

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ «ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»

ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *At5g48310*
ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΦΥΤΩΝ
ARABIDOPSIS THALIANA

ΜΑΡΤΖΙΚΟΥ ΜΑΡΙΑ
A.M. 279002

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΧΑΡΑΛΑΜΠΙΔΗΣ ΚΟΣΜΑΣ

ΑΘΗΝΑ 2012

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ «ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»

ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *At5g48310*
ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΦΥΤΩΝ
ARABIDOPSIS THALIANA

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ
ΧΑΡΑΛΑΜΠΙΔΗΣ ΚΟΣΜΑΣ
ΚΑΡΑΓΚΟΥΝΗ ΑΜΑΛΙΑ
ΡΟΥΣΣΗΣ ΑΝΔΡΕΑΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μοριακή βάση και οι μηχανισμοί διατήρησης του ισοζυγίου παραμένουν άγνωστοι. Στην εργασία μελετήθηκε μοριακά και λειτουργικά το γονίδιο *At5g48310* του φυτού *Arabidopsis thaliana*. Είναι ένα από τα γονίδια για τα οποία και δεν υπάρχει αναφορά στη βιβλιογραφία. Είναι άγνωστης λειτουργίας στα φυτά, αλλά έγινε μια πρώτη προσέγγιση κατανόησής της. Φέρει περιοχές που υποδεικνύουν ότι σχετίζεται με τη μεταφορά σακχάρων. Το ομόλογό του, *Ze173*, αποτελεί πολύ ωραίο δείκτη κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του αγωγού συστήματός της. Η φυλογενετική ανάλυση της πρωτεΐνης *At5g48310* έδειξε την ομαδοποίησή της σε κοινό υποκλάδο με άλλες μη χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες. Επίσης με τη βοήθεια υπολογιστικών προγραμμάτων δείξαμε ότι πιθανόν εδράζει στην πλασματική μεμβράνη.

Η ανάλυση των διαγονιδιακών φυτών αποκάλυψε ότι στην αναπαραγωγική φάση υπάρχει έντονη έκφραση στις ταξιανθίες και σε όλο το αγγειακό σύστημα του βλαστού, ενώ η υπερέκφραση του *At5g48310* δεν προκαλεί φαινοτυπικές αλλαγές κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης τους. Ακόμη παρατηρείται μεγάλη έκφραση του γονιδίου στη χημική ένωση ισοξαμπέν. Τα ομόζυγα μεταλλάγματα είναι ολικής απώλειας λειτουργίας. Οπότε η αλλαγή στην τοπολογία της πρωτεΐνης στη μεμβράνη εμποδίζει και το δέσιμο του ισοξαμπέν. Επειδή η πρωτεΐνη *At5g48310* εντοπίζεται στη μεμβράνη ίσως αλλάζει τη διαπερατότητά της και επιτρέπει τη διαφυγή του νερού. Πειραματικά δείξαμε ότι τα ομόζυγα φυτά είναι ευαίσθητα στην ξηρασία και ανθεκτικά στο ισοξαμπέν.

ABSTRACT

The molecular basis and the preservation mechanisms of plant osmosensing remains unknown. The gene *At5g48310* of the plant *Arabidopsis thaliana* was molecularly and functionally studied. This is one of the genes for which there is no reference in the bibliography. It is a gene of unknown function but here is made an early attempt for its characterization. It has specific domains which suggest that it is related with the sugar transfer. Its homolog, *Ze173*, is a very good index during the growth of its supply system. The phylogenetic analysis of the protein *At5g48310* has shown its grouping to a common subgroup with other uncharacterized proteins. Using computational programs we show that it is probably localized in the plasmatic membrane.

Analysis of transgenic plants reveals that *At5g48310* is expressed during reproductive development, predominantly in the inflorescence and also in whole vascular system of the stem, while overexpression of *At5g48310* does not lead to any phenotypic changes during growth and development. It is also observed great expression of the gene to the chemical isoxaben. Homozygous mutants are of total loss of function (knock-out). As a result, a change in the topology of the protein at the membrane blocks isoxaben's binding. Since the protein *At5g48310* is localized in the membrane, it maybe changes the permeability and allows water loss. So we experimentally shown that the homozygous plants are sensitive to drought and resistant to isoxaben.

**Στους καθηγητές μου και στην οικογένεια μου για την
κατανόηση και την υπομονή τους**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Γενικά για το <i>Arabidopsis thaliana</i>	2
1.1.1 Η πρόοδος στην αλληλούχιση, την επανασυναρμολόγηση και το χαρακτηρισμό του γονιδιώματος του <i>A. thaliana</i>	3
1.1.2 Η δυναμική του γονιδιώματος του <i>A. thaliana</i>	5
1.2 Πρωτεΐνες άγνωστης λειτουργίας στο <i>A. thaliana</i>	6
1.3 Μελέτη της ιστοειδικής έκφρασης του <i>At5g48310</i> και των ομολόγων του γονιδίων <i>At5g65440</i> και <i>At4g24610</i> του <i>Arabidopsis thaliana in silico</i>	7
1.4 Απόκριση του <i>At5g48310</i> του <i>Arabidopsis thaliana</i> σε αβιοτικούς παράγοντες.	13
1.5 Το βακτήριο <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	15
1.5.1 Αλληλεπίδραση φυτού - <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	18
α) Φάση έναρξης της αναγνώρισης του φυτού από το <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	18
β) <i>VirA</i> και <i>VirG</i> : ρυθμιστικά γονίδια-κλειδιά του <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	18
γ) Επαγωγή και λειτουργία των υπόλοιπων <i>vir</i> γονιδίων του <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	20
δ) Μεταφορά και ενσωμάτωση του T-DNA του <i>Agrobacterium tumefaciens</i> στο γονιδίωμα του φυτού.	21
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	26
2.1 Φυτικό υλικό και συνθήκες ανάπτυξης και καλλιέργειας.....	27
2.1.1 Συνθήκες καλλιέργειας του <i>Arabidopsis thaliana</i>	27
2.2 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από φυτά <i>Arabidopsis thaliana</i>	28
2.3 Απομόνωση γονιδιωματικού RNA από το φυτό <i>Arabidopsis thaliana</i>	28
2.4 Βακτηριακά κύτταρα και μετασχηματισμός.	30
α) Προετοιμασία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων <i>E.coli</i>	30
β) Αποθήκευση για μεγάλα χρονικά διαστήματα βακτηριακών κυττάρων.	30
γ) Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>E.coli</i> με πλασμιδιακό DNA με θερμική καταπόνηση.	31
2.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από την <i>E.coli</i> με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης.	31

2.6 Ανάλυση δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων (DNA) σε πήκτωμα αγαρόζης.....	32
2.7 Πέψη νουκλεϊκών οξέων με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.....	33
2.8 Συγκόλληση τμημάτων DNA φυτικής προέλευσης σε πλασμιδιακό φορέα.....	33
2.8.1 Ενοποίηση τμημάτων με κολλώδη άκρα.....	34
2.9 Ανάλυση του γονιδίου <i>At5g48310</i> και των ομολόγων του με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).....	34
2.9.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε αποικίες <i>E.coli</i> - COLONY PCR.	35
2.9.2 Ενίσχυση του DNA ένθετου με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης Touchdown (TD - PCR).	37
2.9.3 Ανάλυση του γονιδίου <i>At5g48310</i> με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης της ανάστροφης μεταγραφής (RT – PCR).....	37
2.10 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων <i>Agrobacterium tumefaciens</i> με τη μέθοδο ψύξης-τήξης.....	39
2.11 Σταθερός μετασχηματισμός <i>Arabidopsis thaliana</i> με το <i>Agrobacterium tumefaciens</i> μέσω ανάπτυξης φυτών και εμφάνισης με το κατάλληλο στέλεχος <i>Agrobacterium</i>	40
2.12 Στερέωση και χρώση GUS ολόκληρων φυτών και οργάνων του φυτού <i>Arabidopsis thaliana</i>	43
2.13 Ιστοειδική μελέτη του υποκινητή του γονιδίου <i>At5g48310</i>	43
2.14 Έκφραση του <i>At5g48310</i> στην υδατική καταπόνηση.....	45
2.15 Επίδραση με το χημικό ισοξαμπέν.....	46
2.16 Επίδραση με το χημικό αμινοτριαζόλη.....	47
2.17 Επίδραση της ορμόνης γιββερελίνης.....	47
2.18 Έκφραση του <i>At5g48310</i> σε τρυβλία με διαφορετικά σάκχαρα.....	47
2.19 Υδατικά διαλύματα και θρεπτικά υποστρώματα βακτηριακών κυττάρων.....	48
2.19.1 Θρεπτικά υποστρώματα και αντιδραστήρια για τη δημιουργία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων και το μετασχηματισμό τους.....	48
2.19.2 Διαλύματα στερέωσης και χρώσης GUS των φυτών.....	49
2.19.3 Διαλύματα απομόνωσης πλασμιδιακού DNA.....	49
2.19.4 Διαλύματα απομόνωσης RNA και γονιδιωματικού DNA.....	49
2.19.5 Διαλύματα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης.....	50
2.19.6 Διαλύματα για αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης.....	50
2.19.7 Διαλύματα και θρεπτικά υποστρώματα μετασχηματισμού φυτών <i>Arabidopsis thaliana</i>	50
2.20 Υπολογιστική ανάλυση και κατασκευή φυλογενετικού δέντρου.....	51

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	53
3.1 Η αλληλουχία του γονιδίου <i>At5g48310</i> του <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>in silico</i> με πακέτα επεξεργασίας βιολογικών δεδομένων.	54
3.1.1 Χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το γονίδιο <i>At5g48310</i> στο <i>Arabidopsis thaliana</i>	55
3.2 Μελέτη της αναπτυξιακής έκφρασης του <i>At5g48310</i> του <i>Arabidopsis thaliana</i>	57
3.3 Ιστοειδική μελέτη του υποκινητή του γονιδίου <i>At5g48310</i> του <i>Arabidopsis thaliana in planta</i>	59
3.4 Λειτουργικός χαρακτηρισμός του γονιδίου <i>At5g48310</i> στο <i>Arabidopsis thaliana</i>	64
3.4.1 Φαινοτυπική ανάλυση μεταλλαγμένων σειρών στο <i>Arabidopsis thaliana</i>	64
3.4.2 Γονοτυπική ανάλυση μεταλλαγμένων σειρών στο <i>Arabidopsis thaliana</i>	67
3.4.3 Ανάλυση διαγονιδιακών σειρών στο <i>Arabidopsis thaliana</i> με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης της ανάστροφης μεταγραφής (RT – PCR).	69
3.5 Έκφραση του <i>At5g48310</i> παρουσία χημικών ουσιών που προκαλούν κυτταρικό θάνατο.	71
3.5.1 Έκφραση του <i>At5g48310</i> παρουσία ισοξαμπέν.	71
3.5.2 Έκφραση του <i>At5g48310</i> παρουσία αμινοτριαζόλης.	72
3.6 Έκφραση του <i>At5g48310</i> σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης.	72
3.7 Έκφραση του <i>At5g48310</i> παρουσία της ορμόνης γιββερελλίνης.	74
3.8 Έκφραση του <i>At5g48310</i> παρουσία διαφορετικών σακχάρων.	74
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	77
ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	83
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	84
6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	95

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά για το *Arabidopsis thaliana*.

