

Σταθερός μετασχηματισμός φυτών *Lotus japonicus* cv. MG20 μέσω *Agrobacterium tumefaciens* με στόχο την απόκτηση φυτών ελέγχου με ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό Hygromycin

***Agrobacterium tumefaciens*-mediated stable transformation of *Lotus japonicus* cv. MG20 plants for the generation of hygromycin resistant plants**



Διπλωματική εργασία- Πανταζή Ιωάννα

Λάρισα 2012

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (ΤΒΒ), στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Υπεύθυνη Καθηγήτρια:

Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Επίκουρος Καθηγήτρια ΤΒΒ, Π.Θ.

Τριμελής Επιτροπή:

Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Επίκουρος Καθηγήτρια ΤΒΒ, Π.Θ.

Τσίκου Δανιέλα, Διδάσκουσα με σύμβαση (ΠΔ 407/80) ΤΒΒ, Π.Θ.

Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΤΒΒ, Π.Θ.

Ευχαριστίες:

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής για την επίβλεψη της διπλωματικής μου εργασίας. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υπεύθυνη καθηγήτρια μου, κυρία Παπαδοπούλου Καλλιόπη, για την πολύ καλή συνεργασία μας και την κυρία Τσίκου Δανιέλα για την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές της καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της εργασίας αυτής. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Αφροδίτη Κροκίδα για τη συμβολή της σε μέρος της παρούσας εργασίας και τον προπτυχιακό φοιτητή Αντωνόπουλο Διονύση για τη βοήθεια του. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους προπτυχιακούς-μεταπτυχιακούς φοιτητές και υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου για τη συνεργασία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT.....	4
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1.1 ΨΧΑΝΘΗ: Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΑΓΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΡΕΥΝΑ.....	6
1.2 ΤΟ ΦΥΤΟ-ΜΟΝΤΕΛΟ <i>LOTUS JAPONICUS</i>	7
1.2.1 ΤΟ <i>L. JAPONICUS</i> ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ.....	8
1.2.2 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΔΙΑΜΕΣΟΛΑΒΟΥΜΕΝΟΣ ΑΠΟ ΤΟ ΑΓΡΟΒΑΚΤΗΡΙΟ.....	9
1.3 <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	11
1.3.1 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ.....	12
1.3.2 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΜΕ ΤΟ ΑΓΡΟΒΑΚΤΗΡΙΟ.....	16
1.4 ΔΥΑΔΙΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ <i>pCAMBIA</i>	17
1.4.1 ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ <i>pCAMBIA</i>	18
1.4.2 ΦΟΡΕΙΣ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΕΠΙΛΟΓΗΣ.....	18
2. ΥΛΙΚΑ/ΜΕΘΟΔΟΙ.....	20
2.1 ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ ΣΠΟΡΩΝ.....	20
2.2 ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑΤΡΗΣΗ.....	21
2.3 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ <i>LOTUS JAPONICUS</i>	21
2.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA.....	26
2.5 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ PCR.....	27

2.6 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ.....	29
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	30
3.1 ΣΚΟΠΟΣ.....	30
3.2 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΑΓΡΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ.....	30
3.3 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΦΥΤΩΝ.....	31
3.4 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ.....	35
4. ΣΗΖΗΤΗΣΗ.....	38
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	41

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία περιγράφουμε μια απλή και αποδοτική διαδικασία μετασχηματισμού και αναγέννησης των φυτών *Lotus japonicus*. Βασιζόμενοι σε προηγούμενες μελέτες χρησιμοποιήσαμε ριζικά έκφυτα που είναι επιρρεπή στον μετασχηματισμό από το *Agrobacterium tumefaciens* και έχουν την ικανότητα αναγέννησης. Συγκεκριμένα, στην εργασία αυτή περιγράφονται η διαδικασία μετασχηματισμού και αναγέννησης (οι συνθήκες ιστοκαλλιέργειας) των φυτών, καθώς και ο έλεγχος της ύπαρξης ή μη μετασχηματισμένων φυτών μέσω μοριακής ανάλυσης. Μέσω αυτής της διαδικασίας μπορέσαμε να παράγουμε μετασχηματισμένα φυτά με ένα ποσοστό επιτυχίας 100%, ενώ ο συνολικός χρόνος επώασης σε ιστοκαλλιέργεια μέχρι να πάρουμε ένα μετασχηματισμένο φυτό που θα μεταφερόταν στο χώμα δεν ξεπερνά τους 4 μήνες. Μπορούμε να ισχυριστούμε με βεβαιότητα, λοιπόν, πως η διαδικασία αυτή αποτελεί ένα γρήγορο και αποδοτικό πρωτόκολλο μετασχηματισμού-αναγέννησης που μπορεί να χρησιμεύσει για μοριακές μελέτες στο φυτό *L. japonicus*.

ABSTRACT

In this study, we describe a simple and efficient transformation and regeneration procedure of the *Lotus japonicus* plants. Based on previous studies, we used root explants which are susceptible to *Agrobacterium* infection and competent for regeneration. Specifically, in this study we describe the transformation and regeneration procedure (tissue culture conditions) of plants, as well as the determination of the transgenic character of the plants by molecular analysis. Through this procedure we managed to produce transgenic plants in extremely high percentage (100%), while the overall time of incubation under tissue culture required to obtain a transgenic plant, did not exceed 4 months. Thus, we can claim with certainty that this procedure is a fast and efficient transformation-regeneration protocol, which could be useful for several molecular studies in *L. japonicus* plant.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΨΥΧΑΝΘΗ: Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΑΓΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΡΕΥΝΑ

Η οικογένεια των ψυχανθών (Fabaceae ή Leguminosae) είναι μια πολύ μεγάλη και οικονομικά σημαντική οικογένεια ανθοφόρων φυτών με ~700 γένη και γύρω στα 20.000 είδη. Η οικογένεια αυτή υποδιαιρείται σε τρεις υπο-οικογένειες (Papilionoideae, Caesalpinioideae, Mimosoideae) και παρουσιάζει μια αξιοσημείωτη ποικιλομορφία από γιγάντια δέντρα μέχρι μονοετείς πόες, με την πλειονότητα να ανήκει στις πολυετείς πόες. Το μεγάλο τους πλεονεκτήματα είναι ότι μπορούν και αζωτοδεσμεύουν, εφόσον συμβιώνουν με το βακτήριο *Rhizobium*, πράγμα που παρέχει σε αυτά τα φυτά και σε μεταγενέστερες καλλιέργειες μια ελεύθερη και ανανεώσιμη πηγή αζώτου. Έχει υπολογιστεί, μάλιστα, ότι 40 με 60 εκατομμύρια τόνοι αζώτου αζωτοδεσμεύονται ετησίως από τα καλλιεργούμενα ψυχανθή (Smil, 1999).

Τα ψυχανθή είναι μεγάλης σημασίας ως πηγή τροφής για τους ανθρώπους και τα ζώα και ως πρώτες ύλες για τη βιομηχανία (Graham & Vance, 2003). Αντιπροσωπεύουν περίπου το ένα τρίτο της παγκόσμιας φυτικής παραγωγής, του ανθρώπινου διαιτολογίου σε πρωτεΐνες και του επεξεργασμένου φυτικού ελαίου. Τα ψυχανθή παγκόσμιας διατροφικής αξίας περιλαμβάνουν το φασόλι (*Phaseolus vulgaris*), τη σόγια (*Glycine max*), το μπιζέλι (*Pisum sativum*), το ρεβύθι (*Cicer arietinum*), τα κουκιά (*Vicia faba*), *Cajanus cajan*, *Vigna unguiculata* και τη φακή (*Lens esculenta*). Από άποψη παραγωγής και εμπορίου, το πιο σημαντικό ψυχανθές είναι η σόγια: το μεγαλύτερο ποσοστό του παραγόμενου σπόρου χρησιμοποιείται για την εκχύλιση λαδιού και ως σανός για τα ζώα (Wang, 2003). Εκτός από τη χρήση τους στη διατροφή, τα ψυχανθή χρησιμοποιούνται για τη διατήρηση του εδάφους, τη φυτοεξυγίανση, την παραγωγή ξυλείας, ως διακοσμητικά βότανα και θάμνοι, για την εκχύλιση τσίχλας, ρετινιού και ως προσθετικά τροφίμων. Επιπλέον, τα ψυχανθή παράγουν δευτερογενείς ενώσεις με προαγωγικές για την υγεία ιδιότητες όπως τα ισοφλαβονοειδή (Dixon & Sumner 2003, Dixon 2004).

Παρ' όλη τη σημασία των ψυχανθών στην αγροκαλλιέργεια, η αύξηση της παραγωγής τους τις τελευταίες δεκαετίες έχει μείνει πίσω λόγω μιας πληθώρας

βιοτικών και αβιοτικών περιοριστικών παραγόντων όπως η ξηρασία, η αλατότητα του εδάφους, η οξύτητα, θρεπτικοί περιορισμοί και ποικίλες ασθένειες (Graham & Vance, 2003). Έτσι, λοιπόν, η ανάπτυξη φυτών ανθεκτικών σε αυτές τις συνθήκες παραμένει ένας σημαντικός στόχος των αναπαραγωγικών προγραμμάτων. Δυστυχώς, τα καλλιεργούμενα ψυχανθή είναι σχετικώς φτωχά συστήματα-μοντέλα για γενετική και γονιδιωματική έρευνα. Κάποια είναι τετραπλοειδή (π.χ. αράπικο φυσίκι), πολλά έχουν μεγάλα γονιδιώματα (π.χ. μπιζέλι και φάβα) και κάποια είναι δύσκολα στο μετασχηματισμό ή στην αναγέννηση (π.χ. φασόλι, σόγια και μπιζέλι). Τα περισσότερα ψυχανθή έχουν μεγάλους σπόρους, σχετικά λίγους σπόρους ανά φυτό και μεγάλα φυτάρια που δεν επιτρέπουν την καλλιέργεια σε μεγάλη πυκνότητα (π.χ. ρεβύθι, σόγια, φασόλι, μπιζέλι,). Κάποια ψυχανθή όπως η σόγια έχουν στο γένωμα τους διπλασιασμούς και κάποια είναι ασυμβίβαστα ή έχουν μεγάλο βιολογικό κύκλο. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να υιοθετηθούν ως μοντέλα για την έρευνα των ψυχανθών δύο άλλα είδη, το *Lotus japonicus* και το *Medicago truncatula*, καθώς και τα δύο φέρουν χαρακτηριστικά φυτών-μοντέλων.

1.2 ΤΟ ΦΥΤΟ-MONTEΛΟ *LOTUS JAPONICUS*

Το *L. japonicus* ανήκει στο φυλογενετικό κλάδο Hologalegina, ο οποίος περιέχει επίσης τα Robinieae, Trifolieae (τριφύλλια), Viceae (μπιζέλια και κουκιά) και τα Cicereae (ρεβύθια) (Szczyglowski & Stougaard, 2008). Το φυσικό του περιβάλλον βρίσκεται στην Άπω Ανατολή περιλαμβάνοντας την περιοχή γύρω από την



Ιαπωνία, την Κορέα και την Κίνα. Αποτελεί ένα εποχιακό είδος βοσκής εύκρατου κλίματος και παρουσιάζει χαρακτηριστικά που είναι χρήσιμα για τη γονιδιωματική έρευνα, όπως ο μικρός κύκλος ζωής (2-3 μήνες), η αυτογονιμοποίηση, η διπλοειδία (n=6) και το μικρό μέγεθος γονιδιώματος (472.1 Mb) (Sato & Tabata, 2006). Τα νεαρά φυτά είναι πολύ μικρού μεγέθους και μπορούν να μεγαλώνουν *in vitro* σε

δοκιμαστικούς σωλήνες και σε μεγάλη πυκνότητα στο έδαφος (Handberg & Stougaard, 1992). Τα ώριμα φυτά είναι θαμνώδη και αποτελούνται από αρκετές διακλαδώσεις πάνω από 30cm σε μήκος. Το *L. japonicus* είναι μοναδικό στο γεγονός ότι είναι ένα ψυχανθές που μεταφέρει αμίδια, παράγοντας L-γλουταμίνη και L-ασπαραγίνη ως προϊόντα της αζωτοδέσμευσης και σχηματίζει καθορισμένα φυμάτια (Streeter, 1991; Takane *et al.*, 2000), ενώ τα περισσότερα από τα άλλα ψυχανθή είτε θα είναι φυτά που μεταφέρουν αμίδια και έχουν μη-καθορισμένα φυμάτια (όπως αλφάλφα και μπιζέλι), είτε θα είναι φυτά που μεταφέρουν ουρεΐδες και έχουν καθορισμένα φυμάτια (όπως η σόγια). Η ομάδα ριζόβιων βακτηρίων που συμβιώνουν με το *L. japonicus* περιλαμβάνει και γρήγορα (*Mesorhizobium loti*) και αργά (*Bradyrhizobium sp.*) αυξανόμενα στελέχη.

