνθηκαν και διασυστηματικά , 2 φυτά της σειράς "51" εμφάνισαν μόνο τοπικές κηλίδες , ενώ τα υπόλοιπα μολύνθηκαν και διασυστηματικά , 1 F1 φυτό της σειράς "75" με ελάχιστες τοπικές κηλίδες μη εξελιγμένες , ενώ τα υπόλοιπα μολύνθηκαν τοπικά και διασυστηματικά , 4 F1 φυτά από τη σειρά "81" με ελάχιστες τοπικές κηλίδες χωρίς εξάπλωση ενώ όλα τα υπόλοιπα μολύνθηκαν τοπικά και διασυστηματικά και τέλος 2 F1 φυτά από τη σειρά "77" δεν έδωσαν συμπτώματα , δυο με μη εξελιγμένες τοπικές κηλίδες , ενώ όλα τα υπόλοιπα μολύνθηκαν και διασυστηματικά .

Μηχανικές μολύνσεις με την φυλή TRV-GR του ιού έγιναν σε F1 φυτά της σειράς "81" (α , γ) , τα αποτελέσματα δίνονται στον πίνακα 4.11.

Πιν. 4.11. Αποτελέσματα των μολύνσεων με τον TRV-SYM

Μολυνθείσες σειρές καπνού	Αριθμός φυτών	Φυτά με τοπικά συμπτώματα ¹	Φυτά με διασυστηματικά συμπτώματα ²
# 81 α	20	20	20
# 81 γ	7	7	7

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

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

Ανθεκτικότητα, στην ελληνική φυλή (GR.) του ιού δεν εμφανίστηκε σε κανένα F1 φυτό της σειράς "81", όπου είχαμε έντονα τοπικά και διασυστηματικά συμπτώματα .

4.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με βάση τα αποτελέσματα από τον εργαστηριακό έλεγχο των φυτών καπνού , για την ενσωμάτωση του γονιδίου της 59 K πολυμεράσης του ιού TRV , ευρέθηκαν τα ακόλουθα στοιχεία .

Τα παραχθέντα με μικροπολλαπλασιασμό γενετικώς τροποποιημένα φυτά καπνού άνηκαν σε 72 σειρές , από τις οποίες 18 σειρές φυτών δεν είχαν ικανοποιητική ανάπτυξη σε διάλυμα ριζοβολίας που περιείχε το αντιβιοτικό kanamycin . Οι σειρές αυτές των φυτών δεν πρέπει να είχαν τροποποιηθεί επιτυχώς , καθόσον δεν υπήρχε ενσωματωμένο το γονίδιο npt II που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό kanamycin και το οποίο είναι συνδεδεμένο με το γονίδιο της 59 K πολυμεράσης του TRV .

Από τον έλεγχο των τροποποιημένων φυτών (που ήταν ανθεκτικά στην καναμυκίνη) , διαπιστώθηκαν με την αντίδραση της PCR τα ακόλουθα στοιχεία : Θετική ένδειξη στη αντίδραση πάρθηκε από έξι μόνον σειρές καπνού . Στις αντιδράσεις της PCR εμφανίστηκε το φαινόμενο της ύπαρξης διαφορετικών αποτελεσμάτων σε φυτά της ίδιας σειράς , το οποίο χρήζει περαιτέρω διερεύνηση , αφού όλα τα φυτά της ίδιας σειράς προέρχονταν από το μικροπολλαπλασιασμό ενός αρχικού μητρικού φυτού .

Μια εξήγηση για την εμφάνιση ανομοιομορφων αποτελεσμάτων στις αντιδράσεις PCR , θα μπορούσε να αποτελέσει η ύπαρξη σε ορισμένα εκ των φυτών , μη τροποποιημένου *Agrobacterium* , το οποίο πιθανώς να μην εξοντώθηκε από τα αντιβιοτικά που υπήρχαν στο διάλυμα ριζοβολίας . Στην πιθανή αυτή περίπτωση, κάποια από τα φυτά αυτά θα είχαν ανθεκτικότητα στην kanamycin, χωρίς όμως να έχουν τροποποιηθεί με το γονίδιο του ιού . Η περίπτωση αυτή

αποκλείστηκε , αφού φύλλα που πάρθηκαν από φυτά καπνού , τα οποία είχαν ανθεκτικότητα στην kanamycin αλλά έδωσαν αρνητική ένδειξη στην PCR , ελέγχθηκαν από το Εργαστήριο Βακτηριολογίας του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου και δεν απομονώθηκε από αυτά *Agrobacterium*. Εξάλλου όταν τα παραπάνω φυτά χρησιμοποιήθηκαν για μικροπολλαπλασιασμό και τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα ριζοβολίας χωρίς cefotaxime (η οποία θανατώνει το *Agrobacterium*) , δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη βακτηρίων .