Το *Arabidopsis thaliana* είναι ένα ζιζάνιο που ανήκει στην οικογένεια *Brassicaceae* (Εικόνα 1.1). Οι οικότυποι που χρησιμοποιούνται κυρίως είναι η *Landsberg erecta* (*Ler*), η *Columbia* (*Col*) και η *Wassilewskija* (*Ws*). Καθώς το ύψος του δεν ξεπερνά τα 30 – 40 cm μπορεί να καλλιεργηθεί στο εργαστήριο μέσα σε θαλάμους ελεγχόμενων συνθηκών. Τα άνθη του είναι ερμαφρόδιτα, δημιουργώντας τόσο θηλυκά όσο και αρσενικά αναπαραγωγικά όργανα και υπό κανονικές συνθήκες αυτογονιμοποιούνται, χαρακτηριστικό ιδιαίτερα χρήσιμο στην αποφυγή ανεπιθύμητων σταυρογονιμοποιήσεων μεταξύ φυτών με διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο. Ένα άνθος παράγει 30 – 50 σπέρματα και ολόκληρο το φυτό μερικές χιλιάδες.



Εικόνα 1.1 Το φυτό *Arabidopsis thaliana*. Α) ροζέτα, Β) φυτό 4 εβδομάδων, Γ) άνθος, Δ) τμήμα ταξιανθίας, Ε) σπέρματα. Πηγή: <http://www.sciencepresse.qc.ca>

Το *Arabidopsis thaliana* είναι ένα είδος άγριου φυτού προσαρμοσμένου σε κλίματα μεγάλης γεωγραφικής κλίμακας και η χρήση του ως πρότυπο οργανισμό μελέτης έχει προσφέρει τεράστια πληροφόρηση σε θέματα βασικής και εφαρμοσμένης έρευνας. Χρησιμοποιείται ευρέως για τη μελέτη της Γενετικής, της Φυσιολογίας και της Μοριακής Βιολογίας των φυτών. Το μικρό μέγεθος του γονιδιώματός του, το καθιστά χρήσιμο για γενετική χαρτογράφηση. Διαθέτει περίπου

157 εκατομμύρια ζεύγη βάσεων, τα οποία είναι οργανωμένα σε 5 χρωμοσώματα στον πυρήνα του φυτικού κυττάρου. Ήταν το πρώτο φυτό και ο τρίτος πολυκύτταρος οργανισμός μετά τα *Caenorhabditis elegans* και *Drosophila melanogaster*, στον οποίο έγινε πλήρη αλληλούχιση γονιδιώματος. Το 2000 ολοκληρώθηκε η αλληλούχιση του γονιδιώματός του από τον οργανισμό Arabidopsis Genome Initiative. Πολλές εργασίες έχουν γίνει έκτοτε για να προσδιοριστεί η λειτουργία των 29.000 γονιδίων που προέκυψαν και των 35.000 πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από αυτά. Σκοπός της επιστημονικής έρευνας είναι η κατανόηση βασικών βιολογικών διεργασιών που λαμβάνουν μέρος στα φυτά και ενδεχομένως η γνώση που θα προκύψει να χρησιμοποιηθεί για τη βελτίωση των καλλιεργούμενων φυτικών ειδών που χρησιμοποιούνται προς όφελος του ανθρώπου.

1.1.1 Η πρόοδος στην αλληλούχιση, την επανασυναρμολόγηση και το χαρακτηρισμό του γονιδιώματος του *A. thaliana*.

Δεδομένου ότι η συστηματική αλληλούχιση ολοκληρώθηκε στα τέλη του 2000, η γονιδιωματική αλληλούχιση έχει υποβληθεί σε αρκετούς κύκλους επανασυναρμολόγησης, κάλυψης κενών και επέκτασης σε μη αλληλουχημένες περιοχές.

Το αρχικό σύνολο των γονιδιακών προτύπων δημιουργήθηκε από ένα συνδυασμό βελτιστοποιημένων αρχικών αλγορίθμων AB εύρεσης γονιδίων και την υποστήριξη δεδομένων όπως αλληλουχίες EST (Expressed Sequence Tag) και cDNA. Συστηματικότερος σχολιασμός ενσωμάτωσε μεγάλο αριθμό πλήρους μήκους cDNA αλληλουχιών έτσι ώστε τα 16.000 από τα 29.000 προβλεπόμενα γονίδια να υποστηρίζονται από πειραματικές αποδείξεις. Στη σύγκριση των αλληλουχιών του *Arabidopsis* με τη γενωμική αλληλουχία του στενά συγγενικού *Brassica oleracea* (Κινέζικο λάχανο) εντοπίστηκαν περιοχές μεγάλης ομοιότητας που είτε ταυτοποιήθηκαν νέα υποθετικά γονίδια είτε επεκτάθηκαν υφιστάμενα. Περίπου το 30% των νέων αυτών γονιδίων κωδικοποίησε μια μεταγραφή. Περίπου το 25% των αρχικά προβλεπόμενων γονιδίων δεν ταίριαζαν με αλληλουχία EST ή η υποθετική τους πεπτιδική αλληλουχία δεν είχε ομοιότητα με οποιαδήποτε άλλη πρωτεΐνη (υποθετικά γονίδια) και κατά συνέπεια η βιολογική τους σημασία παραμένει

αμφίβολη. Παρόλα αυτά η συστηματική ανάλυση αυτής της τάξης των γονιδίων, έδειξε ότι η πλειοψηφία αυτών εκφραζόταν. Σε άλλες αναλύσεις ομοιότητας των EST στη γονιδιωματική αλληλουχία βρέθηκαν αρκετές εκατοντάδες ομοιότητες με υποθετικές μη κωδικοποιημένες περιοχές και με άλλες μη κανονικοποιημένες οντότητες που έμοιαζαν με γονίδια (Bevan and Walsh 2004).

Η ομαλοποιημένη γονιδιωματική αλληλουχία και ο σχολιασμός της αυτή τη στιγμή αναπαριστάται από τη v5 ανάλυση του TIGR (The Institute for Genome Research). Περίπου το 36% του προβλεπόμενου πρωτεώματος κωδικοποιείται από τμηματικές και παράλληλες γενωματικές επαναλήψεις. Αναγνωρίστηκαν περίπου 1400 ψευδογονίδια, πολλά από τα οποία είχαν εκφυλισμένες πρωτεϊνικές αλληλουχίες και ανώριμα κωδικόνια λήξης σε σχέση με τα πιο συγγενικά μέλη της οικογένειας. Η βελτιωμένη ανάλυση των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών και των μεταθετών στοιχείων ένθεσης (τρανσποζονίων) βοήθησε ώστε να αναγνωριστούν 2.355 τρανσποζόνιες τοποθεσίες. Πολλές από αυτές, στον αρχικό σχολιασμό, είχαν οριστεί ως γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες.

Τα νέα προβλεπόμενα γονίδια χαρακτηρίστηκαν λειτουργικά χρησιμοποιώντας σύνθεση συντηρημένων περιοχών και όχι με βάση την ολική ομολογία της αλληλουχίας όπως έγινε αρχικά. Αυτό επιτρέπει στις οικογένειες των πρωτεϊνών και στις σχέσεις μεταξύ τους να είναι προσδιορισμένες με μεγαλύτερη ακρίβεια. Χρησιμοποιούνται όροι της *Γονιδιακής Οντολογίας* (www.geneontology.org) για την περιγραφή κάθε γονιδίου από την άποψη της μοριακής λειτουργίας της κωδικοποιημένης πρωτεΐνης, της βιολογικής διεργασίας με την οποία λειτουργεί η πρωτεΐνη και τον εντοπισμό της στο κύτταρο. Η γονιδιακή οντολογία αποτελεί ένα δομημένο λεξιλόγιο βιολογικών επισημειώσεων (annotations) των προϊόντων των γονιδίων. Συνεπώς, η χρήση γονιδιακών οντολογιών δίνει το πλεονέκτημα της αυτοματοποιημένης διαχείρισης της γονιδιακής πληροφορίας και επιτρέπει τη στατιστική ανάλυσή της σε μεγάλη κλίμακα.

Ένας Affymetrix πίνακας πλήρους γονιδιώματος για το *Arabidopsis* υβριδοποιήθηκε μαζί με cRNA για να ανιχνεύσει μεταγραφές και τη χρωμοσωμική τους θέση. Εντοπίστηκαν αρκετά μεταγραφικά σημεία ενδιαφέροντος σε κεντρομεριδιακές περιοχές, που αντιστοιχούσαν σε μια ποικιλία επαναλαμβανόμενων στοιχείων και μεταθετών στοιχείων ένθεσης, καθώς και σε γονίδια μη αναγνωρισμένα προηγουμένως. Τέλος, καθορίστηκαν με ακρίβεια οι μονάδες μεταγραφής για τα περισσότερα γονίδια και χρησιμοποιήθηκαν για την αναγνώριση κλώνων ανοιχτών

πλαισίων ανάγνωσης (ORF) πλήρους μήκους για μεγαλύτερο από 30% του γονιδιώματος. Αυτά τα ORFs κλωνοποιήθηκαν και αποτελούν πηγές κρίσιμης σημασίας για τη γενετική επιστήμη της γονιδιακής λειτουργίας.

1.1.2 Η δυναμική του γονιδιώματος του *A. thaliana*.

Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά του γονιδιώματος του *Arabidopsis*, που αποκαλύφθηκε από την αλληλούχιση του, ήταν το μέγεθος της αντιγραφής γονιδίων και της τμηματικής αντιγραφής, η οποία προκαλεί έκπληξη δεδομένης της προσδοκίας ενός συμπαγούς λειτουργικά γονιδιώματος. Περίπου το 60% ήταν πιθανό να προέρχεται από μια μόνο περίπτωση αντιγραφής, πιθανότατα ολόκληρου του γονιδιώματος. Στη συνέχεια, πιο λεπτομερής ανάλυση πρότεινε ότι η καταγωγή του *Arabidopsis* έχει υποστεί τουλάχιστον δυο αντιγραφές, με την πιο πρόσφατη να είναι μια περίπτωση πολυπλοειδισμού κατά την αρχική εξέλιξη των σταυρανθών. Οι αναλύσεις αυτές υποστηρίζουν ένα πρότυπο εξέλιξης του γονιδιώματος του *Arabidopsis* που περιλαμβάνει κύκλους αντιγραφής, απώλειας και διαίρεσης γονιδίων. Η συχνή παρατήρηση των οικογενειών των γονιδίων με τη χρήση συνδυασμένων πινάκων, υποστηρίζει περαιτέρω την άποψη περί δυναμικής του γονιδιώματος, που καθοδηγείται από συμβάντα αντιγραφής και εξειδίκευσης των λειτουργιών των γονιδίων από πολλαπλά αντίγραφα γονιδίων.

Το *A.thaliana* είναι ένα καλό πρότυπο της εξελικτικής γονιδιωματικής. Πρόσφατα ανακοινώθηκαν σχέδια που αποβλέπουν στην αλληλούχιση των γονιδιωμάτων των *Arabidopsis lyrata* και *Capsella rubella*, συγγενικά είδη του *A.thaliana*. Αυτές οι αλληλουχίσεις θα επιτρέψουν σημαντική πρόοδο σε πολλούς τομείς της βιολογίας του *A.thaliana*, για παράδειγμα με τον καθορισμό προγονικών πολυμορφισμών και συντηρημένων περιοχών ή ίχνη που μπορεί να έχουν λειτουργική σημασία.

