



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών

«Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας - Μοριακή Γενετική - Διαγνωστικοί  
Δείκτες»

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

**LSK1, μια SHAGGY-like kinase με ρόλο  
στη φυματιογένεση του φυτού *Lotus  
japonicus***

Πλίτση Παναγιώτα – Κων/νιά

Λάρισα, 2016

# **LSK1, μια SHAGGY-like kinase με ρόλο στη φυματιογένεση του φυτού *Lotus japonicus***

**LSK1, a SHAGGY-like kinase with a role in *Lotus japonicus*  
nodulation**

## **ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

**ΚΑΡΠΟΥΖΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ**

**Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας,  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

## **ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:**

**ΚΑΡΠΟΥΖΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ**

**Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

**ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΚΑΛΛΙΟΠΗ**

**Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών Τμήμα Βιοχημείας και  
Βιοτεχνολογίας Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

**ΛΕΩΝΙΔΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ**

**Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>7</b>
1.1 Η GSK3/SHAGGY-like kinase (SK)	7
1.1.1 Λειτουργίες και δομή των ζωικών GSK3	7
1.1.2 Λειτουργίες των SK στα φυτά	9
1.1.2.1 Οι κινάσες SHAGGY-LIKE (SKs) στο <i>Lotus japonicus</i>	15
1.2 Το φυτό μοντέλο <i>Lotus japonicus</i>	17
1.3 Φυματογένεση: φυσιολογία και μοριακά μονοπάτια	18
1.4 Μετασχηματισμός με το <i>Agrobacterium rhizogenes</i> και “Hairy Root” φαινότυπος.	24
1.5 Σίγηση γονιδίου μέσω siRNA και ο δυαδικός φορέας pUBI-GWS-GFP	27
1.5.1 Ο φορέας σίγησης pUBI-GWS-GFP	29
1.6 Στόχοι	30
<b>2. ΥΛΙΚΑ &amp; ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>32</b>
2.1 Θρεπτικά Μέσα	32
2.2 Μετασχηματισμός φυτών <i>Lotus japonicus</i> μέσω του βακτηρίου <i>Agrobacterium rhizogenes</i> LBA1334	32
2.3 Φύτευση και εμβολιασμός με το ριζόβιο <i>Mesorhizobium loti</i> R7A	34
2.4 Συλλογή των φυτών	34
2.5 Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων	34
2.6 Απομόνωση γενωμικού DNA με τη μέθοδο CTAB	35
2.7 Ανίχνευση μετασχηματισμένων ριζών με PCR	35
2.8 Συνθεση cDNA	36
2.9 Ανάλυση τμημάτων DNA σε πηκτή αγαρόζης	37
2.10 Ημιποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (RT-qPCR)	37
2.11 Στατιστική ανάλυση	39
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>40</b>
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>47</b>
<b>5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>51</b>

## **ABSTRACT**

Plant SHAGGY-like kinases (SKs) share great similarity with animal glycogen synthase kinases (GSK3)/SHAGGY. Unlike their animal counterparts, which are very well studied, plant SKs have been the focus of research only for the last 15 years. A number of roles have been described since their first characterization, primarily as negative regulators of brassinosteroid signaling, but also their involvement in other hormone signaling networks, regulation of stomatal development and positioning, flower development, xylem differentiation, and responses to biotic and abiotic stresses. Most of these studies concern the roles of *Arabidopsis thaliana* SKs, whereas nothing is known of the functions of SKs in the model legume *Lotus japonicus*. In *L. japonicus* genome, a family of SKs with 6 putative members, was identified. Following the recent characterization of a *L. japonicus* SK (LSK1), which responded to rhizobial infection, this study is set to investigate further its involvement. Using the “Hairy Root” plant transformation system, the effects of LSK1 silencing in *L. japonicus* nodule formation was studied. Significant reduction of LSK1 expression in the majority of the transformed lines induced a phenotype similar to hypernodulating mutants with abundant nodules, but no obvious effects on the upper parts of the plants. Also, the expression of early nodulation marker gene ENOD40 was highly increased in the silenced lines. *ENOD40* has a role in nodule primordia formation and it is also expressed in mature nodules. Our results also indicate the role of LSK1 as a regulator in another yet developmental process, implying that many more roles for all of the LSK family members await discovery in *L. japonicus*, both in nodulation as well as in other basic cellular functions.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι φυτικές GSK3/SHAGGY-like κινάσες είναι πρωτεϊνικές οικογένειες με μεγάλη ομοιότητα με τις ζωικές GSK3/SHAGGY kinases. Σε αντίθεση με τους καλά μελετημένους ρόλους των GSK3 των θηλαστικών και άλλων ζωικών οργανισμών, λίγα είναι γνωστά για τους ρόλους τους στα φυτά με μεγάλη έμφαση να δίνετε στην εμπλοκή τους στην σηματοδότηση των μπρασσινοστεροειδών στο *Arabidopsis thaliana*, ενώ για τις λειτουργίες τους στο ψυχανθές φυτό μοντέλο *Lotus japonicus* ελάχιστα είναι γνωστά. Στο *Lotus japonicus* έχουν βρεθεί 6 μέλη της οικογένειας (LSKs). Πρόσφατα δεδομένα έδειξαν τη συμμετοχή ενός μέλους, της LSK1, στη διαδικασία της φυματιογένεσης. Σε συνέχεια αυτών των δεδομένων στην παρούσα διπλωματική εξετάστηκε η επίδραση της σίγησης της LSK1 στη φυματιογένεση φυτών *L. japonicus* με το φαινότυπο "Hairy Roots". Φυτά με μειωμένη έκφραση LSK1 ανέπτυξαν σημαντικά μεγαλύτερο αριθμό φυματίων στις ρίζες τους, που προσομοιάζει τον φαινότυπο των hypernodulating μεταλλαγμάτων. Τα φυμάτια εμφάνισαν το χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα των λειτουργικών φυματίων, ενώ οι βλαστοί των φυτών δεν παρουσίασαν αλλοιωμένα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Τα παραπάνω επιβεβαίωσαν την εμπλοκή της LSK1 στη φυματιογένεση, δείχνοντας ότι αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή της. Επιπλέον, τα επίπεδα του γονιδίου *ENOD40*, που κωδικοποιεί μια πρώιμη νοντουλίνη που εκφράζεται στις καταβολές του φυματίου και στους ιστούς του ώριμου φυματίου, ήταν σημαντικά αυξημένα στις σειρές με σίγηση, δείχνοντας την πιθανή καταστολή του από την LSK1. Προφανώς οι LSKs επιτελούν σημαντικούς ρόλους ως ρυθμιστικά μόρια, σε αντιστοιχία με ρόλους που έχουν περιγραφεί για SKs άλλων φυτών. Επιπλέον τα ευρήματα αυτά τονίζουν την ανάγκη για περαιτέρω μελέτη όλων των μελών της οικογένειας στο *L. japonicus*.

## Αντί προλόγου...

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος «Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας - Μοριακή Γενετική - Διαγνωστικοί Δείκτες» στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα παιδιά του εργαστηρίου για την πολύτιμη βοήθειά τους και την ανοχή τους καθόλη τη διάρκεια της παραμονής μου.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ στην Ειρήνη και την Catalyna. Ευχαριστώ για τη βοήθειά σας, την παρέα σας και την ψυχολογική υποστήριξη.

Ένα δεύτερο τεράστιο ευχαριστώ στη Βασιλική και τον Κώστα. Ευχαριστώ για την αμέριστη συμπαράστασή σας και υποστήριξη, καθώς και για το χρόνο που αφιερώσατε στην εκπαίδευσή μου ακόμα και όταν ο φόρτος εργασίας σας ήταν μεγάλος και πιεστικός.

Επίσης ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς επιτροπής τον καθηγητή Λεωνίδα Δημήτριο, Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας, τον καθηγητή Καρπούζα Δημήτριο, Αναπληρωτή Καθηγητή Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας και ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στην καθηγήτρια Καλλιόπη Παπαδοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών που με δέχτηκε στην ερευνητική της ομάδα. Σας ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη σας και τον χρόνο που μου αφιερώσατε.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου και τις αδερφές μου, για τη φροντίδα και υποστήριξή τους, τα υπέροχα ανηψάκια μου, τον πιο γλυκό περισπασμό μου από το διάβασμα και τον Δημοσθένη χωρίς τον οποίο αυτό το Μεταπτυχιακό δεν θα είχε ολοκληρωθεί ή ξεκινήσει ποτέ.

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1. Η GSK3/SHAGGY-like kinase (SK)

### 1.1.1. Λειτουργίες και δομή των ζωικών GSK3

Η πρωτεΐνη Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3), γνωστή και ως SHAGGY στη *Drosophila melanogaster* (Ruel *et al.*, 1993), είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης (Ser/Thr kinase), ομόλογες της οποίας απαντώνται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς που έχουν εξεταστεί όπως το *Dictiostelium*, μύκητες, μύγες, φυτά, σπονδυλωτά, και ασπόνδυλα, και σε όλους η λειτουργική περιοχή κινάσης παρουσιάζει πάνω από 90% ομοιότητα (Ali *et al.*, 2001).

Η GSK3 των θηλαστικών κωδικοποιείται από δύο γονίδια, GSK3α και GSK3β (Woodgett, 1990) τα οποία εκφράζονται σε όλους τους ιστούς. Η περιοχή κινάσης των GSK3α (51kDa, 483 α.α.) και GSK3β (47kDa, 433 α.α.) παρουσιάζει 98% ομοιότητα, αλλά διαφέρουν στις αμινο- και καρβοξυ-τελικές περιοχές τους (Kim & Kimmel, 2006). Αποτελούνται από μια αμινοτελική επικράτεια και την επικράτεια με λειτουργία κινάσης (Dajani *et al.*, 2001)

Η GSK3 παρουσιάζει υψηλή ενεργότητα σε συνθήκες που το κύτταρο είναι μη διεγερμένο (Sutherland *et al.*, 1993, Stambolic and Woodgett, 1994, Woodgett, 1994). Εξωτερικά ερεθίσματα, όπως η ινσουλίνη μέσω της κινάσης Akt/PKB, προκαλούν ταχεία, αντιστρεπτή φωσφορυλίωση της GSK3 στην Ser9 (GSK3α)/Ser21 (GSK3β) του αμινοτελικού της άκρου (Sutherland *et al.*, 1993). Η φωσφορυλίωση δημιουργεί ένα «ψευδοϋπόστρωμα» που καταλαμβάνει τη θέση πρόσδεσης του φωσφορικού στην ενεργή περιοχή της κινάσης και αποκλείει την πρόσδεση κανονικών υποστρωμάτων (Frame *et al.*, 2001). Θετική ρύθμιση προκαλεί η φωσφορυλίωση ενός καταλοίπου τυροσίνης (Tyr279 για την GSK3α /Tyr216 για την GSK3β, Hughes *et al.*, 1993, Lochhead *et al.*, 2006) μέσα στην περιοχή ενεργοποίησης (T-loop). Υπάρχουν ενδείξεις για αυτοφωσφορυλίωση της Tyr216 αμέσως μετά τη σύνθεσή της (Lochhead *et al.*, 2006). Η φωσφορυλιωμένη Tyr ενδέχεται να διευκολύνει τη δράση της, χωρίς να είναι απαραίτητη (Dajani *et al.*, 2001).

Οι πρωτεΐνες-υποστρώματα των ζωικών GSK3s περιέχουν το μοτίβο Ser/Thr-X-X-Ser/Thr (όπου X οποιοδήποτε αμινοξύ). Η φωσφορυλίωση συμβαίνει στο πρώτο κατάλοιπο του πεπτιδίου, μετά από φωσφορυλίωση του τέταρτου καταλοίπου Ser/Thr (priming position) από άλλη κινάση (primed substrate) (Thomas *et al.*, 1999). Το ήδη φωσφορυλιωμένο κατάλοιπο προσδένεται σε μια θέση που δημιουργείται από τα

συντηρημένα θετικά φορτισμένα κατάλοιπα Arg96, Arg180, και Lys205 (στην ανθρώπινη GSK3β) (Dajani *et al.*, 2001). Επίσης η δράση της GSK3 ρυθμίζεται από την πρόσδεσή της σε πρωτείνες ικριώματα (scaffold proteins) αλλά και μέσω της διαφορετικής υποκυτταρικής εντόπισης των ισοενζύμων (Kaidanovich-Beilin & Woodgett, 2011).

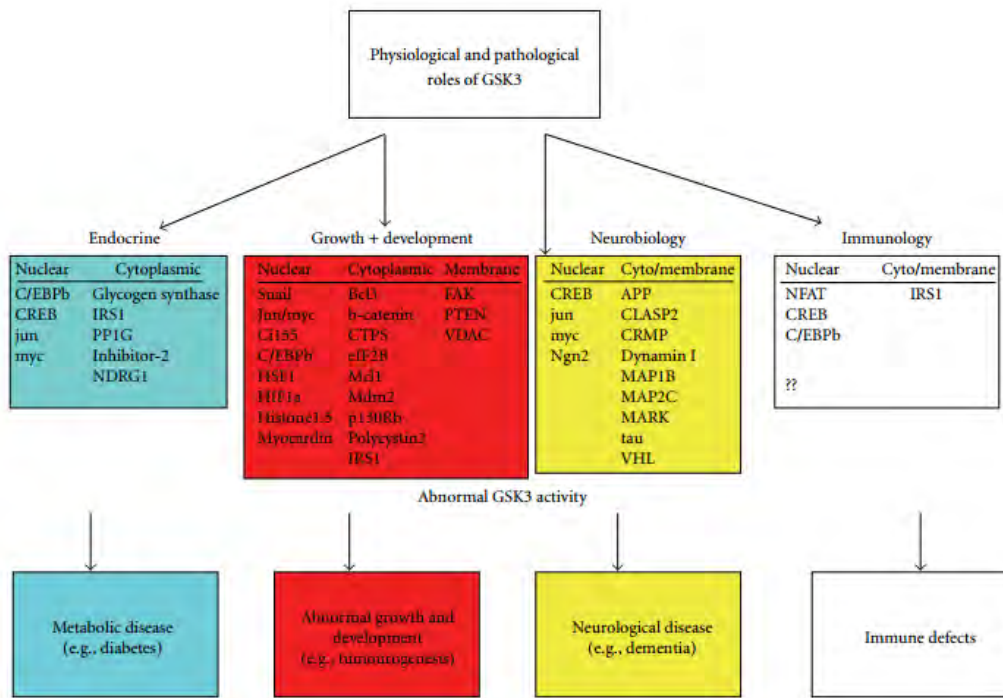
Όσον αφορά τις λειτουργίες της GSK3 στα ζώα μέχρι σήμερα έχειδειχθεί ότι ρυθμίζει ποικίλες φυσιολογικές και αναπτυξιακές διαδικασίες όπως ο μεταβολισμός του γλυκογόνου, η ρύθμιση του κυτταροσκελετού, η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου, μεταβολική ομοιόσταση, η εμβρυακή ανάπτυξη, η νευρωνική διαφοροποίηση και η απόπτωση (Doble & Woodgett, 2003, Kim and Kimmel, 2006, Hur & Zhou, 2010).

Οι πιο καλά μελετημένοι ρόλοι της αφορά στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος Wnt/β-κατενίνης. Συνοπτικά όταν δεν υπάρχει ενεργοποίηση του μονοπατιού μέσω της πρόσδεσης της πρωτεΐνης Wnt στον υποδοχέα της, η GSK3 βρίσκεται προσδεδεμένη στην πρωτεΐνη axin συμμετέχοντας σε ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών που περιλαμβάνει τις β-κατενίνη (b-cat), casein kinase I (CKI) και adenomatous polyposis coli protein (APC). Η CKI παρέχει την πρώτη φωσφορυλίωση της β-κατενίνης, επιτρέποντας την ακόλουθή της φωσφορυλίωση από την GSK3, οδηγώντας την β-κατενίνη σε αποικοδόμηση μέσω του πρωτεασώματος. Όταν το κύτταρο διεγερθεί μέσω της πρόσδεσης της wnt στους υποδοχείς της εμποδίζεται η δράση της GSK3 μέσω διάλυσης του συμπλόκου από τις πρωτείνες FRAT (frequently arranged in T cell lymphomas) και disheveled (dvl).

Παρόμοιο ρόλο παίζει η GSK3 στο αναπτυξιακό μονοπάτι μεταγωγής σήματος Hedgehog (Hh) (Jia *et al.*, 2002). Όταν ο υποδοχέας Hedgehog receptor patched (Ptc) είναι ανενεργός ο μεταγραφικός παράγοντας cubitus interruptus (Ci) σχηματίζει σύμπλεγμα με τις costal2 (Cos) και fused (Fus), που βρίσκεται προσδεδεμένο στους μικροσωληνίσκους. Σε αυτό το σύμπλεγμα η Ci φωσφορυλιώνεται από τις protein kinase A (PKA), CKI και GSK3, οδηγώντας στην πρωτεόλυση του Ci στο μεταγραφικό καταστολέα Ci75.

Λόγω της συμμετοχής της GSK3 ως ένζυμο «κλειδί» πολλαπλών μονοπατιών μεταγωγής σήματος και της ρύθμισης πλήθους μεταγραφικών παραγόντων η GSK3 ερευνάται ως θεραπευτικός στόχος σε μια σειρά από ασθένειες που οφείλονται σε απορρυθμίση μονοπατιών τα οποία ελέγει. Η απορρυθμίση της συγκεκριμένα δείχνει να εμπλέκεται σε ασθένειες όπως: ο διαβήτης, η διπολική διαταραχή, ο καρκίνος, και το Alzheimer (Doble and Woodgett, 2003, Jope & Johnson, 2004, Hur & Zhou, 2010).





**Εικόνα 1:** Οι φυσιολογικοί και παθολογικοί ρόλοι της GSK3 στα ζώα.

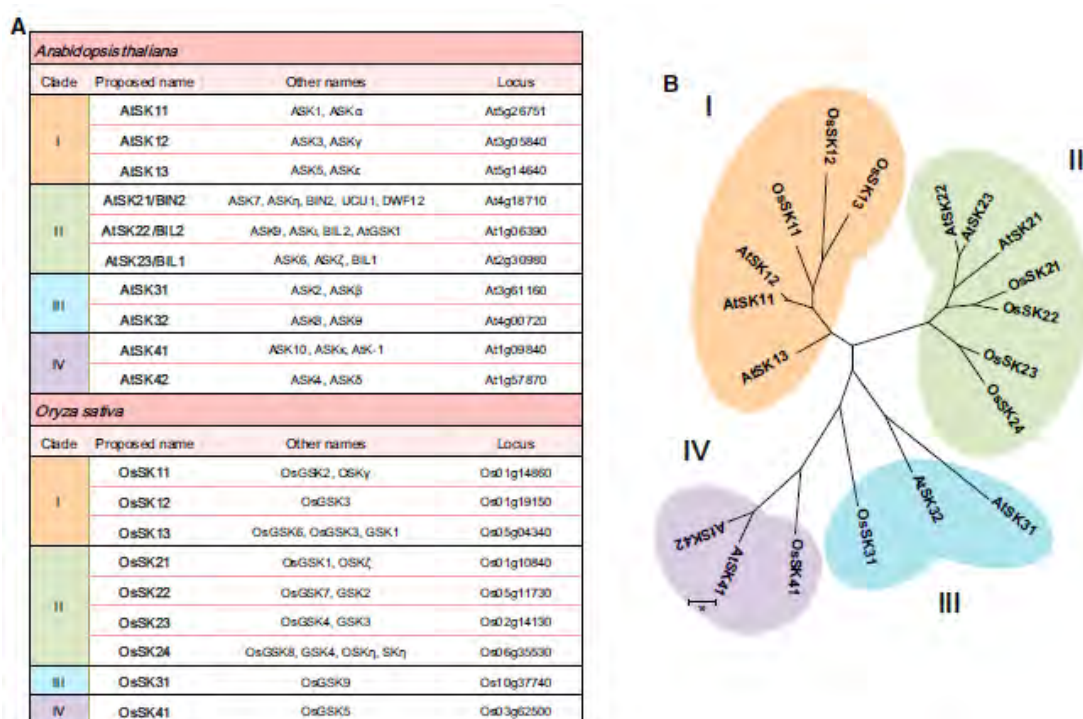
### 1.1.2. Λειτουργίες των SK στα φυτά

Γονίδια που κωδικοποιούν για κινάσες όμοιες με τη GSK3β (GSK3β/SHAGGY-like kinases) περιέχονται επίσης στο φυτικό γονιδίωμα. Σε αντίθεση με τις ζωικές GSK3s των οποίων ο ρόλος και οι πρωτείνες με τις οποίες αλληλεπιδρούν είναι καλά χαρακτηρισμένες και αποτελούν αντικείμενο εντατικής μελέτης πολλά χρόνια, οι φυτικές SKs έχουν αρχίσει να μελετούνται εντατικά σχετικά πρόσφατα. Η συμμετοχή τους σε φυτικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος και τα υποστώματά τους είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστα.

Τα φυτά κωδικοποιούν για οικογένειες SKs με πολλά μέλη, στο *A. thaliana* έχουν βρεθεί 10 μέλη αυτής της οικογένειας (*AtSK*s) και στο ρύζι 9 (*OsSK*s) (Yoo *et al.*, 2006). Βάση της ομολογίας της αμινοξικής τους ακολουθίας οι φυτικές SKs μπορούν να καταταγούν σε 4 ομάδες (I–IV) (Jonak & Hirt, 2002). Η προτεινόμενη ονοματολογία τους και η ομάδα στην οποία αντιστοιχεί το κάθε μέλος φαίνεται στην Εικόνα 2. Όλες οι φυτικές κινάσες που έχουν βρεθεί μέχρι στιγμής εμφανίζουν εξαιρετικά συντηρημένη την λειτουργική περιοχή της κινάσης. Η αμινο- και καρβοξυτελική τους περιοχή όμως διαφέρει σημαντικά (Jonak & Hirt, 2002). Στο *A. thaliana* η καρβοξυτελική περιοχή των *AtSK*s είναι συντηρημένη και παίζει ρόλο στην αλληλεπίδραση με το υπόστωμα.

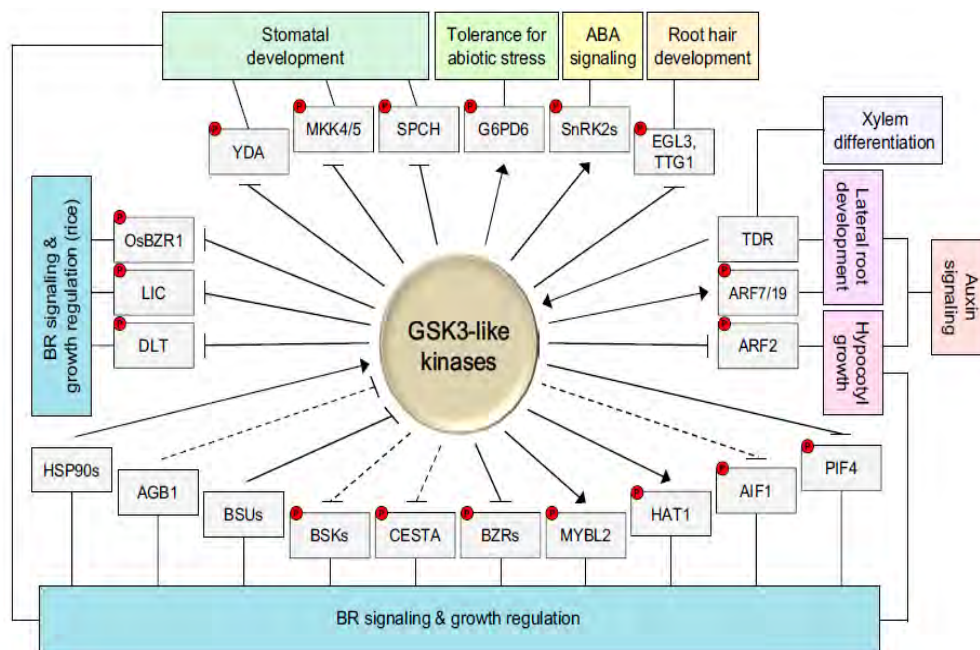
Αντίθετα η αμινοτελική τους περιοχή συνήθως διαφέρει και επηρεάζει την υποκυτταρική τους τοποθέτηση (Kim *et al.*, 2009; Youn *et al.*, 2013).

Όλες οι φυτικές SKs που έχουν εξεταστεί εμφανίζουν συντηρημένη τη φωσφορυλιωμένη τυροσίνη στην περιοχή ενεργοποίησης, που αντιστοιχεί στην φωσφορυλιωμένη Tyr216 της GSK3β των θηλαστικών (Kaidanovich-Beilin & Woodgett, 2011). Επίσης, συντηρημένα εμφανίζονται στις αντίστοιχες θέσεις τα αμινοξικά κατάλοιπα υπεύθυνα για την πρόσδεση του ενεργοποιημένου (μέσω φωσφορυλίωσης από άλλη κινάση) υποστρώματος (Arg94, Arg180, and Lys205 στην ανθρώπινη GSK3β). Παρόλα αυτά, μελέτες έχουν δείξει ότι για την καταλυτική δράση των φυτικών SKs δεν είναι απαραίτητη ούτε η προηγούμενη φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων τους ούτε η πρόσδεσή τους σε πρωτεΐνες κριώματα (He *et al.*, 2002, Zhao *et al.*, 2002). Άλλη μια διαφορά των φυτικών SKs είναι η μη συντηρημένη Ser9/21 στο αμινοτελικό τους άκρο, μέσω της φωσφορυλίωσης του οποίου αναστέλλεται η δράση των GSK3 των θηλαστικών (Forde & Dale, 2007), υποδεικνύοντας ένα διαφορετικό τρόπο ρύθμισης της ενεργότητάς των φυτικών SKs.