Άλλες πιθανές εξηγήσεις είναι α) η ύπαρξη υπολειμμάτων αλκοόλης κατά τον καθαρισμό του DNA , τα οποία παρεμποδίζουν την PCR ή β) το χρωμοσωμικό DNA να έχει τέτοια κλειστή δομή , ώστε να μην μπορούν οι εκκινητές να ανιχνεύσουν το γόνο, με αποτέλεσμα να παίρνουμε αρνητική ένδειξη στην PCR , ενώ στην πραγματικότητα το φυτό να περιέχει στο γένωμα του το επιζητούμενο γονίδιο . Όλα αυτά βέβαια είναι πιθανές εξηγήσεις οι οποίες χρειάζονται περαιτέρω διερεύνηση . (Μαρκουλάτος , Π. , κ.α. , 1996)

Η πιο βάσιμη όμως εξήγηση για την ανομοιομορφία αυτή μεταξύ των φυτών της ίδιας σειράς , όσον αφορά στις αντιδράσεις της PCR , είναι ότι πιθανόν οι εκκινητές μας (primers) να μην ήταν τόσο αποτελεσματικοί . Η υπόθεση αυτή επαληθεύτηκε από δοκιμές που έγιναν με την χρησιμοποίηση μιας δεύτερης ομάδας εκκινητών (primers), για τις σειρές που παρουσίαζαν την ανομοιομορφία των αποτελεσμάτων . Από την εικόνα 4.2 φαίνεται ότι για το ίδιο γενετικό υλικό , λάβαμε διαφορετικές αντιδράσεις PCR , χρησιμοποιώντας 2 διαφορετικά ζεύγη εκκινητών .

Από τις σειρές οι οποίες ριζοβόλησαν και οι οποίες στη συνέχεια δοκιμάσθηκαν στο εργαστήριο με τεχνητές μολύνσεις , με τη φυλή SYM του ιού TRV , εμφάνισαν ανθεκτικότητα στον ιό (δεν έδειξαν συμπτώματα) . Όμως η ανθεκτικότητα αυτή δεν παρατηρήθηκε σε όλα τα φυτά της ίδιας σειράς . Οι 6 σειρές φυτών στις οποίες είχε διαπιστωθεί με την PCR , η παρουσία του γονιδίου της 59 K πολυμεράσης , παρουσίασαν ικανοποιητική ανθεκτικότητα στη μόλυνση με τον TRV-SYM . Αντίθετα οι σειρές, στις οποίες δεν διαπιστώθηκε η παρουσία του επιθυμητού γονιδίου , έδωσαν έντονα τοπικά και διασυστηματικά συμπτώματα . Κατά τη δοκιμή με μηχανικές μολύνσεις των τροποποιημένων φυτών , όλοι οι μάρτυρες (υγιή μη τροποποιημένα φυτά) εμφάνισαν έντονα τοπικά και διασυστηματικά συμπτώματα .

Σύμφωνα λοιπόν με τους πρώτους ελέγχους των διαγονιδιακών φυτών καπνού , βρέθηκαν τελικά έξι σειρές που παρουσίασαν ανθεκτικότητα στις μηχανικές μολύνσεις με τη φυλή SYM του TRV . Ακολούθησε σειρά αυτογονιμοποιήσεων , με σκοπό την παραγωγή υλικού ομοζύγωτου ως προς το επιθυμητό γονίδιο .