Ακόμα έχουν αναπτυχθεί αλγόριθμοι που συσχετίζουν τα μοτίβα του υποκινητή με τα μοτίβα έκφρασης. Μια μέθοδος περιλαμβάνει την ομαδοποίηση γονιδίων ανάλογα με τα επίπεδα έκφρασης τους σε διαφορετικές συνθήκες και τον εντοπισμό υποκινητών στις συρρυθμιζόμενες ομάδες. Η καθολική ευθυγράμμιση, η ανάλυση συχνοτήτων και άλλες μέθοδοι χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για να ταυτοποιήσουν μοτίβα στην αλληλουχία κοινά για την κάθε ομάδα. Τα μοτίβα

μπορούν στη συνέχεια να συσχετιστούν με τις λειτουργίες των γνωστών μοτίβων του υποκινητή και να δοκιμαστούν πειραματικά για να καθοριστεί η λειτουργία τους. Η εφαρμογή αυτών των στρατηγικών είναι πολλά υποσχόμενη για την ερμηνεία των δεδομένων γονιδιακής έκφρασης και τη δημιουργία πρότυπων δικτύων γονιδιακής έκφρασης. Ιδιαίτερη σημασία έχει ο προσδιορισμός των αλληλουχιών του υποκινητή που συντηρούνται μεταξύ συγγενικών ειδών. Παρά το γεγονός ότι το *Arabidopsis* και άλλα μέλη των *Brassicaceae* δεν εμπλέκονται σε συμβιωτικές αλληλεπιδράσεις, μελέτες στα ψυχανθή *Lotus japonicus*, *M. Truncatula* και στο μπιζέλι έχουν ταυτοποιήσει τάξεις πρωτεϊνών με συντηρημένες λειτουργίες, όπως αυτές που σχετίζονται με τη σηματοδότηση Ca^{2+} , την πολική κυτταρική ανάπτυξη και την τριμερή σηματοδότηση μέσω των G πρωτεϊνών (Bevan and Walsh 2005).

1.2 Πρωτεΐνες άγνωστης λειτουργίας στο *A. thaliana*.

Μόνο ένα μικρό ποσοστό των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται στα γονιδιώματα των ζώων ή των φυτών είναι επαρκώς χαρακτηρισμένες όσον αφορά τις κυτταρικές τους λειτουργίες. Οι λειτουργίες στην πλειοψηφία των πρωτεϊνών αυτών παραμένουν είτε εντελώς άγνωστες (40%), είτε έχουν κατανοηθεί μερικώς. Η προσπάθεια για να περιοριστεί αυτό το κενό γνώσης θα προσφέρει αρκετές ευκαιρίες ώστε να κατανοηθούν τα συστήματα στα φυτά. Δύο σημαντικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών άγνωστης λειτουργίας σε πρότυπους οργανισμούς. Η ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος θεωρεί σαν πρωτεΐνες άγνωστης λειτουργίας, PUFs (Proteins Unknown Function), όλες τις πρωτεΐνες που έχουν μη ανιχνεύσιμη ακολουθία ή δομικές ομοιότητες με λειτουργικά χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες στις βάσεις δεδομένων αναφοράς. Αντιθέτως, η πιο συντηρητική εμπειρική προσέγγιση ορίζει ως PUFs όλες τις πρωτεΐνες που στερούνται άμεσης πειραματικής απόδειξης ως επιβεβαίωση για μια συγκεκριμένη λειτουργία. Η εμπειρική προσέγγιση ενσωματώνει τις περισσότερες PUFs που προσδιορίζονται από την προσέγγιση ομοιότητας, καθώς και τις λειτουργικά μη χαρακτηρισμένες αλληλουχίες που έχουν ομοιότητες με τις πρωτεΐνες οι οποίες είναι γνωστής λειτουργίας (PKFs). Με τη βοήθεια της βιοπληροφορικής οι πρωτεΐνες άγνωστης λειτουργίας μπορούν να συσχετιστούν με εκείνες που είναι γνωστές. Οι εντοπισμένες ομοιότητες μπορούν να αποκαλύψουν σημαντικές ενδείξεις για τον

πειραματικό έλεγχο των λειτουργιών τους. Επιπρόσθετα, μπορεί να γίνει πρόβλεψη κάποιων λειτουργικών χαρακτηριστικών από τις αλληλουχίες τους, όπως σήματα (σινιάλα) υποκυτταρικής στόχευσης, δευτερογενείς δομές και μεμβρανικές περιοχές. Μια από τις πιο ελπιδοφόρες και άμεσα διαθέσιμη πηγή πληροφοριών για τις μελέτες προσδιορισμού των λειτουργιών των γονιδίων PUF χρησιμοποιεί δεδομένα της έκφρασης των γονιδίων από βάσεις δεδομένων μικροσυστοιχιών (microarrays) (Hogan και συνεργάτες 2008).

Όταν η αλληλουχία του γονιδιώματος του *Arabidopsis* αναφέρθηκε για πρώτη φορά, το χαρακτηρισμό περιελάμβαναν συνολικά 25.498 προβλεπόμενα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Από αυτά, το 69% ταξινομήθηκε σε εννέα λειτουργικές κατηγορίες χρησιμοποιώντας το σύστημα ανάλυσης PEDANT (Protein Extraction, Description and ANalysis Tool): κυτταρικός μεταβολισμός, μεταγραφή, άμυνα φυτών, σηματοδότηση, ανάπτυξη, καταστροφή των πρωτεϊνών, ενδοκυτταρική μεταφορά, μεταφορά και πρωτεϊνική σύνθεση. Το υπόλοιπο 30% των προϊόντων των γονιδίων, δεν μπορούσε να αποδοθεί σε κάποια από αυτές τις κατηγορίες (Berardini και συνεργάτες 2004).

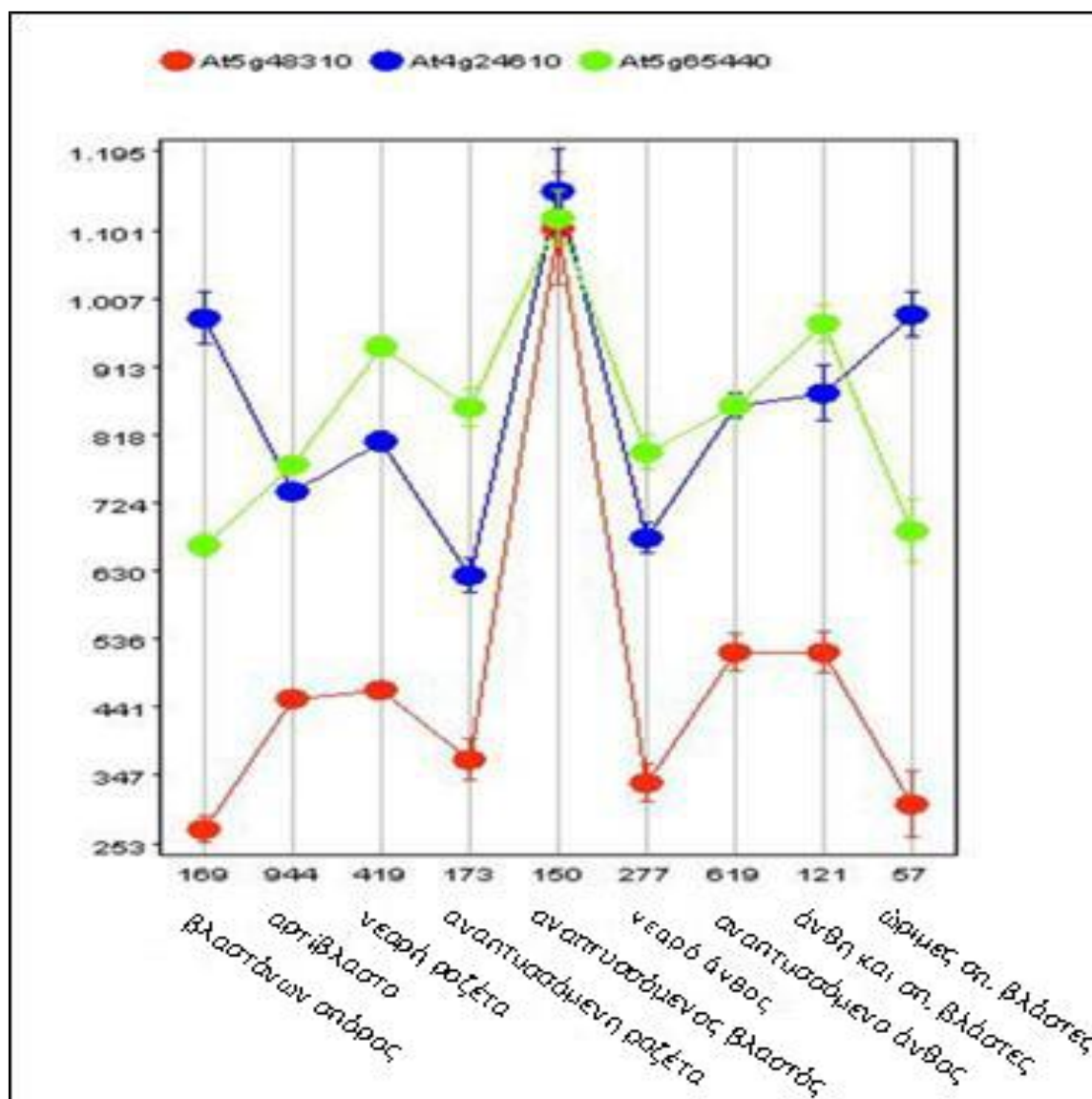
Ένα από τα γονίδια για τα οποία και δεν υπάρχει αναφορά στη βιβλιογραφία είναι και το **At5g48310** το οποίο εντοπίζεται στο πέμπτο χρωμόσωμα του *Arabidopsis thaliana*. Το γονίδιο At5g48310 είναι άγνωστης λειτουργίας στα φυτά.

1.3 Μελέτη της ιστοειδικής έκφρασης του At5g48310 και των ομολόγων του γονιδίων At5g65440 και At4g24610 του *Arabidopsis thaliana* in silico.

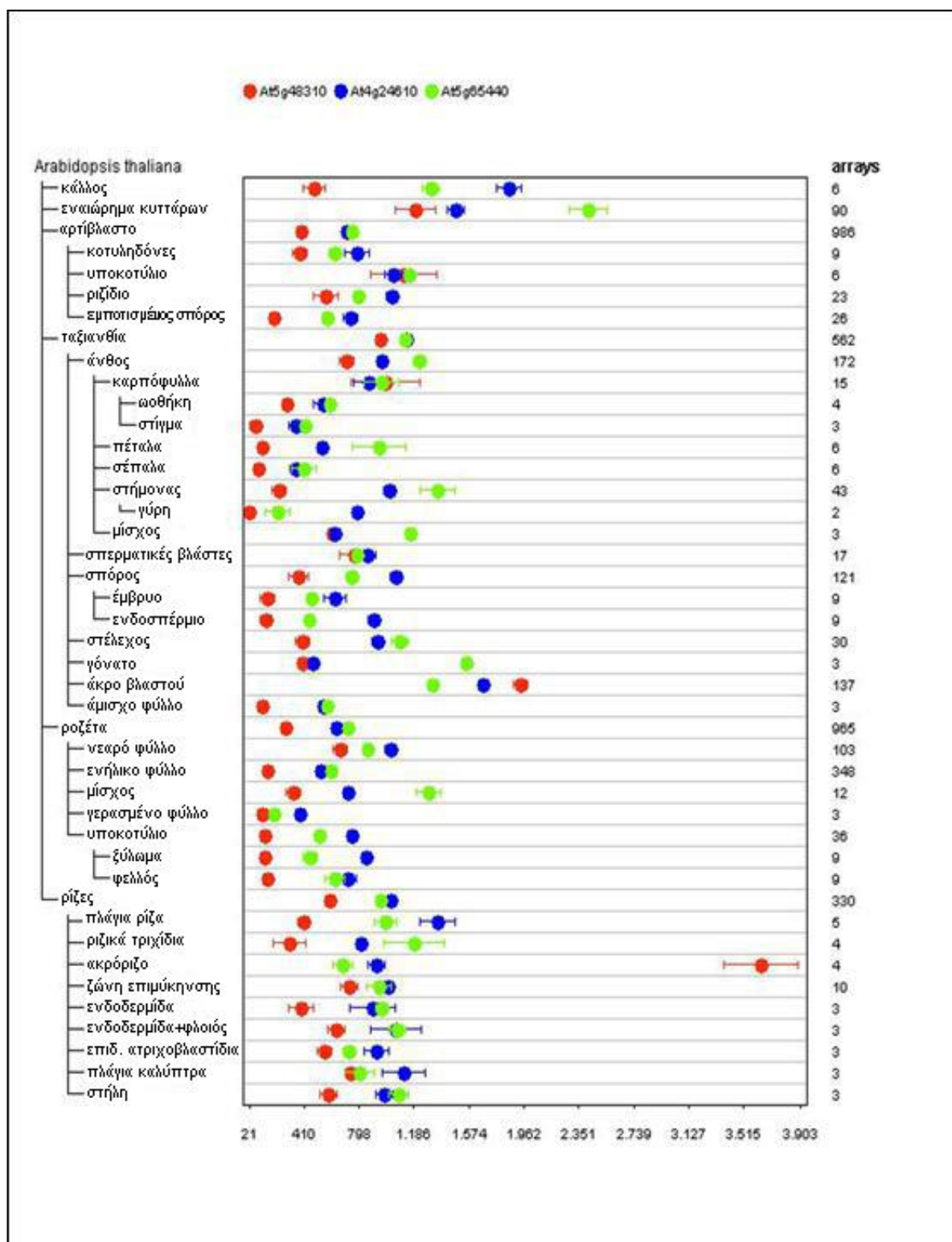
Μελέτες BLAST (Altschul και συνεργάτες 1997) αποκάλυψαν δύο άλλα γονίδια στο *Arabidopsis*, το At4g24610 και το At5g65440 που κωδικοποιούν πρωτεΐνες με μεγάλη ομοιότητα στη δομή και στην αλληλουχία με την πρωτεΐνη At5g48310 (Παράρτημα 2). Έγιναν *in silico* μελέτες ιστοειδικής έκφρασης των τριών γονιδίων, χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων Genevestigator η οποία περιλαμβάνει πληροφορίες από μικροσυστοιχιές RNA (RNA microarrays) για το σύνολο των γονιδίων του *Arabidopsis thaliana*.