**Εικόνα 2** Ομάδες (A) και το φυλογενετικό δέντρο (B) των SHAGGY-like κινασών που έχουν απομονωθεί από το *A. thaliana* και το ρύζι (*O. sativa*). Η φυλογενετική ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα ClustalW χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Maximum Parsimony (Προσαρμοσμένο από Youn & Kim, 2015).

Μέχρι στιγμής έχουν περιγραφεί λειτουργίες των φυτικών SKs σε διαδικασίες όπως: η ανάπτυξη και ο σχηματισμός της ρίζας και του αγγειακού συστήματος, η ανάπτυξη των άνθων και των στομάτων, και συμμετοχή στις αποκρίσεις του φυτού σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα όπως το βιωτικό και αβιωτικό στρες (Yoon & Kim, 2015). Ο σηματοδοτικός ρόλος των φυτικών SKs είναι κυρίως μέσω αρνητικής ρύθμισης των μονοπατιών που συμμετέχουν, παρόμοια με τις GSK3s των θηλαστικών. Ωστόσο, στα φυτά έχει περιγραφεί και θετική ρύθμιση των υποστρωμάτων τους (Εικόνα 3 και 4).



**Εικόνα 3:** Τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος που μεσολαβούνται από τις GSK3-like κινάσες στο *Arabidopsis* και το ρύζι. Τα βέλη δείχνουν ενεργοποίηση του υποστρώματος, ενώ οι παύλες αναστολή. Οι διακεκομμένες γραμμές δείχνουν υποθετικές/μη επιβεβαιωμένες *in vivo* αλληλεπιδράσεις. Τα υποστρώματα που φωσφορυλιώνονται από τις SKs δείχνονται με ένα κόκκινο κύκλο που περιέχει το γράμμα P (Προσαρμοσμένο από Yoon & Kim, 2015).

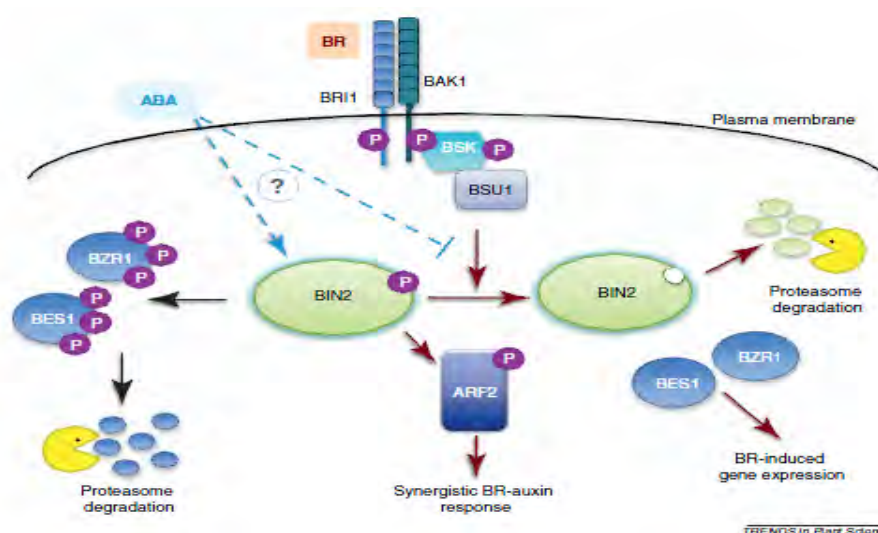
Ο πιο καλά μελετημένος ρόλος μέχρι σήμερα των φυτικών SKs είναι η συμμετοχή τους ως αρνητικοί ρυθμιστές στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος μέσω των μπρασισινοστεροειδών (brassinosteroids, BRs). Τα μπρασισινοστεροειδή είναι στεροειδής φυτικές ορμόνες οι οποίες ρυθμίζουν φυσιολογικές αποκρίσεις των ανώτερων φυτών όπως ο χρόνος ανθοφορίας, η γονιμότητα, η αύξηση των κυττάρων και η διαφοροποίηση του αγγειακού ιστού (Clouse, 2011). Στο *A. thaliana* τα BRs

αναγνωρίζονται από την μεμβανική κινάση υποδοχέα την BR-INSENSITIVE 1 (BRI1), ενεργοποιώντας ένα μονοπάτι μεταγωγής σήματος που έχει ως αποτέλεσμα την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης από τους μεταγραφικούς παράγοντες BR-responsive factors, BRZI και BES1/BRZ2 (Kim & Wang, 2010). Σε αυτή μεταγωγή σήματος συμμετέχει η πρώτη φυτική SK που χαρακτηρίστηκε λειτουργικά η BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 2 (BIN2). Το ενεργό κέντρο κινάσης της BIN2 παρουσιάζει 70% ομοιότητα με τη ζωική GSK3β (Li et al., 2001, Li & Nam, 2002). Απουσία σήματος BR η BIN2 είναι ενεργή και καταστέλλει φωσφορυλιώνοντας τους μεταγραφικούς παράγοντες BRZI και BES1/BRZ2 σε πολλαπλά κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης, με αποτέλεσμα την αποικοδόμηση τους μέσω του πρωτεασώματος (He et al., 2002, Wang et al., 2002) και την έξοδό τους από τον πυρήνα καταστέλλοντας έτσι την πρόσδεσή τους στο DNA (Ryu et al., 2007, 2010) (Εικόνα 4). Παρουσία σήματος BR, η αλληλεπίδραση της BIN2 με τους BES1/BZR1 αναστέλλεται. Οι μη φωσφορυλιωμένοι BES1/BZR1 δεν αποικοδομούνται και μπορούν να εισέλθουν στον πυρήνα, όπου ρυθμίζουν τη μεταγραφή των γονιδίων που εμπλέκονται στη μεταγωγή σήματος μέσω των BRs (Kim & Wang, 2010). Ο μηχανισμός που μεταφέρει το σήμα από την πλασματική μεμβράνη στη BIN2 περιλαμβάνει, μετά την πρόσδεση του BR στον BRI1, την αλληλοφωσφορυλίωση του BRI1 με τον συνυποδοχέα του BAK1 (BRI1-associated receptor kinase) και την ενεργοποίηση του BRI1. Ο BRI1 φωσφορυλιώνει τις BR-signalling kinases (BSKs) στην πλασματική μεμβράνη, οι οποίες με τη σειρά τους προσδέονται και ενεργοποιούν τις BSU1 φωσφατάσες. Οι ενεργοποιημένες BSU1 φωσφατάσες απομακρύνουν το φωσφορικό κατάλοιπο της τυροσίνης 200 της BIN2 απενεργοποιώντας την και προκαλώντας την αποικοδόμησή της από το πρωτεάσωμα. Στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος εκτός της BIN2/AtSK21 συμμετέχουν επιπλέον τα μέλη των ομάδων AtASK I, II και η AtSK32/ AtSKθ της ομάδας III (Kim et al., 2009, Rohzon et al., 2010). Οι λειτουργίες των διαφορετικών AtSK στο μονοπάτι των μπρασσινοστεροειδών αλληλοεπικαλύπτονται εν μέρη, αλλά παρουσιάζουν και εξειδίκευση μέσω της διαφορετικής συγγένειας πρόσδεσης που έχει η κάθε μια με τα 6 μέλη της οικογένειας BZR (Yin et al., 2005).

Εκτός της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων BZR, πλέον έχουν περιγραφθεί και άλλα υποστρώματα των AtSKs που επιδρούν στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος των μπρασσινοστεροειδών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η πιθανή εμπλοκή τους ως ενδιάμεσα μορια στις κυτταρικές αποκρίσεις στις ορμόνες αμπισικό οξύ (ABA) και αυξίνη. Ο τρόπος δράσης της και τα υποστρώματά της είναι πιο καλά



χαρακτηρισμένα στο μονοπάτι της αυξίνης. Ο ARF2, ένας παράγοντας αποκρίσης στην αυξίνη (auxin response factor - ARF), που δρα ως μεταγραφικός καταστολέας, αποτελεί υπόστρωμα της BIN2. Η φωσφορυλίωση του ARF2 από τη BIN2 εμποδίζει την ικανότητά του να προσδένεται στο DNA, αναστέλλοντας την ενεργότητά του ως μεταγραφικού καταστολέα. Έτσι διευκολύνεται η πρόσδεση των ενεργοποιητών ARFs στους ενισχυτές γονιδίων επαγόμενων από την αυξίνη (Vert *et al.*, 2008). Αυτά τα ευρήματα προσφέρουν μια ερμηνεία για την παρατηρούμενη ενίσχυση των κυτταρικών αποκρίσεων στην αυξίνη, μετά από ενεργοποίησή τους με μπρασισινοστεροειδή.



**Εικόνα 4:** Ο κεντρικός ρόλος της BIN2 στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος μέσω των μπρασισινοστεροειδών και η αλληλεπίδρασή της με μονοπάτια που εκκινούνται από τις ορμόνες αυξίνη και αμπισκισικό οξύ (ABA). Το ABA προκαλεί καταστολή της απόκρισης στα μπρασισινοστεροειδή και ενισχύει την φωσφορυλίωση του BES1, χωρίς να είναι γνωστό εάν αυτό γίνεται μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με την BIN2 ή με κάποιο άλλο στοιχείο του μονοπατιού ανοδικά της (Προσαρμοσμένο από Saidi *et al.*, 2013).

Πρόσφατες μελέτες επίσης έχουν δείξει ότι οι *AtSKs* ελέγχουν την ανάπτυξη και θέση των στομάτων μέσω του μονοπατιού μεταγωγής σήματος των ενεργοποιημένων από μιτογόνα (mitogen activated protein, MAP) κινασών (Kim *et al.*, 2012, Khan *et al.*, 2013). Στο *Arabidopsis* η έναρξη του σχηματισμού των στομάτων και η αποτροπή του σχηματισμού τους σε διπλανές θέσεις ρυθμίζεται από την επαγωγή σήματος μέσω του υποδοχέα ERECTA (ER). Η ενεργοποίησή του έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAP κινασών που περιλαμβάνει τις MAPK kinase kinase (MAPKKK) YODA (YDA), τις MAPK kinases MKK4, MKK5, MKK7, και MKK9 και τέλος τις MPK3/6 που αναστέλλουν την ανάπτυξη των στομάτων μέσω φωσφορυλίωσης του μεταγραφικού παράγοντα SPEECHLESS (SPCH). Η BIN2 αλληλεπιδρά και αναστέλλει τη

δράση της YDA μέσω φωσφορυλίωσης (Kim *et al.*, 2012). Επίσης η αναστολή της δράσης της MPK6 από την MKK4 αναστέλλεται μέσω της φωσφορυλίωσης της MKK4 από τις BIN2, AtSK11 και AtSK32 (Khan *et al.*, 2013). Και σε αυτό το μονοπάτι η δράση των AtSKs ρυθμίζεται από τα μπρασσινοστεροειδή μέσω του υποδοχέα BRI1. Επίδραση με μπρασσινοστεροειδή αναστέλλει την δημιουργία στομάτων στο φύλλο.

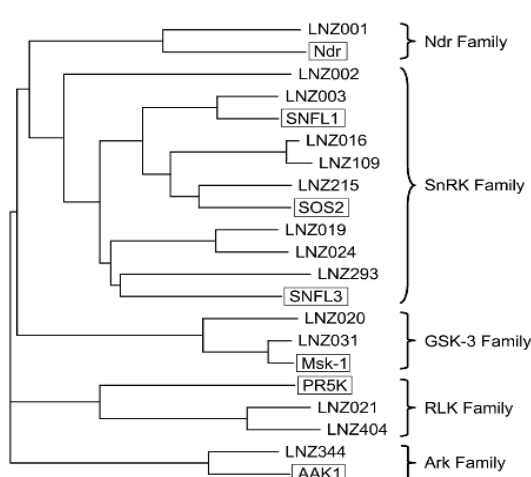
Τέλος αξίζουν να αναφερθούν κάποια παραδείγματα από τη συμμετοχή των φυτικών SKs σε μονοπάτια απόκρισης σε βιοτικές και αβιοτικές πιέσεις. Η πρωτεΐνη WIG (Wound Induced GSK3) του *Medicago sativa*, επάγεται ειδικά μετά από τραυματισμό των φύλλων του φυτού, ενώ σε υγιή φύλλα η ενεργότητά της είναι πολύ χαμηλή. Η ενεργοποίηση της φαίνεται να γίνεται μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων καθώς τα επίπεδα της παραμένουν σταθερά παρά την μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της μετά τον τραυματισμό (Jonak *et al.*, 2000). Τα μετάγραφα κάποιων μελών των AtSKs αυξάνονται μετά την έκθεση των φυτών σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας και οσμωτικής πίεσης ενισχύοντας την ανοχή των φυτών (Charrier *et al.*, 2002). Ο τρόπος με τον οποίο επιδρούν έχει διελευκανθεί για την AtSK11 (Del Santo *et al.*, 2012). Η AtSK11 ενεργοποιεί μέσω φωσφορυλίωσης την αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD), ένα ένζυμο που επηρεάζει την οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου, οδηγώντας σε ανοχή του *Arabidopsis* σε συνθήκες υψηλής αλατότητας. Συμμετοχή των φυτικών SKs έχει βρεθεί και στα μονοπάτια μεταγωγής σήματος MAPK που επάγονται από παθογόνα (βιοτικό στρες). Η MsK1 του *M. sativa* παρουσιάζει μείωση των επιπέδων και της ενεργότητά της όταν το φυτό εκτεθεί σε παράγοντες που επάγουν τους μηχανισμούς άμυνας των φυτών όπως το βακτηριακό ένζυμο cellulase (Wrzaczek *et al.*, 2007). Διαγονιδιακά φυτά *Arabidopsis* με υπερέκφραση της MsK1 έδειξαν ενισχυμένη ευαισθησία στο παθογόνο *Pseudomonas syringae* και μειωμένη ενεργοποίηση των MAP κινασών AtMPK3/6 που επάγουν την φυτική άμυνα. Γίνεται προφανές από τα προηγούμενα παραδείγματα ότι τουλάχιστον κάποιες, φυτικές SKs εμπλέκονται και στις αποκρίσεις σε βιοτικές και αβιοτικές πιέσεις.

Όπως φαίνεται και από τα παραπάνω, οι SKs έχουν μια πληθώρα λειτουργιών τόσο μεταξύ διαφορετικών οργανισμών, όσο και μέσα στο είδος. Το πλήθος των φυτικών υποστρωμάτων τους και τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος στα οποία συμμετέχουν στα φυτά, έχουν μόλις αρχίσει να ανακαλύπτονται. Μέχρι σήμερα έχει περιγραφεί η συμμετοχή τους σε αναπτυξιακές διαδικασίες όπως η ανάπτυξη των στομάτων, η ανάπτυξη των άνθεων, η ανάπτυξη της πλάγιας ρίζας, η διαφοροποίηση του ξυλώματος και η συμμετοχή τους ως ενδιάμεσο μόριο που ενσωματώνει σήματα από μεταγωγικά

μονοπάτια διαφορετικών φυτικών ορμονών και αναμένεται ο αριθμός των νεοπεριγραφθέντων υποστρωμάτων τους να συνεχίσει να αυξάνεται (Youn & Kim, 2015). Οι παραπάνω λειτουργίες έχουν περιγραφεί, εκτός ελάχιστων εξαιρέσεων, για την οικογένεια SKs του *A. thaliana*. Για τις λειτουργίες της οικογένειας στο Ψυχανθές φυτό μοντέλο *Lotus japonicus* τίποτα δεν είναι γνωστό.

### 1.1.1.1. Οι κινάσες SHAGGY-LIKE (SKs) στο *Lotus japonicus*

Στο φυτό *Lotus japonicus* λίγα είναι γνωστά για τις κινάσες που εμπλέκονται σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Το 2005 οι Kameshita *et al.* απομόνωσαν από τις συμβιωτικές δομές του *L. japonicus* που ονομάζονται φυμάτια (βλέπε παρακάτω ενότητα) 15 cDNA κλώνους που περιείχαν δομή παρόμοια κινάσης Ser/Thr. Αυτοί οι 15



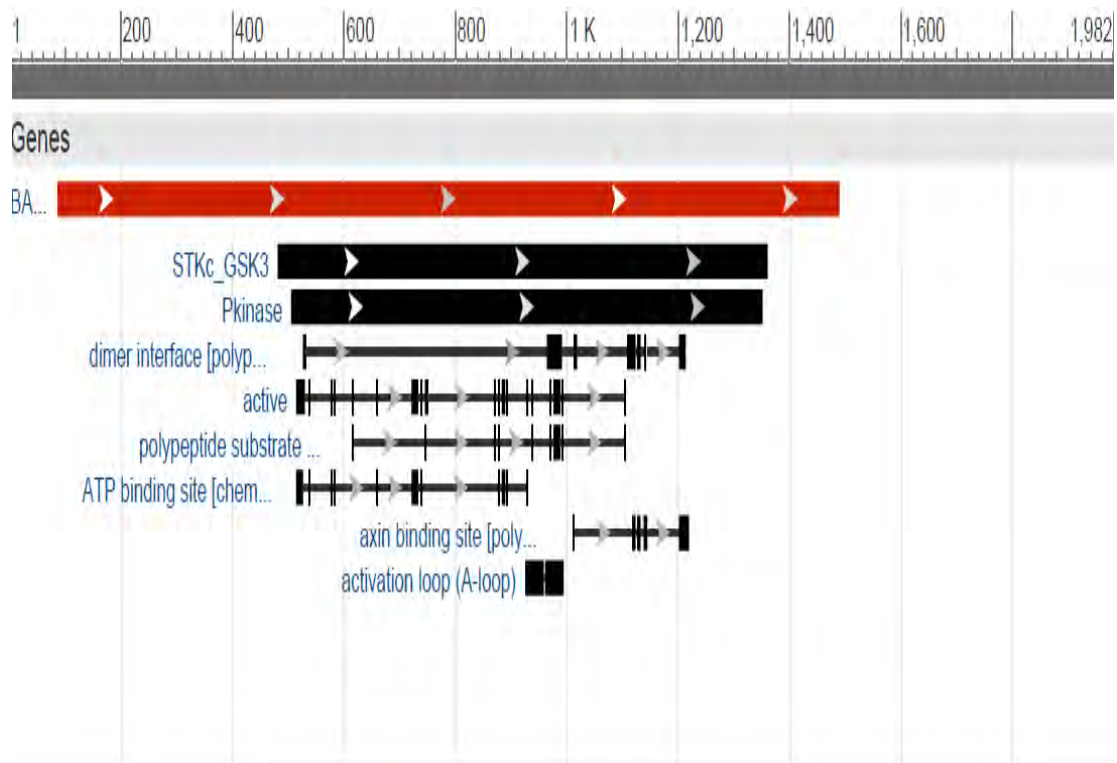
κλώνοι κωδικοποιούν για πρωτεΐνες με δράση κινάσης Ser/Thr και η αλληλουχία τους δεν είχε ξαναπομονωθεί από το *L. japonicus*. Μετά από φυλογενετική ανάλυση οι 15 πιθανές κινάσες κατατάχθηκαν σε 5 διαφορετικές οικογένειες κινασών Ser/Thr μεταξύ των οποίων δύο ανήκαν στην οικογένεια κινασών GSK3/SHAGGY-like. Ο κλώνος LNZ020 αντιστοιχεί στην αλληλουχία AB113573.1 (GenBank, GI:62857011), με ομολογία 76% με την AtSKθ κινάση του *A. thaliana* και κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη με 467 αμινοξικά κατάλοιπα (Εικόνα 3).

**Εικόνα 5:** Φυλογενετική ανάλυση των υποτιθέμενων κινασών Ser/Thr βάσει της αμινοξικής τους αλληλουχίας με βάση την αλληλουχία των cDNA κλώνων που απομονώθηκαν από τους Kameshita *et al.*, 2004. Σε κουτί παρουσιάζονται οι συγγενικές κινάσες από άλλα είδη φυτών (Προσαρμοσμένο από Kameshita *et al.*, 2004).

Ο κλώνος LNZ031 αντιστοιχεί στην αλληλουχία AB113574.1 (GI:62857013) και παρουσιάζει 89% ομοιότητα με την AB113573.1 και 78% ομοιότητα με την AtSKα κινάση του *A. thaliana*. Στην παρούσα εργασία τα παραπάνω γονίδια μετονομάστηκαν *Lotus* SHAGGY-Like 1 (*LSK1*) (κλώνος LNZ020) και *LSK2* (κλώνος LNZ031), σε συμφωνία με τον τρόπο ονομασίας που έχει επικρατήσει για τις SHAGGY/GSK3-like κινάσες στο *A. thaliana* και ρύζι (*Oryza sativa*) (Youn & Kim, 2015).

Έχουν βρεθεί μέσω BLAST άλλοι 4 cDNA κλώνοι που φαίνεται να κωδικοποιούν για SHAGGY-like κινάσες και ανήκουν στην ίδια οικογένεια στο *L. japonicus*, όμως η

δραστικότητα κινάσης και ο λειτουργικός τους ρόλος δεν έχει μελετηθεί ακόμα (Γκαραγκούνης Κ, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Μεταξύ αυτών, το γονίδιο *LSK6* εμφανίζει 81,5% ομοιότητα με το γονίδιο *LSK1*. Η λειτουργία κινάσης της *LSK1* επιβεβαιώθηκε με βάση πειράματα αυτοφωσφορύλιωσης (Τσίκου Δ., αδημοσίευτα αποτελέσματα). Μάλιστα, η ενεργότητα αυτή μειώνεται παρουσία του τριτερπενοειδούς λουπεόλη. Επιπλέον, προκαταρκτικά δεδομένα δείχνουν πιθανή εμπλοκή της *LSK1* στη διαδικασία της φυματιογένεσης. Η έκφρασή της *LSK1*, ποσοτικοποιημένη μέσω ημιποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (RT-qPCR), αυξάνεται σημαντικά 1 ώρα μετά τον εμβολιασμό ριζών του *L. jaramenicus* με το συμβιωτικό του βακτήριο *Mesorhizobium loti*, αλλά μειώνεται μετά από 48 ώρες υποδεικνύοντας τη συμμετοχή της στην εγκαθίδρυση της συμβιωτικής σχέσης. Επίσης, τα επίπεδα έκφρασής της επηρεάζονται από την εφαρμογή λουπεόλης στις εμβολιασμένες ρίζες (Psarrakou I., MSc Thesis, 2014)



**Εικόνα 6:** Λειτουργικές περιοχές του γονιδίου *LSK1* όπως απεικονίζονται στο NCBI.



## 1.2. Το φυτό μοντέλο *Lotus japonicus*

Το φυτό *Lotus japonicus* [Βασίλειο: *Plantae*, Order: *Fabales* (*Leguminosae*) Family: *Fabaceae*, Subfamily: *Faboideae*, Tribe: *Loteae*, Genus: *Lotus*] ανήκει στην τάξη των Ψυχανθών. Πέραν των διάφορων άλλων χρήσεων τους (ως καλλωπιστικά φυτά, για την παραγωγή ξυλείας, phytoremediation κτλ), η τάξη των Ψυχανθών περιλαμβάνει μια σειρά από καλλιεργήσιμα είδη. Είναι η δεύτερη σε σημασία κατηγορία καλλιεργούμενων φυτών μετά τα σιτηρά, καθώς αποτελούν πηγή τροφής για τον άνθρωπο και τα ζώα, ενώ παρέχουν πρώτες ύλες για τη βιομηχανία (Graham & Vance, 2003). Άλλα αντιπροσωπευτικά μέλη αυτής της τάξης είναι το μπιζέλι (*Pisum sativum*), το κοινό φασόλι (*Phaseolus vulgaris*), η φακή (*Lens culinaris*), και η σόγια (*Glycine max*). Τα Ψυχανθή παράγουν μια πληθώρα δευτερογενών μεταβολίτων, μερικοί εκ των οποίων μελετούνται εκτεταμένα ως βιοδραστικές ουσίες με επωφελείς επιδράσεις στην ανθρώπινη και ζωική υγεία (Dixon & Sumner, 2003). Το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό όμως αυτής της τάξης είναι η δημιουργία ειδικών συμβιωτικών δομών στις ρίζες τους με βακτήρια της οικογένειας *Rhizobiaceae*. Τα φυμάτια, όπως αποκαλούνται αυτές οι χαρακτηριστικές δομές, έχουν την ικανότητα δεσμευσης του ατμοσφαιρικού αζώτου, σε μορφή που μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τα φυτά. Αυτή η συμβιωτική σχέση επιτρέπει τον εμπλουτισμό των εδαφών σε νιτρικά και την παραγωγή πλούσιων σε πρωτεϊνών σπόρων των Ψυχανθών (Oldroyd *et al*, 2011).