1.2.1 ΤΟ *L. JAPONICUS* ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ

Το απλοειδές γονιδίωμα του *L. japonicus* αποτελείται από 6 χρωμοσώματα. Το περιεχόμενο DNA του *L. japonicus* ανα χρωμόσωμα είναι περίπου 0.5pg (Bennet & Smith, 1976). Μια μεγάλης κλίμακας μελέτη για την αλληλούχηση του γονιδιώματος του οικότυπου Miyakojima (MG-20) έχει αρχίσει από το 2000, με σκοπό τη συλλογή γενετικών πληροφοριών και τη διευκόλυνση της μοριακής γενετικής των ψυχανθών (Sato *et al.*, 2001). Παράλληλα, παρήχθησαν μικροδορυφόροι και πολυμορφισμοί μονού νουκλεοτιδίου (SNPs) χρησιμοποιώντας τις πληροφορίες από την αλληλούχηση (Sato & Tabata, 2006) και άρχισε η κατασκευή γενετικών χαρτών.

Ένας μεγάλος αριθμός (~111623) από ετικετοποιημένες εκφραζόμενες αλληλουχίες (ESTs) του *L. japonicus* που προέρχονται από μια ποικιλία οργάνων όπως ρίζες, αζωτοδεσμευτικές ρίζες, ανώριμα και ώριμα φυμάτια, μπουμπούκια άνθων, σπόρους, λοβούς καθώς και από ολόκληρα φυτά είναι πλέον διαθέσιμος (Asamizu *et al.*, 2000; Endo *et al.*, 2000; Asamizu *et al.*, 2004; Colebatch *et al.*, 2004), ενώ επίσης διαθέσιμος είναι ένας μεγάλος αριθμός (~604) πλήρους μήκους cDNA κλώνων (Udvardi *et al.*, 2005). Οι cDNA κλώνοι που αντιστοιχούν σε μια συλλογή από *Lotus* ESTs, χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία DNA μικροσυστοιχιών με PCR ενίσχυση για τη μεταγραφική ανάλυση της ανάπτυξης και διαφοροποίησης των

ριζικών φυματίων (Colebatch *et al.* , 2004; Kouchi *et al.* , 2004). Ένα παρόμοιο εργαλείο για μεταγραφικές αναλύσεις έχει αναπτυχθεί και για τον ενδοσυμβιώτη του *L. japonicus*, το *Mesorhizobium loti*.

Το *Lotus* μελετήθηκε σε πρωτεομικές αναλύσεις με συνδυασμό υγρής χρωματογραφίας με τη φασματομετρία μάζας για την ταυτοποίηση πρωτεϊνών που σχετίζονται με την περιβακτηριακή μεμβράνη (Wienkoop & Saalbach, 2003). Η αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μάζας (GC-MS) χρησιμοποιείται για τη διερεύνηση του μεταβολικού προφίλ των φυτών (Fiehn *et al.* , 2000) και είναι η κύρια πλατφόρμα για τη μεταβολομική ανάλυση στο *L. japonicus* (Colebatch *et al.* , 2004; Desbrosses *et al.* , 2005)

Μεγάλη πρόοδος έχει παρατηρηθεί τα τελευταία χρόνια στην εφαρμογή διαφόρων τεχνικών στο *L. japonicus* όπως η παρεμβολή RNA (RNAi) που περιορίζει την έκφραση των γονιδίων. Η RNA παρεμβολή χρησιμοποιήθηκε για να περιορίσει τη σύνθεση ψυχανθαιμοσφαιρίνης στα φυμάτια του *L. japonicus* με δραματικές συνέπειες στην αζωτοδέσμευση (Ott *et al.*, 2005). Στις ανεξάρτητες RNAi σειρές που προέκυψαν, τα επίπεδα έκφρασης της ψυχανθαιμοσφαιρίνης μειώθηκαν σε ποσοστό μεγαλύτερο του 97%. Επιπλέον, έχει αναπτυχθεί η τεχνική TILLING (μια προσέγγιση αντίστροφης γενετικής) που μπορεί να ανιχνεύσει φυτά με σημειακές μεταλλάξεις στα γονίδια που ενδιαφέρουν, μέσα σε έναν EMS (ethyl methane sulfonate)-μεταλλαγμένο πληθυσμό (Perry *et al.*, 2003).

1.2.2 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΔΙΑΜΕΣΟΛΑΒΟΥΜΕΝΟΣ ΑΠΟ ΤΟ ΑΓΡΟΒΑΚΤΗΡΙΟ

Ο μετασχηματισμός και η αναγέννηση φυτών είναι αναγκαία προϋπόθεση για τη μοριακή και φυσιολογική ανάλυση της γονιδιακής λειτουργίας. Για πολλά ψυχανθή, κυρίως τα καλλιεργούμενα, δεν υπάρχουν μεθοδολογίες γενετικού μετασχηματισμού, περιορίζοντας τις πιθανότητες για λειτουργικές γονιδιακές μελέτες. Σε αντίθεση, για το *L. japonicus* υπάρχει τεχνολογία γενετικού μετασχηματισμού μέσω Αγροβακτηρίου. Τα διαγονιδικά φυτά συνήθως δημιουργούνται από το μετασχηματισμό του υποκοτυλίου (Handberg & Stougaard, 1992; Thykjaer *et al.* , 1995; Stiller *et al.* , 1997) και η επιλογή για την ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά γίνεται χρησιμοποιώντας τα *npt II*, *hpt II* και *bar* γονίδια. Πρόσφατα,

έχει αναφερθεί μια νέα διαδικασία μετασχηματισμού-αναγέννησης (Lompari *et al.* , 2003), στην οποία αποδιαφοροποιημένα ριζικά έκφυτα είναι μια πηγή μεγάλου αριθμού κυττάρων που είναι επιρρεπή στο μετασχηματισμό από το Αγροβακτήριο. Η νέα αυτή μέθοδος αποδίδει μια δεκαπλάσια αύξηση στον αριθμό των μετασχηματισμένων φυτών μέσα σε 4 μήνες.

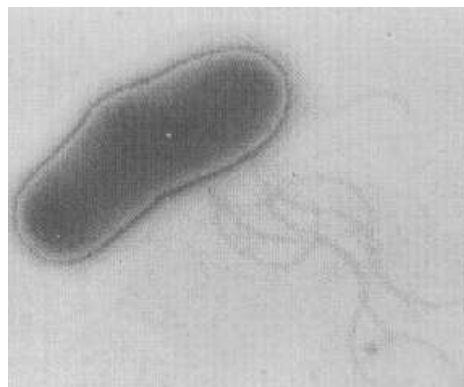
Σε αυτή τη διαδικασία, γνωρίζοντας πως ο χρόνος μιας ιστοκαλλιέργειας σχετίζεται με μια αυξημένη συχνότητα μεταβολών στα φυτά που αναγγενούνται, έγιναν προσπάθειες μίκρυνσης του χρόνου καλλιέργειας του κάλλου όπως για παράδειγμα με τη μίκρυνση καλλιέργειας στο θρεπτικό μέσο επαγωγής του κάλλου (callus induction medium, CIM). Για το σκοπό αυτό, δοκιμάστηκαν αρκετές συγκεντρώσεις ορμονών και καθορίστηκε πως το θρεπτικό μέσο που περιείχε 3 mg/l IAA, 0.15 mg/l 2.4 D, 0.6 mg/l BA και 0.3 mg/l IPA έδινε το 90% από έκφυτα που σχηματίζουν κάλλους, σε σύγκριση με το 35% χρησιμοποιώντας το θρεπτικό μέσο που περιγράφηκε από τους Handberg & Stougaard (1992), το οποίο περιείχε Gamborg's B₅ θρεπτικό μέσο, 2.4-διχλωροφαινοξυοξικό οξύ (2.4 D) και κινετίνη. Εξετάστηκαν ακόμη διαφορετικά συστήματα καλλιέργειας με διαφορετικούς ρυθμιστές της φυτικής ανάπτυξης και ιδανικές περιβαλλοντικές συνθήκες για την επαγωγή μορφογένεσης και το σχηματισμό βλαστού από τον κάλλο και η υψηλότερη συχνότητα (75-90%) κατορθώθηκε παρουσία 0.2 mg/l BA και 10mM NH₄SO₄ (θρεπτικό μέσο επαγωγής βλαστού, SIM) όπως και παλιότερα (Handberg & Stougaard, 1992). Η επιμήκυνση του βλαστού, η επαγωγή της ρίζας και η επιμήκυνση της ρίζας επιτεύχθηκαν στα θρεπτικά μέσα που περιγράφονται στους Stiller *et al.* , 1997 με αποδοτικότητα 90-100%.

Ο χρόνος της συνκαλλιέργειας με το Αγροβακτήριο καθορίστηκε με δοκιμές μετρώντας κάθε φορά τον αριθμό των πράσινων τμημάτων που παραγόταν από τα έκφυτα που καλλιεργούνταν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε υγρομυκίνη. Επιλέχτηκε μια περίοδος προεπάσης 5 ημερών στο θρεπτικό μέσο CIM, κατά την οποία μια ορατή αύξηση στο ριζικό πάχος μπορούσε να παρατηρηθεί. Η διαδικασία μετασχηματισμού ακολουθεί ως εξής: οι ρίζες κόβονται σε κομμάτια των 0.5 cm και συνκαλλιεργούνται με το Αγροβακτήριο στελέχους AGL1 για 2 ημέρες στο θρεπτικό CIM, έπειτα μεταφέρονται στο CIM με 200 mg/l κεφοταξίμη όπου καλλιεργούνται για 2 επιπλέον ημέρες και κατόπιν ακολουθεί η επιλογή σε υγρομυκίνη (15 mg/l)

στο CIM. Οι ανθεκτικοί σε υγρομυκίνη πράσινοι κάλλοι αρχίζουν να εμφανίζονται και να είναι ευδιάκριτοι από το μη μετασηματισμένο ιστό μέσα σε 3-5 εβδομάδες. Ο χρόνος στον οποίο τα έκφυτα εκτίθενται στο θρεπτικό CIM μπορεί να μικρύνει με μεταφορά στο θρεπτικό SIM πριν εμφανιστούν οι πράσινοι κάλλοι, πράγμα το οποίο δεν επηρεάζει τη συχνότητα σχηματισμού του κάλλου και οι ανθεκτικοί σε υγρομυκίνη πράσινοι κάλλοι που εμφανίζονται στο SIM διατηρούν μια καλή χωρητικότητα κυτταρικού πολλαπλασιασμού φτάνοντας σε ένα καλό μέγεθος πριν να αρχίσουν τη διαφοροποίηση σε βλαστό. Οι κάλλοι που αποκτούνται με αυτό τον τρόπο έχουν ένα σκούρο πράσινο φαινότυπο και δεν γίνονται ποτέ καφέ, όπως συχνά συμβαίνει με τους κάλλους που παραμένουν για πολύ καιρό στο θρεπτικό CIM. Αυτή η πρόωρη μεταφορά στο SIM, επιπλέον, προκαλεί σχηματισμό του βλαστού σε 50% των κάλλων μέσα σε 2 εβδομάδες. Να προσθέσουμε, τέλος, πως ο διαχωρισμός του γονιδίου της ανθεκτικότητας σε υγρομυκίνη στην F₁ γενιά χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση του αριθμού πλοειδίας και του αριθμού των θέσεων ένθεσης T-DNA στα διαγονιδιακά φυτά. Ύστερα από αυτογονιμοποίηση των εξεταζόμενων φυτών ή μεταξύ τους διασταύρωση, παρατηρήθηκε η Μενδελική αναλογία 3 (φυτά ανθεκτικά σε υγρομυκίνη):1 (φυτά μη ανθεκτικά σε υγρομυκίνη) όπως αναμενόταν για ένα κυρίαρχο δείκτη ανθεκτικότητας σε ένα διπλοειδές φυτό.

1.3 AGROBACTERIUM TUMEFACIENS

Το *Agrobacterium tumefaciens* είναι ένα Gram αρνητικό, κινητήριο, ραβδοειδούς σχήματος, μη σπορογόνο αλφα-πρωτεοβακτήριο, το οποίο σχετίζεται φυλογενετικά με τα αζωτοδεσμευτικά ριζόβια βακτήρια (*Rhizobium*) που σχηματίζουν ριζικά φυμάτια στα ψυχανθή (Smith & Townsend 1907). Το γονιδίωμα του Αγροβακτηρίου έχει μια ασυνήθιστη δομή, εφόσον αποτελείται από ένα κυκλικό και ένα γραμμικό χρωμόσωμα, καθώς και δύο πλασμίδια (Allardet-Servent A *et al.*, 1993). Το Αγροβακτήριο είναι υπεύθυνο για την ασθένεια του κορονωτού κάλλου που μολύνει αρκετά φυτικά είδη κυρίως φρούτα, καρύδια



και διακοσμητικά φυτά, όπως τα τριαντάφυλλα. Η ασθένεια αυτή προκαλείται με την εισαγωγή ενός μικρού τμήματος βακτηριακού DNA (γνωστό ως T-DNA) από το πλασμίδιο Ti (tumor inducing) σε τυχαία θέση μέσα στο φυτικό γένωμα οδηγώντας σε αλλαγές στην παραγωγή συγκεκριμένων φυτικών ορμονών καθώς και το σχηματισμό των Οπινών (ειδικών ολιγοσακχαριδίων), τις οποίες το Αγροβακτήριο χρησιμοποιεί ως πηγή άνθρακα. Ο μοναδικός αυτός τρόπος δράσης του Αγροβακτηρίου, έχει προκαλέσει το ενδιαφέρον των ερευνητών με αποτέλεσμα αυτό να γίνει εργαλείο στην αναπαραγωγή των φυτών και σε διάφορες έρευνες. Οποιοδήποτε επιθυμητό γονίδιο μπορεί, πλέον, να εισαχθεί στο βακτηριακό DNA και έτσι να περάσει στο φυτικό γονιδίωμα, μειώνοντας τη συμβατική διαδικασία αναπαραγωγής των φυτών και επιτρέποντας την εισαγωγή νέων γονιδίων και μη φυτικών στις καλλιέργειες.