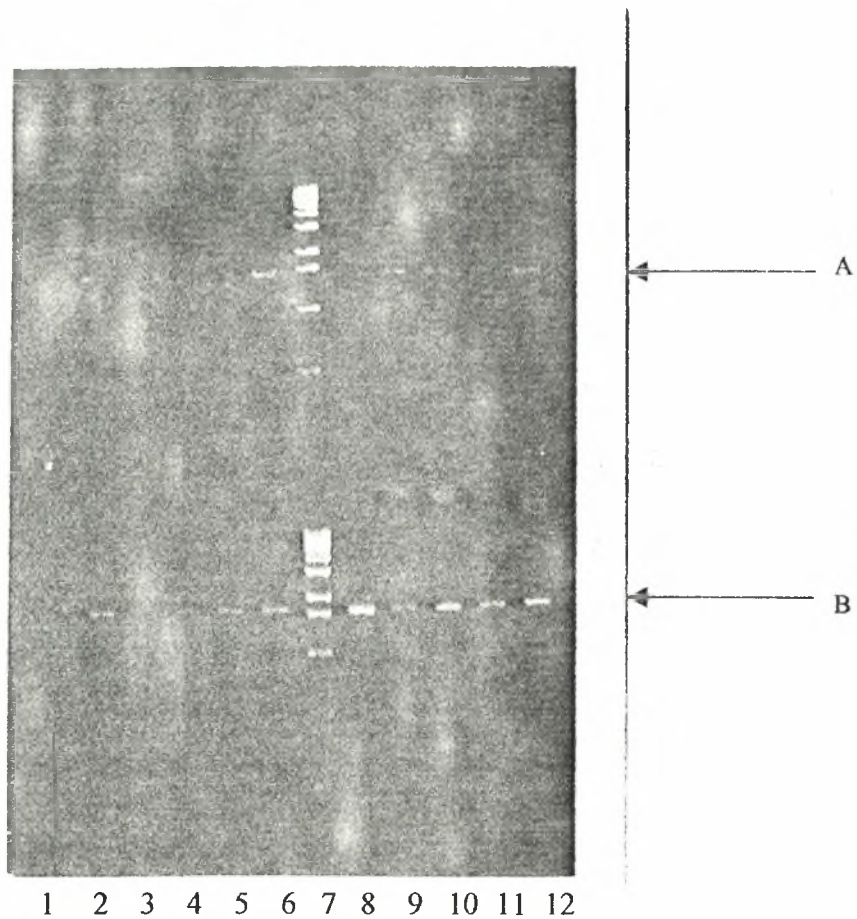
Τα F₁ φυτά , ελέγχθηκαν με τεχνητές μολύνσεις , για την ανθεκτικότητα τους στις διάφορες φυλές του TRV , όπως η SYM , K20 και GR. (ελληνική φυλή) . Τα F₁ φυτά και των πέντε σειρών έδειξαν ανθεκτικότητα στις φυλές SYM και K20 . Υπήρξαν όμως και στις πέντε σειρές φυτά που εμφάνιζαν μόνο ελαφρότατα τοπικά συμπτώματα , χωρίς να παρατηρείται εξάπλωση του ιού στα υπόλοιπα μέρη του ,περιορίζοντας έτσι την ασθένεια . Τούτο πιθανόν να οφείλεται στην ετεροζυγωτία του σπόρου , σε συνδυασμό με τον αριθμό ενσωμάτωσης περισσοτέρων του ενός αντιγράφων του γονιδίου , στον πυρήνα του φυτού . Αντίθετα στις μολύνσεις που

έγιναν με τη φυλή GR δεν υπήρξε κανένα φυτό των πέντε παραπάνω σειρών που να εμφανίζει κάποια μορφή ανθεκτικότητας. Φαίνεται λοιπόν ότι, η ενσωμάτωση στο γένωμα του φυτού του γονιδίου της 59 K πολυμεράσης, προσδίδει ανθεκτικότητα μόνο στη περίπτωση μόλυνσης με την ομόλογη φυλή (SYM), ή με φυλή που ανήκει στον ίδιο ορότυπο (K20), όχι όμως με φυλές διαφορετικού ορότυπου. Τα ίδια αποτελέσματα υπήρξαν σε εργασία με διαγονιδιακά φυτά καπνού, τα οποία εξέφραζαν τον γονίδιο της καψιδιακής πρωτεΐνης του ιού TRV των φυλών, PLB και TCM, τα οποία έδειχναν ανθεκτικότητα έναντι της ομόλογης φυλής, αλλά ήταν ευαίσθητα στην προσβολή με ετερόλογες φυλές. Σύμφωνα με αυτά, για να υπάρχει προστασία θα πρέπει να υπάρχει υψηλό ποσοστό ομολογίας, μεταξύ της καψιδιακής πρωτεΐνης του ιού, που εκφράζεται από το φυτό και εκείνης των φυλών που το προσβάλλουν. (Gonsalves, D. and Slightom, J. L., 1993)