Η οικονομική σημασία και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των Ψυχανθών οδήγησε στην αναζήτηση ενός φυτού μοντέλου, το οποίο να δημιουργεί συμβιωτικές σχέσεις, διαφορετικού από το *Arabidopsis thaliana*. Η ανάγκη για την κατανόηση της βασικής βιολογίας της ομάδας των Ψυχανθών και της διαδικασίας της φυματιογένεσης, με απώτερο σκοπό τη γενετική βελτίωση των καλλιεργήσιμων ειδών οδήγησε στην επιλογή του φυτού *Lotus japonicus*. Το είδος *L. Japonicus*, αν και φυτό μικρής οικονομικής σημασίας, παρέχει μια σειρά πλεονεκτημάτων έναντι των καλλιεργούμενων ειδών που καθιστούν την γενετική και γονιδιωματική μελέτη τους ιδιαίτερα δύσκολη (Udvardi *et al*, 2005). Τα χαρακτηριστικά που το κάνουν κατάλληλο για την χρήση του ως φυτό μοντέλο είναι το μικρό του μέγεθος, η μεγάλη σποροπαραγωγή, ο μικρός χρόνος γενιάς (περίπου 3 μήνες), η ικανότητα αυτογονιμοποίησης, η ευκολία της καλλιέργειάς του σε ελεγχόμενες συνθήκες, το μικρό του διπλοειδές γονιδίωμα ( $n=6$ ), η δεκτικότητα του σε γενετική τροποποίηση με μια σειρά μεθόδων, και η αναγέννηση του από ιστοκαλλιέργειες (Handberg & Stougaard, 1992).

### **1.3. Φυματιογένεση: φυσιολογία και μοριακά μονοπάτια**

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως ένα εξαιρετικά πολύτιμο χαρακτηριστικό των Ψυχανθών είναι η ικανότητά τους να σχηματίζουν συμβιωτικές σχέσεις με βακτήρια που συλλογικά αναφέρονται ως ριζόβια [γένη *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, and *Sinorhizobium* (Martinez-Romero & Caballero-Mellado, 1996)]. Ο επικοισμός των ριζών των Ψυχανθών από αυτά τα βακτήρια οδηγεί στο σχηματισμό χαρακτηριστικών δομών/οργάνων που ονομάζονται φυμάτια. Η δομές αποτελούνται από φυτικά κύτταρα που περικλείουν τα συμβιωτικά βακτήρια. Στα φυμάτια τα βακτήρια διαφοροποιούνται μορφολογικά σε βακτηριοειδή, τα οποία δεσμεύουν το ατμοσφαιρικό άζωτο ( $N_2$ ) και το μετατρέπουν σε αμμώνιο ( $NH_3 + H^+ \rightarrow NH_4^+$ ), με τη δράση της νιτρογενάσης. Το φυτό εκμεταλλεύεται το αμμώνιο, ενώ παρέχει στα βακτήρια υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, και ένα περιβάλλον με χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου, ώστε να μην αναστέλλεται η δράση της νιτρογενάσης των βακτηριοειδών (Debrosses & Stougaard, 2011).

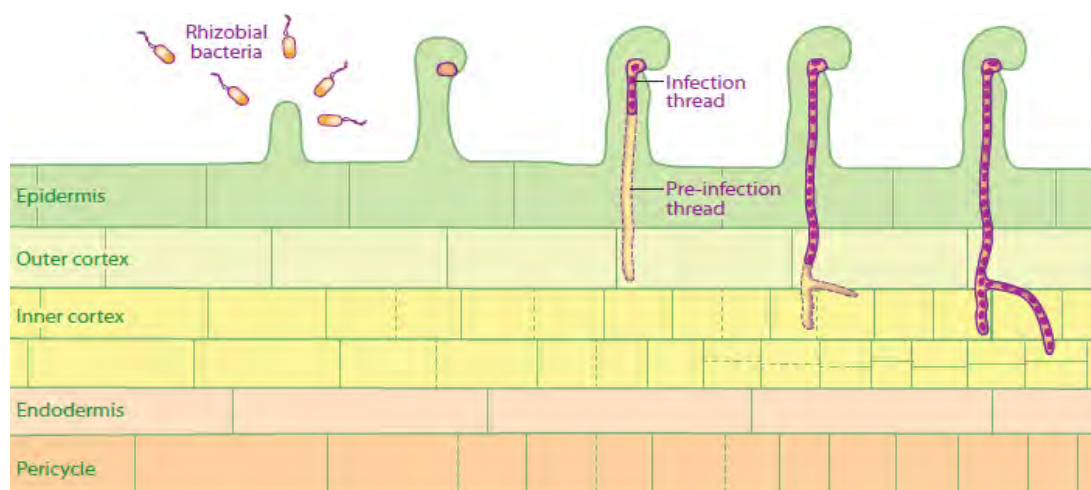
Μπορούν να διακριθούν δύο τύποι φυματίων, ο καθορισμένος, που σχηματίζουν φυτά, όπως το *L. japonicus* και η σόγια, και ο μη καθορισμένος, που σχηματίζουν φυτά όπως η μηδική (*Medicago spp.*) (Newcomb, 1981). Στόν πρώτο τύπο φυματίων, σταματούν οι διαιρέσεις των φυτικών κυττάρων μετά τη μόλυνση, ενώ στο δεύτερο τύπο συνεχίζονται καθόλη τη διάρκεια της ζωής του φυματίου. Και οι δύο τύποι φυματίων χαρακτηρίζονται από περιφερειακά αγωγά στοιχεία και ένα κεντρικό μερίστωμα που περιλαμβάνει μολυσμένα κύτταρα (που περιέχουν βακτηριοειδή σε συμβιωσώματα) και μη μολυσμένα (Mylona *et al*, 1995).

Το *L. japonicus* σχηματίζει καθορισμένα φυμάτια με στελέχη του είδους *Mesorhizobium loti*.

Η έναρξη της συμβίωσης και ο σχηματισμός των φυματιων περιλαμβάνει μια σειρά περίπλοκων, τοπικά και χρονικά ρυθμιζόμενων γεγονότων που περιλαμβάνουν αλλαγές στη μορφολογία της ρίζας και στη γονιδιακή έκφραση των δύο συμβιωτών (Madsen *et al.*, 2010).

Μορφολογικά παρατηρούνται μια σειρά αλλαγών σε κυτταρικό επίπεδο (Patriarca *et al.*, 2004, Hayashi *et al.*, 2005 για επισκόπηση). Αναφορικά διακρίνονται η προσκόλληση των ριζοβίων στη δεκτική περιοχή της ρίζας, η οποία είναι συνήθως το άκρο των νεοαναπτυσσόμενων ριζικών τριχιδίων και η επακόλουθη κύρτωσή τους σε μορφή «αγκύστρου» (Shepherd's crook) που εγκολπώνει τα βακτήρια (Εικόνα 7). Κατά

την κύρτωση και εγκόλπωση των βακτηρίων το κύτταρο του ριζικού τριχιδίου υφίσταται μια σειρά αλλαγών όπως η αναδιοργάνωση του κυτταρικού σκελετού, η αυξημένη ροή ασβεστίου κτλ (Harris *et al.*, 2003). Έπεται η εισχώριση των ριζοβίων μέσω των μολυσματικών νηματίων, μια κυλινδρική δομή που σχηματίζεται κατά μήκος του ριζικού τριχιδίου και κατευθύνει τα βακτήρια στο εσωτερικό μέρος της ρίζας (Szczyglowski *et al.*, 1998). Ταυτόχρονα με τον αρχικό σχηματισμό των μολυσματικών νηματίων, τα κύτταρα που θα αποτελέσουν το καταβολή του φυματίου στα εσωτερικά στρώματα του φλοιού της ρίζας αποδιαφοροποιούνται και αρχίζουν μια σειρά από διαιρέσεις (Niwa *et al.*, 2001). Το μολυσματικό νημάτιο κατευθύνει τα ριζόβια προς την καταβολή του φυματίου, όπου και απελευθερώνονται εντός των κυττάρων. Μέσα στα φυτικά κύτταρα τα ριζόβια μεταπίπτουν στη συμβιωτική τους δομή το βακτηριοειδές, η καταβολή μετατρέπεται σε φυμάτιο και περιβάλλονται από την περιβακτηριακή μεμβράνη που προέρχεται από την κυτταροπλασματική μεμβράνη του φυτικού κυττάρου (Patriarca *et al.*, 2004).



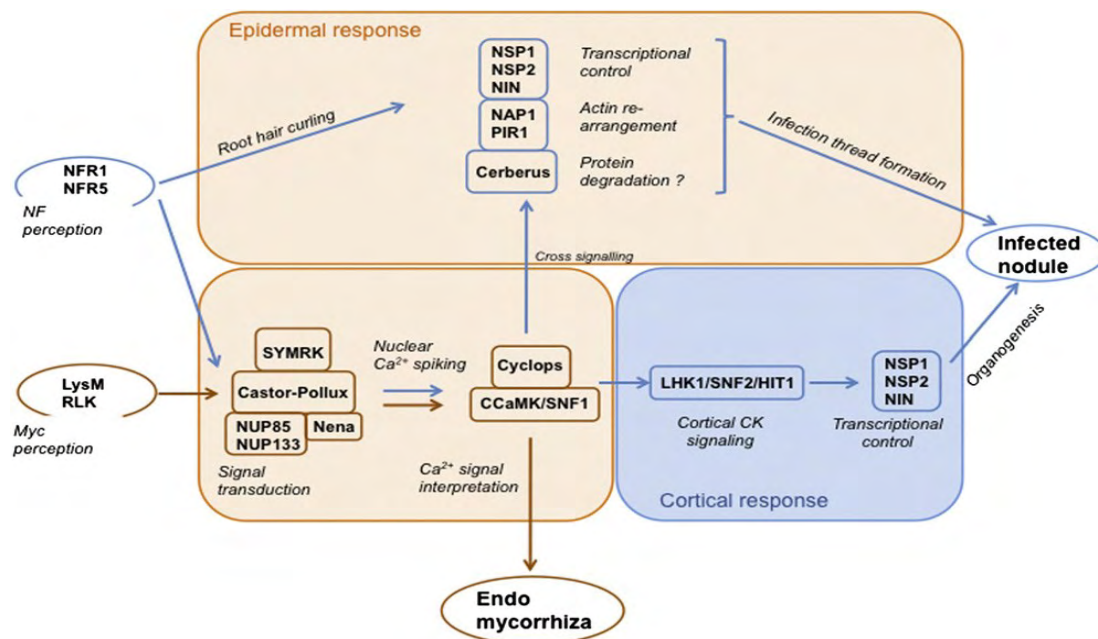
**Εικόνα 7:** Η φυματιογένεση περιλαμβάνει την συγχρονισμένη ανάπτυξη της βακτηριακής μόλυνσης και της οργανογένεσης του φυματίου. Οι κυτταρικές διαιρέσεις (συμβολίζονται με διακεκομμένες γραμμές) στον ριζικό φλοιό (inner cortex) ξεκινάνε νωρίς κατά την αλληλεπίδραση του ριζοβίου και της ρίζας και προηγούνται των γεγονότων της επιμόλυνσης. Τα βακτήρια εγκοιλώνονται στο κυρτωμένο ριζικό τριχίδιο και από εκεί ξεκινάει το μολυσματικό νήμα (infection thread). Η πορεία του μολυσματικού νηματίου προδιαγράφεται από τα προ-μολυσματικά νημάτια (Pre-infection thread). Το μολυσματικό νημάτιο «προχωρά» μέσα τον εσωτερικό φλοιό όπου η καταβολή του φυματίου έχει σχηματιστεί μέσω διαδοχικών διαιρέσεων. Από αυτά τα κύτταρα θα σχηματιστεί το μερίστωμα του φυματίου (Προσαρμοσμένο από Oldroyd *et al.*, 2011).

Οι παραπάνω μορφολογικές αλλαγές συνοδεύονται από αλλαγές και στη γονιδιακή έκφραση των δύο οργανισμών που θα οδηγήσουν στην αναγνώριση τους, την έναρξη της διαδικασίας, και τελικά στο σχηματισμό του νέου οργάνου. Μελέτες με τη χρήση μικροσυστοιχιών από γνωστές αλληλουχίες EST του φυτού *L. japonicus* (Kouchi *et al.*, 2004, Colebach *et al.*, 2004, Høgslund *et al.*, 2009) έχουν δείξει αλλαγή στην έκφραση πάνω από 100 γονιδίων ως απόκριση στη συμβιωτική σχέση. Γονίδια που εμφάνισαν αυξημένη έκφραση εμπλέκονται σε διαδικασίες όπως η μεμβρανική μεταφορά, η άμυνα σε παθογόνα, η απόκριση σε οσμωτικό στρες, η σύνθεση φυτοορμονών, ο μεταβολισμός, η μεταγωγή σήματος, ο μεταγραφικό έλεγχος κτλ. Οι Høgslund *et al.* (2009) αναφέρουν την ταυτοποίηση 37 γονιδίων των οποίων η έκφραση καταγράφεται αποκλειστικά στα φυμάτια και 48 γονίδια που εκφράζονται συνεχώς σε όλα τα στάδια της φυματιογένεσης. Επίσης μελέτες φυτών με μεταλλαγές που σταματούν τη διαδικασία της συμβίωσης σε διάφορα στάδια οδήγησαν στην ανακάλυψη και χαρακτηρισμό της λειτουργίας μιας σειράς γονιδίων.

Ο σχηματισμός των φυματίων μπορεί να χωριστεί σε δύο παράλληλες και στενά συντονισμένες διαδικασίες/ή συντονισμένα στάδια: της οργανογένεσης του φυματίου και των ιστών του, και της επιμόλυνσης που οδηγεί στον επικοισμό των φυτικών κυττάρων από το ριζόβιο (Madsen *et al.*, 2010).

Η προσέλκυση των βακτηρίων στη ρίζα γίνεται μέσω χημικών μορίων που εκκρίνονται από το φυτό, η σημαντικότερη τάξη των οποίων είναι τα φλαβονοειδή. Τα βακτήρια σε απόκριση παράγουν λιποχιτινο-ολιγοσακχαρίτες που ονομάζονται Nod παράγοντες (Nod factors, NFs) και αναγνωρίζονται από επιδερμικά κύτταρα στο *L. japonicus*. Η αναγνώριση των Nod παραγόντων γίνεται μέσω ετεροδιμερών κινασών σερίνης/θρεονίνης που μοιάζουν με μεμβρανικοί υποδοχείς και περιέχουν έναν τομέα LysM στην εξωκυττάρια περιοχή τους (LysM RLKs, Radutoiu *et al.*, 2003) όπως οι NFR5/1 στο *L. japonicus*. Οι διάφορες πλευρικές ομάδες των λιποχιτινο-ολιγοσακχαριτών αναγνωρίζονται από διαφορετικούς LysM RLKs, εξηγώντας γιατί ένα Ψυχανθές μπορεί να επικοιστεί από ένα περιορισμένο εύρος ριζοβίων (host specificity). Επιπλέον των LysM RLKs φαίνεται ότι ένα δευτερογενές σήμα από την αναγνώριση των Nod παραγόντων προσλαμβάνεται από τις παρόμοιες με υποδοχείς τύπου κινάσες με περιοχές πλούσιες σε κατάλοιπα λυσίνης (Leucine-rich-repeat domains RLKs) όπως ο υποδοχέας LjSYMRK στο *L. japonicus* (Orlloyd & Downie, 2004). Η αναγνώριση των NFs οδηγεί σε μια σειρά γεγονότων που βασίζονται στην μεταγωγή σήματος μέσω ασβεστίου στην οποία εμπλέκονται κανάλια κατιόντων [CASTOR στο *L. japonicus* (Imaizumi-Anraku *et al.*, 2004)] και νουκλεοπορίνες [NUP133, NUP85 (Kanamori *et al.*,

2006, Saito *et al.*, 2007)]. Η αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης ασβεστίου (Calcium spiking) οδηγεί στην ενεργοποίηση ενός κεντρικού ρυθμιστή, μιας κινάσης εξαρτώμενης από ασβέστιο/καλμοδουλίνη, CCaMK στο *L. japonicus* (Levy *et al.*, 2004) και μιας πρωτεΐνης που περιέχει μια δομή coiled coil που φωσφορυλιώνεται από την CCaMK (CYCLOPS, Yano *et al.*, 2008). Η ενεργοποίηση του CCaMK μέσω των LysM RLKs και του μονοπατιού του SYMRK, είναι το κεντρικό σημείο της οργανογένεσης του φυματίου. Ακολουθεί η ενεργοποίηση μιας σειράς γονιδίων όπως των GRAS μεταγραφικών παραγόντων NSP1 and NSP2 (Heckmann *et al.*, 2006; Hirsch *et al.*, 2009), του γονιδίου *NIN* που λειτουργεί ως μεταγραφικός ρυθμιστής (Schauser *et al.*, 1999), και μέλη της οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων ERF τα οποία επάγουν την έκφραση γονιδίων που επιτελούν την βακτηριακή επιμόλυνση στην ριζική επιδερμίδα και την φυματιογένεση στον ριζικό φλοιό (Εικόνα 8). Τα γονίδια που εκφράζονται στα πρώτα στάδια της φυματιογένεσης ονομάζονται πρώιμα (early nodulin genes) ενώ τα γονίδια που εκφράζονται στα τελευταία στάδια και η έναρξη της έκφρασή τους συμπίπτει με την έναρξη της αζωτοδέσμευσης ονομάζονται όψιμα γονίδια (late nodulin genes) (van Kammen, 1984).



**Εικόνα 8:** Οι γνωστοί μεσολαβητές και τα βήματα μετάδοσης σήματος που εμπλέκονται στην φυματιογένεση και στην αναγνώριση των παραγόντων Nod (Nod Factors, NFs) από τους μεμβρανικούς υποδοχείς *NFR1* και *NFR5* στο φυτό *Lotus japonicus*. Η αρχική αναγνώριση οδηγεί σε δύο παράλληλα μονοπάτια που οδηγούν στη έναρξη του μολυσματικού νηματίου και στην οργανογένεση του φυματίου. Το σύμπλοκο *CYCLOPS-CCaMK* φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην σύγκλιση των δύο διαδικασιών. Μετά

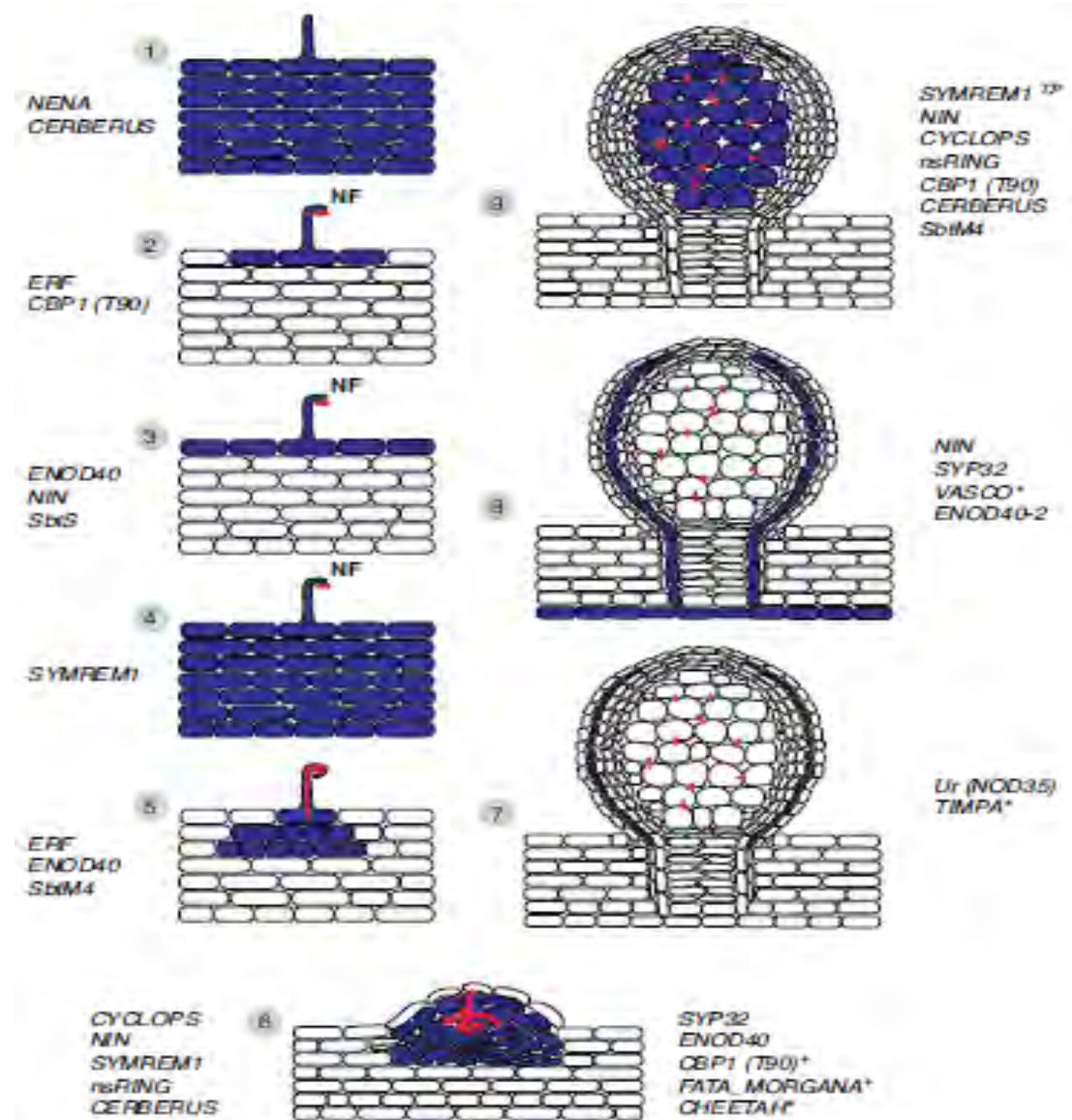
την ενεργοποίηση του συμπλόκου μέσω της εισροής ασβεστίου, οι μεταγραφικοί παράγοντες των γονιδίων *NIN*, *NSP1*, και *NSP2* είναι απαραίτητοι για την έναρξη της φυματιογένεσης. Τα γονίδια *NIN*, *NSP1*, και *NSP2* είναι απαραίτητα και για το σχηματισμό του μολυσματικού νηματίου. Μεταγωγή σήματος μέσω του υποδοχέα LHK1 της κυτοκίνης είναι το βασικότερο βήμα για την έναρξη της καταβολής του φυματίου. Με ροζ απεικονίζονται τα γεγονότα που συμβαίνουν στην επιδερμίδα, ενώ με μπλε απεικονίζονται τα γεγονότα που συμβαίνουν στον φλοιό. Προσαρμοσμένο από Madsen *et al.* (2010).

Μερικά από τα φυτικά γονίδια που έχουν βρεθεί να παίρνουν μέρος στη βακτηριακή μόλυνση περιλαμβάνουν γονίδια μέλη της οικογένειας *SCAR/WAVE* (*NAP1*, *PIR1* στο *L. japonicus*, Yokota *et al.*, 2009) που ελέγχουν την πρόοδο του μολυσματικού νηματίου, Ε3 λιγάσες της ουβικουιτίνης όπως η *LUMPY INFECTIONS (LIN)/CERBERUS* (Yano *et al.*, 2009) που ελέγχουν μέσω αποικοδόμησης υποδοχείς όπως ο SYMRK, φλοτιλίνες όπως οι *FLOT2* και *FLOT4* (Haney & Long, 2009) και το γονίδιο *CYCLOPS* που εμπλέκεται στον αρχικό σχηματισμό του μολυσματικού νηματίου αλλά και στο σχηματισμό του φυματίου.

Η οργανογένεση του φυματίου βασίζεται κυρίως στην τοπική σχετική ισορροπία των ορμονων κυτοκίνης και αυξίνης (Olroyd *et al.*, 2011). Το ορμονικό ισοζύγιο που σχηματίζεται μετά την μικροβιακή αναγνώριση προωθεί το σχηματισμό του φυματίου και καταστέλλει το σχηματισμό πλευρικής ρίζας. Πιο συγκεκριμένα η κυτοκίνη είναι θετικός ρυθμιστής της έναρξης της φυματιογένεσης και της διατήρησης του μεριστώματος του φυματίου μέσω της ενεργοποίησης του υποδοχέα της LHK1 και τη δράση μεταγραφικών παραγόντων όπως ο *NIN*, *NSP2* (Frugier *et al.*, 2008) όπως φαίνεται και στην Εικόνα 8 Παράλληλα είναι υπεύθυνη για την αναστολή της πολικής μεταφοράς της αυξίνης στα κύτταρα του φλοιού στα αρχικά στάδια της φυματιογένεσης μέσω τοπικής καταστολής γονιδίων όπως γονίδια που κωδικοποιούν για μεταφορείς της αυξίνης (PINs). Η συσσώρευση της αυξίνης είναι επίσης σημαντική για την ανάπτυξη του φυματίου και δρα ανταγωνιστικά με τις δράσεις της κυτοκίνης. Το αιθυλένιο φαίνεται να είναι αρνητικός ρυθμιστής της φυματιογένεσης (Lee & Lague, 1992), και παίζει ρόλο στον ορισμό της δεκτικής ζώνης (Guinel & Geil, 2002) και στη θέση της καταβολής του φυματίου (Ding & Oldroyd, 2009). Οι ορμόνες γασμονικό οξύ, το αμπισικό οξύ και το σαλικυλικό οξύ, που σχετίζονται με αποκρίσεις των φυτών σε παθογόνα και καταστάσεις στρες, δουν ανασταλτικά εμποδίζοντας την διαδικασία του  $Ca^{2+}$  spiking ή την έκφραση γονιδίων όπως το *ENOD40* και *NIN* που επάγονται από την κυτοκίνη (Stacey *et al.*, 2006). Παρόλ αυτά τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος και τα μόρια που εμπλέκονται στις αποκρίσεις που διαμεσολαβούνται από τις ορμόνες, καθώς



και το πώς αυτά αλληλεπιδρούν στον έλεγχο του σχηματισμού των φυματίων, δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως (Ryu *et al*, 2012).