1.3.1 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ

Το Αγροβακτήριο και τα συγγενικά του είδη *A. rhizogenes* και *A. vitris* είναι τα μόνα γνωστά παθογόνα βακτήρια που μεταφέρουν το DNA τους στα φυτά και έτσι έχουν εξελιχθεί σε πολύτιμο εργαλείο για τη γενετική μηχανική των φυτών. Η αλληλεπίδραση μεταξύ του Αγροβακτηρίου και του φυτού μπορεί να διαιρεθεί σε πολλά στάδια: αναγνώριση, έκφραση των Vir γονιδίων, προσκόλληση διείσδυση στο κύτταρο ξενιστή, στόχευση των παρογόντων Vir και του T-DNA στο κύτταρο ξενιστή και ενσωμάτωση του T-DNA σε χρωμόσωμα του ξενιστή (Pitzschke & Hirt, 2010) (Εικόνα 1).

Η όλη διαδικασία ρυθμίζεται και ελέγχεται από ένα σύνολο γονιδίων, γνωστά ως γονίδια Vir, τα οποία ενεργοποιούνται από την ανίχνευση φαινολικών ενώσεων τραυματισμένων φυτών. Το Αγροβακτήριο διαθέτει ένα ρυθμιστικό σύστημα δύο στοιχείων που περιλαμβάνει τις VirA και VirG πρωτεΐνες (Tzfira & Citovsky, 2000). Η VirA δρα ως μια αισθητήρια μεμβρανική πρωτεΐνη, ενώ η VirG ρυθμίζει την κυτταροπλασματική απόκριση στις φαινολικές ενώσεις του τραυματισμένου φυτού και προωθεί την ενεργοποίηση όλων των Vir γονιδίων. Η VirG αλληλεπιδρά ειδικά με το κουτί Vir, μια συντηρημένη αλληλουχία 12 ζευγών βάσεων που βρίσκεται στην αλληλουχία του προαγωγέα όλων των γονιδίων Vir. Η VirG είναι επίσης, ικανή να

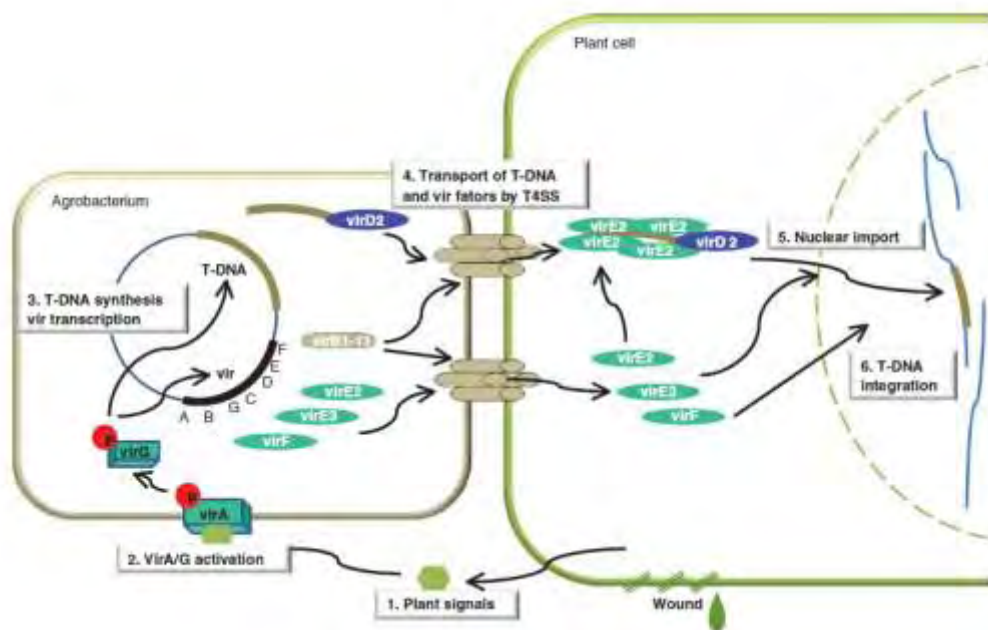
επάγει την δική της έκφραση, καθώς παράγεται από το mRNA παρουσία και απουσία φυτικών φαινολικών ουσιών (Stachel & Zambryski, 1986). Μερικές ενώσεις που είναι γνωστές ότι επάγουν την έκφραση των γονιδίων *Vir* είναι οι πρόδρομες ουσίες της λιγνίνης και των φλαβονοειδών και η ακετοσυριγκόνη (Stachel *et al.* 1985). Το μονοπάτι σηματοδότησης ξεκινά όταν οι φαινολικές ουσίες του τραυματισμένου φυτού αλληλεπιδράσουν άμεσα ή έμμεσα με την πρωτεΐνη *VirA* (Tzfira & Citovsky, 2000), η οποία λειτουργεί και ως αυτοκινάση (φωσφορυλιώνει τον εαυτό της σε ένα κατάλοιπο ιστιδίνης) και ως φωσφοτρανφεράση (φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη *VirG* στο κατάλοιπο ασπαργίνης).

Αρχικά, στη ριζόσφαιρα του εδάφους συμβαίνει η μεταφορά μέσω βακτηριακής σύζευξης του πλασμιδίου *Ti*, αυξάνοντας έτσι τον αριθμό των παθογόνων στελεχών στο έδαφος. Το Αγροβακτήριο παράγει ένα διάχυτο σήμα σύζευξης που ονομάζεται 3OC8HSL, το οποίο ενεργοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα *TraR*, οποίος ρυθμίζει τη μεταγραφή των γονιδίων που απαιτούνται για την σύζευξη. Αυτή η απόκριση προκαλείται επίσης από τις οπίνες που παράγονται από τα μολυσμένα φυτά που είτε καταστέλλουν είτε ενεργοποιούν ένα καταστολέα του γονιδίου *TraR*. Το Αγροβακτήριο μπορεί να κινείται με τη βοήθεια των μαστιγίων του και έλκεται προς θέσεις τραυματισμού με χημειοτακτισμό. Ο μηχανισμός χημειοτακτισμού είναι άγνωστος μέχρι τώρα, αλλά θεωρείται πως η μετανάστευση συμβαίνει προς τα σάκχαρα και τα αμινοξέα που συσσωρεύονται γύρω από τις ρίζες των φυτών στη ριζόσφαιρα. Μερικά στελέχη μπορεί να έλκονται και από ειδικές φυτικές ενώσεις όπως η ακετοσυριγκόνη, καθώς επίσης και από τις οπίνες. Η προσκόλληση στο φυτό είναι μια διαδικασία δύο σταδίων που περιλαμβάνει μια αρχική αδύναμη προσκόλληση και έπειτα την εγκατάσταση στην τραυματισμένη επιφάνεια του φυτού με τη σύνθεση ινιδίων κυτταρίνης από τα βακτήρια. Μερικά από τα γονίδια που είναι απαραίτητα σε αυτή τη διαδικασία έχουν ταυτοποιηθεί και ονομάζονται *chvA*, *chvB*, *pscA* και *at*, ενώ θεωρείται επίσης πως υπάρχουν μόρια μέσα στο φυτό που συμμετέχουν στη διαδικασία προσκόλλησης, όπως είναι η βιτρονεκτίνη (γλυκοπρωτεΐνη προσκόλλησης που είναι στοιχείο της εξωτερικής μεμβράνης του φυτού).

Αφού έχει γίνει η προσκόλληση του Αγροβακτηρίου στο φυτό, μπορεί να ακολουθήσει η παραγωγή και εξαγωγή του T-DNA συμπλόκου. Η πρωτεΐνη VirD2 δρα ως μια ενδονουκλεάση ειδικής θέσης που αναγνωρίζει και κόβει το αριστερό και δεξιό T-DNA συνοριακό άκρο μαζί με την πρωτεΐνη VirD1. Το T-σύμπλοκο απαιτεί ένα ειδικό σύστημα εξαγωγής για να το διανεμίει από το βακτηριακό φάκελο, στην κυτταρική μεμβράνη του φυτού και εν τέλει μέσα στο κυτταρόπλασμα του φυτού. Η εξαγωγή του T-DNA συμβαίνει μέσω ενός μηχανισμού έκκρισης τύπου IV που αποτελείται από ένα νηματοτοειδές τριχίδιο και ένα σύμπλοκο μεταφοράς, το οποίο μετατοπίζει ουσίες μέσω των κυτταρικών μεμβρανών (Salmond, 1994). Στο Αγροβακτήριο, αυτός ο μηχανισμός έκκρισης αποτελείται από πρωτεΐνες που αποκωδικοποιούνται από το γονίδιο *virD4* και το οπερόνιο *virB* (Tzfira and Citovsky, 2000). Έντεκα VirB πρωτεΐνες παίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταφορά του T-συμπλόκου δια μέσου της μεμβράνης. Η VirB1 ξεκινά τη συνάθροιση και η VirB2 είναι η κύρια δομική πρωτεΐνη στο νηματοτοειδές τριχίδιο. Το νηματοτοειδές τριχίδιο έχει υποστηριχθεί από τον Zupan *et al.* (1998) πως αισθάνεται την επαφή με το φυτικό κύτταρο και μεταβιβάζει αυτή την πληροφορία πίσω στο σύμπλοκο μεταφοράς και ξεκινά την εξαγωγή του T-συμπλόκου.

Το T-DNA σύμπλοκο πιστεύεται πως περνάει μέσα στον πυρήνα του φυτικού κυττάρου με ενεργό πυρηνική πρόσληψη, καθώς το μέγεθος του T-DNA συμπλόκου (12.6 nm διάμετρος) (Citovsky *et al.* 1997) ξεπερνά τη διάμετρο των πυρηνικών πόρων (9 nm), παρόλο που το μέγεθος του πυρηνικού πόρου αυξάνεται σε 23 nm κατά την πυρηνική πρόσληψη (Forbes, 1992). Στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου-δέκτη το T-DNA περιβάλλεται από τις VirE2 πρωτεΐνες, οι οποίες το προστατεύουν από τις επιθέσεις ενδονουκλεασών του φυτικού κυττάρου (Tinland, 1996) και εξάγονται με το μηχανισμό έκκρισης τύπου IV ανεξάρτητα από το T-DNA σύμπλοκο. Η ενσωμάτωση στο γένωμα του φυτικού κυττάρου συμβαίνει κυρίως τυχαία και πιστεύεται πως ελέγχεται από παράγοντες του ξενιστή. Σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) που εντοπίζονται στις VirE2 και VirD2 πρωτεΐνες αναγνωρίζονται από την πρωτεΐνη ιμπορτίνη άλφα, η οποία έπειτα συνεργάζεται με την ιμπορτίνη βήτα και το σύμπλοκο του πυρηνικού πόρου για να μεταφέρει το T-DNA μέσα στο πυρήνα. Έχει, επίσης, ταυτοποιηθεί ένας VIP1 βασικός μεταγραφικός παράγοντας ,

ο οποίος φαίνεται πως διευκολύνει την είσοδο του T-συμπλόκου στον κυτταρικό πυρήνα, ενώ μια δεύτερη πρωτεΐνη, η VirD2, στοχεύει το T-σύμπλοκο σε μεταγραφικά ενεργό DNA. Όταν ενσωματωθεί στο φυτικό γένωμα, εκφράζονται τα βιοσυνθετικά γονίδια της αυξίνης και της κυτοκινίνης, έχοντας ως αποτέλεσμα ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και ανάπτυξη του κάλλου. Τα βιοσυνθετικά γονίδια των οπινών εκφράζονται επίσης και οι οπίνες αυτές χρησιμοποιούνται από τον κάλλο ως μοναδική πηγή άνθρακα, κάνοντας τον σχεδόν ανεξάρτητο από το φυτό.



Εικόνα 1. Επισκόπηση της αλληλεπίδρασης Αγροβακτηρίου-φυτού. 1. Τα σήματα του φυτού προκαλούν 2. VirA/G ενεργοποίηση και έτσι 3. T-DNA σύνθεση και έκφραση των γονιδίων Vir στο Αγροβακτήριο. 4. Μέσω ενός βακτηριακού τύπου IV συστήματος έκκρισης (T4SS) το T-DNA και οι πρωτεΐνες Vir μεταφέρονται στο φυτικό κύτταρο για να σχηματίσουν ένα T-DNA/Vir σύμπλοκο. 5. Το T-DNA σύμπλοκο εισάγεται στο κυτταρικό πυρήνα του ξενιστή στον οποίο 6. Το T-DNA ενσωματώνεται στα χρωμασώματα του ξενιστή με ανασυνδυασμό (Pitzschke & Hirt, 2010).