Όπως φαίνεται το πρότυπο έκφρασης είναι παρόμοιο και για τα τρία γονίδια, με σαφής υπεροχή στην έκφραση του γονιδίου At5g65440 σε όλα σχεδόν τα αναπτυξιακά στάδια έναντι του γονιδίου At5g48310 (Εικόνα 1.2). Μεγαλύτερη

έκφραση παρουσιάζεται και για τα τρία γονίδια, στους αναπτυσσόμενους βλαστούς και στα άνθη ενώ υπάρχει μικρή έκφραση και στην αναπτυσσόμενη ροζέτα. Συγκριτικά το στάδιο με τη μεγαλύτερη έκφραση για το γονίδιο *At5g48310* είναι αυτό που φέρει τους αναπτυσσόμενους βλαστούς και τις ταξιανθίες. Έντονη έκφραση παρατηρείται στην άκρη της ρίζας, στις κορυφές των βλαστών, στο υποκότυλο των νεαρών φυτών και στις ταξιανθίες (Εικόνα 1.3).



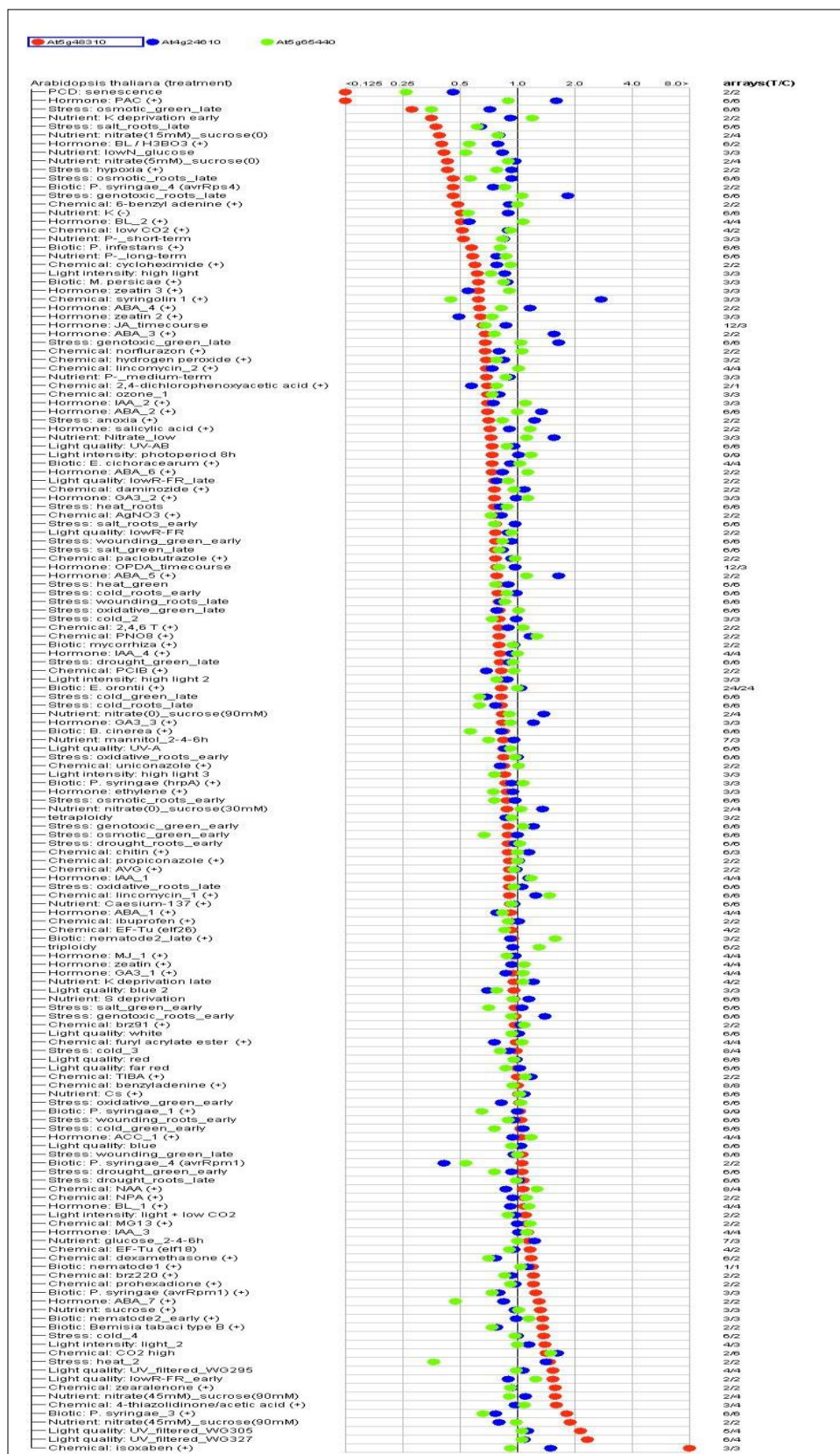
Εικόνα 1.2 Το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *At5g48310* και των ομόλογων γονιδίων από το *Arabidopsis thaliana*, *At4g24610* και *At5g65440* *in silico*, σύμφωνα με αποτέλεσμα μικροσυτοιχιών RNA. Μεγαλύτερη έκφραση παρουσιάζεται και για τα τρία γονίδια, στους αναπτυσσόμενους βλαστούς και στα άνθη ενώ υπάρχει μικρή έκφραση και στην αναπτυσσόμενη ροζέτα.



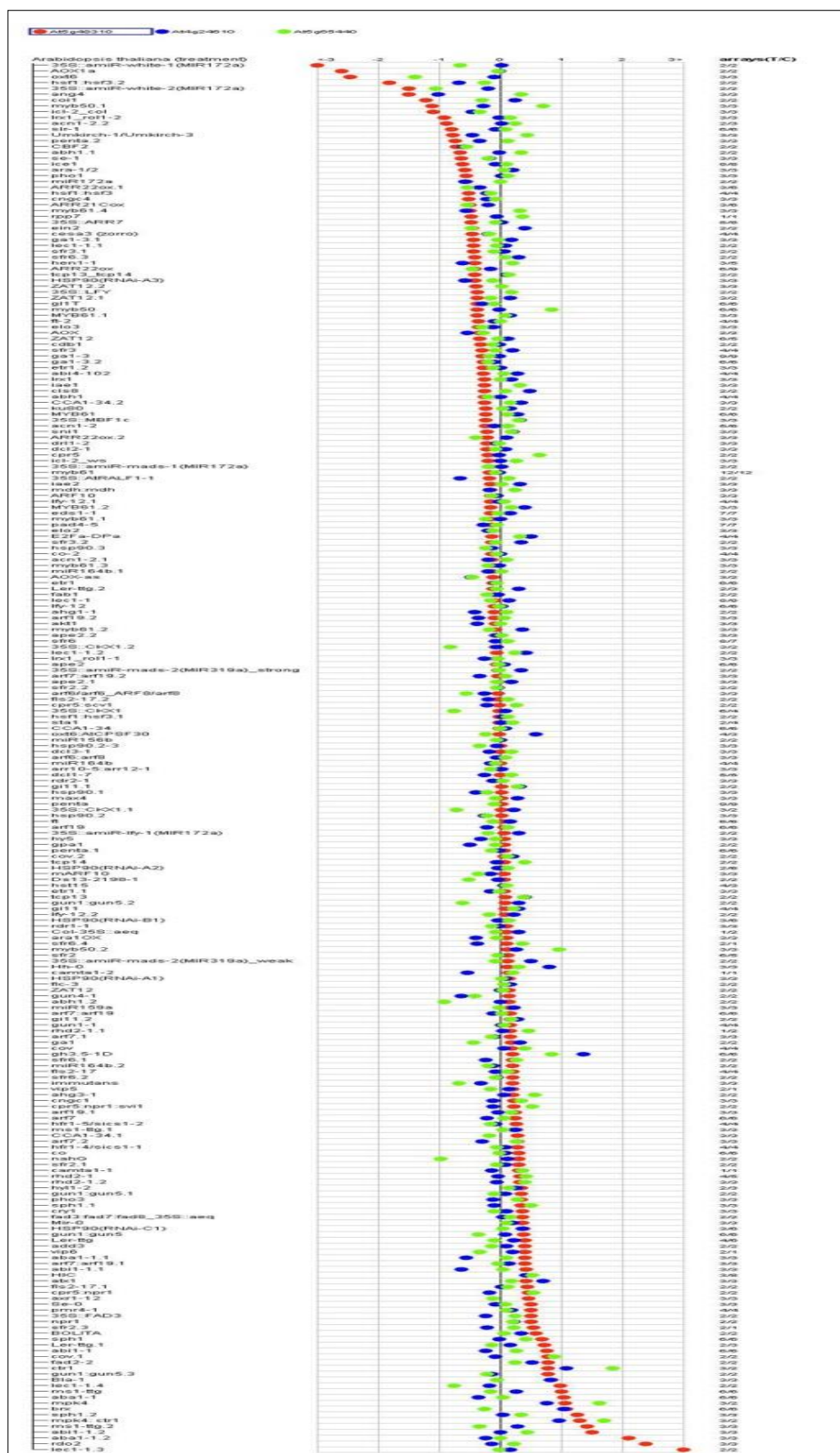
Εικόνα 1.3 Το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *At5g48310* και των ομόλογων γονιδίων από το *Arabidopsis thaliana*, *At4g24610* και *At5g65440* *in silico*, σύμφωνα με αποτέλεσμα μικροσυτοιχιών RNA. Μεγάλη έκφραση παρουσιάζεται και για τα τρία γονίδια στο άκρο του βλαστού. Παρατηρείται έντονη έκφραση του *At5g48310* στο ακρόριζο.