**Εικόνα 9:** Ένα στιγμιότυπο γονιδίων και τα στάδια που εκφράζονται κατά τη διάρκεια της βακτηριακής επιμόλυνσης και φυματιογένεσης στο φυτό *L. japonicus*. Με μπλε απεικονίζονται τα κύτταρα στα οποία εκφράζονται τα αντίστοιχα γονίδια (Προσαρμοσμένο από Popp & Ott, 2011).

Τέλος αξίζει να αναφερθεί ο μηχανισμός της αυτορρύθμισης του αριθμού των φυματίων (Autoregulation Of Nodulation, AON) που σχηματίζονται τελικά, ο οποίος καθορίζεται από το συνδυασμό των ενεργειακών αναγκών του φυτού και των περιβαλλοντικών συνθηκών. Μέσω του μηχανισμού της αυτορρύθμισης τα παλαιότερα φυμάτια καταστέλλουν τη δημιουργία νεών φυματίων (Caetano-Anolles & Gresshoff,

1991). Μεταλλαγμένα φυτά με συσσώρευση φυματίων στις ρίζες τους, διαφεύγουν αυτού του μηχανισμού και δεν ανταποκρίνονται στην καταστολή του σχηματισμού φυματίων από το άζωτο, όπως παρατηρείται υπό φυσιολογικές συνθήκες (Stougaard, 2000).

Η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός του γονιδίου *HAR1*, έδειξε ότι αποτελεί μέρος της μεταγωγής σήματος για τον έλεγχο του αριθμού των φυματίων που προέρχεται από τον βλαστό και αποτελεί μέρος του ελέγχου της ανάπτυξης των πλάγιων ριζών (Kruse et al., 2002). Το γονίδιο *HAR1* κωδικοποιεί για έναν υποδοχέα με δράση κινάσης σερίνης/θρεονίνης με μια περιοχή πλούσια σε κατάλοιπα λευκίνης (LRR domain) και παρουσιάζει ομολογία με το γονίδιο *CLAVATA1* του *A. thaliana*. Η λειτουργία του εικάζεται ότι είναι η πρόσδεση ενός μηνύματος προερχόμενου από τη ρίζα το οποίο περιορίζει τον περαιτέρω σχηματισμό φυματίων. Πιο πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει και τη συμμετοχή άλλων γονιδίων στο μηχανισμό, όπως του *TOO MUCH LOVE (TML)*, Magori et al., 2009) που εκφράζονται τόσο στη ρίζα όσο και στο βλαστό και αποτελούν μέρος του μονοπατιού μεταγωγής σήματος για τον έλεγχο του τελικού αριθμού φυματίων που θα αναπτυχθούν (Reid et al., 2014).

Οι ορμόνες αυξίνη, γασμονικό οξύ (JA) και τα μπρασισινοστεροειδή (BR) φαίνεται να παίζουν ρόλο ως σηματοδοτικά μόρια στον μηχανισμό του AON (Nakagawa & Kawaguchi, 2006; Oka-Kira & Kawaguchi, 2006; Terakado et al., 2006), χωρίς όμως να είναι ξεκάθαρος ακόμα ο τρόπος που τον επηρεάζουν ή τα μόρια που εμπλέκονται.

#### **1.4. Μετασχηματισμός με το *Agrobacterium rhizogenes* και “Hairy Root” φαινότυπος.**

Το *Agrobacterium rhizogenes* (ή *Rhizobium rhizogenes*, σύμφωνα με τους Young et al., 2001) είναι ένα Gram αρνητικό βακτήριο, συγγενικό του είδους *Agrobacterium tumefaciens*, που φέρει το πλασμίδιο Ti υπεύθυνο για τη νεοπλαστική ασθένεια “crown gall” στα ανώτερα φυτά. Σε αντιστοιχία, το *A. rhizogenes* προκαλεί το φαινότυπο “Hairy root”, που οφείλεται στο πλασμίδιο Ri και χαρακτηρίζεται από αυξημένη ανάπτυξη ριζικού ιστού, χωρίς γεωτροπισμό, με πολλαπλαπλά διακλαδιζόμενες εκτοπικές ρίζες στο σημείο της μόλυνσης και ενισχυμένους ρυθμούς ανάπτυξης (Terfer, 1984). Και τα δύο βακτήρια μολύνουν τραυματισμένα φυτά, προσελκυσόμενα μέσω χημειοταξίας από φαινορικά στοιχεία που παράγονται από το σημείο τραυματισμού. Η παθογένεια και των δύο βακτηρίων οφείλεται σε μια περιοχή του πλασμιδίου που ονομάζεται T-DNA η οποία ενσωματώνεται στο DNA του φυτού (Chilton et al., 1982). Η περιοχή του T-DNA



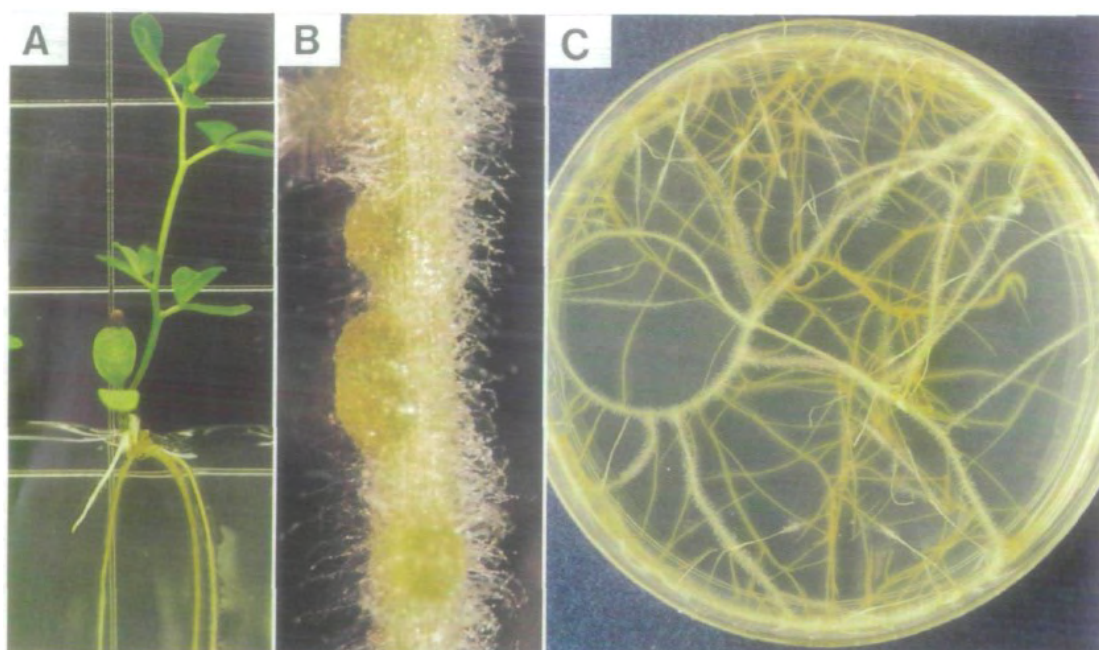
φέρει γονίδια που προσδίδουν στα μετασχηματισμένα κύτταρα την ικανότητα να μεγαλώνουν χωρίς ορμόνες και γονίδια σύνθεσης οπινών (τροποποιημένα αμινοξέα) που χρησιμοποιούνται αποκλειστικά από τα βακτήρια (Sinkar *et al.*, 1987). Ο φαινότυπος “Hairy root” οφείλεται στα γονίδια *rol* A, B, C, D (White *et al.*, 1985) τα οποία εντοπίζονται στην περιοχή του T-DNA. Ως T-DNA ορίζεται μια περιοχή του πλασμιδίου που περιβάλλεται από δύο συνοριακές αλληλουχίες 25bp (LB και RB) (Waters *et al.*, 1991), η οποία ενσωματώνεται ως μονόκλωνο DNA στο φυτικό γονιδίωμα με τη δράση των γονιδίων *vir* που υπάρχουν σε άλλη περιοχή του πλασμιδίου (Gelvin, 2003). Παρατηρείται πολικότητα στη μεταφορά και ενσωμάτωση του T-DNA, η οποία κατευθύνεται και ξεκινά από το δεξί συνοριακό (Wang *et al.*, 1984).

Η γενετική τροποποίηση των φυτών που συντελείται μέσω των δύο αγροβακτηρίων, εκμεταλεύεται την ικανότητα μεταφοράς και ενσωμάτωσης του T-DNA για την οποία η κύρια απαίτηση είναι η ύπαρξη των δύο συνοριακών, χωρίς να αναγνωρίζονται τα ενδιάμεσα γονίδια (Gelvin, 2003). Η ικανότητα των γονιδίων *vir* να δρουν *in trans* επίσης βοήθησε στο σχεδιασμό δυαδικών φορέων, όπου η κατασκευή T-DNA κλωνοποιείται σε πλασμιδιακό φορέα και εισάγεται σε κατάλληλο στέλεχος αγροβακτηρίου που περιέχει το δεύτερο βοηθητικό πλασμίδιο (helper plasmid) το οποίο φέρει τα γονίδια *vir* για την κινητοποίηση και εισαγωγή του T-DNA στο φυτικό κύτταρο (Bevan, 1984). Η εισαγωγή φαίνεται να γίνεται τυχαία αλλά κυρίως σε μεταγραφικά ενεργές περιοχές του φυτικού γονιδιώματος.

Η μέθοδος μετασχηματισμού με το *A. rhizogenes* παρουσιάζει μια σειρά πλεονεκτημάτων έναντι του μετασχηματισμού μέσω του *A. tumefaciens* κυριότερο εκ των οποίων είναι η ταχύτητα και η απλότητα της διαδικασίας. Επιπλέον μπορούν να μετασχηματιστούν με μεγάλη απόδοση και να εξεταστούν ταυτόχρονα μεγάλος αριθμός ριζών (Stiller *et al.*, 1997). Αναγεννημένα σύνθετα φυτά (αγρίου τύπου βλαστός) με μετασχηματισμένες λειτουργικές ρίζες δημιουργούνται σε ένα μήνα από τον μετασχηματισμό. Επίσης οι Stiller *et al.* (1997) έδειξαν ότι μπορούν από “Hairy Roots” να αναγεννηθούν ολόκληρα μετασχηματισμένα φυτά σε 5 με 6 μήνες.

Το πρώτο πρωτόκολλο μετασχηματισμού του *L. japonicus* με στέλεχος του *A. rhizogenes* για την επαγωγή “Hairy roots”, περιγράφηκε από τους Diaz *et al.* (2005). Οι μετασχηματισμένες “Hairy Roots” του *L. japonicus* μπορούν να αναπτύξουν φυσιολογικά φυμάτια 3-4 εβδομάδες μετά τον σχηματισμό τους.

Το συγκεκριμένο σύστημα μετασχηματισμού χρησιμοποιείται σε μελέτες γονιδίων που εκφράζονται στο ριζικό σύστημα και έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για την μελέτη των γονιδίων που εμπλέκονται στις συμβιωτικές σχέσεις και των υποκινητών τους (π.χ. Boisson-Dernier *et al.*, 2001) ή στην αλληλεπίδραση φυτού-παθογόνου (Christey, 2001). Τέλος, λόγω της ικανότητας τους να διαιρούνται απεριόριστα χωρίς την εξωγενή προσθήκη ορμονών και της διατήρησης των μεταβολικών και φυσιολογικών χαρακτηριστικών της ρίζας (Rao & Ravishankar, 2002), μπορούν να διατηρηθούν σε *in vitro* καλλιέργειες και να χρησιμοποιηθούν ως σύστημα παραγωγής διαγονιδιακών πρωτεϊνών ή μεγάλων ποσοτήτων δευτερογενών μεταβολιτών οικονομικής και φαρμακευτικής σημασίας (Sharma *et al.*, 2013).



**Εικόνα 10:** Φαινότυπος φυτών *L. japonicus* μετασχηματισμένων με *A. rhizogenes* μετά από τραυματισμό στο υποκοτύλιο (A) Επαγωγή “Hairy Roots” σε φυτάρια μεγαλωμένα σε τρυβλία Petri 3 εβδομάδες μετά την μόλυνση με το αγροβακτήριο, (B) Φυμάτια σε “Hairy Root” μετασχηματισμένων με *A. rhizogenes* 7 ημέρες μετά τον εμβολιασμό με το ριζόβιο *R. Loti* στέλεχος NZP2235, (C) Αξενική καλλιέργεια “Hairy root” σε στερεό θρεπτικό (Προσαρμοσμένο από Stiller *et al.*, 1997).

## **1.5. Σίγηση γονιδίου μέσω siRNA και ο δυαδικός φορέας pUBI-GWS-GFP**

Η σίγηση γονιδίων μέσω μικρών RNA (short interfering RNAs, siRNA) έχει καταστεί ένα ισχυρό εργαλείο για τη μελέτη της λειτουργίας ενός γονιδίου στην αντίστροφη γενετική. Είναι από τις πλέον χρησιμοποιούμενες μεθόδους για τον έλεγχο του φαινοτύπου που μπορεί να προκαλέσει η απουσία ενός γονιδίου (Waterhouse & Helliwell 2003) και έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα σε μελέτες λειτουργίας φυτικών γονιδίων (π.χ. Wesley *et al.*, 2001, Waterhouse & Helliwell, 2003, Kumagai & Kouchi, 2003). Η μέθοδος βασίζεται στην ανακάλυψη ενός συντηρημένου μηχανισμού άμυνας μεταξύ των ευκαρυωτικών οργανισμών που προκαλεί τη μεταγραφική ή μετά-μεταγραφική σίγηση ιικού RNA, μορίων RNA με ενδομοριακή συμπληρωματικότητα που οδηγεί στη δημιουργία δομών φουρκέτας και στη σίγηση διαγονιδίων που έχουν εισαχθεί στο κύτταρο με σκοπό την υπερέκφρασή τους. Η καταστολή γίνεται με την αποδόμηση του dsRNA μέσω του συμπλόκου DICER σε μικρά τμήματα 21-25 βάσεων, ενσωμάτωσή του στο σύμπλοκο RISC ως μονόκλωνο RNA, όπου χρησιμεύει σαν αλληλουχία οδηγός αναγνώρισης των συμπληρωματικών RNA και την επακόλουθη κατατροφή τους.

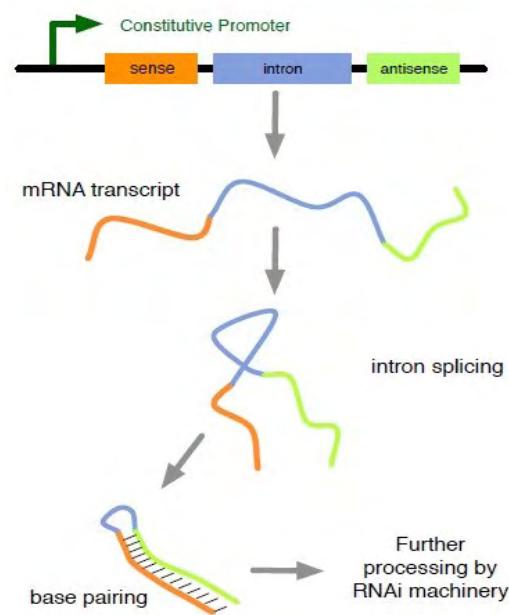
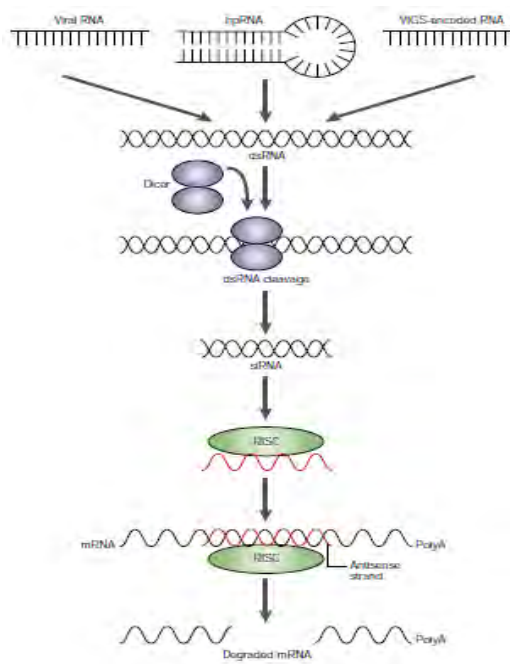
Κεντρικό ρόλο παίζει το δίκλωνο RNA. Η καταστολή μπορεί να συμβεί σε διάφορα επίπεδα. Πιο συνηθισμένα στα φυτά συμβαίνει στο επίπεδο της καταστολής του μεταγραφήματος και ονομάζεται μετά-μεταγραφική γονιδιακή σίγηση (Sharp, 2001, Hell & Baulcomb, 2004). Μια σειρά πλεονεκτημάτων όπως: η ειδικότητα που παρουσιάζει, η γενετική επίσταση με κυρίαρχο φαινότυπο και η σταθερή σίγηση φυτών μέσω του *Agrobacterium* την έχουν καταστήσει μέθοδο επιλογής για τη προκαταρκτική μελέτη γονιδίων που μπορούν να προκαλέσουν ενδιαφέροντες φαινότυπους (Small, 2006). Επιπλέον, επιλέγοντας συντηρημένες περιοχές μπορεί να σιγηθεί η έκφραση μιας οικογένειας γονιδίων αντί για ένα μόνο γονίδιο.

Η σίγηση των επιλεγμένων γονιδίων δεν είναι απόλυτη καθώς η αποτελεσματικότητα εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως από το επιλεγμένο γονίδιο στόχο, την περιοχή στόχο του γονιδίου, τον ιστό κτλ. Γι'αυτό το λόγο τα φυτά ονομάζονται knock-down σειρές, καθώς ακόμα και φυτά που έχουν μετασχηματιστεί με τον ίδιο φορέα στις ίδιες συνθήκες μπορούν να παρουσιάζουν εύρος φαινοτύπων. Αυτό το χαρακτηριστικό επιτρέπει τη χρήση της μεθόδου σε μελέτες γονιδίων που εάν

εξαληφθούν είναι θνησιγόνα π.χ. αναπτυξιακά γονίδια ή γονίδια με βασικές κυττατικές λειτουργίες (Wesley *et al.*, 2001).

Ένας από τους πιο διαδεδομένους και αποτελεσματικούς τρόπους εισαγωγής του RNA στόχου είναι με τη χρήση δυαδικών φορέων που φέρουν κατασκευές με την αλληλουχία στόχο σε αντίστροφη επανάληψη, οι οποίες χωρίζονται από ένα ιντρόνιο. Το RNA δομής φουρκέτας (hpRNA) είναι η πιο αποτελεσματική και σταθερή κατασκευή σίγησης (90%), με ομοιόμορφη έκφραση στους ιστούς που εισάγεται όπως έδειξαν οι Wesley *et al.* το 2001. Κομμάτια μήκους 98-853 nt (συνήθως 300-600bp) είναι αποτελεσματικά ως βραχίονας της φουρκέτας και μπορούν να προέρχονται είτε από την κωδική περιοχή του γονιδίου είτε από τις 3', 5'- UTR του.

Οι Kumagai & Kouchi (2003) ήταν οι πρώτοι που χρησιμοποίησαν αυτή την μέθοδο για τη μελέτη γονιδίων που εμπλέκονται στη φυματιογένεση χρησιμοποιώντας κατασκευή



**Εικόνα 11:** Μοντέλο του τρόπου μεταγραφικής σίγησης γονιδίων. (Προσαρμοσμένο από Waterhouse & Helliwell, 2003).

**Εικόνα 12:** Κασσέτα υπό τον έλεγχο συστατικού υποκινητή που φέρει τα στοιχεία για τη δημιουργία dsRNA με τη δομή φουρκέτας για την επαγωγή μεταγραφικής σίγησης.

που έφερε τμήμα του γονιδίου μάρτυρα GUS και μολύνοντας με *A. rhizogenes* σταθερά μετασηματισμένες σειρές που φέραν το ίδιο γονίδιο υπό συστατικούς ή φυματιοειδικούς ενισχυτές. Το 60% των “Hairy Roots” που προέκυψαν έδειξαν

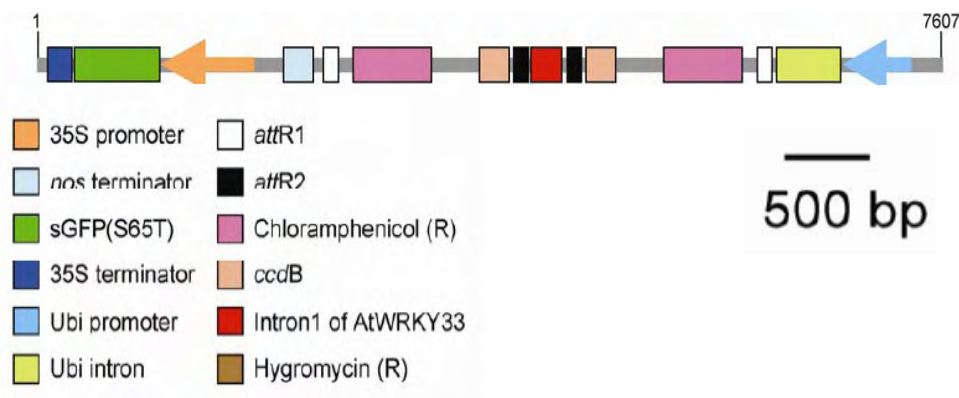
μειωμένη ή καθόλου έκφραση του GUS, δείχνοντας ότι η γονιδιακή σίγηση είναι εφικτή και στις “Hairy Roots”.

### 1.5.1. Ο φορέας σίγησης pUBI-GWS-GFP

Ο δυαδικός φορέας pUBI-GWS-GFP κατασκευάστηκε από τους Maekawa *et al.* (2008) χρησιμοποιώντας ως βάση το δυαδικό φορέα pCAMBIA1300 (Cambia, Canberra, Australia).

Ο pUBI-GWS-GFP περιέχει τα χαρακτηριστικά του φορέα pCAMBIA1300 εκτός της περιοχής του T-DNA, ενώ η συγκεκριμένη περιοχή έχει τροποποιηθεί για να υποστηρίζει κατασκευή για έκφραση RNA φουρκέτας (hrRNA) μέσω της τεχνολογίας GATEWAY αντικαθιστώντας το MCS του pCAMBIA1300. Το ένθεμα κλωνοποιείται στις δύο θέσεις διπλής επιλογής chloramphenicol και *ccB*, με τις θέσεις ανασυνδυασμού *attR1* και *attR2* στα άκρα τους εκατέρωθεν του ιντρονίου *AtWRKY* για την εισαγωγή με την αντίδραση LR Clonase της επιθυμητής αλληλουχίας σε αντιπαράλληλη φορά. Η κατασκευή περιέχεται μεταξύ τμήματος του υποκινητή του γονιδίου *LjUbiquitin1* (535bp) μαζί με ένα μικρό τμήμα του πρώτου ιντρονίου και της αλληλουχίας τερματισμού *nos*. Επίσης έχει αντικατασταθεί το γονίδιο ανθεκτικότητας στην υγρομυκίνη που περιέχεται στον T-DNA του pCAMBIA1300 από το γονίδιο επιλογής *GFP* υπό τον ισχυρό εκκινητή 35S για έκφραση σε φυτικά κύτταρα. Η εισαγωγή του γονιδίου του *GFP* επιτρέπει την γρήγορη επιβεβαίωση και επιλογή των μετασηματισμένων φυτών.

Οι Maekawa *et al.* (2007) έδειξαν ότι με τον παραπάνω φορέα επιτυγχάνεται σίγηση στο 84% των “Hairy Roots” που μετασημάτισαν, συμπεριλαμβανομένων και των ώριμων φυματίων.