1.3.2 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΜΕ ΤΟ ΑΓΡΟΒΑΚΤΗΡΙΟ

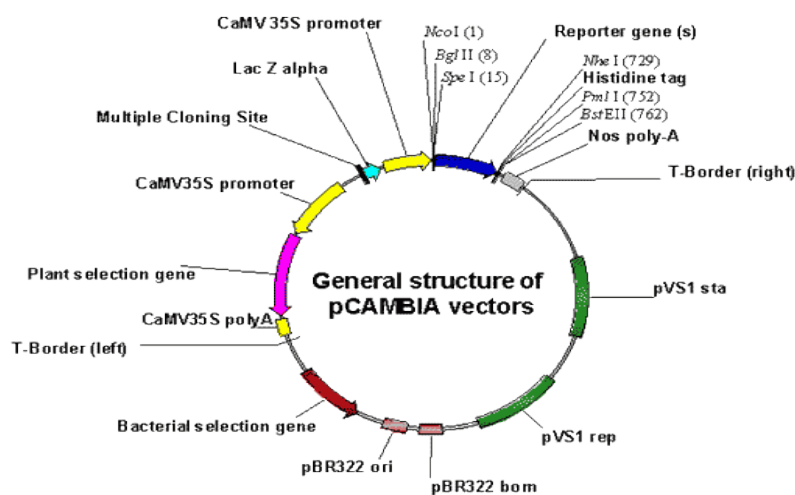
Το Αγροβακτήριο θεωρείται ως ένα πολύ χρήσιμο σύστημα μεταφοράς γονιδίων, λόγω της ικανότητας του να μεταφέρει οποιοδήποτε γονίδιο που μας ενδιαφέρει εντός του T-συμπλόκου και να εισάγει το γονίδιο στο DNA του στοχευμένου φυτού με ένα υψηλό βαθμό επιτυχίας. Αυτό συμβαίνει λόγω του ότι σε αντίθεση με άλλα κινητικά γενετικά στοιχεία όπως τα τρανσποζόνια και ο ρετροϊόι, το T-DNA δεν κωδικοποιεί λειτουργίες που χρειάζονται για την κίνηση και την ενσωμάτωση του DNA. Έτσι, λοιπόν, το T-DNA μπορεί να αντικατασταθεί από ένα γονίδιο που μας ενδιαφέρει, το οποίο θα εισάγεται αυτομάτως στον πυρήνα του φυτού ξενιστή με ένα υψηλό βαθμό επιτυχίας και με λίγη ανθρώπινη παρεμβολή. Ο μετασχηματισμός που διαμεσολαβείται από το Αγροβακτήριο είναι σχετικώς αποτελεσματικός για αρκετά είδη και ένας μικρός αριθμός αντιγράφων ανέπαφων και αμετάβλητων διαγονιδίων ενσωματώνονται συχνά στο φυτό με επιτυχία. Υπάρχουν, παρ' όλα αυτά, λίγα είδη δικοτυλήδων και πολλά είδη μονοκοτυλήδων φυτών, τα οποία είναι δύσκολα στον μετασχηματισμό από το Αγροβακτήριο (Ke *et al.*, 2001). Παρ' όλες τις πρόσφατες εξελίξεις στον κόσμο του γενετικού χειρισμού των φυτών, το Αγροβακτήριο παραμένει μια κύρια μέθοδος για το μετασχηματισμό των φυτών, παρά την ανάπτυξη εξελιγμένων εναλλακτικών μεθόδων μεταφοράς γονιδίων. Αρκετά, διαφορετικά είδη φυτών έχουν ήδη μετασχηματιστεί επιτυχώς, όπως είναι ο λωτός (Curtis, 1995), το ρύζι (Hiei, 1997) και η ντομάτα (Tzfira *et al.*, 2002). Αυτό αποδεικνύει πως οι άμεσοι μέθοδοι μεταφοράς γονιδίων δεν είναι πλέον οι μόνοι δρόμοι για το μετασχηματισμό σημαντικών καλλιεργούμενων φυτών (Newell, 2000). Ένας από τους κύριους λόγους προτίμησης του μετασχηματισμού με το Αγροβακτήριο είναι διότι επιτρέπει τη μεταφορά ενός καλά καθορισμένου κομματιού DNA στο φυτικό γένωμα, παρόλο που ο βαθμός επιτυχίας δεν είναι 100% (Gheysen *et al.*, 1998). Από το κομμάτι αυτό DNA έχουν αφαιρεθεί τα γονίδια που κωδικοποιούν για φυτικές ορμόνες και έχει εισαχθεί μαζί με το γονίδιο που μας ενδιαφέρει ένας δείκτης επιλογής (π.χ. ένα γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό) και μια θέση περιορισμού, όπου θα κόψουν τα ένζυμα περιορισμού. Η διαδικασία μετασχηματισμού συμβαίνει όπως η φυσική μέθοδος μόλυνσης, με τη διαφορά ότι το T-DNA βρίσκεται σε διαφορετικό

πλασμίδιο από το αυτό που περιλαμβάνει τα γονίδια Vir (σύστημα δυαδικού φορέα).

1.4 ΔΥΑΔΙΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ pCAMBIA

Οι δυαδικοί φορείς pCAMBIA (Εικόνα 2) προήλθαν από τους φορείς pPZP (Hajdukiewicz, Svab & Maliga, 1992) και χρησιμοποιούνται ως φορείς κλωνοποίησης γονιδίων. Οι pCAMBIA φορείς προσφέρουν:

- υψηλό αριθμό αντιγράφων στον *E. coli* για υψηλής παραγωγής DNA
- pVS1 αντίγραφο για υψηλή σταθερότητα στο Αγροβακτήριο
- μικρό μέγεθος ~7-12 kb
- θέσεις περιορισμού σχεδιασμένες για διαμορφωμένες τροποποιήσεις πλασμιδίου και μικρούς αλλά επαρκείς πολυσυνδέτες για εισαγωγή DNA
- επιλογή των μετασηματισμένων βακτηρίων με χλωροαμφικίνη ή канаμυκίνη
- επιλογή των μετασηματισμένων φυτών με υγρομυκίνη Β ή канаμυκίνη
- απλά μέσα για την κατασκευή μεταφραζόμενων συγχωνεύσεων στα *gusA* γονίδια αναφοράς.



Εικόνα 2. Γενική δομή των φορέων pCAMBIA (<http://www.cambia.org/daisy/cambia/585>)

1.4.1 ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ pCAMBIA

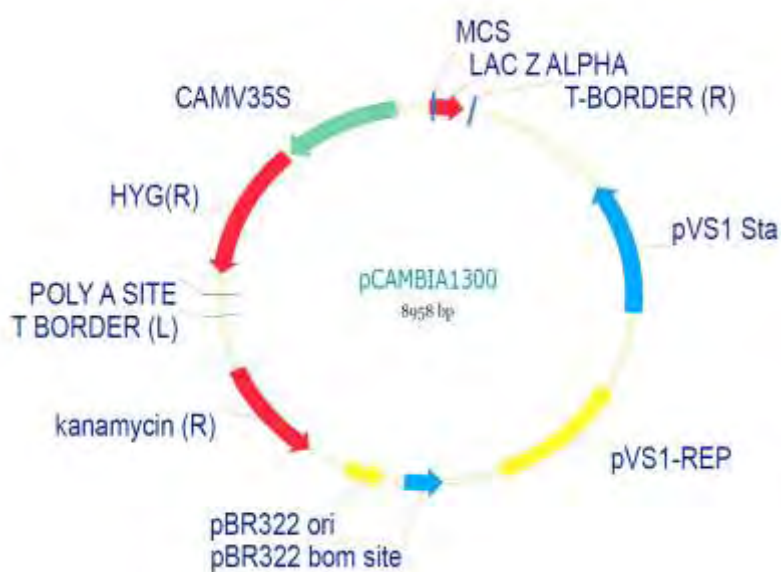
Ο pUC18 πολυσυνδέτης χρησιμοποιήθηκε σε μερικούς φορείς, αλλά και οι pUC8 και pUC9 πλυσυνδέτες χρησιμοποιήθηκαν επίσης για να απλοποιήσουν την επιλογή των ενζύμων κλωνοποίησης. Στην εποχή της PCR δεν είναι πια απαραίτητο να έχεις ένα μεγάλο αριθμό θέσεων κλωνοποίησης. Τα γονίδια για την επιλογή του μετασχηματισμένου φυτού, τα οποία διαθέτουν οι φορείς pCAMBIA οδηγούνται από μια διπλής-ενίσχυσης εκδοχή του CaMV35S προαγωγέα και τερματίζονται από το CaMV35S πολύ-A σήμα. Τα γονίδια αναφοράς χαρακτηρίζονται από μια ετικέτα εξι-ιστιδίων στο C άκρο για τον απλό καθαρισμό με χρωματογραφία συγγένειας. Η αλληλουχία για αυτή την ετικέτα βρίσκεται ανάμεσα στην πρώτη *NheI* θέση και τη μοναδική *PmlI* θέση. Τα γονίδια που μας ενδιαφέρουν μπορούν να εισαχθούν στη θέση του γονιδίου αναφοράς.

1.4.2 ΦΟΡΕΙΣ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΕΠΙΛΟΓΗΣ

pCAMBIA1200; pCAMBIA1300; pCAMBIA1380; pCAMBIA1390; pCAMBIA2200;
pCAMBIA2300

Αυτοί οι φορείς περιέχουν ελάχιστες ετερόλογες αλληλουχίες για το φυτικό μετασχηματισμό και την επιλογή των μετασχηματισμένων φυτών. Επιτρέπουν την εισαγωγή επιθυμητών γονιδίων για μετασχηματισμό σε φυτά αλλά απαιτούν όλες τις ενισχυτικές και τερματικές αλληλουχίες για την έκφραση των φυτών που περιέχουν τα κλωνοποιημένα γονίδια. Οι φορείς ελάχιστης επιλογής έχουν ένα από τα δύο γονίδια για την επιλογή του μετασχηματισμένου φυτού: *hptII* που κωδικοποιεί την ανθεκτικότητα σε υγρομυκίνη ή *nptII* που κωδικοποιεί την ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη. Και στις δύο περιπτώσεις το γονίδιο επιλογής οδηγείται από μια εκδοχή διπλής ενίσχυσης του CaMV35S προαγωγέα. Αυτά τα γονίδια έχουν υποστεί θεσο-εξαρτώμενη μεταλλαξιγένεση για να καταστραφούν παρεμβαλλόμενες θέσεις περιορισμού μέσα στην κωδικοποιούσα αλληλουχία με σιωπηλές αλλαγές. Δύο διαφορετικοί δείκτες βακτηριακής ανθεκτικότητας

παρέχονται (καναμυκίνη ή χλωροαμφαινικόλη), επιτρέποντας να χρησιμοποιηθεί ένα εύρος από στελέχη Αγροβακτηρίου και *E.coli*. Ο pUC18 πολυσυνδέτης μέσα στο lacZα τμήμα επιτρέπει διαλογή των κλώνων στην κλωνοποίηση *E.coli*, καθώς τα μετασχηματισμένα βακτήρια θα έχουν ένα άσπρο χρώμα λόγω μη έκφρασης του lacZα τμήματος από την ένθεση του γονιδίου στη θέση αυτή, ενώ τα μη μετασχηματισμένα θα δίνουν ένα μπλέ χρώμα λόγω της έκφρασης του lacZα. Ο pCAMBIA 1380 και ο pCAMBIA 1390 βασίζονται στον pCAMBIA 1300, αλλά ο pUC18 πολυσυνδέτης και το lacZα τμήμα αφαιρέθηκαν και αντικαταστάθηκαν από τους απλούστερους pUC8(1380) και pUC9(1390) πολυσυνδέτες. Η πλήρης μορφή παρέχεται για PCR κλωνοποίηση και γονιδιακή έκφραση. Ένα παράδειγμα φορέα ελάχιστης επιλογής φαίνεται στην *Εικόνα 3*, ο οποίος και χρησιμοποιείται στο πείραμα που περιγράφουμε στην επόμενη ενότητα.



Εικόνα 3. pCAMBIA 1300, ένας φορέας ελάχιστης επιλογής, ο οποίος ανήκει στην οικογένεια φορέα MSV, διαθέτει ένα μέγεθος T-DNA 2728 bp και περιλαμβάνει το γονίδιο ανθεκτικότητας στην υγρομυκίνη hptII για την επιλογή του μετασχηματισμένου φυτού, το γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη nptII για την επιλογή του μετασχηματισμένου βακτηρίου και τον πολυσυνδέτη pUC18.