Πειράματα που έγιναν στο *Arabidopsis thaliana* (Εικόνα 1.4) κατέδειξαν μεγάλη έκφραση του υπό μελέτη γονιδίου στις χημικές ουσίες ισοξαμπέν και αμινοτριαζόλη (AT), σε θρεπτικά συστατικά όπως σακχαρόζη και γλυκόζη και σε συνθήκες περιβαλλοντικής καταπόνησης. Ακόμα μικρή έκφραση είχε στο AOX1 μετάλλαγμα (alternative oxidase) (Εικόνα 1.5). Το AOX1 είναι μια οξειδάση που βρίσκεται στα φυτά και αποτελεί μέρος της αλυσίδας μεταφοράς των ηλεκτρονίων (Giraud και συνεργάτες 2008 και Ho και συνεργάτες 2008). Η έκφραση της επηρεάζεται από περιβαλλοντικές καταπονήσεις όπως το κρύο, από τη μόλυνση από παθογόνα και από άλλους παράγοντες που μειώνουν τη ροή ηλεκτρονίων μέσω του κυτοχρώματος του μονοπατιού της αναπνοής.

Παρόλα αυτά οι λειτουργίες αυτών των πρωτεϊνών δεν είναι γενικά γνωστές και μόνο λίγες φυτικές πρωτεΐνες έχουν αναγνωρισμένες βιολογικές λειτουργίες. Το *At5g65440* περιέχει ένα μεταγραφικό ρυθμιστή, μια Ca^{2+} εξαρτώμενη λιπido - δεσμευτική πρωτεΐνη (CaLB). Αυτό το πεδίο έχει ταυτοποιηθεί σε αρκετές πρωτεΐνες. Το Ca^{2+} είναι ένας σημαντικός δευτερεύων αγγελιοφόρος στο μονοπάτι μεταγωγής του σήματος στα φυτά που ρυθμίζουν την επαγόμενη από την καταπόνηση έκφραση γονιδίων. Η λειτουργική ανάλυση των πρωτεϊνών στα φυτά που περιέχουν τις Ca^{2+} δεσμευτικές περιοχές (C2 περιοχές) θα βοηθήσει στην κατανόηση των μηχανισμών πίσω από το ρόλο των μεταγραφικών ρυθμιστών στο μονοπάτι που σηματοδοτείται από το Ca^{2+} και στο άνοιγμα νέων προοπτικών για τη γενετική βελτίωση των καλλιεργειών. Η AtCLB συνδέεται εξειδικευμένα στον υποκινητή του γονιδίου της συνθάσης του τριτερπενίου (thalianol synthase) του *Arabidopsis* (*AtTHAS1*), του οποίου η έκφραση επάγεται από τη βαρύτητα και το φως. Η έκφραση του γονιδίου *Atclb* διαπιστώθηκε σε όλους τους αναλυθέντες ιστούς του *Arabidopsis* (φύλλο, ρίζα, μίσχος, άνθος και καρπός) με Real-Time PCR ανάλυση. Η ανάλυση ανοσοφθορισμού αποκάλυψε ότι η πρωτεΐνη AtCLB είναι εντοπισμένη στον πυρήνα των κυττάρων στις άκρες της ρίζας του *Arabidopsis*. Ο ρόλος του γονιδίου *Atclb* προσδιορίστηκε στην απόκριση αρνητικής ρύθμισης στην αβιοτική καταπόνηση στο *Arabidopsis*. Η απώλεια της λειτουργίας του γονιδίου *Atclb* παρέχει μια ενισχυμένη ανθεκτικότητα στην ξηρασία και στην αλατότητα και μια τροποποιημένη βαρυτροπική απάντηση στην εισαγωγή T-DNA στις διαγονιδιακές σειρές εξάλειψης γονιδίου. Η έκφραση του *AtTHAS1* σε διαγονιδιακές σειρές εξάλειψης του *Atclb* γονιδίου αυξήθηκε έναντι του άγριου τύπου και μιας 35S-*Atclb* σειράς υπερέκφρασης που προτείνει τον AtCLB ως μεταγραφικό παρεμποδιστή του *AtTHAS1* (De Silva και συνεργάτες 2011).



Εικόνα 1.4 Πειράματα που έγιναν στο *At5g48310* και στα ομόλογα του γονίδια. Φαίνονται οι εκφράσεις των γονιδίων στα διάφορα ερεθίσματα που χρησιμοποιήθηκαν. Παρατηρείται έντονη έκφραση του *At5g48310* στο χημικό ισοζαμπέν.

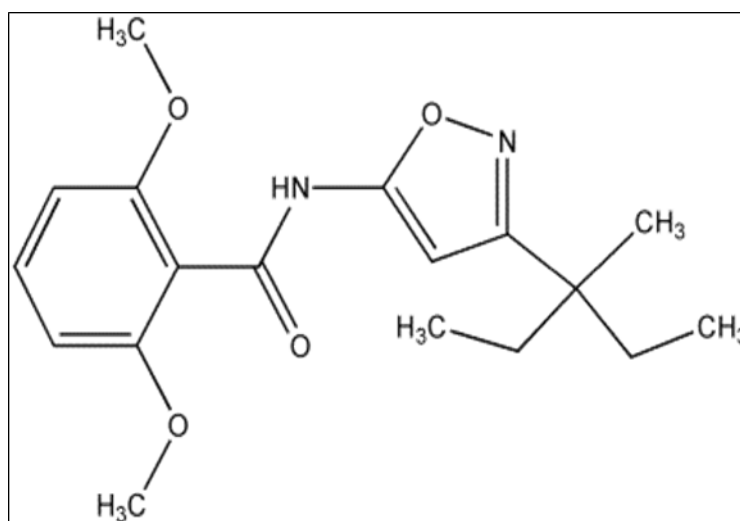


Εικόνα 1.5 Πειράματα που έγιναν στο *At5g48310* και στα ομόλογα του γονίδια. Φαίνονται οι εκφράσεις των γονιδίων στα διάφορα μεταλλάγματα που χρησιμοποιήθηκαν. Παρατηρείται μικρή έκφραση του *At5g48310* στο AOX1.

1.4 Απόκριση του *At5g48310* του *Arabidopsis thaliana* σε αβιοτικούς παράγοντες.

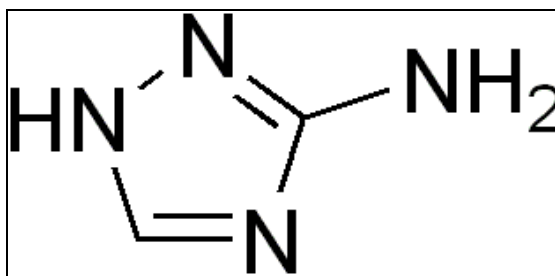
Η ανάπτυξη των φυτών επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από ένα συνδυασμό περιβαλλοντικών καταπονήσεων, όπως η υψηλή θερμοκρασία, η ξηρασία ή η υψηλή αλατότητα (Kasuga και συνεργάτες 1999 και Krasensky and Jonak 2012). Τα φυτά πρέπει να προσαρμόζονται σε αυτές τις καταπονήσεις για να επιβιώσουν. Η ανάπτυξη τους επηρεάζεται ακόμη και από διάφορες χημικές ουσίες, ορμόνες και σάκχαρα όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1.4.

Το ισοξαμπέν (Εικόνα 1.6) ή αλλιώς βενζαμίδιο, N-[3(1-Ethyl-1-methylpropyl)-5-isoxazolyl]-2, 6, dimethoxybenzamide είναι ένα εξαιρετικά δραστικό φυτοφάρμακο που χρησιμοποιήθηκε αρχικά σε σιτηρά, πόες και καλλωπιστικά φυτά (Huggenberger και συνεργάτες 1982). Είναι εκλεκτικά φυτοτοξικό στα δικοτυλήδονα φυτά, καθώς προκαλεί κυτταρική νέκρωση λόγω του ότι αναστέλλει τη σύνθεση της κυτταρίνης και κατά επέκταση του κυτταρικού τοιχώματος, ενώ τα περισσότερα μονοκοτυλήδονα είναι ανθεκτικά (Heim και συνεργάτες 1990 και Scheible και συνεργάτες 2001). Δρα επίσης στη σύνθεση των πρωτεϊνών και στα γονίδια επαγωγής της αυξίνης. Άλλες κυτταρικές διεργασίες όπως η βλάστηση των σπερμάτων, η μίτωση, η αναπνοή, η φωτοσύνθεση, η σύνθεση των λιπιδίων και του RNA δεν επηρεάζονται από το ισοξαμπέν.



Εικόνα 1.6 Η δομή του ισοξαμπέν. Ο χημικός του τύπος είναι $C_{18}H_{24}N_2O_4$ και έχει μοριακό βάρος 332,4 g/Mole. (Πηγή: USDOE, 2000)

Η αμινοτριαζόλη (AT) (Εικόνα 1.7) είναι ένα φυτοφάρμακο το οποίο μπορεί να απορροφηθεί από τα φυτικά κύτταρα και να επιβραδύνει τις μεταβολικές διεργασίες του φυτού, όπως είναι η βιοσύνθεση χρωστικών ουσιών, οι λειτουργίες του χλωροπλάστη και η επιμήκυνση της ρίζας. Είναι επίσης γνωστή ως ένας ισχυρός αναστολέας της καταλάσης, η οποία μειώνει τη δραστηριότητα της καταλάσης και προκαλεί ενδογενή συσσώρευση του υπεροξειδίου του υδρογόνου που τελικά οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο (Jannat και συνεργάτες 2011).



Εικόνα 1.7 Η δομή της αμινοτριαζόλης. Ο χημικός της τύπος είναι $C_2H_4N_4$ και έχει μοριακό βάρος 84,08 g/Mole. (Πηγή: www.chemspider.com)

Οι φυτοορμόνες αναγνωρίστηκαν αρχικά ως ενώσεις μικρού μοριακού βάρους που παράγονται από τα φυτά. Δρουν εξειδικευμένα σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις επάγοντας την έκφραση γονιδίων, τα οποία με τη σειρά τους ρυθμίζουν μια πληθώρα φυσιολογικών διεργασιών. Συνδέονται σε εξειδικευμένους υποδοχείς και έχουν την ικανότητα να μεταφέρονται από ένα σημείο του φυτού σε ένα άλλο. Δρουν ως μεταφορείς μηνυμάτων, επιτρέποντας την ανταλλαγή πληροφοριών μεταξύ οργάνων και ιστών. Πολλές φορές επιτελούν ρόλο τοπικού μεταφορέα σιγνάλων κατά τη διάρκεια βιοτικών και αβιοτικών περιβαλλοντολογικών αλλαγών.

Μια από τις ομάδες των φυτοορμονών είναι οι γιββερελλίνες (GA). Οι φυτοορμόνες δεν απαντώνται μέσα στο φυτό σε ελεύθερη μορφή, αλλά σχηματίζουν συνήθως σύμπλοκα με σάκχαρα ή αμιδικές ομάδες. Ελέγχουν πολλές αναπτυξιακές διεργασίες συμπεριλαμβανομένου της βλάστησης των σπερμάτων και το σχηματισμό της ρίζας, του βλαστού και των ανθέων (Olszewski και συνεργάτες 2002). Κέντρα παραγωγής των γιββερελλινών αποτελούν οι καταβολές των φύλλων, το ακραίο μερίστωμα, οι κορυφές των ριζών όπως επίσης και οι αναπτυσσόμενοι καρποί και σπόροι. Έχει αποδειχθεί ότι προκαλούν διέγερση της κυτταρικής διαίρεσης και επιμήκυνσης.