**Εικόνα 13:** T-DNA του φορέα pUBI-GWS-GFP.

## 1.6. Στόχοι:

Η παρούσα μελέτη έχει ως σκοπό τη διερεύνηση του λειτουργικού ρόλου του γονιδίου *LSK1* στη διαδικασία της φυματιογένεσης στο φυτό *L. japonicus* και γίνεται σε συνέχεια των ευρημάτων που συζητήθηκαν προηγουμένως (Psarrakou MSc Thesis, 2014). Μετά την επιβεβαίωση της *LSK1* ως μια κινάση που εμπλέκεται στα πρώτα στάδια της εγκαθίδρυσης της συμβιωτικής σχέσης, ερευνήσαμε το αποτέλεσμα που έχει η σίγησή της σε λειτουργικά φυμάτια 21 ημερών μετά τον εμβολιασμό με το ριζόβιο *Mesorhizobium loti*. Οι παράμετροι που ελέγχθηκαν ήταν η επιβεβαίωση και ποσοτικοποίηση της σίγησης μέσω RT-qPCR, ο φαινότυπος των φυματίων, και ο έλεγχος της έκφρασης επιλεγμένων γονιδίων-δεικτών της φυματιογένεσης.

Τα control φυτά μετασηματίστηκαν με τον άδειο φορέα pUBI-GWS-GFP (Maekawa *et al.*, 2008), ενώ τα knock-down φυτά μετασηματίστηκαν με τον φορέα pUBI-LSK-GFP που έφερε κατασκευή σίγησης για την έκφραση hpRNA έναντι του γονιδίου *LSK1* (Psarrakou, MSc Thesis 2014). Επιπλέον της επιβεβαίωσης της σίγησης, ελέγχθηκε και η έκφραση των γονιδίων δεικτών της φυματιογένεσης *ENOD2*, *ENOD40*, *NIN* και *CYCLOPS*. Όπως αναφέρθηκε στην αντίστοιχη παράγραφο κατά την διάρκεια της φυματιογένεσης μέχρι την τελική εγκαθίδρυση της λειτουργικής σχέσης, παρατηρείται αλλαγή της γονιδιακής έκφρασης των δύο συμβιωτών. Η αλλαγή αυτή είναι συντονισμένη και χρονικά καθορισμένη. Με τη μέτρηση της έκφρασης γονιδίων δεικτών που είναι γνωστή η χρονική τους επαγωγή κατά τη διαδικασία αυτή, μπορεί να ταυτοποιηθεί ή να υποδειχθεί σε ποιο βήμα της επεμβαίνει η γενετική τροποποίηση του μελετούμενου γονιδίου. Τα γονίδια *NIN* και *CYCLOPS* συμμετέχουν στις άμεσες αποκρίσεις μετά την αναγνώριση του ριζοβίου και συνδέουν τις διαδικασίες της οργανογένεσης και βακτηριακής μόλυνσης. Η έκφραση του *NIN* επάγεται 5 ώρες μετά τον εμβολιασμό (Radutoiu *et al.*, 2003) ενώ μετάγραφα του *CYCLOPS* είναι ανιχνεύσιμα με τη μέθοδο της RT-qPCR 4 μέρες μετά τον εμβολιασμό και συνεχίζουν να αυξάνουν (Yano *et al.*, 2008). Τα γονίδια *ENOD2* και *ENOD40* ανήκουν στην κατηγορία των early nodulin genes. Το *ENOD2* κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη πλούσια σε υδροξυ-προλίνες και εκφράζεται στο παρέγχυμα που περιβάλλει το φυμάτιο. Η έκφρασή του κορυφώνεται 12 μέρες μετά τον εμβολιασμό (Radutoiu *et al.*, 2003). Θεωρείται «όψιμο» πρώιμο γονίδιο και χρησιμοποιείται ως αναπτυξιακός δείκτης της μετάβασης στα όψιμα στάδια της διαφοροποίησης του φυματίου (Delis *et al.*, 2011). Το γονίδιο *ENOD40* χρησιμοποιείται επίσης ως δείκτης της έναρξης του αρχεφύτρου του φυματίου. Η ακριβής του δράση είναι άγνωστη αλλά φαίνεται να είναι σημαντική για την

οργανογένεση του φυματίου, καθώς φυτά με σίγηση του γονιδίου αναπτύσσουν μικρό αριθμό φυματίων (Kumagai *et al.*, 2006).

Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική μείωση της έκφρασης του *LSK1* στα μετασηματισμένα φυτά με το φορέα σίγησης, η οποία συνοδεύτηκε και από την παρατήρηση φαινοτύπου. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε σημαντικά αυξημένος αριθμός φυματίων στα knock-down φυτά σε σχέση με τα control και μεγαλύτερο μήκος ρίζας. Παράλληλα η σχετική έκφραση του γονιδίου *ENOD40* εμφανίστηκε να αυξάνεται σημαντικά στα knock-down φυτά, ενώ η σχετική έκφραση των υπόλοιπων γονιδίων δεικτών δεν έδειξε να μεταβάλλεται μεταξύ των δύο μεταχειρίσεων.

## 2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1. Θρεπτικά Μέσα

Η αναλυτική σύσταση των θρεπτικών μέσων που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στο Παράρτημα.

### 2.2. Μετασχηματισμός φυτών *Lotus japonicus* μέσω του βακτηρίου *Agrobacterium rhizogenes* LBA1334

Περίπου 300 σπόροι *L. japonicus* ποικιλίας Gifu χωρισμένοι σε 4 σωλήνες τύπου erpendorf 1,5ml, αρχικά εμβαπτίστηκαν σε πυκνό H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> για 7 λεπτά, ακολούθησε 3 φορές έκπλυση με νερό απιονισμένο και επιφανειακή απολύμανσή με διάλυμα χλωρίνης (2% NaOCl, 0,2% Tween 20 σε 19ml αποστειρωμένου dH<sub>2</sub>O). Οι σπόροι παρέμειναν στο διάλυμα χλωρίνης για 20 λεπτά υπό συνεχή, ήπια, ανάδευση, Έπειτα μεταφέρθηκαν σε θάλαμο νηματικής ροής όπου ακολούθησαν 6 πλύσεις με αποστειρωμένο νερό. Μετά τις πλύσεις προστέθηκε επιπλέον αποστειρωμένο νερό στο οποίο οι σπόροι παραμείνανε για ένα βράδυ στους 4°C στο σκοτάδι. Την επόμενη ημέρα επιστρώθηκαν σε τρυβλία Petri πάνω σε αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί το οποίο είχε βραχεί με 3ml αποστειρωμένου dH<sub>2</sub>O. Τα τρυβλία σφραγίστηκαν με parafilm και οι σπόροι παρέμειναν για ένα βράδυ στους 4°C υπό συνεχές σκοτάδι. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο νηματικής ροής. Οι σπόροι παρέμειναν σε σκοτάδι για 3 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθως μεταφέρθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης (16h φως/8h σκοτάδι, 23°C) και τοποθετήθηκαν κάθετα για 3 επιπλέον ημέρες.

Παράλληλα έγινε η ανάπτυξη καλλιεργειών του *A. rhizogenes* για την μόλυνση των φυτών. Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 2 στελέχη του βακτηρίου, ένα με άδειο φορέα pUBI-GWS-GFP (Maekawa *et al.*, 2008), χωρίς όμως το θνησιγόνο γονίδιο, με το οποίο μολύνθηκαν τα φυτά μάρτυρες (control). Τα φυτά με τη σίγηση μολύνθηκαν με βακτήριο που φέρει τον φορέα pUBI-LSK-GFP, που εμπεριέχει την κασσέτα σίγησης (LSK1 knock-down φυτά) (Psarrakou, MSc Thesis, 2014). Η κατασκευή έγινε με τη χρήση της τεχνολογίας GATEWAY κλωνοποιώντας αρχικά κομμάτι μεγέθους 275bp του γονιδίου *LSK1* στον φορέα pENTR4, χρησιμοποιώντας ως εμπρόσθιο εκκινητή 5'-GACCCATGGATGAACATGATGAGACGG-3' που φέρει τη θέση κοπής του περιοριστικού ενζύμου NcoI και ως ανάστροφο εκκινητή 5'-AGCGCTCGAGCTCTTTTGGGAAGTTCATC-3' με τη θέση κοπής του ενζύμου XhoI. Με τη χρήση του ενζύμου LR Clonase έγινε



υποκλωνωποίηση του ενθέματος στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα pUBI-GWS-GFP και μετασχηματισμός του *A. rhizogenes* στέλεχος LBA1334, το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία.

Αρχικά έγινε επίστρωση των επιθυμητών ήδη μετασχηματισμένων στελεχών *A. rhizogenes* σε θρεπτικό υπόστρωμα LB με τα αντιβιοτικά streptomycin και kanamycin για επιλογή των δυαδικών πλασμιδίων. Τα τρυβλία αφέθηκαν να αναπτυχθούν για 3 ημέρες στους 26°C. Μετά την ανάπτυξη των βακτηρίων επιλέχθηκαν μεμονωμένες αποικίες με τις οποίες εμβολιάστηκαν υγρές καλλιέργειες LB που περιείχαν τα αντιβιοτικά επιλογής. Οι υγρές καλλιέργειες αφέθηκαν για επώαση 3 ημέρες στους 26°C υπό συνεχή ανάδευση (180rpm). Μια ημέρα πριν την μόλυνση των φυτών, 500μL από την κάθε καλλιέργεια επιστρώθηκαν εκ νέου σε τρυβλία με LB με streptomycin και kanamycin. Τα τρυβλία αφέθηκαν για ανάπτυξη στους 26°C μέχρι την μόλυνση. Η σύσταση του θρεπτικού και οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών επιλογής αναφέρονται στο Παράρτημα.

Η διαδικασία της μόλυνσης πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο νηματικής ροής. Στα τρυβλία με τα ανεπτυγμένα βακτήρια προστέθηκαν 2-4ml αποστειρωμένου dH<sub>2</sub>O, προκειμένου να δημιουργηθεί ένα γαλακτώδες διάλυμα. Το διάλυμα αυτό μεταφέρθηκε σε άδειο τρυβίο Petri που περιείχε αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί. Στο ίδιο τρυβλίο μεταφέρονταν τα φυτά που είχαν αναπτύξει ικανοποιητικό μέγεθος ρίζας (περίπου 1cm). Αφού κοβόταν η ρίζα τους λίγο κάτω από το υποκοτύλιο στη μεταβατική ζώνη μεταξύ βλαστού και ρίζας, ακολουθούσε ελαφρή πίεση του σημείου τραυματισμού με τη λαβίδα. Μετά από περίπου 5 λεπτά παραμονής στο τρυβλίο με το βακτήριο, τα φυτά μεταφέρονταν σε νέα τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα Gamborg's B5, 2% σουκρόζη και άγαρ 1%. Τα τρυβλία με τα μολυσμένα φυτά, καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο για 3 ημέρες και τοποθετήθηκαν οριζόντια στο θάλαμο ανάπτυξης. Μετά τις 3 ημέρες αφαιρέθηκε το αλουμινόχαρτο και εκτέθηκαν σε κανονικές συνθήκες ανάπτυξης. Συνολικά 88 φυτά χρησιμοποιήθηκαν, τα οποία χωρίστηκαν 44 και 44 ανά μεταχείριση.

Μετά από συνολικά 5 ημέρες συγκαλλιέργειας με το βακτήριο, έγινε μεταφορά σε φρέσκο θρεπτικό B5 με 2% σουκρόζη, 1% άγαρ και cefotaxime. Πριν τη μεταφορά τα φυτά ξεπλένονταν σε αποστειρωμένο νερό για την απομάκρυνση της περίσσειας των αγροβακτηρίων που είχαν αναπτυχθεί στην επιφάνειά τους. Μετά από μια εβδομάδα στο παραπάνω θρεπτικό, ακολούθησε νέα μεταφορά σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα Jenssen με 1% άγαρ στο οποίο παρέμειναν επιπλέον μια εβδομάδα πριν τη φύτευσή τους.

### **2.3. Φύτευση και εμβολιασμός με το ριζόβιο *Mesorhizobium loti* R7A**

Φυτά με αναγεννημένες ρίζες μεταφέρθηκαν σε γλάστρες που περιείχαν άμμο με βερμικουλίτη σε αναλογία 2 προς 1, το οποίο είχε αποστειρωθεί στους 121°C για 30 λεπτά. Σε κάθε γλάστρα φυτεύθηκαν 1 με 2 φυτά. Οι γλάστρες τοποθετήθηκαν στον θάλαμο ανάπτυξης, όπως περιγράφεται παραπάνω. Ποτίστηκαν με πλήρες θρεπτικό διάλυμα Hoagland (με άζωτο) μια φορά μετά τη φύτευση και στη συνέχεια ποτίζονταν ανά 2 ημέρες εναλλάξ με θρεπτικό διάλυμα Hoagland, χωρίς άζωτο, ή με απιονισμένο νερό. Συνολικά φυτεύθηκαν 20 με 25 φυτά ανά μεταχείριση. Η ανάπτυξη των φυτών έγινε σε σταθερές συνθήκες μέχρι την ολοκλήρωση του πειράματος.

Εννέα ημέρες μετά την μεταφορά των φυτών σε γλάστρες έγινε ο εμβολιασμός με το ριζόβιο *Mesorhizobium loti* στέλεχος R7A. Καλλιέργεια του ριζοβίου που είχε αναπτυχθεί για 4 ημέρες σε υγρό θρεπτικό YMB με αντιβιοτικό επιλογής rifampicin, αραιώθηκε σε αποστειρωμένο νερό μέχρι OD<sub>600</sub> 0,02. Οι ρίζες των φυτών εμβολιάστηκαν με 1 ml της αραιωμένης καλλιέργειας. Η εφαρμογή του εμβολίου έγινε με απευθείας ριζοπότισμα με τη χρήση πιπέτας.

### **2.4. Συλλογή των φυτών**

Συνολικά 9 φυτά από κάθε μεταχείριση επιβίωσαν μέχρι το τέλος του πειράματος, 21 ημέρες μετά τον εμβολιασμό τους. Η συλλογή έγινε με προσεκτική αφαίρεσή από τις γλάστρες, έκπλυση των ριζών με νερό βρύσης για να απομακρυνθούν τα υπολείματα άμμου, καταμέτρηση του μήκους της ρίζας τους και του αριθμού των φυματίων που είχαν αναπτυχθεί. Οι ρίζες των φυτών ελέγχθηκαν για φθορισμό GFP κάτω από στερεοσκόπιο Leica MZ10F συνδεδεμένου με κάμερα DFC 295 (Leica, Solms, Germany), τοποθετήθηκαν σε σωλήνες 1,5 ml και ψύχθηκαν σε υγρό άζωτο. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

### **2.5. Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων**

Οι ρίζες των φυτών που είχαν αποθηκευτεί στους -80°C λειοτριβήθηκαν με τη χρήση αποστειρωμένου εμβόλου και μέρος του δείγματος χρησιμοποιήθηκε για απομόνωση γενωμικού DNA με τη χρήση της μεθόδου CTAB (βλέπε παρακάτω), ενώ το

υπόλοιπο μέρος των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή ολικού RNA. Η απομόνωση του ολικού RNA έγινε με το kit RNeasy Plant της Qiagen.

## **2.6. Απομόνωση γενωμικού DNA με τη μέθοδο CTAB**

Η αρχή της μεθόδου της απομόνωσης DNA με τη μέθοδο CTAB βασίζεται στην λύση των κυτταρικών μεμβρανών, την απομάκρυνση δευτερογενών μεταβολιτών και φαινολικών μέσω των συστατικών του διαλύματος CTAB, την ακόλουθη απομάκρυνση των πρωτεϊνών με χλωροφόρμιο και τέλος την κατακρύμνηση και καθαρισμό του DNA από RNA και άλατα με τη χρήση αλκοολών. Μέσω της αρχικής λειοτρίβησης έχουν προηγουμένως σπάσει μηχανικά τα φυτικά κυτταρικά τοιχώματα.

200μL προθερμασμένου (65°C) διαλύματος CTAB (100mM Tris-Cl pH=8.0, 20mM EDTA pH=8, 1,4M NaCl, 2% w/v CTAB, 1% w/v PVP 40000) προστέθηκαν στα λειοτριβημένα δείγματα. Ακολούθησε προσθήκη 1μL β-μερκαπτοαιθανόλης και τοποθέτηση των δειγμάτων σε υδατόλουτρο στους 65°C για 30 λεπτά με περιοδική ανάδευση. Έπειτα έγινε προσθήκη 200μL διαλύματος SEVAG (24/1, v/v, χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη) και ανάδευση με vortex για 30 δευτερόλεπτα. Ακολουθούσε: φυγοκέντρηση στις 17.000g για 2 λεπτά, μεταφορά της επάνω φάσης σε νέο σωλήνα erpendorf, προσθήκη 0,7X του όγκου ισοπροπανόλης, επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά, φυγοκέντρηση σε 17.000g για 10 λεπτά, απομάκρυνση του υπερκειμένου και επαναδιάλυση του pellet σε παγωμένη 70% αιθανόλη, φυγοκέντρηση στις 17.000g για 5 λεπτά και απομάκρυνση του υπερκειμένου, επανάληψη της φυγοκέντρησης, απομάκρυνση της αιθανόλης και στέγνωμα του pellet που περιέχει το απομονωμένο DNA σε θερμοκρασία δωματίου. Η επαναδιάλυση του pellet έγινε σε 30μl υπερκάθαρου αποστειρωμένου H<sub>2</sub>O, ανάλογα με το μέγεθός του.

## **2.7. Ανίχνευση μετασχηματισμένων ριζών με PCR**

Το γενωμικό DNA που εξήχθει με τη μέθοδο του CTAB χρησιμοποιήθηκε για την επιβεβαίωση της εισαγωγής του ενθέματος στις αναγεννημένες ρίζες. Η επιβεβαίωση έγινε με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) με τη χρήση εκκινητών για το γονίδιο GFP που περιέχεται στο T-DNA ένθεμα (Πίνακας 1). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του kit KAPA Taq PCR της εταιρίας KAPA BIOSYSTEMS. Ο σχεδιασμός της έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του προμηθευτή: αρχική

αποδιάταξη 95°C για 5', αποδιάταξη 95°C για 30'', υβριδισμός εκκινητών 58°C για 30'', επιμήκυνση 72°C για 40'', επανάληψη για 35 κύκλους και τελική επιμήκυνση στους 72°C για 5', σε τελικό όγκο αντίδρασης 20μL. Το αναμενόμενο προϊόν ενίσχυσης ήταν περίπου 215 bp.

## 2.8. Συνθεση cDNA

Το ολικό RNA που απομονώθηκε για κάθε δείγμα μετρήθηκε με τη χρήση συσκευής Qubit (Invitrogen) και υποβλήθηκε σε επεξεργασία με DNase προκειμένου να απομακρυνθούν οποιαδήποτε υπολλείματα γενωμικού DNA. Η κατεργασία έγινε με το kit Deoxyribonuclease I της εταιρίας Invitrogen σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 1000ng ολικού απομονωμένου RNA. Μετά το πέρας της κατεργασίας ελέγχθηκε η παρουσία υπολλειμάτων DNA μέσω PCR με εκκινητές ειδικούς για το γονίδιο της *Ubiquitin* του *L. jaronicus* με θερμοκρασία υβριδισμού ( $T_m$ ) 56°C (Delis *et al.*, 2011). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του kit της KAPA BIOSYSTEMS όπως περιγράφεται σε προηγούμενη παράγραφο, με τη διαφορά της προσθήκης 2μL δείγματος ολικού RNA ως αρχική μήτρα, σε τελικό όγκο 20μL. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα σχεδιάστηκε με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή (αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 5', αποδιάταξη στους 95°C για 30'', υβριδισμός εκκινητών στους 56 °C για 30'', επιμήκυνση στους 72 °C για 40'', επανάληψη για 30 κύκλους και τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 5').

Η σύνθεση της πρώτης αλυσίδας cDNA έγινε με χρήση του kit Tetro Reverse Transcriptase (Bioline) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Σε κάθε αντίδραση προστέθηκαν 750ng καθαρού RNA, όπως περιγράφηκε προηγουμένως σε τελικό όγκο αντίδρασης 20μL.

**Πίνακας 1:** Αλληλουχία,συμβολισμός και θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση μέρους του γονιδίου GFP στην 1<sup>η</sup> PCR. Ο εμπρός εκκινητής συμβολίζεται με F, ενώ ο αντίστροφος με R. Η αλληλουχία τους αναγράφεται με φορά 5' προς 3'.

Σύμβολο Εκκινητή	Αλληλουχία	$T_m$
pUBGFP-F	5'-GCTACCCCGACCACATGAA-3'	58°C
pUBGFP-R	5'-GTTGTA CTCCAGCTTGTGCC-3'	

## **2.9. Ανάλυση τμημάτων DNA σε πηκτή αγαρόζης**

Μετά το πέρας των αντιδράσεων, τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν μέσω οριζόντιας ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης, κατασκευασμένης με διάλυμα 1X TAE (Tris, οξικό οξύ και EDTA) και προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου 0,007% v/v (Maniatis *et al.*, 1982). Ως μάρτυρας μεγέθους χρησιμοποιήθηκε ο 1 kb DNA ladder της εταιρίας New England Biolabs.

## **2.10. Ημιποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (RT-qPCR)**

Η μέτρηση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *LSK* έγινε με τη μέθοδο της ημιποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (RT-qPCR).

Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή μεθόδου της συμβατικής PCR, με τη διαφορά της καταγραφής του πολλαπλασιασμού της αλληλουχίας στόχου σε πραγματικό χρόνο. Η παρακολούθηση της αντίδρασης γίνεται μέσω της προσθήκης σε αυτή φθορίζοντων μορίων όπως η SYBR Green. Μετρώντας την ένταση του φθορισμού που εκπεμπεται σε κάθε κύκλο, υπολογίζεται η συγκέντρωση των προϊόντων ενίσχυσης.

Ο προδιορισμός της ποσότητας των παραγόμενων προϊόντων μπορεί να γίνει είτε με σχετική ποσοτικοποίηση μετρώντας παράλληλα και τη συγκέντρωση ενός γονιδίου αναφοράς είτε απόλυτα με τη χρήση πρότυπης καμπύλης.

Στην παρούσα εργασία η έκφραση του γονιδίου *LSK1* μετρήθηκε με σχετική ποσοτικοποίηση (RT-qPCR) μετρώντας τα αντίγραφα cDNA του γονιδίου στο ολικό cDNA που απομονώθηκε. Στα ίδια δείγματα μετρήθηκε η έκφραση του γονιδίου *LSK6* για να εξεταστεί εάν η κατασκευή σίγησης επηρεάζει την έκφραση ενός γονιδίου της ίδιας οικογένειας με πολύ μεγάλη ομοιότητα αλληλουχίας (81,5%). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 2. Το κομμάτι που ενισχύθηκε για το *LSK1* ήταν 177bp.

Επιπλέον, μετρήθηκε η έκφραση των γονιδίων *ENOD40*, *ENOD2*, *NIN* (Delis *et al.*, 2011) και *CYCLOPS* (Yano *et al.*, 2008) ως γονίδια αναφοράς της διαδικασίας της φυματιογένεσης. Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκε cDNA που κατασκευάστηκε εκ νέου με τις διαδικασίες που αναφέρονται προηγουμένως στα control δείγματα 5 και 7, και στα knock-down δείγματα 15-18.

Σε όλες τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς το γονίδιο της *Ubiquitin* του *L. japonicus*, χρησιμοποιώντας ως εμπρόσθιο εκκινητή UBQrtF: 5'-

TTACCTTGTGCTCCGTCTTC-3' και ως αντίστροφο UBQrtR: 5'-AACAAACAGCACACAGCCAATCC-3' (Delis *et al.*, 2011).

Πριν την τελική αντίδραση έγινε έλεγχος της ποιότητας των cDNA μέσω real time PCR με την ενίσχυση μόνο του cDNA της Ubiquitin.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν περιείχονταν στο kit KAPA SYBR® FAST qPCR Kits της εταιρίας KAPA BIOSYSTEMS. Ως χρωστική αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η ROX low. Σε κάθε αντίδραση προστέθηκαν 2μL cDNA μήτρας και ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 10μL. Οι συγκεντρώσεις των αντιδρώντων προστέθηκαν με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που έλαβε χώρα η αντίδραση σχεδιάστηκε με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή, θέτωντας ως  $T_m$  τους 58°C και επανάληψη των βημάτων της αποδιάταξης (95°C για 15"), υβριδισμού των εκκινητών (58°C για 20") και επιμήκυνσης (72°C για 11") για 40 κύκλους.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στο μηχάνημα Mx3005P της Stratagene και η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό MxPro, Stratagene, version 4.10.

Η ειδικότητα της αντίδρασης εκτιμήθηκε με την καμπύλη αποδιάταξης και με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αгарόζης 1% για επιβεβαίωση του μεγέθους του προϊόντος ενίσχυσης. Σε όλες τις αντιδράσεις ανιχνεύτηκε ένα προϊόν. Για τη μέτρηση της έκφρασης του κάθε γονιδίου χρησιμοποιήθηκαν 2 τεχνικές επαναλήψεις από κάθε δείγμα.

**Πίνακας 2:** Αλληλουχία, συμβολισμός και θερμοκρασία υβριδισμού ( $T_m$ ) των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την μέτρηση της έκφρασης του γονιδίου *LSK1* (GSK3bF και R) και του γονιδίου *LSK6* (qRT\_LSK6\_2\_F και R) με τη μέθοδο της ημιποσοτικής real time PCR. Ο εμπρόσθιος εκκινητής συμβολίζεται με F, ενώ ο αντίστροφος με R. Η αλληλουχία τους αναγράφεται με φορά 5' προς 3'.