2. ΥΛΙΚΑ/ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ ΣΠΟΡΩΝ

1. Αρχικά, μετριοούνται οι σπόροι του φυτού *Lotus japonicus* MG20 που θα χρειαστούν και τοποθετούνται σε ένα σωληνάριο erpendorf. Αν οι σπόροι είναι λιγότεροι από 100 προστίθενται στο erpendorf 750μl ddH₂O + 250 μl NaOCl+ 1 μl Triton X100.

2. Τα επόμενα 20 λεπτά το σωληνάριο ανακινείται ελαφρά, ενώ έπειτα από αυτό το στάδιο όλοι οι χειρισμοί απαιτούν αποστειρωμένες συνθήκες οπότε πραγματοποιούνται σε θάλαμο νηματικής ροής.

3. Οι σπόροι ξεπλένονται 6 φορές με αποστειρωμένο ddH₂O

4. Μετά την τελευταία πλύση οι σπόροι αφήνονται σε 1ml ddH₂O, το σωληνάριο καλύπτεται με αλουμινόχαρτο και διατηρείται στους 4⁰C όλη τη νύχτα.

5. Την επόμενη μέρα, οι σπόροι παρατάσσονται ευθεία σε τριβλία Petri που περιέχουν το θρεπτικό μέσο B₅/2, το οποίο αποτελείται από: B₅ άλατα/2, B₅ βιταμίνες/2, 1% σουκρόζη και 1% άγαρ. Σε κάθε τριβλίο Petri μπορούν να παραταχθούν 10 σπόροι στη μέση του τριβλίου και σε ίση περίπου απόσταση μεταξύ τους. Έπειτα από τη στρώση των σπόρων τα τριβλία κλείνονται με parafilm.

6. Τα τριβλία γυρίζονται ανάποδα, καλύπτονται με αλουμινόχαρτο και διατηρούνται στους 4⁰C όλη τη νύχτα.

7. Την ακόλουθη μέρα τα τριβλία Petri με το αλουμινόχαρτο μεταφέρονται στο θάλαμο ανάπτυξης (23⁰C, 16 ώρες φως, 8 ώρες σκοτάδι, 260 mE s⁻¹ m⁻²) για ολονύκτια επώαση.

8. Το αλουμινόχαρτο αφαιρείται για να ελέγχουμε αν έχουν βγει μικρές ρίζες. Αν υπάρχουν μικρές ρίζες τα τριβλία ανοίγονται σε αποστειρωμένες συνθήκες και οι ρίζες προσαρμόζονται απαλά με λαβίδα πάνω στην επιφάνεια του μέσου. Τα τριβλία, έπειτα, κλείνονται με parafilm και διατηρούνται σε κατακόρυφη θέση στον θάλαμο ανάπτυξης χωρίς το αλουμινόχαρτο.

9. Τις επόμενες 30 μέρες που χρειάζονται οι ρίζες για να αναπτυχθούν είναι ιδιαίτερα σημαντική η επανάληψη της προσαρμογής των ριζών στην επιφάνεια του μέσου για να επιβεβαιωθεί πως οι ρίζες εφάπτονται στο θρεπτικό μέσο.

2.2 ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑΤΡΗΣΗ

Το Αγροβακτήριο μετασχηματίζεται με μια τεχνική που ονομάζεται ηλεκτροδιάτρηση (electroporation) με τη χρήση του μηχανήματος electroporator, το οποίο δημιουργεί οπές στο κυτταρικό τοίχωμα του βακτηρίου μέσα από τις οποίες μπορεί να περάσει το πλασμίδιο pCAMBIA 1300 που θέλουμε να εισαγάγουμε.

Τα βήματα που πρέπει να ακολουθηθούν είναι τα εξής:

- Εισαγωγή 1 μl πλασμιδίου pCAMBIA 1300 συγκέντρωσης 200 ng/μl σε 100μl δεκτικών κυττάρων AGL1 που βρίσκονται σε ένα σωληνάριο erpendorf.
- Επώαση για 1 λεπτό στον πάγο.
- Προσθήκη του περιεχομένου του erpendorf σε μια κυψελίδα του μηχανήματος electroporator και εφαρμογή pulse στο μηχάνημα αυτό. Προσθήκη 1 ml θρεπτικού μέσου YEP (Yeast Extract Peptone Medium).
- Επώαση στους 28⁰C για 2-4 ώρες.
- Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 4000 στροφές, απόρριψη του υπερκειμένου και επαναδιάλυση σε 100μl YEP.
- Στρώση σε τρυβλία με 3 αντιβιοτικά (καναμυκίνη-το πλασμίδιο έχει ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό, ριφαμπικίνη, καρμπενικιλίνη-το Αγροβακτήριο έχει ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά αυτά).
- Επώαση για 2-3 ημέρες στους 28⁰C.

2.3 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ *LOTUS JAPONICUS*

Όλα τα στάδια της διαδικασίας μετασχηματισμού των φυτών *Lotus japonicus* πραγματοποιούνται σε θάλαμο νηματικής ροής σε αποστειρωμένες συνθήκες.

1. Στάδιο πριν την μόλυνση με το Αγροβακτήριο

Οι ρίζες φυτών ηλικίας 30 ημερών κόβονται και μεταφέρονται σε τριβλία Petri που περιέχουν το θρεπτικό μέσο επαγωγής κάλλων (callus inducing medium, CIM) και ακολουθεί επώαση 5 ημερών στο θάλαμο ανάπτυξης. Είναι σημαντικό να κρατηθεί η ολική επιφάνεια της ρίζας σε επαφή με το θρεπτικό μέσο.

2. Στάδιο μόλυνσης με το Αγροβακτήριο

Το μετασηματισμένο στέλεχος Αγροβακτηρίου AGL1 που φέρει το πλασμίδιο pCAMBIA 1300 αναπτύσσεται σε θρεπτικό μέσο LB, στο οποίο προστίθενται τα αντιβιοτικά καναμυκίνη, ριφαμπικίνη και καρμπενικιλίνη σε συγκέντρωση 50μg/ml το καθένα. Την επόμενη μέρα η βακτηριακή καλλιέργεια μεταφέρεται σε ένα τριβλίο Petri όπου εμβαπτίζονται οι ρίζες που είχαν κοπεί στο προηγούμενο στάδιο. Οι ρίζες κόβονται σε μικρά κομμάτια των 0.5 cm, ώστε να γίνει καλύτερα η επιμόλυνση των ριζών με το Αγροβακτήριο και αφήνονται για 10 λεπτά.

3. Συνκαλλιέργεια

Μετά τη μόλυνση, τα έκφυτα μεταφέρονται σε τριβλία με το θρεπτικό μέσο CIM και αφήνονται στο θάλαμο ανάπτυξης για 48 ώρες.

4. Ξέπλυμα των ριζών

Τα έκφυτα ξεπλένονται 3 φορές σε αποστειρωμένο νερό, στεγνώνονται γρήγορα σε διηθητικό χαρτί και μεταφέρονται σε τριβλία με θρεπτικό CIM που περιέχει 200mg/l κεφοταξίμη για 2 ημέρες. Σε αυτό το στάδιο η αύξηση του Αγροβακτηρίου κανονικά καταστέλλεται.

5. Μεταφορά σε θρεπτικό μέσο επιλογής

Τα έκφυτα μεταφέρονται σε τριβλία με το θρεπτικό μέσο CIM που περιέχει 200mg/l κεφοταξίμη και 15mg/l υγρομυκίνη για 3-4 εβδομάδες. Στα τριβλία αυτά τα έκφυτα τοποθετούνται με τέτοιο τρόπο ώστε να έχουν αρκετό διάστημα μεταξύ τους. Αν υπάρχουν ακόμη ίχνη αύξησης του Αγροβακτηρίου μπορεί να είναι αναγκαίο να επαναληφθεί η διαδικασία ξεπλύματος και στεγνώματος

προσθέτοντας και 3-5 σταγόνες κεφοταξίμης στο νερό κατά το πρώτο ξέπλυμα. Κατά τη διάρκεια επώασης στο θρεπτικό CIM εμφανίζονται μικροί πράσινοι κάλλοι, οι οποίοι αν παραμείνουν στο CIM για παραπάνω από 3 εβδομάδες μπορεί να χρειαστεί να καθαριστούν από περιβάλλον νεκρωτικό ιστό.

6. Μεταφορά στο θρεπτικό μέσο SIM1

Όταν οι μικροί πράσινοι κάλλοι που εμφανίζονται στο προηγούμενο στάδιο φτάσουν 1-2 mm ύψος πρέπει να μεταφερθούν στο θρεπτικό μέσο επαγωγής βλαστού 1 (SIM1). Ακολουθεί επώαση 3 εβδομάδων κατά την οποία οι πράσινοι κάλλοι μεγαλώνουν.

7. Μεταφορά στο θρεπτικό μέσο SIM2

Οι κάλλοι μεταφέρονται στο θρεπτικό μέσο επαγωγής βλαστού 2 (SIM2). Κατά την μεταφορά των κάλλων είναι πολύ σημαντικό να καθαριστεί προσεκτικά το πράσινο μέρος από τον καφέ νεκρωτικό ιστό. Η καλλιέργεια σε αυτό το νέο μέσο είναι φυσιολογικά διάρκειας 15 ημερών μέχρι να σχηματιστούν μικροί βλαστοί.

8. Μεταφορά στο θρεπτικό μέσο SEM

Όταν εμφανιστούν μικροί βλαστοί, ακολουθεί μεταφορά στο θρεπτικό μέσο επιμήκυνσης βλαστού (SEM) χωρίς επιλογή για 10 επιπλέον ημέρες.

9. Μεταφορά στο θρεπτικό μέσο RIM

Οι βλαστοί μεταφέρονται στο θρεπτικό μέσο επαγωγής της ρίζας (RIM) και αφήνονται για επώαση 1 εβδομάδα. Αν τα συμπλέγματα των βλαστών είναι πολύ μεγάλα είναι καλύτερα να διαιρεθούν σε μικρότερα κομμάτια. Οι βλαστοί είναι έτοιμοι για μεταφορά από το θρεπτικό RIM στο REM όταν παρατηρείται σχηματισμός ενός μικρού άσπρου κάλλου στην βάση του βλαστού.

10. Μεταφορά στο θρεπτικό μέσο REM

Οι βλαστοί μεταφέρονται στο θρεπτικό μέσο επιμήκυνσης της ρίζας (REM). Αυτό το στάδιο κρατάει περίπου 10 μέρες.

Θρεπτικά μέσα για το μετασχηματισμό φυτών *Lotus japonicus* μέσω του Αγροβακτηρίου

Θρεπτικό μέσο LB για την καλλιέργειας βακτηρίων

-1% πεπτόνη (προϊόν διάσπασης πρωτεϊνούχων ουσιών με πρωτεολυτικά ένζυμα)

-0.5% εκχύλισμα ζύμης (πηγή νουκλεοτιδίων, βιταμινών, αυξητικών παραγόντων)

-1% NaCl (οσμωτική ισορροπία)

Θρεπτικό μέσο επαγωγής κάλλων (Callus Inducing Medium, CIM)

Gamborg B₅ θρεπτικό μέσο + 3 mg/l IAA (ινδολ-3-οξικό οξύ- αυξητική ορμόνη)

+ 0.15 mg/l 2.4D (2.4 διχλωροφαινοξυοξικό οξύ-συνθετική αυξίνη)

+ 0.6 mg/l BA (βενζυλαμινοπουρίνη-αυξητική ορμόνη)

+ 0.3 mg/l IPA (ινδολ-3-προπιονικό οξύ- αυξητική ορμόνη)

+ 3% σουκρόζη

+ 1% φυτικό άγαρ (phytagel)

Θρεπτικό μέσο επαγωγής βλαστού 1 (Shoot Inducing Medium 1, SIM1)

MS θρεπτικό μέσο + 0.5 mg/l TDZ (Thidiazuron-κυτοκίνη, αυξητικός ρυθμιστής)

+ 3% σουκρόζη

+1%φυτικό άγαρ(προτιμάται για την καλλιέργεια φυτικών ιστών)

+ 15 mg/l υγρομυκίνη

Θρεπτικό μέσο επαγωγής βλαστού 2 (Shoot Inducing Medium 2, SIM2)

MS θρεπτικό μέσο + 0.05 mg/l TDZ

+ 3% σουκρόζη

+ 1% φυτικό άγαρ

+ 15 mg/l υγρομυκίνη

Θρεπτικό μέσο επιμήκυνσης βλαστού (Shoot Elongation Medium , SEM)

MS θρεπτικό μέσο + 0.05 mg/l TDZ

+ 3% σουκρόζη

+ 1% φυτικό άγαρ

Θρεπτικό μέσο επαγωγής της ρίζας (Root Inducing Medium, RIM)

B₂/2 ή MS/2 θρεπτικό μέσο + 0.1 mg/l NAA (ναφθαλινοξικό οξύ-συνθετική αυξίνη)

+ 3% σουκρόζη

+ 1% φυτικό άγαρ

Θρεπτικό μέσο επιμήκυνσης της ρίζας (Root Elongation Medium, REM)

B₂/2 ή MS/2 θρεπτικό μέσο + 3% σουκρόζη

+ 1% φυτικό άγαρ

Σημείωση: 1. Το pH όλων τα παραπάνω μέσων ρυθμίστηκαν στο 5.7-5.8 με ένα διάλυμα KOH 1M πρίν την αποστείρωση.