Βέβαια, τα γενετικά τροποποιημένα αυτά φυτά καπνού που είναι ανθεκτικά στις μηχανικές μολύνσεις με τον TRV-SYM, θα πρέπει να ελεγχθούν και κατά πόσο διατηρούν την ανθεκτικότητα αυτή όταν γίνουν μολύνσεις με τους νηματώδεις - φορείς του ιού, καθώς και όταν δοκιμασθούν σε φυσικές συνθήκες αγρού (ξηρασία, υψηλές θερμοκρασίες). Η εργασία αυτή όπως και οι δοκιμές στον αγρό, είναι ένα απαραίτητο βήμα μεταξύ της δημιουργίας νέας ανθεκτικής σε ιούς ποικιλίας και της εισαγωγής της στην γεωργική πράξη. Σημειώνεται ότι η μόλυνση με νηματώδεις θα πρέπει να γίνει σε εντομοστεγή κλωβό ώστε να εξασφαλισθεί η απομόνωση του τροποποιημένου γενετικά υλικού. (Kaniewski, W.K. and Thomas, P.E., 1993)

Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με διαγονιδιακά φυτά καπνού, τα οποία εξέφραζαν το γονίδιο της καψιδιακής πρωτεΐνης του TRV , αποδείχθηκε ότι ενώ ήταν ανθεκτικά σε μηχανικές μολύνσεις με τον TRV , ήταν επιδεκτικά σε μολύνσεις με τους φορείς-νηματώδεις του ιού . (Ploeg, T.A., et al , 1993)

Από όλα τα παραπάνω εξάγεται το συμπέρασμα ότι η εφαρμογή της γενετικής μηχανικής , για τη μεταφορά γονιδίων ιών σε φυτά ξενιστές τους υπόσχεται πολλά στην δημιουργία φυτών ανθεκτικών στους ιούς . Τα χρόνια στα οποία η μέθοδος δημιουργίας διαγονιδιακών φυτών , με τη χρησιμοποίηση τροποποιημένων στελεχών του *Agrobacterium* είναι γνωστή , έχει επιτευχθεί σημαντική πρόοδος όσον αφορά τη μεταφορά χρήσιμων στη γεωργία γονιδίων . Στα γονίδια αυτά περιλαμβάνονται και κάποια που προσφέρουν στα φυτά , ανθεκτικότητα σε ιώσεις . Υπάρχουν παραδείγματα διαγονιδιακών φυτών , που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στους ιούς TMV , PVX , PVY , CMV , PEBV κ.α , τα οποία στα επόμενα χρόνια θα είναι πολύ περισσότερα . (Gonsalves, D. and Slightom, J. L., 1993 / Carr, J.P. and Zaitlin, M., 1993)



Εικόνα 4.2 . Διαφορετικές ενδείξεις στην αντίδραση της PCR με τη χρησιμοποίηση δυο διαφορετικών ζευγών εκκινητών (A , B) για το ίδιο γενετικό υλικό

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- AAB Description of plant viruses ,(December 1989). Tobacco rattle virus . No 346 (No 12 revised)
- Angement, C. G., Van De Oувeland, M.J., Bol, J. F. , (1990) . *Susceptibility to virus infection of transgenic tobacco plants expressing structural and non structural genes of tobacco rattle virus* . Virology , 175 : 191-198 .
- Carr, J. P. and Zaitlin ,M. , (1993) . *Replicase - mediated resistance* . Virology , vol 4 : 339-347 .
- Gasser, C. S. , Fraley, R. T. (1989). *Genetically engineering plants for crop improvement* . Science 244, 1293-1299 .
- Gonsalves, D. and Slightom, J. L. (1993) . *Coat protein - mediated protection : analysis of transgenic plants for resistance in a variety of crops* . Virology vol 4 : 397-405 .
- Goodman, R. M. , Hauptli, H., Crossway, A., Knauf, V.C. , (1987) . *Gene transfer in crop improvement*. Science 236, 48-54 .
- Harrison, B.D and Robinson, D.J. (1981) . *Tobraviruses in: Handbook of plant virus infection and comparative diagnosis* . Kurstak, E., eds Elsevier. North - Holland Biometical press , pp. 516-540 .
- Hull, R. , Davies, J. W. , (1992) . *Approaches to nonconventional control of plant virus diseases* . Critical reviews in Plant Sciences . 1 : 17-33 .
- Kaniewski, W.K. and Thomas, P.E., (1993) . *Field testing of virus resistant transgenic plants* . Virology , vol 4 : 389-396
- Kara, D . Webster , Reavy, B. and Barcker, H.,(1994) . *An introduction to Agrobacterium tumefaciens mediated transformation techniques* . A handbook of methods used in the virology department . SCRI , 1-45
- Κατινάκης, Π., (1994) . Βιοχημεία (Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης) . Αθήνα , Γ.Π.Α , Σελ . 1-15.

Lomonosoff, G. P., (1995). *Pathogen - Derived resistance to plant viruses* . Annual. Rev. Phytopathol. 33, 323-339 .