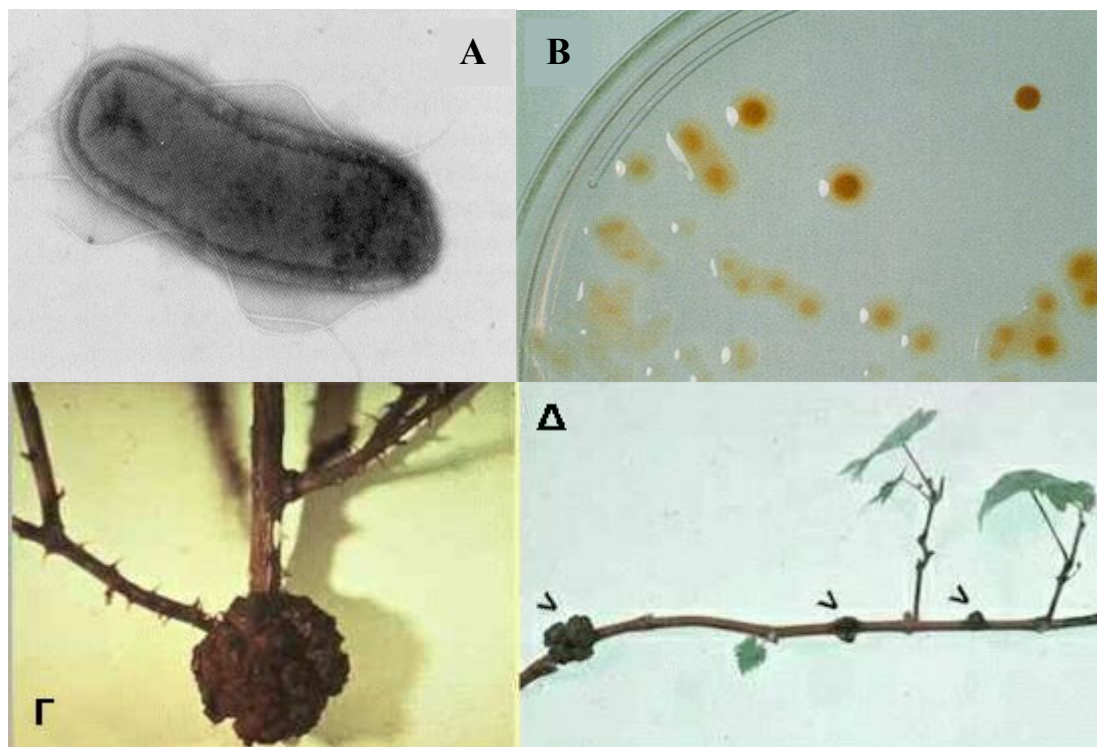
Στα φυτά τα σάκχαρα εκπληρώνουν βασικές λειτουργίες, ως κύρια πηγή ενέργειας, ως υποστρώματα για τη σύνθεση των πολυμερών, ως μεταφορικές και αποθηκευτικές ενώσεις ή ως πρόδρομες ουσίες του άνθρακα που απαιτούνται για ένα ευρύ αριθμό αναβολικών και καταβολικών αντιδράσεων. Επηρεάζουν τη βλάστηση, την ανάπτυξη έως και την έκφραση των γονιδίων, αν και λίγα είναι γνωστά για τους μηχανισμούς μέσω των οποίων τα φυτά αντιδρούν σε αυτά (Rognoni και συνεργάτες 2007).

1.5 Το βακτήριο *Agrobacterium tumefaciens*.

Το *Agrobacterium tumefaciens* είναι ένα αρνητικό κατά Gram ραβδόμορφο βακτήριο και ανήκει στην οικογένεια των *Rhizobiaceae*. Το γονιδίωμα του είναι αλληλουχημένο (περίπου 5.500 γονίδια) και αποτελείται από ένα γραμμικό και ένα κυκλικό χρωμόσωμα (Ti-πλασμίδιο). Είναι ένα βακτήριο του εδάφους και προκαλεί την ασθένεια του κορωνωτού κάλλου (Εικόνα 1.8) (Deacon 2002). Μπορεί να προσβάλει σχεδόν όλα τα δικοτυλήδονα φυτά και μερικά μονοκοτυλήδονα της οικογένειας *Liliaceae* και *Amaryllideae* (De Cleene and De Ley 1976, De Cleene 1985).

Η ικανότητα του *Agrobacterium tumefaciens* να μολύνει άλλους οργανισμούς εξαρτάται άμεσα από την ύπαρξη σε αυτό ενός μεγάλου πλασμιδίου μεγέθους 200-250 kb, του Ti-πλασμιδίου (Εικόνα 1.9) (Sforza και συνεργάτες 2002). Το πλασμίδιο αυτό διατηρείται μέσα στο *Agrobacterium*, μόνο όταν αυτό αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες κάτω των $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($28\text{ }^{\circ}\text{C}$ άριστη). Γενετικές αναλύσεις έδειξαν ότι, δύο περιοχές (Vir-περιοχή και T-DNA περιοχή) του Ti-πλασμιδίου είναι υπεύθυνες για την ικανότητά του να μολύνει φυτικά κύτταρα (Χατζόπουλος 2001). Η Vir περιοχή περιέχει μια σειρά γονιδίων τα οποία όταν επάγονται παράγουν τις Vir πρωτεΐνες, οι οποίες με τη σειρά τους μεταφέρουν το τμήμα του DNA της T-DNA περιοχής στο γονιδίωμα του φυτού. Η T-DNA περιοχή του Ti-πλασμιδίου περιέχει γονίδια τα οποία εκφράζονται μέσα στο φυτό. Μερικά από αυτά τα γονίδια είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση ή τροποποίηση βασικών φυτικών αυξητικών παραγόντων, όπως για παράδειγμα αυξίνες και κυτοκινίνες. Η ρυθμιστική έκφραση αυτών των T-DNA γονιδίων τροποποιεί την κανονική διαφοροποίηση των φυτικών κυττάρων και

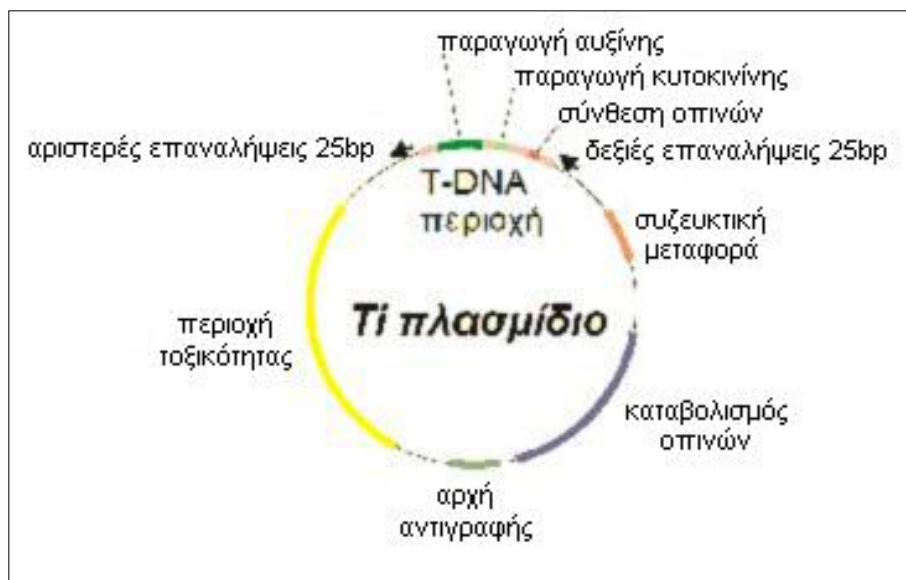
οδηγεί σε νεοπλασία. Άλλα γονίδια της T-DNA περιοχής κατευθύνουν την παραγωγή ειδικών αμινοξέων και παραγώγων σακχάρων (οπίνες), τα οποία αναγνωρίζονται και καταβολίζονται αποκλειστικά και μόνο από το *Agrobacterium tumefaciens*. Τα T-DNA γονίδια δεν συμβάλλουν στη μεταφορά και ενσωμάτωση της περιοχής αυτής στο γονιδίωμα του φυτού. Η διαδικασία μεταφοράς και ενσωμάτωσης οφείλεται στα γονίδια της Vir περιοχής του Ti-πλασμιδίου.



Εικόνα 1.8 Το βακτήριο *Agrobacterium tumefaciens*. Α) Ραβδόμορφο βακτήριο με ένα έως έξι μαστίγια, Β) Χαρακτηριστικές αποικίες του βακτηρίου σε υδρογονανθρακικό θρεπτικό υπόστρωμα, Γ), Δ) Όγκοι σε τριανταφυλλιά και σε αμπέλι αντίστοιχα που έχουν δημιουργηθεί από το *Agrobacterium tumefaciens*. (Πηγές: <http://www.biology.ed.ac.uk> και <http://www.cals.ncsu.edu>)

Τα Vir γονίδια ρυθμίζονται από ένα πολύπλοκο σύστημα χημειοϋποδοχέων, το οποίο είναι ικανό να αναγνωρίζει φυτικούς μεταβολίτες (ακετοσυριγκόνη) που παράγονται κατά τη διάρκεια βιοσύνθεσης των λιγνινών των κυτταρικών τοιχωμάτων. Έτσι κατά αυτό τον τρόπο ο τραυματισμός του φυτού δεν επιτρέπει μόνο την είσοδο του *Agrobacterium tumefaciens*, αλλά και την επαγωγή των Vir

γονιδίων από τις νεοσυντιθέμενες λιγνίνες. Η μεταφορά του T-DNA εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις συνοριακές αλληλουχίες που βρίσκονται στα δύο άκρα του. Πρόκειται για δύο πολύ όμοιες σε σειρά επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες μεγέθους 25 ζ.β. οι οποίες αναγνωρίζονται από τις Vir πρωτεΐνες. Η διαδικασία αντιγραφής της T-DNA περιοχής οδηγεί στην παραγωγή μιας σειράς μονόκλωνων και δίκλωνων T-DNA ενδιάμεσων προϊόντων, από τα οποία πιθανότατα το μονόκλωνο T-DNA μόριο μεταφέρεται στο φυτό μέσω μεμβρανικών πόρων που δημιουργούνται από τα προϊόντα των Vir γονιδίων. Οποιαδήποτε λοιπόν DNA αλληλουχία βρίσκεται μεταξύ των δύο T-DNA συνοριακών αλληλουχιών μπορεί να μεταφερθεί με παρόμοιο τρόπο στο φυτό παρουσία των Vir πρωτεϊνών. Στα φυτά, η μονόκλωνη T-DNA αλυσίδα μεταφέρεται στον πυρήνα του μολυσμένου κυττάρου από μια Vir πρωτεΐνη, η οποία παραμένει ομοιοπολικά συνδεδεμένη στο 5' άκρο του μορίου. Η μεταφορά του συμπλόκου (Vir πρωτεΐνης–μονόκλωνης T-DNA αλυσίδας) στον πυρήνα, οφείλεται στο πεπτίδιο συνθήματος που φέρει η Vir πρωτεΐνη στο αμινοτελικό της άκρο. Πιστεύεται ότι η ίδια πρωτεΐνη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο και στην ενσωμάτωση της T-DNA αλυσίδας στο γονιδίωμα του φυτού.



Εικόνα 1.9 Συνοπτική διαγραμματική απεικόνιση του Ti-πλασμιδίου. (Πηγή: <http://www.bios.net>)

Σήμερα υπάρχει μια πληθώρα τροποποιημένων στελεχών *Agrobacterium tumefaciens*, τα οποία φέρουν Ti-πλασμίδια απαλλαγμένα από την T-DNA περιοχή, διατηρώντας όμως τα γονίδια της Vir περιοχής. Η εισαγωγή σε αυτά τα στελέχη, ειδικά κατασκευασμένων δυαδικών φορέων που φέρουν επιθυμητές DNA αλληλουχίες μεταξύ των δύο συνοριακών, επιτρέπει την εύκολη κατευθυνόμενη γενετική τροποποίηση πολλών φυτών.