2. Οι φυτικές ορμόνες είναι συνήθως προετοιμασμένες ως 10000x διαλύματα.

2.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Αρχικά, πραγματοποιείται δειγματοληψία (αποκοπή φύλλων) του φυτού. Τα φύλλα τοποθετούνται σε σωληνάρια erpendorf που περιέχουν υγρό άζωτο.

1. Τα φύλλα λυοτριβούνται με πλαστικά έμβολα.

2. Προζεσταίνεται το διάλυμα CTAB στους 65⁰C.

Διάλυμα CTAB
100 mM Tris-HCl pH=8
20 mM EDTA pH=8
1.4 M NaCl
9% w/v CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide)
1 μl/δείγμα μερκαπτοαιθανόλης (αναστολή των νουκλεασών)

3. Προσθήκη ενός όγκου προθερμασμένου διαλύματος CTAB σε κάθε δείγμα, έντονη ανάδευση και επώαση 10-30 λεπτά στους 65⁰C.

4. Προσθήκη σε κάθε δείγμα ενός όγκου του αντιδραστηρίου Sevag και έντονη ανάδευση.

Sevag

Χλωροφόρμιο: ισοαμλική αλκοόλη σε αναλογία 24:1

5. Φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα για 2 λεπτά και μεταφορά της προκύπτουσας υδατική φάσης σε καθαρά σωληνάρια erpenforf.

6. Προσθήκη 0.7 όγκου ισοπροπανόλης στην υδατική φάση, ήπια ανάδευση και επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα για 15 λεπτά και πλύση του ιζήματος με 0.5 ml κρύας 70% αιθανόλης.
8. Εκτέλεση άλλης μιας φυγοκέντρησης σε μέγιστη ταχύτητα για 5 λεπτά.
9. Προσθήκη 50-100 μl νερού στο οποίο έχει προστεθεί RNase.

2.5 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ PCR

Προκειμένου να διαπιστωθεί η μεταφορά του ενθέματος του T-DNA από το Αγροβακτήριο στα φυτά, πραγματοποιείται μια αντίδραση PCR για την ενίσχυση του γονιδίου που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό υγρομυκίνη, το οποίο βρίσκεται μέσα στο ένθεμα.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης(PCR) αποτελεί μια γρήγορη, εύκολη και οικονομική τεχνική που επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό *in vitro* επιλεγμένων αλληλουχιών DNA. Η μέθοδος βασίζεται στην επαναλαμβανόμενη αντιγραφή ενός τμήματος DNA με τη βοήθεια μιας ειδικής θερμοανθεκτικής πολυμεράσης και δύο ολιγονουκλεοτιδικών εκκινήτων σχεδιασμένων σε γνωστές αλληλουχίες. Έτσι ένα δείγμα DNA αναμιγνύεται με τα τέσσερα δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), τα δύο εναρκτήρια ολογονουκλεοτίδια (εκκινήτες), και την ειδική DNA πολυμεράση (Taq πολυμεράση), ενώ προστίθεται και κατάλληλη συγκέντρωση ιόντων Mg^{+2} (τα ιόντα Mg^{+2} μαζί με τα dNTPs αποτελούν το πραγματικό υπόστρωμα που αναγνωρίζει η πολυμεράση) και ρυθμιστικού διαλύματος (για να διατηρηθούν σταθερά το pH και η ιονική ισχύς του περιβάλλοντος της αντίδρασης).

Τα αντιδραστήρια και οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση PCR διαφαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

	Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις
Μήτρα DNA (γενωμικό DNA)	-	100-200ng
Ευθύς εκκινητής HygF.	5 μ M	0.4 μ M
Ανάστροφος εκκινητής HygR.	5 μ M	0.4 μ M
dNTPs	10 mM	200mM
ρυθμιστικό διάλυμα+Mg ⁺²	10x	1X
Ταq πολυμεράση	5 u/μl	0.4 u

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

HygF: 5'-GACCAATGCGGAGCATATACG-3'

HygR: 5'-CAGCTTCGATGTAGGAGGGC-3'

Η αντίδραση PCR χωρίζεται σε 3 στάδια:

1. Την αποδιάταξη του DNA στόχου, η οποία επιτυγχάνεται στους 95⁰C.
2. Την υβριδοποίηση των ειδικών εκκινητών στον αποδιαταγμένο DNA στόχο, η οποία ρυθμίζεται 5⁰C χαμηλότερα από το σημείο τήξης(Tm).
3. Την επιμήκυνση από κάθε εκκινητή μιας συμπληρωματικής αλυσίδας, η οποία πραγματοποιείται συνήθως στους 72⁰C.

Επομένως το πρόγραμμα που εισάγαμε στον θερμοκυκλοποιητή είναι οι εξής:

-95⁰C για 3 λεπτά

-95⁰C για 30 δευτερόλεπτα (αποδιάταξη)

-55⁰C για 30 -//- (υβριδοποίηση εκκινητών) (Θ =Tm-5⁰C, Tm=60⁰C)

-72⁰C για 45 -//- (επιμήκυνση αλυσίδων)

-72⁰C για 3 λεπτά (τελική επιμήκυνση)

-4⁰C για ∞ (διατήρηση δειγμάτων)

} x 30 κύκλοι

2.6 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Η τεχνική αυτή, επιτρέπει τον διαχωρισμό μορίων δίκλωνου DNA σε ουδέτερο pH. Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή μετανάστευσης φορτισμένων μορίων κάτω από την επίδραση ενός εξωτερικά εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροστατική δύναμη που αναπτύσσεται κατευθύνει τα φορτισμένα μόρια προς το ηλεκτρόδιο του αντίθετου φορτίου. Έτσι λοιπόν, το DNA που φέρει αρνητικό φορτίο λόγω των φωσφορικών του ομάδων, τοποθετείται στην κάθοδο(-) και κινείται προς την άνοδο(+).

Η προετοιμασία της πηκτής των δειγμάτων γίνεται ως εξής :

- Κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης προστίθεται σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE (διατηρεί σταθερή την κατανομή του ηλεκτρικού φορτίου) και θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να λιώσει.
- Στη λιωμένη αγαρόζη προστίθεται διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (φθορίζουσα χρωστική που παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και έτσι προκαλεί τον φθορισμό του DNA μετά από έκθεση σε UV ακτινοβολία) και αφήνεται να κρυώσει.
- Η πηκτή τοποθετείται σε κατάλληλο εκμαγείο της συσκευής ηλεκτροφόρησης και αφήνεται να πήξει σε θερμοκρασία δωματίου. Στο σημείο αυτό, στην πηκτή βυθίζεται μια ειδική “χτένα” που δημιουργεί τις υποδοχές των δειγμάτων.
- Μόλις στερεοποιηθεί η πηκτή απομακρύνεται η “χτένα” και η συσκευή ηλεκτροφόρησης συμπληρώνεται με το ρυθμιστικό διάλυμα TAE.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός των πειραμάτων που διεξήχθησαν με τις παραπάνω μεθόδους είναι η απόκτηση μετασχηματισμένων φυτών *Lotus japonicus* MG20, τα οποία φέρουν το γονίδιο ανθεκτικότητας στην υγρομυκίνη. Το γεγονός αυτό θα αποκαλύψει την επιτυχία της προσπάθειας μας να εφαρμόσουμε αυτό το νέο πρωτόκολλο μετασχηματισμού-αναγέννησης στο φυτό-μοντέλο *Lotus japonicus* με σκοπό την απόκτηση καλύτερων και γρηγορότερων αποτελεσμάτων μετασχηματισμού.

3.2 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΑΓΡΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Ο μετασχηματισμός των Αγροβακτηρίων στελέχους AGL1 πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροδιάτρηση χρησιμοποιώντας το πλασμίδιο pCAMBIA1300. Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται μια καλλιέργεια Αγροβακτηρίου στελέχους AGL1, στην οποία οι πορτοκαλί κουκίδες αποτελούν τις αποικίες των Αγροβακτηρίων.



Εικόνα 4. Καλλιέργεια στελέχους Αγροβακτηρίου στελέχους AGL1.

3.3 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΦΥΤΩΝ

Στο στάδιο αυτό, αρχικά έγινε αποστείρωση σπόρων *Lotus japonicus* MG20, οι οποίοι αφέθηκαν να μεγαλώσουν σε θρεπτικό μέσο B₅/2 για 30 ημέρες (Εικόνα 5). Οι ρίζες των 30 ημερών έπειτα, κόπηκαν και μεταφέρθηκαν στο θρεπτικό μέσο επαγωγής κάλλων CIM για 5 ημέρες.



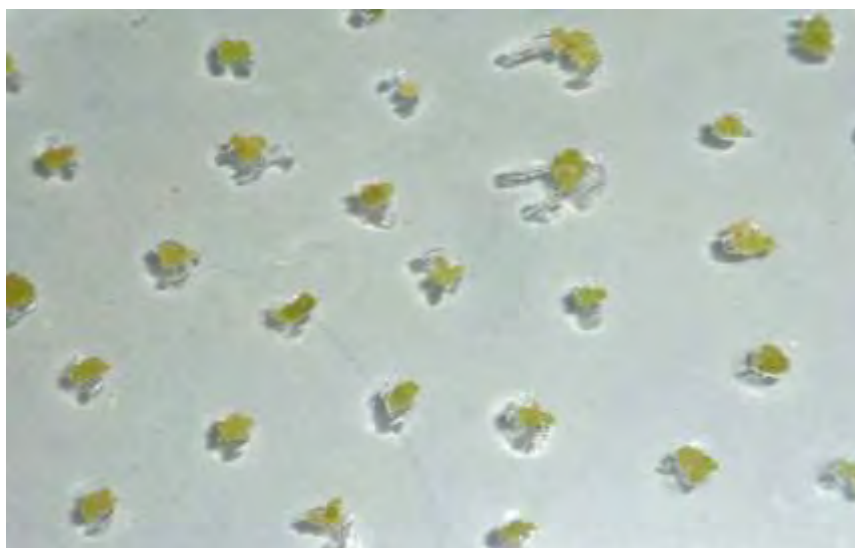
Εικόνα 5. Ρίζες φυτών που άρχισαν να εκβλαστάνουν σε θρεπτικό μέσο B₅/2.

Στη συνέχεια, ακολούθησε η επιμόλυνση των ριζών με το μετασχηματισμένο στέλεχος Αγροβακτηρίου, το οποίο αναπτυσσόταν στο θρεπτικό μέσο LB. Έτσι, λοιπόν, οι ρίζες εμβαπτίστηκαν στην καλλιέργεια του Αγροβακτηρίου και κόπηκαν σε κομμάτια των 0.5 cm ώστε να γίνει καλύτερα η επιμόλυνση τους, ενώ μετά τη μόλυνση τα ριζικά έκφυτα (Εικόνα 6) μεταφέρθηκαν στο θρεπτικό μέσο CIM για 48 ώρες.



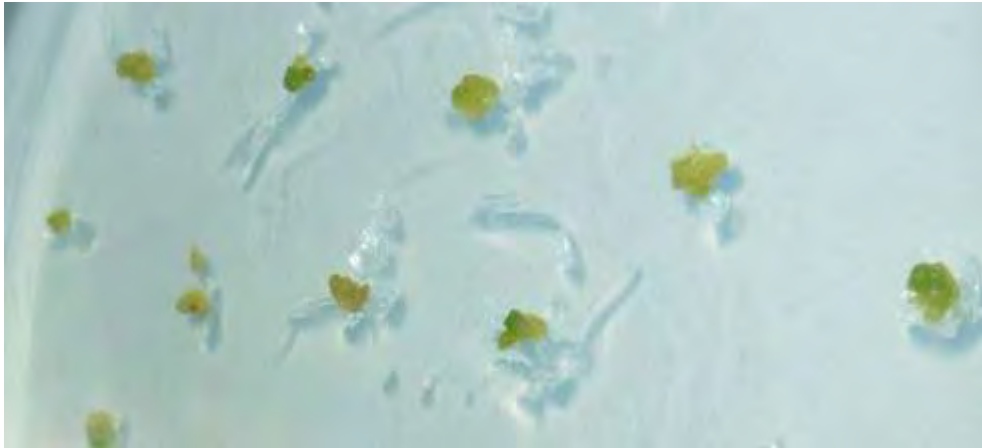
Εικόνα 6. Ριζικά έκφυτα σε θρεπτικό μέσο CIM.