Maniatis, I. , (1989). *Molecular cloning . A laboratory manual* .
Second edition .

Μαρκουλάτος, Π., Σαμαρά, Β., Μαρινάκης, Γ., Καπαρός, Κ., Φουντουκίδου, Π., Κρικέλης, Β., Σπύρου, Ν., Βαμβακόπουλος Ν., (1996) . *Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) , στη διάγνωση των ιώσεων* . Ελληνική ιολογία , τεύχος 1, τομ (1) : 83-88.

Neijdat, A. , Clark , G. W. , Beach, R. N. , (1990) . *Engineered resistance against plant virus diseases* . *Physiol. Plant.* 80, 662-668

Ploeg ,A.T., Mathis, A., Bol, J.F., Brown, J.D., Robinson, D. J.,. (1993) *Susceptibility of transgenic tobacco plants expressing tobacco rattle virus coat protein to nematode-transmitted and mechanically inoculated tobacco rattle virus* . *Journal of General Virology* 174 , 2709-2715 .

Portykus ,I. , (1991) . *Gene transfer to plants : Assessment of published approaches and results* . *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 42, 205-225 .

Παναγόπουλος , Χ. Γ., 1993 . *Ασθένειες Καρποφόρων Δέντρων και Αμπέλου* . Εκδόσεις Λ. Σταμούλης , Αθήνα , 82-86 .

Yie ,Y. , Tien, P. (1993) . *Plant virus satellite RNA's and their role in engineering resistance to virus diseases* . *Virology* 4 : 363-368 .

Παράρτημα



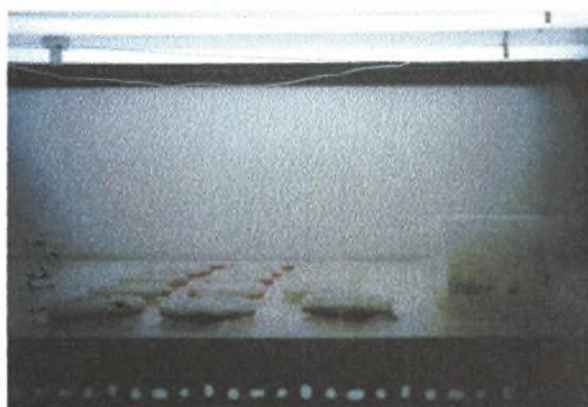
Εικόνα 1



Εικόνα 2



Εικόνα 3



Εικόνα 4

Εικόνα 1. Τροποποιημένα φυτά καπνού των σειρών 75, 81, 89, στο θερμοκήπιο

Εικόνα 2. "in vitro" καλλιέργεια φυτών καπνού

Εικόνα 3. F₁- φυτά καπνού στο θερμοκήπιο, τα οποία προήλθαν από σπόρο των γενετικά τροποποιημένων φυτών

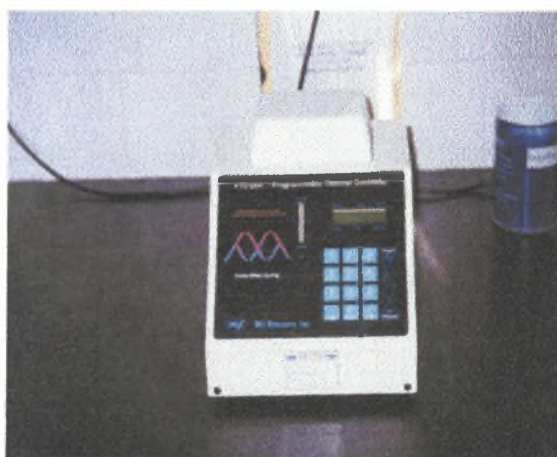
Εικόνα 4. "in vitro" καλλιέργεια S₁ σπόρου από τα τροποποιημένα φυτά



Εικόνα 5



Εικόνα 6



Εικόνα 7



Εικόνα 8

Εικόνα 5. Θάλαμος ανάπτυξης με ελεγχόμενες συνθήκες .

Εικόνα 6 . Θάλαμος νηματικής ροής (laminar flow cabinet) .

Εικόνα 7. Θερμοκυκλοποιητής (Thermocycler) .

Εικόνα 8. Συσκευή ηλεκτροφόρησης .



Εικόνα 9



Εικόνα 10

Εικόνα 9 . Φασματοφωτόμετρο

Εικόνα 10 . Φυγόκεντρος



Քառակ



Քառակ

Հայաստանի Հանրապետության Առողջապահության նախարարություն

ՀՀ Առողջապահության նախարարություն