1.5.1 Αλληλεπίδραση φυτού - *Agrobacterium tumefaciens*.

α) Φάση έναρξης της αναγνώρισης του φυτού από το *Agrobacterium tumefaciens*.

Στο έδαφος το *Agrobacterium tumefaciens* απαντάται συνήθως στη ριζόσφαιρα, αλλά έχει βρεθεί και μέσα στο αγγειακό σύστημα πολλών φυτών (Kerr 1969, Burr and Katz 1983). Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες στην αρχική αναγνώριση του φυτού από το *Agrobacterium tumefaciens* είναι η χημειοταξία (Shaw και συνεργάτες 1989). Όπως και πολλά άλλα βακτήρια έτσι και το *Agrobacterium* έλκεται χημειοτακτικά από ένα ευρύ φάσμα σακχάρων και αμινοξικών συστατικών (Loake και συνεργάτες 1988). Παρόλα αυτά έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει και μια σειρά δευτερογενών μεταβολιτών του φυτού, όπως για παράδειγμα ενδιάμεσα προϊόντα της βιοσύνθεσης των λιγνινών. Επιπρόσθετα έχει αποδειχθεί ότι, παρουσία των VirA και VirG πρωτεϊνών, το *Agrobacterium* είναι ικανό να αναγνωρίζει διάφορα φαινολικά παράγωγα (ακετοσυριγκόνη) που εκκρίνονται από το φυτό στο σημείο τραυματισμού (Pitzschke and Hirt 2010). Η αναγνώριση αυτή γίνεται από χαμηλής συγγένειας υποδοχείς, που βρίσκονται στη μεμβράνη του *Agrobacterium tumefaciens* και είναι ειδικοί για τα φαινολικά παράγωγα (Parke και συνεργάτες 1987).

β) VirA και VirG: ρυθμιστικά γονίδια-κλειδιά του *Agrobacterium tumefaciens*.

Τόσο το VirA όσο και το VirG γονίδιο κωδικοποιούν για μια πρωτεΐνη. Η VirA, πρωτεΐνη είναι ένας διαμεμβρανικός χημειοϋποδοχέας. Η VirG πρωτεΐνη είναι ένας μεταγραφικός ενεργοποιητής, που φωσφορυλιώνεται από τη VirA πρωτεΐνη. Συγκεκριμένα, η VirG πρωτεΐνη μετά την ενεργοποίηση της, συνδέεται στις vir-box

(κουτί *vir*) αλληλουχίες της περιοχής του προαγωγέα των *vir* γονιδίων και ενεργοποιεί τη μεταγραφή όλων των *vir* γονιδίων (Winans και συνεργάτες 1986). Επιπρόσθετα έχει βρεθεί ότι οι δύο αυτές πρωτεΐνες εμπλέκονται και στη ρύθμιση γενικότερων λειτουργιών του πλασμιδίου, όπως για παράδειγμα στη βακτηριακή σύντηξη και στον καταβολισμό των οπινών. Λεπτομερής ανάλυση της *virA* κωδικής περιοχής έδειξε ότι η αμινοτελική περιπλασματική περιοχή της πρωτεΐνης εμπλέκεται στην απόκριση σε σάκχαρα και μεταβολές του pH, ενώ ο περιπλασματικός βρόχος μεταξύ των δυο διαμεμβρανικών περιοχών είναι υπεύθυνος για την αναγνώριση των φαινολικών παραγώγων του φυτού (Knight και συνεργάτες 2010).

Η VirA πρωτεΐνη, σαν χημειοϋποδοχέας που είναι, ενεργοποιείται όπως αναφέρθηκε παραπάνω από διάφορα σάκχαρα, όπως για παράδειγμα η D-γαλακτόζη, η D-γλυκόζη και η D-ξυλόλη. Τα σάκχαρα αυτά είναι προϊόντα αποικοδόμησης πολυσακχαριτών των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών (McNeil και συνεργάτες 1984). Η αναγνώριση των σακχάρων αυτών από άλλα βακτήρια, περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση ειδικών γλυκο- και γαλακτο- συνδεόμενων πρωτεϊνών (GBPs) με την περιπλασματική περιοχή της Trg μεθυλοσυνδεόμενης διαμεμβρανικής πρωτεΐνης. Η αλληλεπίδραση αυτή ενεργοποιεί το μηχανισμό φωσφορυλίωσης, ο οποίος εμπλέκει μια πρωτεϊνική κινάση, τη CheA. Η ρύθμιση της δραστηριότητας της Trg και άλλων διαμεμβρανικών πρωτεϊνών γίνεται από τη CheA με τη διαδικασία της μεθυλίωσης και απομεθυλίωσης. Η περιπλασματική περιοχή της VirA πρωτεΐνης είναι ομόλογη με αυτή της Trg πρωτεΐνης, επιτρέποντας της έτσι να αλληλεπιδρά με γλυκο- και γαλακτο- συνδεόμενες πρωτεΐνες. Ο περιπλασματικός βρόχος μεταξύ των δυο διαμεμβρανικών περιοχών της VirA πρωτεΐνης, που σχηματίζεται από την υδρόφοβη περιοχή της πρωτεΐνης, διαδραματίζει όπως αναφέρθηκε σημαντικό ρόλο στην απόκριση σε φαινολικά παράγωγα που εκκρίνονται από το φυτό. Τα αγροβακτήρια που βρίσκονται στη ριζόσφαιρα είναι ικανά να αναγνωρίσουν φαινολικά παράγωγα σε συγκεντρώσεις μικρότερες από 10^{-8} M. Η συγκέντρωση αυτή δεν είναι ικανή να προκαλέσει φωσφορυλίωση της VirG από την VirA. Καθώς όμως τα αγροβακτήρια πλησιάζουν την πηγή χημειοτακτικά, η συγκέντρωση των φαινολικών παραγώγων αυξάνει από 10^{-8} σε 10^{-6} , οδηγώντας στην άμεση ενεργοποίηση της μεταγραφής των *vir* γονιδίων (Shaw και συνεργάτες 1989).

γ) Επαγωγή και λειτουργία των υπόλοιπων *vir* γονιδίων του *Agrobacterium tumefaciens*.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η φωσφορυλίωση της VirG πρωτεΐνης από τη VirA οδηγεί στην επαγωγή της μεταγραφής και των υπολοίπων *vir* γονιδίων, του *virB*, *virC*, *virD* και *virE*. Γενετικές αναλύσεις έδειξαν ότι τα τέσσερα αυτά γονίδια είναι σημαντικά για τη μεταφορά του T-DNA στο γονιδίωμα του φυτού. Η VirB περιοχή συνιστά ένα οπερόνιο, το οποίο κωδικοποιεί για 11 πρωτεΐνες, από τις οποίες οι 9 είναι ιδιαίτερα υδρόφοβες. Όλες οι πρωτεΐνες του οπερονίου αυτού δεν έχουν την ίδια λειτουργία. Ορισμένες από αυτές φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό μεμβρανικών πόρων, από όπου θα περάσει το μονόκλωνο T-DNA μόριο. Άλλες πάλι φαίνεται να εμπλέκονται στην παραγωγή ή υδρόλυση του ATP (VirB4, VirB11) (Atmakuri και συνεργάτες 2004). Η VirB4 είναι πιθανότατα μια μεμβρανική ATPάση, ενώ η VirB11 φέρει περιοχές σύνδεσης για μονο-νουκλεοτίδια και ATP (Christie και συνεργάτες 1989). Οι VirB9 και VirB10 πρωτεΐνες είναι πιθανότατα δομικά συστατικά των μεμβρανικών πόρων, καθώς έχουν απομονωθεί από μεμβρανικά τμήματα (Sivanesan και συνεργάτες 2010).

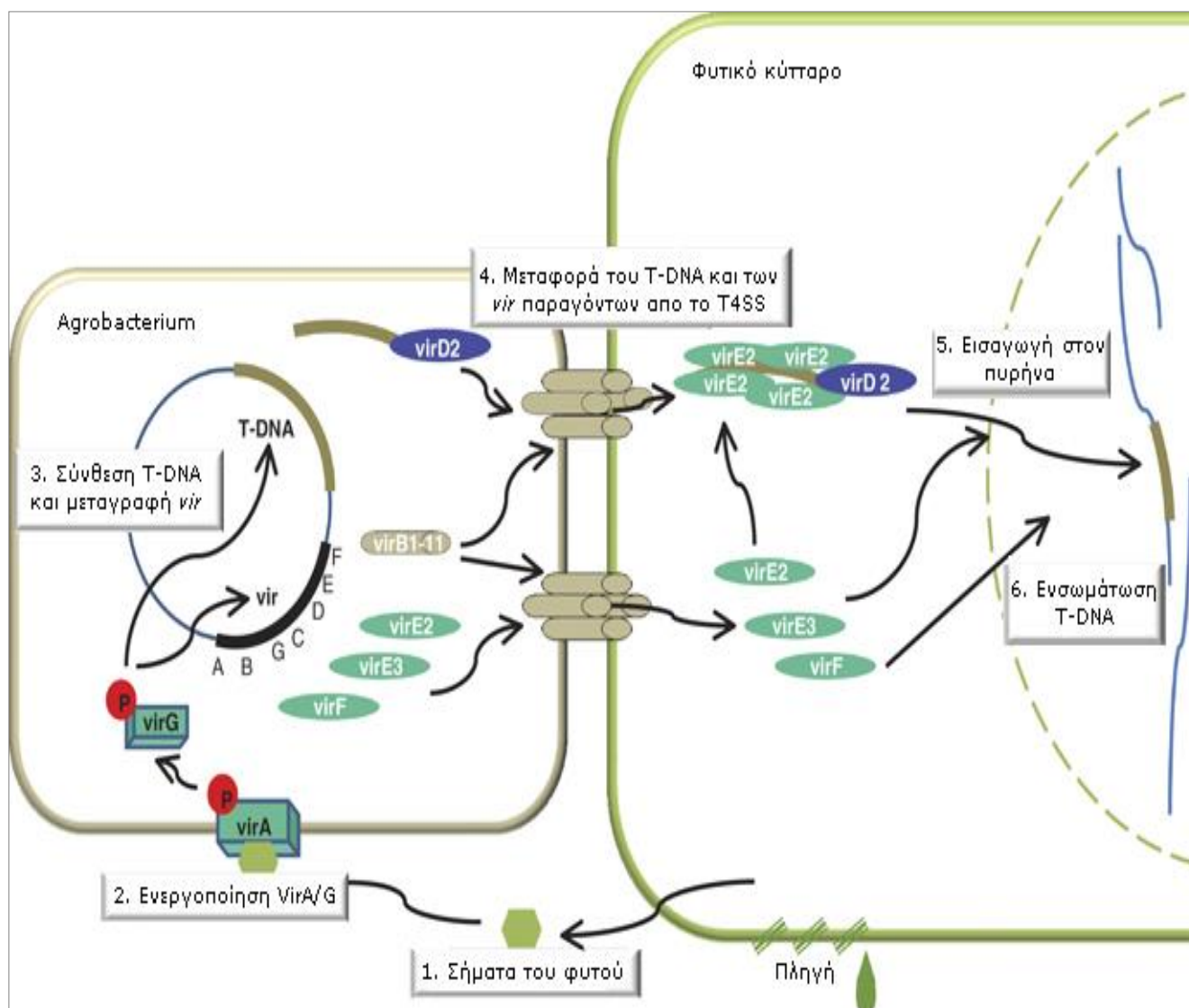
Η VirD περιοχή κωδικοποιεί για τέσσερις πρωτεΐνες (Porter και συνεργάτες 1987), από τις οποίες οι VirD1 και VirD2 εμπλέκονται στην αναγνώριση των T-DNA συνοριακών αλληλουχιών. Η VirD1 πρωτεΐνη συνδέεται εξειδικευμένα στο αριστερό συνοριακό, ενώ η VirD2 πριν τη σύνδεση της με το δεξί συνοριακό δημιουργεί μια εγκοπή στη μια από τις δυο αλυσίδες του T-DNA (Hwang και συνεργάτες 2006). Ο ρόλος των VirD3 και VirD4 είναι ακόμα άγνωστος. Παρόλα αυτά πιθανολογείται ότι οι δύο αυτές πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με το T-DNA και το οδηγούν διαμέσου της βακτηριακής μεμβράνης (Escudero και συνεργάτες 2006). Η VirC περιοχή κωδικοποιεί για δύο πρωτεΐνες (Yanofsky and Nester 1986). Η VirC1 είναι μια πρωτεΐνη που ενισχύει τη δράση εγκοπής της μιας T-DNA αλυσίδας από το σύμπλοκο VirD1-D2. Μετά τη δημιουργία εγκοπής στο δεξί συνοριακό του T-DNA, ακολουθεί αντιγραφή της μίας αλυσίδας με εκτόπιση κλώνου και απελευθέρωση της μονόκλωνης T-DNA αλυσίδας.