Σύμβολο Εκκινητή	Αλληλουχία	$T_m$
GSK3bF_RT	5'- CCTATTGGTTAATCCCCAGACA-3'	58°C
GSK3bR_RT	5'- ACAACCAACAGACCACATATCG-3'	
qRT_LSK6_2_F	5'- ACCAACCAGAGAAGAAATAAAGTGC - 3'	
qRT_LSK6_2_R	5'- CATCCAAAGCAGAGCATCGTAG - 3'	

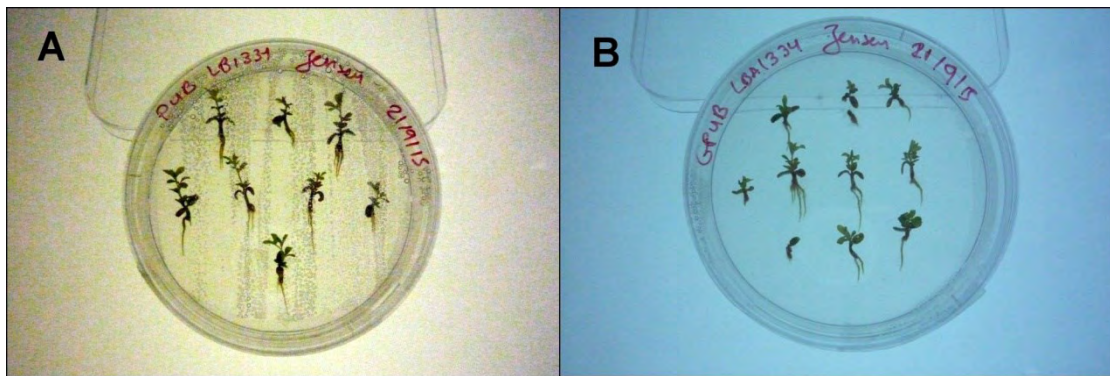
Ο υπολογισμός της σχετικής έκφρασης των μεταγράφων του υπό μελέτη γονιδίου έγινε μετά από κανονικοποίηση με την έκφραση του γονιδίου της Ubiquitin. Η τιμή δείχνει το λόγο (U) της έκφρασης των δύο γονιδίων, ως  $(1+E)^{-\Delta Ct}$  όπου  $\Delta Ct = C_t^X - C_t^U$  (Livak & Schmittgen, 2001). Η απόδοση της αντίδρασης (E) ορίστηκε ως 1.

### **2.11. Στατιστική ανάλυση**

Η στατιστική σύγκριση των αποτελεσμάτων για τον αριθμό των φυματίων, το μήκος ρίζας και τον αριθμό φυματίων ανά cm ρίζας μεταξύ control και *LSK1* knock-down σειρές έγινε με το Student's t-test με τη χρήση του Excel (Microsoft). Για όλες τις μέσες τιμές υπολογίστηκε το τυπικό σφάλμα. Το επίπεδο σημαντικότητας καθορίστηκε στο 0,05. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων της RT-qPCR έγινε υπολογίζοντας το μέσο όρο σχετικής έκφρασης για τα control φυτά και τα περιθώρια εμπιστοσύνης (95% CIs), ενώ οι *LSK1* knock-down σειρές θεωρήθηκαν σαν ξεχωριστές επαναλήψεις γιατί το ποσοστό σίγησης διαφέρει σε κάθε φυτό. Η στατιστική σύγκριση έγινε εξετάζοντας εάν η σχετική έκφραση της κάθε σειράς με σίγηση περιέχονταν στα περιθώρια εμπιστοσύνης της έκφρασης των control φυτών.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Φυτά *L. japonicus* ηλικίας μιας εβδομάδας, τραυματίστηκαν μέσω αποκοπής της πρωτογενούς ρίζας (Handberg & Stougaard, 1992, Stiller *et al.*, 1997, Martirani *et al.*, 1999) και μολύνθηκαν με το στέλεχος *A. rhizogenes* LBA1334 που έφερε το δυαδικό φορέα pUBI-GWS-GFP για τα control και pUBI -LSK-GFP που στοχεύει την LSK1 οι knock-down σειρές

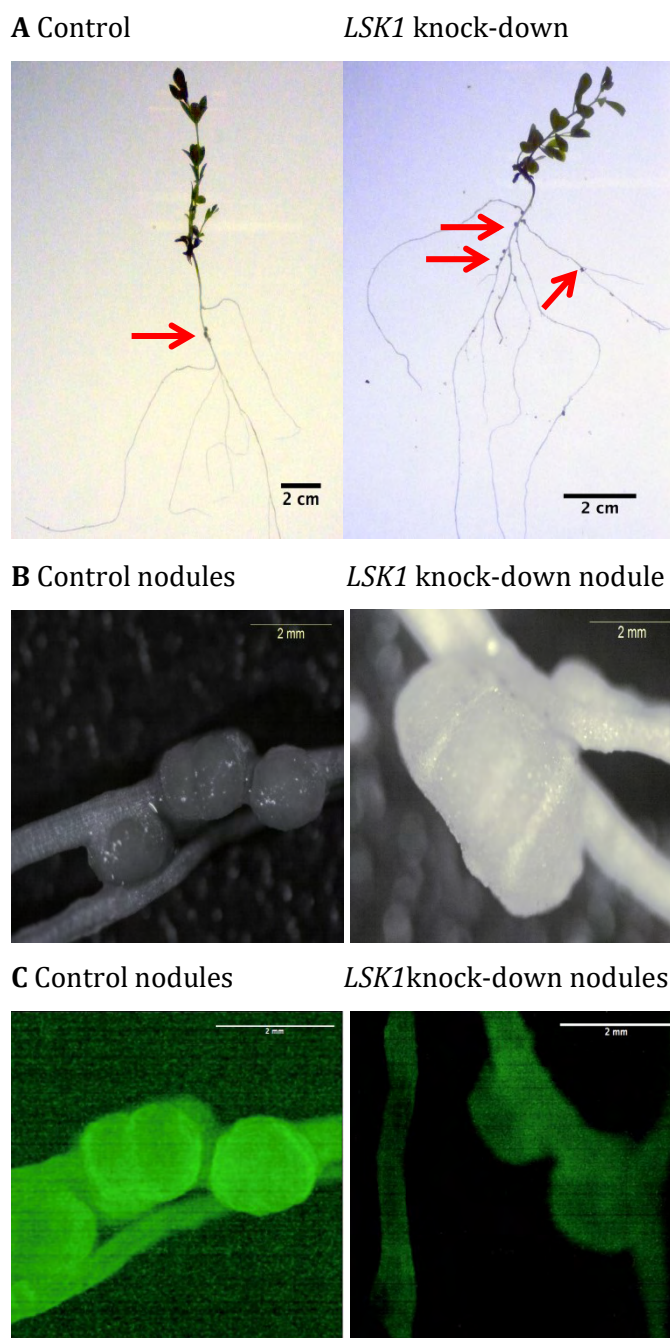


**Εικόνα 14:** Φυτά μετασηματισμένα με τον δυαδικό φορέα σίγησης pUBI-LSK-GFP (A) και με τον δυαδικό φορέα pUBI-GWS-GFP (control) (B) που αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο Jensen. Παρατηρείται ο φαινότυπος “Hairy Roots” στις αναγεννημένες ρίζες 18 ημέρες μετά την μόλυνσή τους με το αγροβακτήριο.

Μέχρι την ημέρα της δειγματοληψίας, 21 ημέρες μετά τον εμβολιασμό με το ριζόβιο, επιβίωσαν 9 φυτά σε κάθε ομάδα. Από αυτά, 3 φυτά control και 2 σειρές με τη σίγηση δεν είχαν αναπτύξει καθόλου φυμάτια, και εμφάνισαν χλωρωτικά χαρακτηριστικά.

Την ημέρα της συλλογής, οι ρίζες των φυτών ελέγχθηκαν κάτω από στερεοσκόπιο για την ανίχνευση φθορισμού GFP, για να επιβεβαιωθεί η επιτυχία του μετασηματισμού με το ένθεμα του pUBI. Τα 13 φυτά που ελέγχθησαν ήταν όλα θετικά για φθορισμό GFP. Στην Εικόνα 9, παρουσιάζονται ενδεικτικές φωτογραφίες φυτών την ημέρα της συλλογής, των φυματίων τους και του φθορισμού GFP κάτω από στερεοσκόπιο.

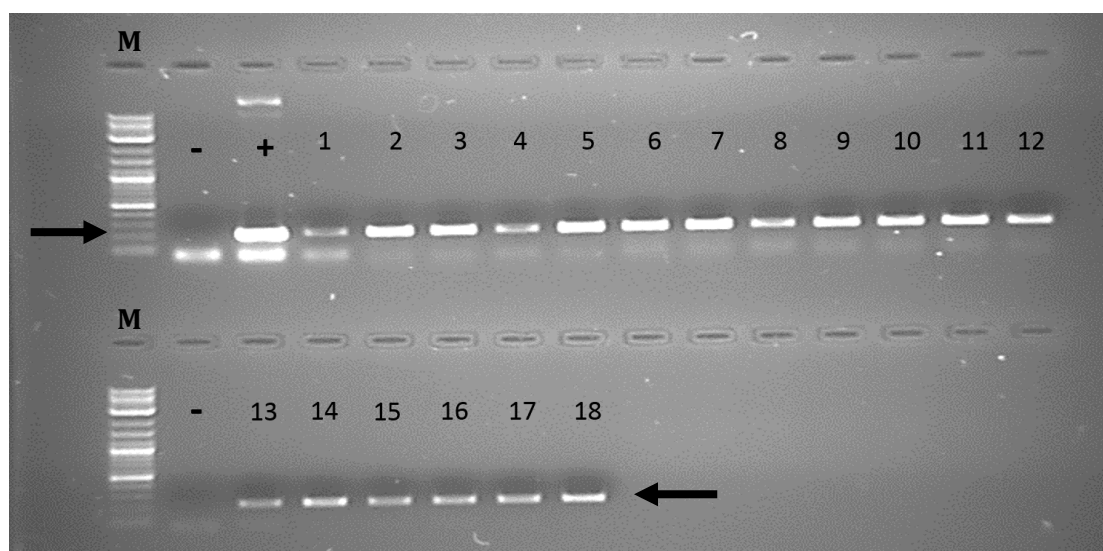




**Εικόνα 15:** Αριθμός και εμφάνιση των φυματίων σε φυτά με σίγηση του γονιδίου *LSK1* (*LSK1* knock-down) σε σύγκριση με τα φυμάτια των control φυτών 21 ημέρες μετά τον εμβολιασμό με το ριζόβιο *Mesorhizobium loti* R7A: (A) Ολόκληρα φυτά μετά την αναγέννηση της ρίζας όπου παρατηρείται ο φαινότυπος “Hairy Root”. Τα βέλη δείχνουν τα φυμάτια (B) Φωτογραφίες φωτεινού πεδίου των φυματίων κάτω από στερεοσκόπιο, (C) Φθορισμός GFP των φυματίων μετασχηματισμένων ριζών.

Η ένθεση του T-DNA επιβεβαιώθηκε και με PCR. Στην αντίδραση συμπεριλήφθησαν και τα 5 δείγματα που δεν είχαν αναπτύξει φυμάτια. Εκτός από το DNA που απομονώθηκε από τα δείγματα στην αντίδραση συμπεριλήφθησαν και 2

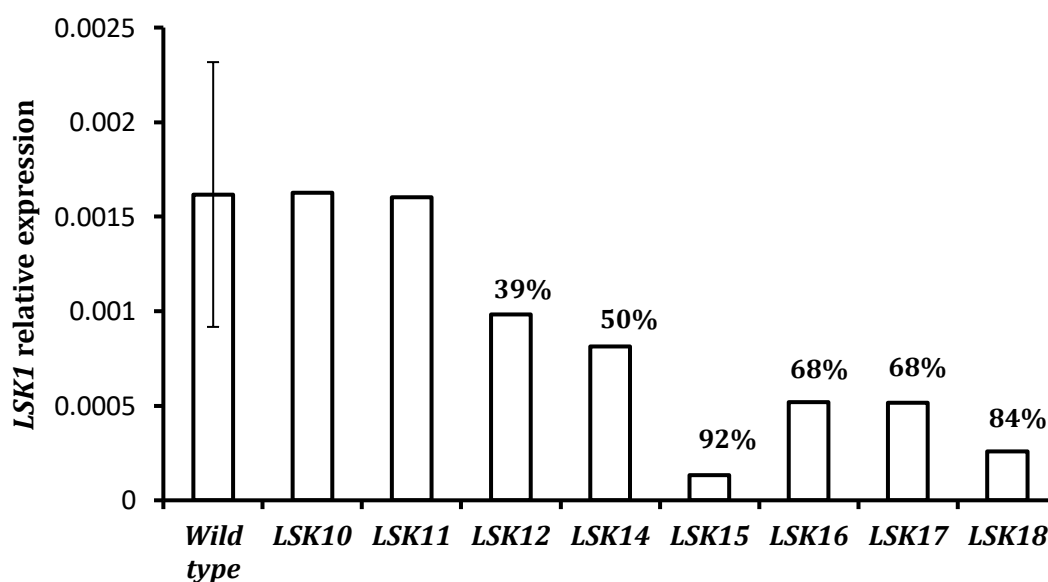
αρνητικά control. Στο ένα αρνητικό control προστέθηκε μόνο νερό, αντί για DNA και στο δεύτερο προστέθηκε γενωμικό DNA *L. japonicus* αγρίου τυπου (wild type, wt). Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε καθαρό πλασμίδιο pUBI. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην Εικόνα 16. Όλα τα δείγματα ήταν θετικά για το ένθεμα. Το προϊόν της αντίδρασης εμφανίστηκε κοντά στη ζώνη των 200bp, όπως ήταν αναμενόμενο (μέγεθος κομματιού ενίσχυσης 215bp).



**Εικόνα 16:** Αποτελέσματα της PCR για την ανεύρεση των φυτών που μετασηματίστηκαν επιτυχώς με το T-DNA του φορέα pUBI μετά από ενίσχυση κομματιού 215bp με τη χρήση ειδικών εκκινητών για το γονίδιο GFP που περιέχεται στο ένθεμα (βέλη). Με (M) συμβολίζεται ο μάρτυρας μοριακού βάρους, με (-) τα αρνητικά control (στην πρώτη σειρά νερό, στη δεύτερη DNA *L. japonicus* wt), με (+) συμβολίζεται το θετικό control (πλασμίδιο pUBI αραιωμένο 1:10), από (1-9) τα φυτά control μετασηματισμένα με άδειο φορέα pUBI-GWS-GFP και από (10-18) τα knock down φυτά μετασηματισμένα με τον φορέα pUBI-LSK-GFP.

Στη συνέχεια, έγινε επιβεβαίωση της σίγησης μέσω μέτρησης της σχετικής έκφρασης του mRNA του γονιδίου *LSK1* στα φυτά μάρτυρες και στις σειρές knock-down με τη μέθοδο της ημιποσοτικής Real-Time PCR, με την ταυτόχρονη μέτρηση των επιπέδων του γονιδίου της Ubiquitin στα ίδια δείγματα, έγινε κανονικοποίηση του αριθμού των μεταγράφων της *LSK1* στο κάθε δείγμα. Η σχετική έκφραση αποδίδεται ως ο λόγος (U) της ποσότητας των μεταγράφων των δύο γονιδίων. Από την ανάλυση εξαιρέθηκαν τα control δείγματα (1-3) που δεν είχαν αναπτύξει φυμάτια και 2 δείγματα, 1 control (δείγμα 4) και 1 *LSK1* knock-down (σειρά 13), τα οποία δεν έδωσαν σήμα ενίσχυσης στην αντίδραση RT-qPCR.

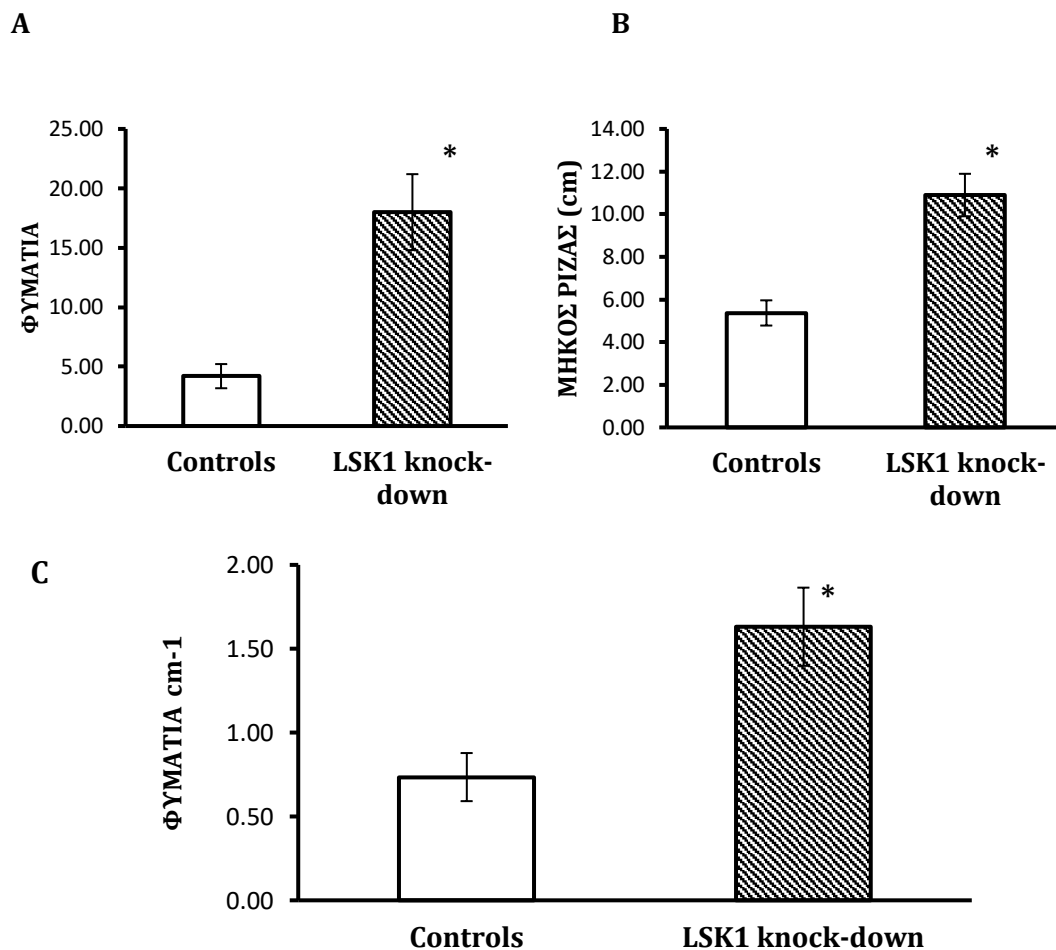
Η ανάλυση έδειξε σημαντικά μικρότερη σχετική έκφραση του γονιδίου της *LSK1* στις ρίζες των φυτών που μετασηματίστηκαν με τον φορέα σίγησης (Γράφημα 1). Αν και δεν επιτεύχθηκε σε όλες τις ρίζες σίγηση του *LSK1* στον ίδιο βαθμό (πράγμα αναμενόμενο μ' αυτή η μέθοδο σίγησης), η έκφραση ήταν σταθερά μικρότερη ή ίση του μέσου όρου σχετικής έκφρασης στα control φυτά. Για τα control φυτά υπολογίστηκε ο μέσος όρος, ενώ το κάθε δείγμα των knock down φυτών θεωρήθηκε ως μια ξεχωριστή σειρά, ώστε ν' ανιχνευθούν μεμονωμένα φυτά με σημαντικό ποσοστό σίγησης του *LSK1*. Όπως φαίνεται και από το Γράφημα 1 στα δείγματα 12 έως 18 παρατηρείται σημαντικά μικρότερη έκφραση του *LSK1*, ειδικά στις ρίζες των φυτων 15 και 18. Οι σειρές 10 και 11 στις οποίες δεν παρατηρήθηκαν φυμάτια στις ρίζες, τα επίπεδα έκφρασης του *LSK1* ήταν ανάλογα της έκφρασης των φυτών control (Γράφημα 1).



**Γράφημα 1:** Σχετική έκφραση του γονιδίου *LSK1* σε ρίζες control φυτών που μετασηματίστηκαν με τον φορέα pUBI -GWS-GFP (Wild type) και των knock-down φυτών που μετασηματίστηκαν με τον φορέα σίγησης pUBI-LSK-GFP όπως μετρήθηκε με τη μέθοδο της RT-qPCR. Για τα control φυτά (n=5) παρουσιάζεται ο μέσος όρος  $\pm 95\%$  CIs.

Τα φυτά με μειωμένη έκφραση του *LSK1* αναπτύξανε περισσότερα φυμάτια σε σχέση με τα φυτά control (Student's t-test  $t=-3,78$ ,  $p=0,004$ ) όπως φαίνεται στο (A) μέρος του Γραφήματος 2. Επίσης, οι σειρές με τη σίγηση ανέπτυξαν μεγαλύτερο μήκος ρίζας (Student's t-test  $t = -4,52$ ,  $p=0,001$ ) σε σχέση με τα control φυτά (B, Γράφημα 2) και τέλος ο κανονικοποιημένος αριθμός φυματίων άνα εκατοστό ρίζας ήταν επίσης σημαντικά μεγαλύτερος σε σχέση με των control φυτών (Student's t-test  $t=-3,10$ ,  $p=0,01$ ). Στην ανάλυση δεν συμπεριλήφθηκαν τα control δείγματα 1-4 και οι σειρές 10,

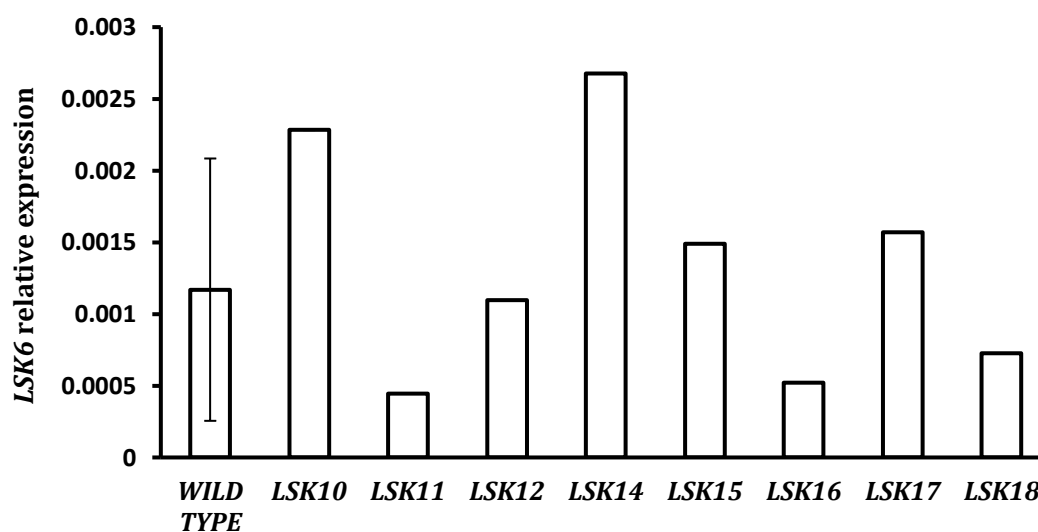
11 και 13 των *LSK1* knock-down. Τα δείγματα 10 και 11 δεν είχαν αναπτύξει καθόλου φυμάτια στις ρίζες τους και τα υπόλοιπα δείγματα εξαιρέθηκαν για τους λόγους που αναφέρονται στην προηγούμενη παράγραφο.



**Γράφημα 2:** Μέσος αριθμός φυματίων ανά ρίζα (A), το μέσο μήκος ρίζας (B) και ο μέσος αριθμός φυματίων ανά εκατοστό ρίζας (C) σε φυτά control (άσπρες στήλες, n=5) και σε φυτά με σίγηση του γονιδίου *LSK1* (γκρι στήλη, n=6). Με \* υποδηλώνονται οι στατιστικά σημαντικές συγκρίσεις από το αντίστοιχο control ( $P < 0,05$ ). Η στατιστική σύγκριση έγινε με εφαρμογή του Student's t-test.

Πέρα της παρουσίας κάποιων συμπτηγμένων φυματίων στις *LSK1* knock-down σειρές (Εικόνα 1), η εμφάνιση των φυματίων δεν διέφερε μεταξύ των μεταχειρίσεων και παρουσίαζαν το χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα των λειτουργικών φυματίων. Επίσης ο βλαστός τους παρουσίαζε υγιή χαρακτηριστικά, με πράσινο χρώμα και κανονική ανάπτυξη.