Μετά τη 48ωρη επώαση των φυτών με το Αγροβακτήριο, τα ριζικά έκφυτα ξεπλήθυκαν 3 φορές σε αποστειρωμένο νερό για να απομακρυνθούν τα Αγροβακτήρια και μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό μέσο CIM που περιέχει 200mg/l κεφοταξίμη για 2 ημέρες. Η παρουσία του αντιβιοτικού κεφοταξίμη στο θρεπτικό μέσο εμποδίζει την περαιτέρω ανάπτυξη των Αγροβακτηρίων. Έπειτα, τα έκφυτα μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό μέσο CIM που περιέχει 200mg/l κεφοταξίμη και 15mg/l υγρομυκίνη για 3-4 εβδομάδες, με σκοπό την επιλογή των μετασχηματισμένων από τα μη μετασχηματισμένα φυτά εφόσον τα πρώτα θα πρέπει να έχουν ανθεκτικότητα στην υγρομυκίνη, καθώς η ένθεση T-DNA περιέχει το γονίδιο ανθεκτικότητας στην υγρομυκίνη. Τα μετασχηματισμένα φυτά που επιβιώνουν σε αυτό το θρεπτικό αρχίζουν να σχηματίζουν μικρούς πράσινους κάλλους και όταν αυτοί φτάσουν 1-2 mm ύψος μεταφέρονται στο θρεπτικό μέσο επαγωγής βλαστού 1 (SIM1) (Εικόνα 7) για 3 εβδομάδες.



Εικόνα 7. Μικροί πράσινοι κάλλοι που αναπτύσσονται στο θρεπτικό μέσο επαγωγής βλαστού 1 (SIM1).

Όταν οι πράσινοι κάλλοι μεγαλώσουν αρκετά και εμφανιστούν δομές που οδηγούν στην αναγέννηση, οι κάλλοι μεταφέρονται στο θρεπτικό μέσο επαγωγής βλαστού 2 (SIM2) (Εικόνα 8) για 15 ημέρες, φροντίζοντας να καθαριστεί το πράσινο μέρος από τον καφέ νεκρωτικό ιστό κατά τη μεταφορά.



Εικόνα 8. Πράσινοι κάλλοι που εμφανίζουν δομές, οι οποίες οδηγούν στην αναγέννηση του φυτού και έχουν μεταφερθεί στο θρεπτικό μέσο επαγωγής βλαστού 2 (SIM2).

Όταν εμφανιστούν μικροί βλαστοί, ακολουθεί μεταφορά στο θρεπτικό μέσο επιμήκυνσης βλαστού (SEM) (Εικόνα 9) χωρίς επιλογή για 10 επιπλέον ημέρες.



Εικόνα 9. Μικροί βλαστοί που προέκυψαν από κάλλους και έχουν μεταφερθεί στο θρεπτικό μέσο επιμήκυνσης βλαστού (SEM).

Στην πορεία, οι βλαστοί μεταφέρονται στο θρεπτικό μέσο επαγωγής της ρίζας (RIM) (Εικόνα 10) για 1 εβδομάδα.



Εικόνα 10. Βλαστοί που έχουν μεταφερθεί στο θρεπτικό μέσο επαγωγής της ρίζας (RIM).

Οι βλαστοί είναι έτοιμοι για μεταφορά από το θρεπτικό RIM στο θρεπτικό μέσο επιμήκυνσης της ρίζας (REM) όταν παρατηρείται σχηματισμός ενός μικρού άσπρου κάλλου στην βάση του βλαστού (Εικόνα 11).



Εικόνα 11. Βλαστοί που εμφανίζουν ένα μικρό άσπρο κάλλο στη βάση τους και βρίσκονται σε θρεπτικό μέσο επαγωγής της ρίζας (RIM).

Μετά τη μεταφορά των βλαστών στο θρεπτικό μέσο επιμήκυνσης της ρίζας (REM), οι ρίζες αρχίζουν να επιμηκύνονται όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 12).



Εικόνα 12. Βλαστοί με ρίζες που έχουν αρχίσει να επιμηκύνονται στο θρεπτικό μέσο επιμήκυνσης της ρίζας (REM).

Όταν οι ρίζες μεγαλώσουν αρκετά, τα φυτά μεταφέρονται από τα τρυβλία σε γλάστρες για την περαιτέρω ανάπτυξη τους.

3.4 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ

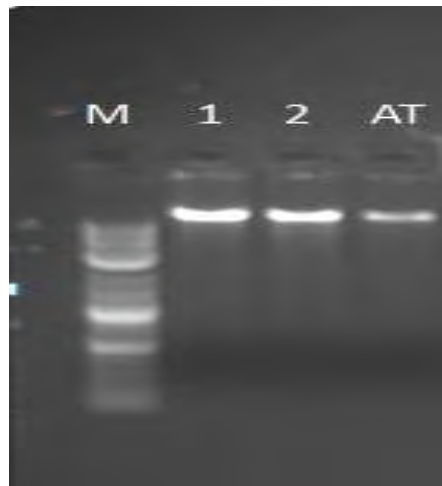
Τα φυτά που προέκυψαν από τη διαδικασία του μετασχηματισμού υποβλήθηκαν σε έλεγχο με τη μέθοδο της PCR για να διαπιστωθεί εάν έχουν μετασχηματιστεί, δηλαδή εάν έχει ενσωματωθεί στο γονιδιωματικό τους DNA η ένθεση T-DNA.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν 2 δειγματοληψίες (αποκοπή φύλλων) από φυτά (Εικόνα 13) τα οποία είχαν υποστεί την παραπάνω διαδικασία μετασχηματισμού καθώς και μια δειγματοληψία ενός φυτού αγρίου τύπου, έτσι ώστε να απομονώσουμε το DNA τους.



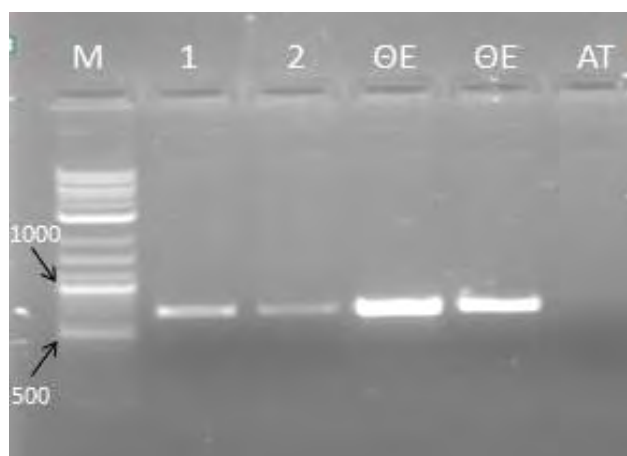
Εικόνα 13. Φυτό *Lotus japonicus* που προέκυψε από τη διαδικασία μετασχηματισμού και αναγέννησης.

Η ηλεκτροφόρηση που ακολούθησε το πρωτόκολλο απομόνωσης DNA μας έδωσε το παρακάτω αποτέλεσμα (Εικόνα 14), σύμφωνα με το οποίο η απομόνωση DNA ήταν επιτυχής εφόσον και τα 3 δείγματα εμφάνιζαν ζώνη.



Εικόνα 14. Ηλεκτροφόρηση μετά από απομόνωση DNA. Η πρώτη στήλη αντιστοιχεί στον δείκτη μοριακών βαρών (M) και οι επόμενες στα δείγματα 1 και 2 φυτών που είχαν υποστεί την διαδικασία μετασχηματισμού και τέλος στο δείγμα αγρίου τύπου (AT).

Τέλος, ακολούθησε αντίδραση PCR για την ενίσχυση μιας περιοχής που αντιστοιχεί στο γονίδιο ανθεκτικότητας στην υγρομυκίνη σε 2 δείγματα φυτών που είχαν υποστεί την διαδικασία μετασχηματισμού, 2 δείγματα θετικού ελέγχου (πλασμίδιο pCAMBIA1300) και 1 δείγμα αγρίου τύπου (αρνητικού ελέγχου), προκειμένου να διαπιστωθεί η επιτυχία ή μη της διαδικασίας μετασχηματισμού που περιγράψαμε. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR και το αποτέλεσμα που πήραμε φαίνεται στην Εικόνα 15.



Εικόνα 15. Ηλεκτροφόρηση μετά από ενίσχυση μιας περιοχής που αντιστοιχεί στο γονίδιο ανθεκτικότητας στην υγρομυκίνη. Η πρώτη στήλη αντιστοιχεί στον δείκτη μοριακών βαρών (M) και οι επόμενες στα δείγματα 1 και 2 φυτών που είχαν υποστεί την διαδικασία μετασχηματισμού, έπειτα ακολουθούν 2 δείγματα θετικού ελέγχου (ΘΕ) και τέλος ένα δείγμα αγρίου τύπου ως δείγμα αρνητικού ελέγχου (ΑΤ).

Η παραπάνω εικόνα, δείχνει πως τα δείγματα 1 και 2 είχαν λάβει το ένθεμα T-DNA που είχαμε εισαγάγει επιβεβαιώνοντας εν τέλει πως η διαδικασία μετασχηματισμού ήταν επιτυχής. Να συμπληρώσουμε, επίσης, πως τα προϊόντα που ενισχύθηκαν αντιστοιχούν στο προβλεπόμενο μέγεθος των 600 περίπου βάσεων.

4. ΣΗΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία εφαρμόσαμε μια νέα διαδικασία μετασχηματισμού και αναγέννησης του φυτού-μοντέλου *Lotus japonicus* χρησιμοποιώντας ριζικά έκφυτα που βασίζεται σε παλαιότερες αναφορές όπως αυτές που περιγράφονται στους Handberg & Stougaard, 1992 και Lombardi *et al.*, 2003 με σκοπό την απόκτηση καλύτερων και γρηγορότερων αποτελεσμάτων μετασχηματισμού. Με τη διαδικασία αυτή αναμένουμε την απόκτηση μετασχηματισμένων φυτών που περιέχουν το γονίδιο ανθεκτικότητας στην υγρομυκίνη που εισάγαμε χρησιμοποιώντας το πλασμίδιο pCAMBIA1300.

Η επιλογή του φυτού *Lotus japonicus* ως φυτό-μοντέλο για την διεξαγωγή των πειραμάτων μας έγινε χάρη στα μοναδικά του χαρακτηριστικά (μικρός κύκλος ζωής, αυτογονιμοποίηση, διπλοειδία, μικρό μέγεθος γονιδιώματος) που το καθιστούν χρήσιμο στην έρευνα. Για το μετασχηματισμό των φυτών στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν ριζικά έκφυτα όπως και στην εργασία των Lombardi *et al.*, 2003 εξαιτίας του γεγονότος ότι μπορούσαν να δώσουν ένα μεγάλο αριθμό μετασχηματισμένων φυτών σε αντίθεση με τη παλαιότερη εργασία των Handberg & Stougaard, 1992 όπου είχαν χρησιμοποιήσει έκφυτα υποκοτυλίου. Το πείραμα που εκτελέσαμε για το μετασχηματισμό των φυτών αυτών περιλαμβάνει σε γενικές γραμμές 3 στάδια: τον μετασχηματισμό του Αγροβακτηρίου, το μετασχηματισμό των φυτών και τον έλεγχο των μετασχηματισμένων φυτών. Αρχικά, έγινε ο μετασχηματισμός του Αγροβακτηρίου στελέχους AGL1 με ηλεκτροδιάτρηση χρησιμοποιώντας το πλασμίδιο pCAMBIA1300. Το πλασμίδιο αυτό φέρει στην T-DNA περιοχή το γονίδιο για την ανθεκτικότητα στην υγρομυκίνη οπότε είναι εύκολο να προσδιοριστεί η παρουσία του ενθέματος αυτού σε κύτταρα μετά από επώαση σε θρεπτικά που περιέχουν το αντιβιοτικό αυτό. Σύμφωνα με παλαιότερες εργασίες όπως αυτή των Handberg & Stougaard, 1992 μπορούμε να συμπεράνουμε πως η χρησιμοποίηση του γονιδίου ανθεκτικότητας στην υγρομυκίνη ως ένα δείκτη επιλογής είναι πολύ αποδοτική, καθώς το ποσοστό επιτυχίας του μετασχηματισμού με χρήση του γονιδίου αυτού για την επιλογή των μετασχηματισμένων φυτών ήταν 90%, ενώ αντίθετα το ποσοστό που επέφερε η χρήση του γονιδίου ανθεκτικότητας σε καναμυκίνη ήταν 5-65%. Στη συνέχεια, ακολούθησε η διαδικασία

μετασχηματισμού των φυτών *Lotus japonicus* MG20, η οποία χωρίζεται σε επιμέρους στάδια και βασίζεται κυρίως στην πιο πρόσφατα δημοσιευμένη εργασία των Lombardi *et al.*, 2003. Αρχικά, έγινε απολύμανση των σπόρων του φυτού οι ρίζες των οποίων μετά από 30 ημέρες μεταφέρθηκαν στο θρεπτικό μέσο επαγωγής κάλλων (CIM) για 5 ημέρες. Ακολούθησε η επιμόλυνση των ριζικών εκφύτων με το μετασχηματισμένο στέλεχος Αγροβακτηρίου και επώαση στο θρεπτικό μέσο CIM για 48 ώρες. Στην πορεία, έγινε έκπλυση του Αγροβακτηρίου από τα ριζικά έκφυτα σε αποστειρωμένο νερό και επώαση σε θρεπτικό μέσο CIM που περιέχει 200mg/l κεφοταξίμη για 2 ημέρες και αργότερα σε θρεπτικό μέσο CIM που περιέχει 200mg/l κεφοταξίμη και 15mg/l υγρομυκίνη για 3-4 εβδομάδες. Η παρουσία κεφοταξίμης παρεμποδίζει την περαιτέρω ανάπτυξη του Αγροβακτηρίου και ταυτόχρονα η παρουσία υγρομυκίνης επιτρέπει την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων. Οι μικροί πράσινοι κάλλοι που σχηματίστηκαν μεταφέρθηκαν στο θρεπτικό μέσο επαγωγής βλαστού 1 (SIM1) για 3 εβδομάδες και όταν αυτοί μεγάλωσαν αρκετά και εμφάνισαν δομές που οδηγούν στην αναγέννηση μεταφέρθηκαν στο θρεπτικό μέσο επαγωγής βλαστού 2 (SIM2) για 15 ημέρες. Το στάδιο επαγωγής βλαστού στην παρούσα εργασία διαφέρει από το αντίστοιχο που περιγράφεται από τους Lombardi *et al.*, 2003 καθώς σε εκείνη την εργασία οι κάλλοι μεταφέρθηκαν σε ένα μόνο στάδιο σε θρεπτικό μέσο SIM που περιέχει αυξητική ορμόνη BA και $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ενώ στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η ορμόνη TDZ (thidiazuron, αυξητικός ρυθμιστής που μοιάζει με κυτοκίνη) σε 2 διαφορετικές συγκεντρώσεις που εφαρμόζονται στα θρεπτικά SIM1 και SIM2 αντίστοιχα. Όταν εμφανίστηκαν μικροί βλαστοί ακολούθησε μεταφορά στο θρεπτικό μέσο επιμήκυνσης βλαστού (SEM) για 10 ημέρες, ενώ στη διαδικασία μετασχηματισμού που περιγράφεται από τους Lombardi *et al.*, 2003 η επώαση αυτή κράτησε 30 ημέρες χωρίς την παρουσία ορμονών στο θρεπτικό μέσο. Επομένως, μπορούμε να συμπεράνουμε πως η ορμόνη TDZ έχει καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά τον χρόνο που απαιτείται για την απόκτηση βλαστών έτοιμων για το επόμενο στάδιο. Σε αυτό το σημείο, μπορούμε να προσθέσουμε πως το ποσοστό επιτυχίας της αναγέννησης μέσω της διαδικασίας που εφαρμόσαμε ήταν 50-55%, παρόμοιο δηλαδή με προηγούμενες εργασίες όπως αυτή των Handberg & Stougaard, 1992. Οι βλαστοί μεταφέρθηκαν στη συνέχεια στο θρεπτικό μέσο επαγωγής της ρίζας (RIM) για 1 εβδομάδα και όταν σχηματίστηκε

έναν μικρό άσπρο κάλλο στη βάση του βλαστού έγινε η μεταφορά των βλαστών στο θρεπτικό μέσο επιμήκυνσης της ρίζας (REM). Όταν οι ρίζες μεγάλωσαν αρκετά, τα φυτά μεταφέρθηκαν από τα τρυβλία σε γλάστρες με περλίτη-βερμικουλίτη (1:1) και ακολούθησε το τελευταίο στάδιο του πειράματος, ο έλεγχος των μετασχηματισμένων φυτών. Για την διαπίστωση του μετασχηματισμού ή μη των φυτών που υπέστησαν την παραπάνω διαδικασία μετασχηματισμού και άρα της επιτυχίας του πειράματος μας, δείγματα από τα φυτά ελέγχθηκαν με τη μέθοδο PCR. Αρχικά, έγινε η απομόνωση γενωμικού DNA από 2 δείγματα που προέκυψαν από τη διαδικασία μετασχηματισμού-αναγέννησης και ένα φυτό αγρίου τύπου και στη συνέχεια ακολούθησε η αντίδραση PCR για την ενίσχυση μιας περιοχής που αντιστοιχεί στο γονίδιο ανθεκτικότητας στην υδρομυκίνη. Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR αποκάλυψε ότι τα 2 δείγματα έφεραν το γονίδιο ανθεκτικότητας στην υδρομυκίνη. Αυτό σημαίνει ότι τα φυτά είχαν μετασχηματιστεί επιτυχώς.

Βλέποντας πως η όλη διαδικασία μετασχηματισμού-αναγέννησης επέφερε μέσα σε περίπου 3-4 μήνες μετασχηματισμένα φυτά με ποσοστό επιτυχίας 100% μπορούμε να συμπεράνουμε πως η διαδικασία αυτή θα μπορούσε να αποτελέσει μια σαφώς καλύτερη μέθοδο απόκτησης μετασχηματισμένων φυτών από αυτή των Handberg & Stougaard, 1992 καθώς η διαδικασία αυτή είναι περισσότερο χρονοβόρα (6 μήνες) και το ποσοστό επιτυχίας μετασχηματισμού δε φτάνει το 100%. Η διαδικασία μετασχηματισμού που περιγράφεται από τους Lombardi *et al.*, 2003 φαίνεται να είναι σχεδόν το ίδιο αποδοτική, καθώς διαρκεί 4 μήνες αλλά το ποσοστό επιτυχίας αυτής είναι σαφώς μικρότερο (70-90%) από αυτό που παρατηρήθηκε στην παρούσα εργασία (100%). Εν κατακλείδι, μπορούμε να ισχυριστούμε με βεβαιότητα ότι η μέθοδος που εφαρμόσαμε θα μπορούσε να αποτελέσει μια αρκετά καλή επιλογή για την απόκτηση μετασχηματισμένων φυτών σε σύντομο χρονικό διάστημα και με μεγάλο ποσοστό επιτυχίας.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Allardet-Servent A, Michaux-Charachon S, Jumas-Bilak E, Karayan L, Ramuz M (1993) Presence of one linear and one circular chromosome in the *Agrobacterium tumefaciens* C58 genome. *Journal of Bacteriology* 175, 7869-7874

Asamizu E, Watanabe M, and Tabata S (2000), Large scale structural analysis of cDNAs in the model legume, *Lotus japonicus*. *Journal of Plant Research* 113, 451-455

Asamizu E, Nakamura Y, Sato S, Tabata S (2004) Characteristics of the *Lotus japonicus* gene repertoire deduced from large-scale expressed sequence tag (EST) analysis. *Plant Molecular Biology* 54, 405-414

Bennet M.D and Smith J.B (1976) Nuclear DNA amounts in Angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 274, 224-274

Citovsky V, Guranick B, Simon M.N and Wall J.S (1997) The molecular structure of *Agrobacterium* VirE2 single stranded DNA complexes involved in nuclear import. *Journal of Molecular Biology*, 272, pp. 718-727

Colebatch G, Desbrosses G, Ott T, Krusell T, Montanari O, Kloska S, Kopka J, Udvardi MK (2004) Global changes in transcription orchestrate metabolic differentiation during symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus*. *The Plant Journal* 39, 487–512

Curtis, I.S (1995) Genetic improvement of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*. Ph.D. Thesis, University of Nottingham.

Desbrosses G.G, Kopka J, Udvardi M.K (2005) *Lotus japonicus* metabolic profiling: development of GC-MS resources for the study of plant-microbe interactions. *Plant Physiology* 137, 1302-1318

Dixon, R.A. and Sumner, L.W. (2003) Legume natural products: understanding and manipulating complex pathways for human and animal health. *Plant Physiology* 131, 878-885

Dixon, R.A. (2004) Phytoestrogens. *Annual Review of Plant Biology* 55, 225-261

Endo M, Kokubun T, Takahata Y, Higashitani A, Tabata S, Watanabe M (2000) Analysis of expressed sequence tags of flower buds in *Lotus japonicus*. *DNA Research* 7, 213-216

Fiehn O, Kopka J, Dörmann P, Altmann T, Trethewey RN, Willmitzer L (2000) Metabolite profiling for plant functional genomics. *Natural Biotechnology* 8, 1157-1161

Forbes, D.J. (1992) Structure and Function of the nuclear pore complex. *Annual Review of Cell Biology* 8, 495-527

Gheysen G, Angenon G, and Van Montagu M (1998) *Agrobacterium*-mediated transformation: a scientifically intriguing story with significant applications, in Transgenic Plant Research. *Harwood Academic Publishers*, pp. 1-33

- Graham P.H. and Vance C.P. (2003) Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology* 131, 872-877
- Hajdukiewicz P, Svab Z, Maliga P (1994) The small versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Molecular Biology* 25, 989-994
- Handberg K. and Stougaard J (1992) *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular-genetics. *Plant Journal* 2, 487-496
- Hiei Y, Ohta S, Komari T, and Kumashiro T (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal* 6, 271-282
- Ke J, Khan R, Johnson T, Somers D.A. and Das A (2001) High efficiency gene transfer to recalcitrant plants by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports* 20, 150-156
- Kouchi H, Shimomura K, Hata S, Hirota A, Wu GJ, Kumagai H, Tajima S, Suganuma N, Suzuki A, Aoki T, *et al.* (2004) Large scale analysis of gene expression profiles during early stages of root nodule formation in a model legume. *DNA Research* 11, 263-274
- Lompari P, Ercolano E, El Alaoui H, Chiurazzi M (2003) A new transformation-regeneration procedure in the model legume *Lotus japonicus*: root explants as a source of a large number of cells susceptible to *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Reports* 21, 771-777
- Newell, C.A. (2000) Plant Transformation technology; Developments and Applications. *Molecular Biotechnology* 16, 53-65
- Ott T, van Drongen J, Gunther C, Krusell L, Desbrosses G, Vigeolas H, Bock V, Czechowski T, Geigenberger P, Udvardi M.K (2005) Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Current Biology* 15, 1-5
- Perry J.A, Welham TJ, Cheminant S, Parniske M, Wang T (2003) A TILLING reverse genetics tool and a web-accessible collection of mutants of the legume *Lotus japonicus*. *Plant Physiology* 131, 866-871
- Pitzschke A and Hirt H (2010) New insights into an old story: *Agrobacterium* induced tumour formation in plants by plant transformation. *The EMBO Journal* 1-12
- Sato S, Kaneko T, Nakamura Y, Asamizu E, Kato T, Tabata S (2001) Structural analysis of a *Lotus japonicus* genome. I. Sequence features and mapping of fifty-six TAC clones which cover the 5.4 Mb regions of the genome. *DNA Research* 8, 311-318
- Sato S and Tabata S (2006) *Lotus japonicus* as a platform for legume research. *Current Opinion in Plant Biology* 9, 128-132
- Smil V (1999) Nitrogen in crop production: an account for global flows. *Global Biogeochem. Cycles* 13, 647-662

- Smith E.F and Townsend C.O (1907) A plant-tumor of bacterial origin. *Science* 25, 671-673
- Stachel S.E, Messens E, Van Montagu M, Zambryski P (1985) Identification of the signal molecules produced by wounded plant cell that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 318, 624-629
- Stachel S.E, Timmerman B, Zambryski P (1986) virA and virG control the plant induced activation of the T-DNA transfer process of *A. tumefaciens*. *Cell* 46, 325-333
- Stiller J, Martirani L, Tuppale S, Chian R-J, Chiurazzi M, Gresshoff P.M (1997) High frequency transformation and regeneration of transgenic plants in the model legume *Lotus japonicus*. *Journal of Experimental Botany* 48, 1357-1365
- Streeter J.G (1991) Transport and metabolism of carbon and nitrogen in legume nodules. *Advances in Botanical Research* 18, 129–187
- Szczyglowski K and Stougaard J (2008) *Lotus* genome: pod of gold for legume research. *TRENDS in Plant Science* 13, 515 - 517
- Takane K, Tajima S, Kouchi H. (2000) Structural and expression analysis of uricase mRNA from *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13, 1156-60
- Thykjaer T, Stiller J, Handberg K, Jones J, Stougaard J (1995) The maize transposable element Ac is mobile in the legume *Lotus japonicus*. *Plant Molecular Biology* 27, 981-993
- Tinland B (1996) The integration of T-DNA into plant genomes. *Trends in plant science reviews* 1, 178-184
- Tzfira T and Citovsky V (2000) From host recognition to T-DNA integration: the function of bacterial and plant genes in the *Agrobacterium* - plant cell interaction. *Molecular Plant Pathology* 1, 201-212
- Tzfira T, Vaidya M, Citovsky V (2002) Increasing plant susceptibility to *Agrobacterium* infection by overexpression of the *Arabidopsis* nuclear protein VIP1. *PNAS* 99, 10435-10440
- Wang T.L, Domoney C, Hedley CL, Casey R, Grusak MA (2003) Can we improve the nutritional quality of legume seeds? *Plant Physiology* 131, 886-891
- Wienkoop S and Saalbach G (2003) Proteom analysis. Novel proteins identified at the peribacteroid membrane from *Lotus japonicus* root nodules. *Plant Physiology* 131, 1080-1090
- Udvardi M.K, Tabata S, Parniske M, Stougaard J (2005) *Lotus japonicus*: legume research in the fast lane. *TRENDS in Plant Science* 10, 222-228
- Zupan J, Ward D, Zambryski P (1998) Assembly of the VirB transport complex for DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. *Current Opinion in Microbiology* 1,649-655