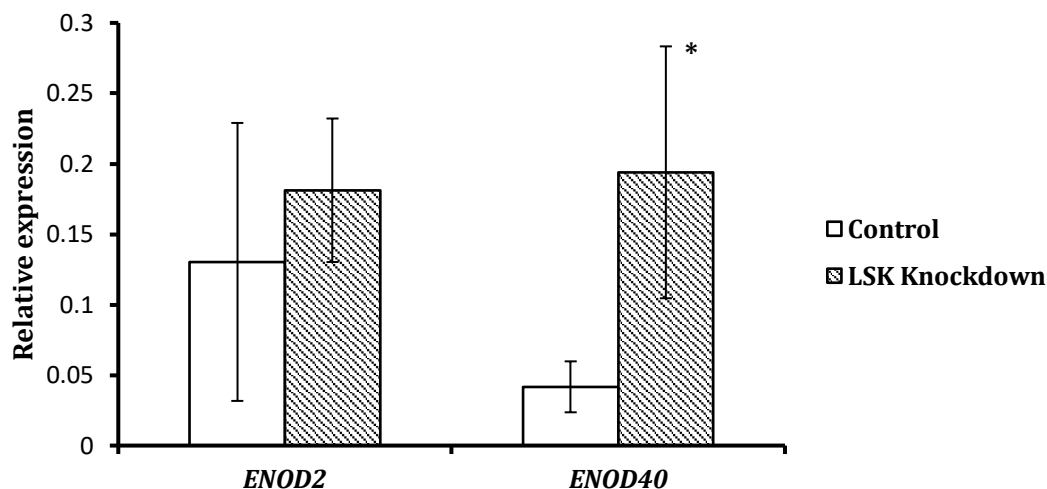
Εκτός από ποσοτικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου της *LSK1*, χρησιμοποιήθηκαν και ειδικοί εκκινητές για την μέτρηση της έκφρασης του γονιδίου *LSK6* στα ίδια δείγματα. Τ' αποτελέσματα (Γράφημα 3) έδειξαν ότι η κατασκευή σίγησης που αφορούσε το γονίδιο *LSK1* δεν επηρέασε σημαντικά την έκφραση του γονιδίου *LSK6*. Στα δείγματα *LSK1*-knockdown παρατηρείται το ίδιο εύρος έκφρασης όπως και στα control δείγματα. Από την ανάλυση εξαιρέθηκαν και πάλι τα 3 δείγματα control που δεν είχαν αναπτύξει φυμάτια και 2 δείγματα, το δείγμα 5 από τα φυτά control και η σειρά 13 των *LSK1* knock-down, τα οποία δεν έδωσαν κανένα σήμα ενίσχυσης στην αντίδραση RT-qPCR.



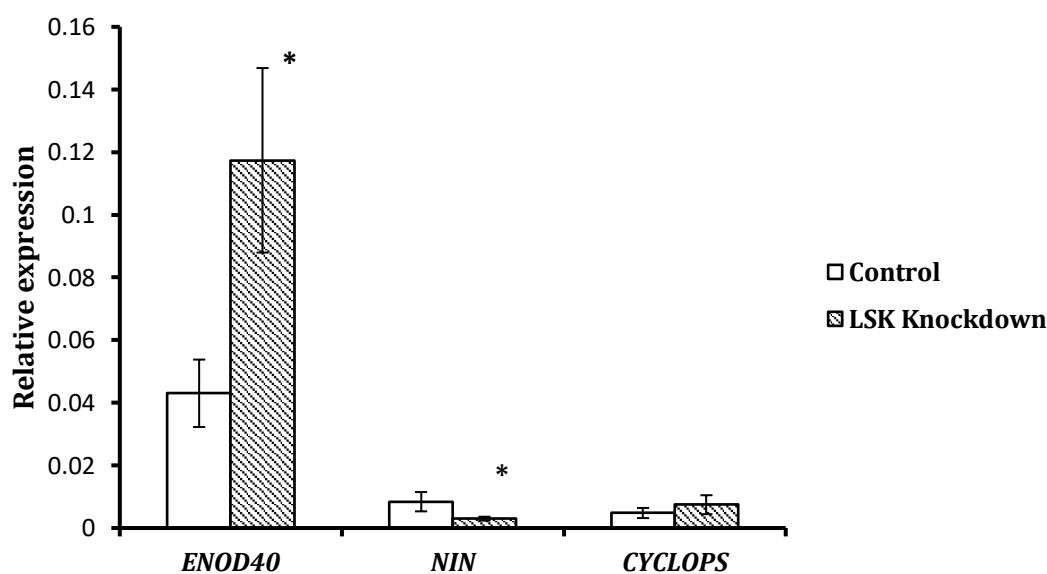
**Γράφημα 3:** Επίδραση της κασπέτας σίγησης του γονιδίου *LSK1* στην έκφραση του γονιδίου *LSK6*, όπως μετρήθηκε με εκκινητές ειδικούς για το γονίδιο *LSK6* με τη μέθοδο της RT-qPCR. Για τα control φυτά (wild type), n=5, παρουσιάζεται ο μέσος όρος  $\pm$ 95% CIs.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, μέσω του ελέγχου της έκφρασης γονιδίων-δεικτών της φυματογένεσης, μπορούν να εξαχθούν κάποια συμπεράσματα σχετικά με το ποια διαδικασία της φυματογένεσης επηρεάζεται από τη σίγηση της *LSK1*. Τα γονίδια που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία ήταν τα *ENOD40*, *ENOD2*, *NIN* και *CYCLOPS*. Η μέτρηση έγινε με τη μέθοδο της RT-qPCR με ειδικούς εκκινητές και χρησιμοποιώντας την ουβικουϊτίνη ως γονίδιο αναφοράς. Ως μήτρα χρησιμοποιήθηκε νεοσυντεθιμένο cDNA από τα "Hairy Roots" 2 control δειγμάτων και των τεσσάρων σειρών *LSK1* knock-down που παρουσίασαν τα μεγαλύτερα ποσοστά σίγησης. Το γονίδιο *ENOD40* έδειξε σημαντικά αυξημένη έκφραση στις *LSK1*-knockdown σειρές σε σχέση με τα control, σε δύο ξεχωριστές επαναλήψεις (Γράφημα 4 και 5). Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα των *ENOD2* και *CYCLOPS*. Μικρή,

αλλά στατιστικά σημαντική μείωση παρατηρείται στην έκφραση του γονιδίου *NIN* στα LSK1-knockdown φυτά (Γράφημα 5).



**Γράφημα 4:** Τα επίπεδα της σχετικής έκφρασης των γονιδίων *ENOD2* και *ENOD40* στα control (n=2) και στα LSK1 knock-down φυτά. (n=4), όπως μετρήθηκαν με τη μέθοδο της RT-qPCR. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος έκφρασης ±95% CIs. Με \* υποδηλώνονται οι στατιστικά σημαντικές συγκρίσεις από το αντίστοιχο control (P<0,05)



**Γράφημα 5:** Τα επίπεδα της σχετικής έκφρασης των γονιδίων *ENOD40*, *NIN* και *CYCLOPS* στα control (n=2) και στα LSK1 knock-down φυτά (n=4), όπως μετρήθηκαν με τη μέθοδο της RT-qPCR. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος έκφρασης ±95% CIs. Με \* υποδηλώνονται οι στατιστικά σημαντικές συγκρίσεις από το αντίστοιχο control (P<0,05).

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση της σίγησης του γονιδίου *LSK1* στη φυματιογένεση μέχρι το σχηματισμό ώριμων φυματίων 21 ημέρες μετά τον εμβολιασμό. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε μέσω επαγωγής “Hairy Roots” σε φυτά *L. japonicus*, τα οποία μετασχηματίστηκαν με το βακτήριο *A. rhizogenes* στέλεχος LBA1334 που έφερε κασσέτα έκφρασης hrRNA έναντι του *LSK1* και το γονίδιο GFP για επιβεβαίωση της εισαγωγής του T-DNA.

Τα αποτελέσματα έδειξαν για τα 18 φυτά που επιβίωσαν μέχρι το τέλος του πειράματος, ότι όλα είχαν μετασχηματιστεί με τον φορέα ένθεσης, όπως επιβεβαίωσε τόσο η παρατήρησή τους για φθορισμό GFP κάτω από μικροσκόπιο, όσο και η ανίχνευση του ενθέματος μέσω PCR.

Η σίγηση του *LSK1* μετρήθηκε με τη μέθοδο της RT-qPCR. Σε δύο από τις knock-down σειρές (10 και 11) αν και είχε γίνει ένθεση της κατασκευής δεν παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων της *LSK1*, πιθανώς λόγω της ενσωμάτωσης της σε μη ενεργή μεταγραφικά περιοχή. Στις υπόλοιπες knock-down σειρές επετεύχθηκαν διαφορετικά ποσοστά σίγησης που κυμάνθηκαν από 39 – 91%, δείχνοντας ότι η κατασκευή ήταν αρκετά αποτελεσματική. Επιπλέον η ειδικότητα της σίγησης του *LSK1* εξετάστηκε με την μέτρηση της έκφρασης του γονιδίου *LSK6*, που ανήκει επίσης στην οικογένεια των SK του *L. japonicus* και παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα στην αλληλουχία του (81,5%) με το *LSK1* (Garagounis, unpublished).

Η μείωση των επιπέδων έκφρασης της *LSK1* στις knock-down σειρές έδειξε να επηρεάζει τον αριθμό των φυματίων που σχηματίστηκαν τελικά, καθώς και το μέγεθος της ρίζας. Πιο συγκεκριμένα οι knock-down σειρές εμφάνισαν τετραπλάσιο αριθμό φυματίων σε σχέση με τα control φυτά και αυξημένο μέγεθος ρίζας. Το φυσιολογικό ροζ χρώμα τους και η ικανή αύξηση των φυτών χωρίς την προσθήκη αζώτου δείχνουν ότι πρόκειται για φυσιολογικά φυμάτια ικανά για αζωτοδέσμευση. Ο αυξημένος αριθμός φυματίων στις knock-down σειρές επιβεβαιώνει την εμπλοκή της *LSK1* στη διαδικασία της φυματιογένεσης, υποδηλώνοντας ότι μπορεί να έχει ρόλο στη ρύθμιση του αριθμού των φυματίων που θα σχηματιστούν.

Επιπλέον εξετάστηκε η έκφραση των γονιδίων δεικτών της φυματιογενεσης *ENOD2*, *ENOD40*, *NIN* και *CYCLOPS*. Η έκφραση των γονιδίων *NIN* και *CYCLOPS* δεν έδειξε να επηρεάζεται από τη μείωση των επιπέδων της *LSK1*, αποκλείοντας την

εμπλοκή της στα αρχικά στάδια σηματοδότησης της φυματιογένεσης που επάγονται μέσω της ενεργοποίησης αυτών των μεταγραφικών παραγόντων (Schauser *et al.*, 1999, Yano *et al.*, 2008). Η έκφραση του γονιδίου *ENOD2* επίσης δεν έδειξε να μεταβάλλεται δείχνοντας ότι η σίγηση δεν επηρεάζει τη μετάβαση των φυματίων στα ώριμα αζωτοδεσμευτικά στάδια (Delis *et al.*, 2011). Αντίθετα, η έκφραση του *ENOD40* εμφανίστηκε σημαντικά αυξημένη στις σειρές με τη σίγηση. Το γονίδιο *ENOD40* επάγεται κατά τις πρώτες κυτταροδιαίρέσεις του σχηματισμού της καταβολής του φυματίου μέσω της κυτοκίνης και συνεχίζει να εκφράζεται καθόλη τη διάρκεια της οργανογένεσης (Delis *et al.*, 2011).

Το *ENOD40* κωδικοποιεί για πεπτιδία που σχετίζονται με τη συνθάση της σουκρόζης (SUS) στη σόγια (*G. max*), αλληλεπίδραση που συμβαίνει και σε φυτά μη Ψυχανθή. Φαίνεται ότι έτσι ρυθμίζει τη σουκρόζη που μεταφέρεται και χρησιμοποιείται από τα φυμάτια (Rohrig *et al.* 2002). Ένα πιθανό μοντέλο για τη δράση του είναι η πρόσδεσή και η σταθεροποίηση της ενεργοποιημένης SUS. Με την αποδέσμευσή του η SUS αποφωσφορυλιώνεται και αποικοδομείται μέσω του πρωτεασώματος (Hardin *et al.*, 2003). Πιθανώς η LSK1 να περιορίζει την παραγωγή της ENOD40, έμμεσα ή άμεσα, ρυθμίζοντας τη δράση κάποιου μεταγραφικού παράγοντα, περιορίζοντας τα επίπεδα της SUS που είναι σταθερά και ενεργά στα φυμάτια. Κατά συνέπεια, ενδεχομένως, η LSK1 να περιορίζει το διαθέσιμο άνθρακα για το σχηματισμό των φυματίων και τη μετέπειτα λειτουργία τους.

Τα παραπάνω δεδομένα υποδηλώνουν ένα ρόλο της LSK1 στο μηχανισμό αυτορρύθμισης του αριθμού των φυματίων (AON). Ο μηχανισμός αυτός ελέγχει μέσω αρνητικής ανατροφοδότησης τον τελικό αριθμό των φυματίων που θα σχηματιστούν, διατηρώντας την ισορροπία ανάμεσα στις ενεργειακές ανάγκες του φυτού σε άζωτο και την «σπατάλη» υδατανθράκων σε κοστοβόρα επιπλέον φυμάτια (Ryu *et al.*, 2012). Το μοντέλο που προτείνεται για τη δράση του AON, είναι η «παρακολούθηση» του αριθμού των φυματίων μέσω ενός σήματος που μεταφέρεται από τη ρίζα στον βλαστό, όπου αποκωδικοποιείται από υποδοχείς όπως το HAR1 στο *L. japonicus* (Krusell *et al.*, 2002) και το SUNN στο *M. trunculata* (Nishimura *et al.*, 2002). Αυτοί οι υποδοχείς παρουσιάζουν 75% ομοιότητα με την κινάση υποδοχέα με περιοχές πλούσιες σε επαναλήψεις κατάλοιπων λευκίνης (Leucine Rich Repeats, LRRs) CLV1 (CLAVATA) του *A. thaliana* (Searle *et al.*, 2003), και εκφράζονται αποκλειστικά στο φλοιώμα του βλαστού και στα φυμάτια (Nontachaiyaroorn *et al.*, 2007). Συλλογικά αυτοί οι υποδοχείς ονομάζονται NARK. Ως απόκριση, ο βλαστός παράγει ένα δεύτερο σήμα που μεταφέρεται στη ρίζα όπου ρυθμίζει τις μετέπειτα διαδικασίες φυματιογένεσης,

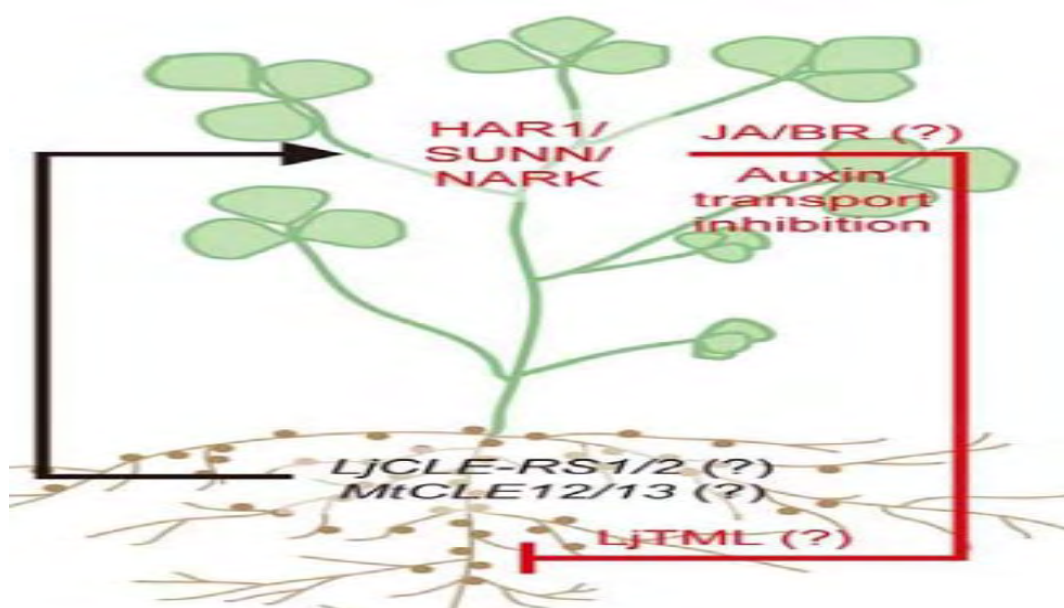


εμποδίζοντας τη δημιουργία υπέρογκου αριθμού φυματίων. Ο υποδοχέας CLAVATA 1 στο *A. thaliana* ελέγχει την ισορροπία μεταξύ διαφοροποιημένων και αδιαφοροποιητων κυττάρων στο Ακραίο Μερίστωμα του Βλαστού (Schoof *et al.*, 2000), μέσω της πρόσδεσης του πεπτιδίου CLV3. Ένα αντίστοιχο πεπτίδιο το LjCLE-RS1/2 (Mortier *et al.*, 2010) έχει απομονωθεί ως ανάλογο του CLV3 στο μηχανισμό AON. Τα μόρια-σινιάλα και ο τρόπος μεταγωγής του σήματος της αναστολής της φυματιογένεσης μέσω του AON στη ρίζα δεν είναι ακόμα γνωστά (Ryu *et al.*, 2012). Ο υποδοχέας CLAVATA1 ανήκει στην ίδια οικογένεια υποδοχέων (LRR-RLKs) με τον BRI1 που ενεργοποιούνται από τα μπρασσινοστεροειδή και αναστέλλουν τη δράση της BIN2/AtSK21. Επιπλέον οι ορμόνες αυξίνη, γασμονικό οξύ (JA) και μπρασσινοστεροειδή (BR) φαίνεται να παίζουν ρόλο ως μεταγωγί σήματος στο μονοπάτι του AON (Nakagawa & Kawaguchi, 2006; Oka-Kira & Kawaguchi, 2006; Terakado *et al.*, 2006). Εξωγενής παροχή μπρασσινοστεροειδών σε μεταλλαγμένα φυτά που σχηματίζουν υπερβολικά πολλά φυμάτια (hypernodulating) στις ρίζες τους έδειξε να μειώνει τον αριθμό τους, αλλά η ίδια επίδραση δεν παρατηρήθηκε σε φυτά αγρίου τύπου (Terakado *et al.*, 2006). Επίσης αντιφατικά είναι τ' αποτελέσματα από άλλα πειράματα που δείχνουν διαφορετική επίδραση των μπρασσινοστεροειδών μεταξύ της αρνητικής επίδρασης τους στον αριθμό των φυματίων όταν παρέχονται εξωγενώς και της αδυναμίας να σχηματίσουν λειτουργικά φυμάτια φυτα με μεταλλάξη στο βιοσυνθετικό μονοπάτι των μπρασσινοστεροειδών ή μεταλλαγμένα φυτά με μειωμένη ευαισθησία στα BRs (Ferguson *et al.*, 2005). Ενδέχεται αυτές οι αντιφάσεις να προέρχονται από τις διαφορετικές επιδράσεις των ορμονών σε τοπικό και σε συστημικό (ολόκληρο το φυτό) επίπεδο (Ryu *et al.*, 2012). Παρόλα αυτά, δεδομένου του κύριου ρόλου της BIN2/AtSK21 και της AtSK32/θ του *Arabidopsis* στη μεταγωγή σήματος των μπρασσινοστεροειδών, η LSK1 μπορεί να παίζει έναν ανάλογο ρόλο στη μεταγωγή σήματος στα κύτταρα του φυματίου, μετά την πρόσδεση του μηνύματος από τον βλαστό. Αν και δεν είναι γνωστό σε ποιο ακριβώς στάδιο της φυματιογένεσης ξεκινά να δρα ο μηχανισμός, πειράματα έχουν δείξει ότι ξεκινάει πριν τις πρώτες κυτταρικές διαιρέσεις. Το παραπάνω μοντέλο συμφωνεί και με την ταχεία αύξηση των επιπέδων της LSK1 που ανιχνεύεται μια ώρα μετά τον εμβολιασμό των φυτών με το ριζόβιο (Psarrakou, MSc Thesis, 2014).

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή οι SKs του *L. japonicus* αποτελούν επίσης πολυμελή οικογένεια, με άλλα 4 μέλη να έχουν προβλεφθεί. Από τα υπόλοιπα 3 μέλη η LSK3 παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ομοιότητα με την BIN2 (Garagounis, unpublished) και δεδομένα μικροσυστοιχιών cDNA ανίχνευσαν την αύξηση της έκφρασης στα φυμάτια (Coleblatch *et al.*, 2004). Η ίδια μελέτη έδειξε ότι το 8% των γονιδίων των οποίων η έκφραση αυξάνεται στα ώριμα φυμάτια κωδικοποιούν για γονίδια που εμπλέκονται

στη μεταγραφή και για μεταγραφικούς παράγοντες, με το 5% αυτών κωδικοποιεί για πιθανά μόρια που εμπλέκονται σε σηματοδοτικές πορείες με βάση την ομοιότητα των cDNAs με χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες άλλων οργανισμών. Αντίστοιχα δεδομένα άλλων μελετών που εξετάζουν τη συνολική αλλαγή του μεταγραφώματος σε διαδοχικά στάδια της φυματογένεσης (Høglund *et al*, 2009, Breakspear *et al*, 2014). Με βάση τις ποικίλες λειτουργίες που έχουν οι SKs σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς στους οποίους έχουν μελετηθεί μέχρι τώρα, είναι αναμενόμενο, εκτός της LSK1 που εξετάστηκε, να παίζουν και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας διαφορετικούς ρόλους τόσο στη φυματογένεση όσο και σε άλλες βασικές κυτταρικές διεργασίες σε όλους τους ιστούς του φυτού. Η συντηρημένες λειτουργίες των SKs καθιστούν τη μελέτη τους και στο *L. japonicus* επιτακτικής σημασίας όπου ενδεχομένως να αποκαλυφθεί ο ρόλος τους ως ενδιάμεσα ρυθμιστικά μόρια σηματοδοτικών μονοπατιών για τα οποία λίγα είναι γνωστά όπως η επίδραση και η «συγχώνευση» της μεταγωγής σήματος μέσω ορμονών.

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε με σκοπό να εξετάσει τον πιθανό ρόλο της κινάσης σερίνης/θρεονίνης SHAGGY-like στη διαδικασία της δημιουργίας των πολύ εξειδικευμένων συμβιωτικών δομών, των φυματίων. Η αρχική υπόθεση επιβεβαιώθηκε, υποδεικνύοντας τη συμμετοχή της LSK1 στον έλεγχο του τελικού αριθμού των φυματίων που θα σχηματιστούν, ενισχυόμενη από προηγούμενα δεδομένα για την ταχεία αύξηση των επιπέδων της μια ώρα μετά τον εμβολιασμό (Psarrakou, MSc Thesis, 2014).



## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ali, A., Hoeflich, K.P., Woodgett, J.R.(2001).Glycogensynthase kinase-3:properties, functions, and regulation. *Chem.Rev.* 101, 2527–2540.
2. Ane J.M., Kiss G.B., Riely B.K., Penmetsa R.V., Oldroyd G.E., (2004) *Medicago truncatula* DMI1 required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science* 303(5662): 1364–1367.
3. Bevan, M. (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* 12:8711–8721.
4. Boisson-Dernier A, Chabaud M, Garcia F, Becard G, Rosenberg C,Barker DG (2001) *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Mol Plant Microbe Interact* 14:695–700
5. Breakspear A, Liu C., Roy S., Stacey N., Rogers C., Trick M., Morieri G., Mysore K.S., Wen J., Oldroyd G.E., Downie J.A., Murray J.D. (2014) The Root Hair “Infectome” of *Medicago truncatula* Uncovers Changes in Cell Cycle Genes and Reveals a Requirement for Auxin Signaling in Rhizobial Infection. *Plant Cell.* (12):4680-701
6. Caetano-Anolles G., Gresshoff P. (1991) Plant genetic control of nodulation. *Annual Review of Microbiology* 45: 345–382
7. Charrier, B., Champion, A., Henry, Y., Kreis, M. (2002) Expression profiling of the whole *Arabidopsis* shaggy-like kinase multigene family by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Plant Physiol.* 130:577–590
8. Chilton M.D., Tepfer D., Petit A., David C., Casse Delbart F.T. (1982) *Agrobacterium rhizogenes* insert T-DNA into the genome of the host plant root cells. *Nature.* 1982; 295:432-4
9. Christey, M.C. (2001) Use of Ri-mediated transformation for production of transgenic plants. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 37:687–700
10. Clouse, S.D. (2011). Brassinosteroids. *Arabidopsis* Book 9:e0151.
11. Colebatch G., Desbrosses G., Ott T., Krusell L., Montanari O., Kloska S., Kopka J., Udvardi M.K. (2004) Global changes in transcription orchestrate metabolic differentiation during symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus*. *The Plant Journal*, 39, 487–512
12. Dajani, R., Fraser E., Roe S.M., Young N., Good V., Dale T.C., Pearl, L.H. (2001) Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 beta: structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition. *Cell* 105, 721–732
13. Dal Santo, S., Stampfl, H., Krasensky, J., Kempa, S., Gibon, Y.,Petutschnig, E., Rozhon, W., Heuck, A., Clausen, T., and Jonak, C. (2012) Stress-induced GSK3 regulates the redox stress response by phosphorylating glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24:3380–3392.
14. Delis C., Krokida A., Georgiou S., Pena-Rodriguez L.M., Kavroulakis N., Ioannou E., Roussis V., Osbourn A.E., Papadopoulou K.K. (2011) Role of lupeol synthase in *Lotus japonicus* nodule formation. *New Phytologist* 189: 335–346.
15. Desbrosses G. & Stougaard J. (2011) Root Nodulation: A Paradigm for How Plant-Microbe Symbiosis Influences Host Developmental Pathways. *Cell Host & Microbe* 10, 348-358
16. Ding, Y., & Oldroyd, G.E. (2009). Positioning the nodule, the hormone dictum. *Plant Signal. Behav.* 4, 89–93.
17. Dixon, R. & Summer L.W. (2003). Legume natural products: understanding and manipulating complex pathways for human and. *Plant Physiol.* , 131, 878–88
18. Doble, B.W., & Woodgett, J.R. (2003). GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J. Cell Sci.* 116:1175–1186.
19. Ferguson B.J., Indrasumunar A., Hayashi S., (2010) Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology* 52: 61–76
20. Forde, J.E., and Dale, T.C. (2007). Glycogen synthase kinase 3: a key regulator of cellular fate. *Cell Mol. Life Sci.* 64:1930–1944
21. Frame, S. & Cohen P. (2001) GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem. J.* 359:1–16.

22. Frugier F., Kosuta S., Murray J.D., Crespi M., Szczyglowski K. (2008) Cytokinin: secret agent of symbiosis. *Trends Plant Sci.* 13:115–20
23. Gelvin S.B. (2003) *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*, Vol. 67, No. 1, p. 16–37
24. Graham C.P., Vance P.H. (2003) Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*, 131, 872–877.
25. Guinel, F.C. & Geil, R.D. (2002). A model for the development of the rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses in legumes and its use to understand the roles of ethylene in the establishment of these two symbioses. *Can. J. Microbiol.* 80, 695–720.
26. Handberg K. & Stougaard J. (1992). *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *The Plant Journal*, 2(4), 487–496
27. Haney C.H., Long S.R. (2010). Plant flotillins are required for infection by nitrogen-fixing bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107:478–83
28. Hardin S.C., Tang G-Q., Scholz A., Holtgraewe D., Winter H., Huber S.C. (2003) Phosphorylation of sucrose synthase at serine 170: occurrence and possible role as signal for proteolysis. *The Plant Journal* 35,588–603
29. Harris JM, Wais R, and Long SR. (2003) Rhizobium-induced calcium spiking in *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16, 335–341.
30. Hayashi M., Tansengco M.L., Suganuma N., Szczyglowski K., Krusell L., Ott T., Udvardi M. (2005). METHODS FOR STUDYING NODULE DEVELOPMENT AND FUNCTION. *Lotus japonicus Handbook*, A.J. Márquez (ed.), 53–82.
31. He, J.X., Gendron, J.M., Yang, Y., Li, J., Wang, Z.Y. (2002) The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:10185–10190.
32. Heckmann A.B., Lombardo F., Miwa H., Perry J.A., Bunnell S., (2006) *Lotus japonicus* nodulation requires two GRAS domain regulators, one of which is functionally conserved in a non-legume. *Plant Physiol.* 142:1739–50
33. Herr A.J., & Baulcombe D.C., (2003) RNA Silencing Pathways in Plants. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2004 69: 363–370
34. Høglund N., Radutoiu S., Krusell L., Voroshilova V., Hannah M.A. (2009) Dissection of Symbiosis and Organ Development by Integrated Transcriptome Analysis of *Lotus japonicus* Mutant and Wild-Type Plants. *PLoS ONE* 4(8): e6556.
35. Hughes K., Nikolakkaki E., Plyte S.E., Totty N.F., Woodgett J.R. (1993) Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation. *EMBO J.* 12, 803–808
36. Hur, E.M., & Zhou, F.Q. (2010) GSK3 signalling in neural development. *Nat. Rev. Neurosci.* 11:539–551
37. Imaizumi-Anraku H, Takeda N, Charpentier M, Perry J, Miwa H, (2004) Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots. *Nature* 433(7025): 527–531.
38. Jia, J., Amanai K., Wang G., Tang, J., Wang B., Jiang J. (2002) Shaggy/GSK antagonizes hedgehog signaling by regulating cubitus interruptus. *Nature* 416, 548–552
39. Jonak, C. (2000) Wound-induced expression and activation of WIG, a novel glycogen synthase kinase 3. *Plant Cell* 12, 1467–1476
40. Jonak, C. & Hirt, H. (2002) Glycogen synthase kinase 3/SHAGGY like kinases in plants: an emerging family with novel functions. *Trends Plant Sci.* 7, 457–461
41. Jope R.S., & Johnson G.V. (2004) The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem. Sci.* 29, 95–102
42. Kaidanovich-Beilin, O., & Woodgett, J.R. (2011). GSK-3: functional insights from cell biology and animal models. *Front Mol. Neurosci.* 4:40.
43. Kameshita I, Nishida T, Nakamura S, Sugiyama Y, Sueyoshi N, Umehara Y, Nomura M, Tajima S. (2005) Expression Cloning of a Variety of Novel Protein Kinases in *Lotus japonicus*. *J. Biochem.* 137, 33–39
44. Kanamori N., Madsen L.H., Radutoiu S., Frantescu M., Quistgaard E.M., (2006) A nucleoporin is required for induction of Ca<sup>2+</sup> spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(2): 359–364.

45. Khan, M., Rozhon, W., Bigeard, J., Pflieger, D., Husar, S., Pitzschke, A., Teige, M., Jonak, C., Hirt, H., and Poppenberger, B. (2013). Brassinosteroid-regulated GSK3/Shaggy-like kinases phosphorylate mitogen-activated protein (MAP) kinase kinases, which control stomata development in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 288:7519–7527.
46. Kim, L., & Kimmel, A.R. (2006). GSK3 at the edge: regulation of developmental specification and cell polarization. *Curr. Drug Targets* 7:1411–1419.
47. Kim, T.W., & Wang, Z.Y. (2010). Brassinosteroid signal transduction from receptor kinases to transcription factors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61:681–704.
48. Kim, T.W., Guan, S., Sun, Y., Deng, Z., Tang, W., Shang, J.X., Sun, Y., Burlingame, A.L., and Wang, Z.Y. (2009) Brassinosteroid signal transduction from cell-surface receptor kinases to nuclear transcription factors. *Nat. Cell Biol.* 11:1254–1260.
49. Kim, T.W., Michniewicz, M., Bergmann, D.C., and Wang, Z.Y. (2012). Brassinosteroid regulates stomatal development by GSK3-mediated inhibition of a MAPK pathway. *Nature* 482:419–422
50. Kouchi H, Shimomura K, Hata S, Hirota A, Wu GJ, Kumagai H, Tajima S, Sukanuma N, Suzuki A, Aoki T, Hayashi M, Yokoyama T, Ohyama T, Asamizu E, Kuwata C, Shibata D, Tabata S. (2004) Large-scale analysis of gene expression profiles during early stages of root nodule formation in a model legume, *Lotus japonicus*. *DNA Research* 4, 263-274.
51. Krusell L, Krause K, Ott T, Desbrosses G, Kramer U. (2005) The sulfate transporter SST1 is crucial for symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus* root nodules. *Plant Cell* 17:1625–36
52. Kumagai H, & Kouchi H, (2003) Gene Silencing by Expression of Hairpin RNA in *Lotus japonicus* Roots and Root Nodules. *MPMI* Vol. 16, No. 8, 2003, pp. 663–668
53. Kumagai H, Kinoshita E, Ridge R.W., Kouchi H. (2006) RNAi Knock-Down of ENOD40s Leads to Significant Suppression of Nodule Formation in *Lotus japonicus*. *Plant Cell Physiol.* 47(8): 1102–1111
54. Lee, K.H., and Larue, T.A. (1992). Ethylene as a possible mediator of light- and nitrate-induced inhibition of nodulation of *Pisum sativum* L. cv Sparkle. *Plant Physiol.* 100, 1334–1338.
55. Levy J, Bres C, Geurts R, Chalhoub B, Kulikova O, Duc G, Journet EP, Ane JM, Lauber E, Bisseling T (2004).: A putative Ca<sup>2+</sup> and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science*, 303:1361-1364
56. Li, J., and Nam, K.H. (2002) Regulation of brassinosteroid signaling by a SK3/SHAGGY-like kinase. *Science* 295:1299–1301
57. Li, J., Nam, K.H., Vafeados, D., and Chory, J. (2001). BIN2, a new brassinosteroid-insensitive locus in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 127:14–22
58. Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods.* Dec;25(4):402-8
59. Lochhead P.A., Kinstrie R., Sibbet G., Rawjee T., Morrice N., Cleghon V. (2006) A chaperone-dependent GSK3beta transitional intermediate mediates activation- loop autophosphorylation. *Mol. Cell* 24, 627–633
60. Madsen, L.H., Tirichine, L., Jurkiewicz, A., Sullivan, J.T., Heckmann, A.B., Bek, A.S., Ronson, C.W., James, E.K., and Stougaard, J. (2010) The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*. *Nat Commun* 1, 10.
61. Maekawa T., Kusakabe M., Shimoda Y., Sato S., Tabata S., Murooka Y., Hayashi M. (2008) Polyubiquitin promoter-based binary vectors for overexpression and gene silencing in *Lotus japonicus*. *Mol Plant Microbe Interact.* Apr;21(4):375-82
62. Magori, S., Oka-Kira, E., Shibata, S., Umehara, Y., Kouchi, H., Hase, Y., Tanaka, A., Sato, S., Tabata, S., Kawaguchi, M. (2009) Too much love, a root regulator associated with the long-distance control of nodulation in *Lotus japonicus*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22, 259–268
63. Martínez-Romero, E. & Caballero-Mellado, J. (1996). Rhizobium phylogenies and bacterial genetic diversity. *Crit Rev Plant Sci.* 15(2):113-14
64. Martirani, L., Stiller, J., Mirabella, R., Alfano, F., Lamberti, A., Radutoiu, S. E., Iaccarino, M., Gresshoff, P. M., and Chiurazzi, M. (1999) T-DNA tagging of nodulation- and root-related genes in *Lotus japonicus*: Expression patterns and potential for promoter trapping and insertional mutagenesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12:275- 284.



65. Mortier V, Den Herder G, Whitford R. (2010) CLE peptides control *Medicago truncatula* nodulation locally and systemically. *Plant Physiology* 153: 222–237
66. Mukai, F. (2002) Alternative splicing isoform of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3b. *J. Neurochem.* 81, 1073–1083
67. Mylona P., Pawlowski K, Bisseling T. (1995) Symbiotic Nitrogen Fixation. *The Plant Cell*, Vol. 7, 869-885
68. Nakagawa T., & Kawaguchi M. (2006) Shoot-applied MeJA suppresses root nodulation in *Lotus japonicus*. *Plant and Cell Physiology* 47: 176–180
69. Nakamura, A., Goda, H., Shimada, Y., and Yoshida, S. (2004) Brassinosteroid selectively regulates PIN gene expression in *Arabidopsis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 952-954.
70. Newcomb, W. (1981) Nodule morphogenesis and differentiation. In *Biology of the Rhizobiaceae*, K.L. Giles and A.G. Atherly, eds (New York: Academic Press), pp. 247-297.
71. Nishimura R., Hayashi M., Wu G.J., Kouchi H., Imaizumi-Anraku H., Murakami Y., Kawasaki S., Akao S., Ohmori M., Nagasawa M., Harada K., Kawaguchi M. (2002) HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development. *Nature* 420, 426–429.
72. Niwa S., Kawaguchi M., Imaizumi-Anraku H., Chechetka S.A., Ishizaka M., Ikuta A., Kouchi H. (2001) Responses of a model legume *Lotus japonicus* to lipochitin oligosaccharide nodulation factors purified from *Mesorhizobium loti* JRL501. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14, 848-856
73. Nontachaiyapoom S., Scott P.T., Men A.E., Kinkema M., Schenk P.M., Gresshoff P.M. (2007) Promoters of orthologous *Glycine max* and *Lotus japonicus* nodulation autoregulation genes interchangeably drive phloem-specific expression in transgenic plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20, 769–780
74. Oka-Kira, E., & Kawaguchi, M. (2006). Long-distance signaling to control root nodule number. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 496-502.
75. Oldroyd G.E.D., Downie J.A. 2004. Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:566–76
76. Oldroyd G.E.D., Murray J. D., Poole P. S., Downie J. A. (2011) The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis. *Annu. Rev. Genet.* 2011. 45:119–44
77. Pap M. & Cooper, G. M. (1998) Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J. Biol. Chem.* 273, 19929–19932
78. Patriarca E. J., Tate R., Ferraioli S., Iaccarino M. (2004) Organogenesis of Legume Root Nodules. *International Review of Cytology*, Vol. 234, 201-261.
79. Phillip A. Sharp P.A. (2001) RNA interference—2001. *Genes Dev.* 2001 15: 485-490
80. Popp C. & Ott T. (2011) Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, 14:458–467
81. Psarrakou I., 2014 Λειτουργική ανάλυση και υπερέκφραση της κινάσης GSK3β του *Lotus japonicus*, MSc Thesis, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
82. Rao, S.R.; Ravishankar, G., (2002) Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol Adv* 20:101–153
83. Reid D.E., Ferguson B.J., Hayashi S., Lin Y.-H., Gresshoff P.M. (2011) Molecular mechanisms controlling legume autoregulation of nodulation. *Annals of Botany* 108: 789–95.
84. Rodutoiu, S, Madsen, LH, Madsen, EB, Felle, HH, Umehara, Y, Gronlund, M, Sato, S, Nakamura, Y, Tabata, S, Sandal, N, and Stougaard, J. (2003) Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* 425, 585-592.
85. Rohrig, H., Schmidt, J., Miklashevichs, E., Schell, J., and John, M. (2002). Soybean *ENOD40* encodes two peptides that bind to sucrose synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 1915–1920.
86. Rozhon, W., Mayerhofer, J., Petutschnig, E., Fujioka, S., and Jonak, C. (2010). ASKtheta, a group-III *Arabidopsis* GSK3, functions in the brassinosteroid signalling pathway. *Plant J.* 62:215–223
87. Ruel, L., Bourouis, M., Heitzler, P., Pantesco, V., Simpson, P. (1993). *Drosophila* shaggy kinase and rat glycogen synthase kinase-3 have conserved activities and act downstream of Notch. *Nature* 362:557–560
88. Ryu H., Cho H., Choi D., Hwang I., (2012) Plant Hormonal Regulation of Nitrogen-Fixing Nodule Organogenesis. *Molecules and Cells*
89. Ryu, H., Cho, H., Kim, K., and Hwang, I. (2010) Phosphorylation dependent nucleocytoplasmic shuttling of BES1 is a key regulatory event in brassinosteroid signaling. *Mol. Cells* 29:283–290

90. Ryu, H., Kim, K., Cho, H., Park, J., Choe, S., and Hwang, I. (2007) Nucleocytoplasmic shuttling of BZR1 mediated by phosphorylation is essential in *Arabidopsis* brassinosteroid signaling. *Plant Cell* 19:2749–2762.
91. Saito K, Yoshikawa M, Yano K, Miwa H, Uchida H, (2007) NUCLEOPORIN85 is required for calcium spiking, fungal and bacterial symbioses, and seed production in *Lotus japonicus*. *Plant Cell* 19(2): 610–624
92. Sambrook, J. and Russel, D.W. (2001) edn. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
93. Schauser L, Roussis A, Stiller J, Stougaard J. (1999) A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature* 402:191–95
94. Schoof H, Lenhard M, Haecker A, MayerKFX, Ju¨rgens G.,Laux T. (2000) The stem cell population of *Arabidopsis* shootmeristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell* 100: 635–644.
95. Searle I.R., Men A.E., Laniya T.S., Buzas D.M., Iturbe-Ormaetxe I., Carroll BJ, Gresshoff PM (2003) Long-distance signaling in nodulation directed by a CLAVATA1-like receptor kinase. *Science* 299, 109–112.
96. Sharma P., Padh H., Shrivastava N., (2013) Hairy Roots: An Ideal Platform for Transgenic Plant Production and Other Promising Applications. Volume 13, Issue 1, 62–75,
97. Sharp P. A. (2001) RNA interference—2001. *Genes Dev.* 2001 15: 485-490
98. Sinkar V.P., White F.F., Gordon M.P. (1987) Molecular biology of Ri-plasmid—A review. *J. Biosci.*, Vol. 11, Numbers 1–4, 47–57.
99. Small I. (2007) RNAi for revealing and engineering plant gene functions. *Current Opinion in Biotechnology*, 18:148–153
100. Stacey, G., McAlvin, C.B., Kim, S.Y., Olivares, J., and Soto, M.J. (2006). Effects of endogenous salicylic acid on nodulation in the model legumes *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 141, 1473-1481.
101. Stambolic V. & Woodgett J.R. (1994). Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta in intact cells via serine9 phosphorylation. *Biochem.J.* 303(Pt 3), 701–704.
102. Stiller J, Martirani L, Tuppale S, Chian RJ, Chiurazzi M, Gresshoff PM. (1997) High frequency transformation and regeneration of transgenic plants in the model legume *Lotus japonicus*. *Journal of Experimental Botany* 48, 1357-1365.
103. Stougaard J. (2000) Regulators and Regulation of Legume Root Nodule Development. *Plant Physiol.* Vol. 124, 531-540.
104. Sutherland C., Leighton I.A., Cohen P. (1993) Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth- factor signalling. *Biochem.J.* 296(Pt 1), 15–19
105. Sutherland, C. (2011) What are the bona fide GSK3 substrates? *Int. J. Alzheimers Dis.* 2011:505607
106. Szczygłowski K, Shaw S.R, Wopereis J, Hamburger D, Copeland S, Dazzo F.B, and de Bruijn FJ. (1998) Nodule organogenesis and symbiotic mutants of the model legume *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11, 684-697.
107. Tepfer, D. (1984) Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. *Cell* 37:959–967
108. Terakado J., Yoneyama T., Fujihara S. (2006) Shoot-applied polyamines suppress nodule formation in soybean (*Glycine max*). *J. Plant Physiol.* 163, 497-505
109. Thomas, G.M., Frame, S., Goedert, M., Nathke, I., Polakis, P., Cohen, P. (1999) A GSK3-binding peptide from FRAT1 selectively inhibits the GSK3-catalysed phosphorylation of axin and beta-catenin. *FEBS Lett.* 458, 247–251
110. Udvardi M. K., Tabata S., Parniske M., Stougaard J. (2005) *Lotus japonicus*: legume research in the fast lane. *TRENDS in Plant Science* Vol.10:222-228
111. van Kammen, A. (1984) Suggested nomenclature for plant genes involved in nodulation and symbiosis. *Plant Mol. Biol. Rep.* 2: 43–45.
112. Vert, G., & Chory, J. (2006) Downstream nuclear events in brassinosteroid signalling. *Nature* 441:96–100
113. Wang K., Herrera-Estrella L., Van Montagu M., Zambryski P. (1984) Right 25 bp terminus sequences of the nopaline T-DNA is essentially for and determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome. *Cell* 38:455462

114. Wang T., Iyer L.M., Pancholy R., Shi X., Hall T.C. (2005) Assessment of penetrance and expressivity of RNAi-mediated silencing of the *Arabidopsis* phytoene desaturase gene. *New Phytol*, 167:751-760.
115. Wang, Z.Y., Nakano, T., Gendron, J., He, J., Chen, M., Vafeados, D., Yang, Y., Fujioka, S., Yoshida, S., Asami, T. (2002). Nuclearlocalized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Dev. Cell*:505–513.
116. Waterhouse, P.M., & Helliwell, C.A. (2003) Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nat. Rev. Genet.* 4, 29–38.
117. Waters V.L., Hirata K.H., Pansegrau W., Lanka E, Guiney D.G. (1991) Sequence identity in the nick regions of IncP plasmid transfer origins and T-DNA borders of *Agrobacterium* Ti plasmids. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 1456–1460
118. Wesley, S. V., Helliwell, C. A., Smith, N. A., Wang, M. B., Rouse, D. T., Liu, Q., Gooding, P. S., Singh, S. P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P. A., Robinson, S. P., Gleave, A. P., Waterhouse, P. M. (2001) Constructs for efficient, effective and high throughput genesilencing in plants. *Plant J.* 27, 581–590
119. Woodgett J.R. (1994). Regulation and functions of the glycogen synthase kinase-3 subfamily. *Semin. Cancer Biol.* 5, 269–275.
120. Woodgett, J. R. (1990). Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J.* 9, 2431-2438.
121. Woodgett, J.R., & Cohen, P. (1984). Multisite phosphorylation of glycogen synthase. Molecular basis for the substrate specificity of glycogen synthase kinase-3 and casein kinase-II (glycogen synthase kinase-5). *Biochim. Biophys. Acta* 788:339–347
122. Wrzaczek, M., Rozhon, W., Jonak, C. (2007). A proteasomeregulated glycogen synthase kinase-3 modulates disease response in plants. *J. Biol. Chem.* 282:5249–5255
123. Yano K, Shibata S., Chen W.L., Sato S., Kaneko T., Jurkiewicz A., Sandal N., Banba M., Imaizumi-Anraku H., Kojima T. (2009): CERBERUS, a novel U-box protein containing WD-40 repeats, is required for formation of the infection thread and nodule development in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Plant J*, 60:168-180.
124. Yano K, Yoshida S, Muller J, Singh S, Banba M, Vickers K, Markmann K, White C, Schuller B, Sato S. (2008) CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105:20540-20545.
125. Yin, Y., Vafeados, D., Tao, Y., Yoshida, S., Asami, T., Chory, J. (2005) A new class of transcription factors mediates brassinosteroidregulated gene expression in *Arabidopsis*. *Cell* 120:249–259.
126. Yokota K, Fukai E., Madsen L.H., Jurkiewicz A., Rueda P., Radutoiu S, Held M., Hossain MS, Szczyglowski K, Morieri G. (2009) Rearrangement of actin cytoskeleton mediates invasion of *Lotus japonicus* roots by *Mesorhizobium loti*. *Plant Cell*, 21:267-284.
127. Yoo, M.J., Albert, V.A., Soltis, P.S., Soltis, D.E. (2006) Phylogenetic diversification of glycogen synthase kinase 3/SHAGGY-like kinase genes in plants. *BMC Plant Biol.* 6:3.
128. Youn J.H. & Kim T.W. (2015) Functional Insights of Plant GSK3-like Kinases: Multi-Taskers in Diverse Cellular, Signal Transduction Pathways. *Mol. Plant.* 8, 552–565.
129. Young J.M., Kuykendall L.D., Martínez-Romero E., Kerr A., Sawada H. (2001) A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51:89-103
130. Zhao, J., Peng, P., Schmitz, R.J., Decker, A.D., Tax, F.E., Li, J. (2002) Two putative BIN2 substrates are nuclear components of brassinosteroid signaling. *Plant Physiol.* 130:1221–1229



## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

### 1) Θρεπτικά υλικά βακτηριακής ανάπτυξης

Θρεπτικό υλικό	Συστατικά
LB pH 7,5	10g/l NaCl, 10g/L Tryptone, 5g Yeast extract, 1,5% agar
YMB	10g/L manitol, 0,5g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,2g MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 0,1g NaCl, 0,1g Yeast Extract, 1,5% agar

### 2) Αντιβιοτικά και συγκεντρώσεις

ANTIBIOTIKO	C <sub>STOCK</sub>	ΔΙΑΛΥΤΗΣ	C <sub>τελική</sub>
Kanamycin	50mg/ml	ddH <sub>2</sub> O	50μg/ml
Streptomycin	100mg/ml	ddH <sub>2</sub> O	100μg/ml
Rifambicin	16mg/ml	methanol	25μg/ml
Cefotaxime	200mg/ml	ddH <sub>2</sub> O	300μg/ml

### 3) Θρεπτικά υποστρώματα ανάπτυξης φυτών

Θρεπτικό υλικό	Συστατικά
Gamborg's B5 medium pH 5,5	3,06g/L B5 salt mix (Duchefa Biochemie), 20g/L sucrose, 1ml/L vitamins, 1% agar
Jensen medium pH 5,8	0.1 g/l CaHPO <sub>4</sub> , 20 mg/l K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 20 mg/l MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 20 mg/l NaCl, 10 mg/l Fe-citrate, 100 μg/l Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O, 200 μg/l MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O, 10 μg/l CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O, 25 μg/l ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 300 μg/l H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , 1% agar

#### 4) Θρεπτικό διάλυμα ποτίσματος Hoagland χωρίς άζωτο (-N)

ΔΙΑΛΥΜΑ	Σ ΑΡΧΙΚΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ	ml/l ΤΕΛΙΚΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ
MgSO <sub>4</sub>	1M	2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1M	1
Fe-EDTA	1/10 M	1
Microelements*		1
CaCl <sub>2</sub>	0,5M	10
KCl	1M	5

#### Microelements stock solution

Micro element	gr/lt
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	1,81
ZnCl <sub>2</sub>	0,11
CuCl <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	0,05
H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,02

#### 5) Χάρτης του δυαδικού φορέα pCAMBIA1300