Σε αυτό το στάδιο πιθανόν να εμπλέκονται και πρωτεΐνες των *virE* γονιδίων. Η VirE περιοχή κωδικοποιεί για δύο πρωτεΐνες, τη VirE1 και τη VirE2. Η VirE2 είναι

μια πρωτεΐνη που συνδέεται με το μονόκλωνο DNA. Η δράση της VirE2 πρωτεΐνης πιθανόν να εξαρτάται από τη μικρή VirE1 με την οποία δημιουργεί σταθερά τετραμερή σύμπλοκα. Πιθανολογείται ότι η λειτουργία της είναι η προστασία του μονόκλωνου T-DNA μορίου από νουκλεάσες (García-Rodríguez και συνεργάτες 2006). Επιπρόσθετα συμβάλλει στη σωστή αναδίπλωση του μονόκλωνου T-DNA μορίου, η οποία είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική του μεταφορά μέσα στον πυρήνα του φυτικού κυττάρου (Gietl και συνεργάτες 1987, Christie και συνεργάτες 1988, Dym και συνεργάτες 2008) (Εικόνα 1.10). Γενετικές αναλύσεις έδειξαν ότι μεταλλαγή στην περιοχή των *VirB* και *VirD* γονιδίων έχει σαν αποτέλεσμα το Ti-πλασμίδιο να χάνει την ικανότητα μεταφοράς του T-DNA (Vergunst και συνεργάτες 2003). Αντίθετα, μετάλλαξη στην περιοχή των *VirC* και *VirE* γονιδίων είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση της μολυσματικής ικανότητας του *Agrobacterium* (Klee και συνεργάτες 1983). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν, ότι τα *VirB* και *VirD* γονίδια είναι απόλυτα αναγκαία για τη μεταφορά του T-DNA, ενώ τα *VirC* και *VirE* γονίδια πιθανότατα να συμμετέχουν σε επικουρικές λειτουργίες. Η έκφραση όμως όλων αυτών των οπερονίων (*virB*, *virD*, *virC* και *virE*) βρίσκεται όπως αναφέρθηκε κάτω από τον έλεγχο των *VirA* και *VirG* πρωτεϊνών.

δ) Μεταφορά και ενσωμάτωση του T-DNA του *Agrobacterium tumefaciens* στο γονιδίωμα του φυτού.

Η διαδικασία μεταφοράς του T-DNA μέσα στο φυτικό κύτταρο είναι άγνωστη. Η επικρατέστερη υπόθεση είναι ότι στο 5' άκρο του T-DNA συνδέεται ομοιοπολικά μια ενεργοποιημένη VirD2 πρωτεΐνη, ενώ όλο το μόριο καλύπτεται και προστατεύεται από μόρια της πρωτεΐνης VirE2. Η VirD2 πρωτεΐνη περιέχει τουλάχιστον 3 πεπτίδια σήματος. Το πεπτίδιο σήματος που βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης είναι αρκετό για να μεταφέρει το σύμπλοκο στον πυρήνα (Wang και συνεργάτες 1990). Καθώς η άμεση παρακολούθηση της μεταφοράς του T-DNA μορίου στον πυρήνα είναι πολύ δύσκολο να γίνει, όλες οι γνώσεις όσον αφορά τη διαδικασία αυτή, βασίζονται σε μελέτες της δομής και της διασποράς του T-DNA μορίου στο μετασχηματισμένο φυτό.



Εικόνα 1.10 Σχηματική παράσταση όπου φαίνεται η αλληλεπίδραση του *Agrobacterium tumefaciens* με το φυτικό κύτταρο και ο μηχανισμός μεταφοράς του DNA. 1) Το φυτό εκκρίνει στο σημείο τραυματισμού φαινολικά παράγωγα τα οποία αναγνωρίζονται από τα βακτηριακά κύτταρα. 2) Οι πρωτεΐνες VirA που είναι μεμβρανικοί χημειούποδοχείς συνδέονται με τα φαινολικά παράγωγα και φωσφορυλιώνουν τη VirG πρωτεΐνη. 3) Οι φωσφορυλιωμένες VirG πρωτεΐνες ενεργοποιούν με τη σειρά τους τη μεταγραφή όλων των *Vir* γονιδίων. Η μια από τις δύο αλυσίδες του T-DNA αντιγράφεται. 4) Το T-DNA και οι Vir πρωτεΐνες μεταφέρονται με τη βοήθεια του τύπου 4 εκκριτικού συστήματος (T4SS). 5) Το T-DNA σύμπλοκο εισάγεται στον πυρήνα του φυτικού κυττάρου όπου 6) το T-DNA ενσωματώνεται στο γονιδίωμα. (Pitzschke and Hirt 2010).

Κυτταρολογική και γενετική χαρτογράφηση της ενσωμάτωσης του T-DNA που έγινε σε διάφορα φυτικά είδη, έδειξε ότι η θέση ενσωμάτωσης του T-DNA στο γονιδίωμα του φυτού είναι τυχαία (Chyi και συνεργάτες 1986). Έχει διαπιστωθεί όμως, ότι η ενσωμάτωση γίνεται σχεδόν πάντα σε ευχρωματινικές περιοχές του γονιδιώματος. Σε περιοχές δηλαδή που παρουσιάζουν έντονη μεταγραφική δραστηριότητα. Αναφορικά με το μετασχηματισμό του *Arabidopsis thaliana*, ο αριθμός των αντιγράφων που ενσωματώνονται κυμαίνεται από 1 έως 6. Μελέτες που έγιναν έδειξαν ότι τουλάχιστον το 30% των φυτών, περιείχαν ένα μόνο αντίγραφο του T-DNA στο γονιδίωμα τους (Koncz και συνεργάτες 1989). Το T-DNA συνήθως ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του ξενιστή ως ένα μόνο πλήρους μήκους ή κολοβό μόριο, καθώς και ως πολλαπλά μόρια συνδεδεμένα μεταξύ τους με διάφορους προσανατολισμούς (Tzfira και συνεργάτες 2004). Λεπτομερείς μελέτες, που έγιναν σε διαγονιδιακά φυτά που περιείχαν μόνο ένα αντίγραφο του T-DNA στο γονιδίωμα τους, έδειξαν ότι πιθανότατα η ενσωμάτωση του T-DNA να παρεμβάλλεται στο μηχανισμό της μεταγραφής. Το γεγονός αυτό δεν σημαίνει υποχρεωτικά ότι η ενσωμάτωση πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια της μεταγραφής, αλλά ότι η ενσωμάτωση λαμβάνει χώρα σε περιοχές του γονιδιώματος που παρουσιάζουν χαλαρή δομή, όπως συμβαίνει στις περιοχές που γίνεται μεταγραφή, αντιγραφή και επιδιόρθωση του DNA. Για να διευκολυνθούν τα μοριακά γεγονότα που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της ενσωμάτωσης του T-DNA, καθώς επίσης και τα σημεία που γίνεται ο ανασυνδυασμός, μια σειρά από T-DNA που είχαν ενσωματωθεί σε φυτά, αποκόπηκαν και απομονώθηκαν από αυτά και μελετήθηκαν λεπτομερώς (Mayerhhofer και συνεργάτες 1991). Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι η ενσωμάτωση του T-DNA είναι πιθανότατα ένα γεγονός μη ομόλογου ανασυνδυασμού. Ο ανασυνδυασμός αυτός μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο τρόπους. Ο πρώτος περιλαμβάνει το μηχανισμό του «κλασικού» μη ομόλογου ανασυνδυασμού που γίνεται κατά την ενσωμάτωση οποιουδήποτε DNA μορίου στο γονιδίωμα ενός φυτού. Ο δεύτερος μηχανισμός πιθανολογεί ότι η VirD2 πρωτεΐνη που βρίσκεται συνδεδεμένη στο 5' άκρο του T-DNA έχει κάποια λειτουργία λιγάσης, καταλύοντας την αντίδραση συγκόλλησης του 5' άκρου του T-DNA με ένα ελεύθερο 3' άκρο που βρίσκεται στο DNA του φυτού (Gelvin 2003).

Και οι δύο μηχανισμοί έχουν σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία μικρών ελλειμμάτων του DNA κατά τη διάρκεια της ενσωμάτωσης. Η ενσωμάτωση χωρίς τη συμμετοχή της VirD2 πρωτεΐνης έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία μικρών ή

μεγάλων ελλειμμάτων και στα δύο άκρα του T-DNA. Αντίθετα η ενσωμάτωση με τη συμμετοχή της VirD2 πρωτεΐνης οδηγεί σε ακριβή συγκόλληση του 5' άκρου του T-DNA με το DNA του φυτού διατηρώντας 1 ή 3 βάσεις από το δεξί 25 ζ.β. συνοριακού του T-DNA. Στην όλη διαδικασία λοιπόν μεταφοράς του T-DNA από το *Agrobacterium tumefaciens* στο φυτό υπάρχουν ακόμα πολλά αναπάντητα ερωτήματα. Παρόλα αυτά όμως, το σύστημα του *Agrobacterium* αποτελεί μέχρι σήμερα έναν από τους πιο δημοφιλείς τρόπους μεταφοράς γενετικού υλικού από έναν οργανισμό (φυτικό ή ζωικό) σε έναν άλλο φυτικό (Jones και συνεργάτες 2005).

1.6 Σκοπός της Διπλωματικής Εργασίας.

Στη συγκεκριμένη Διπλωματική Εργασία στόχος ήταν να μελετηθεί το γονίδιο *At5g48310* του *Arabidopsis thaliana* σε μοριακό και λειτουργικό επίπεδο γιατί μέχρι στιγμής ήταν ένα γονίδιο άγνωστης λειτουργίας. Για το συγκεκριμένο γονίδιο δεν υπήρχαν στοιχεία για την έκφραση και τη ρύθμιση του στη διεθνή βιβλιογραφία. Για το σκοπό αυτό αποφασίστηκε σειρά πειραμάτων τόσο *in silico* όσο και *in planta* που περιλάμβαναν την ακόλουθη προσέγγιση:

1. Ανάλυση των αλληλουχιών (DNA και πρωτεϊνών) του γονιδίου *At5g48310 in silico* με πακέτα επεξεργασίας βιολογικών δεδομένων.
2. Τη μελέτη της αναπτυξιακής έκφρασης του *At5g48310* του *Arabidopsis thaliana*.
3. Τη μελέτη του ιστοειδικού προτύπου έκφρασης του γονιδίου *in planta*.
4. Ανάλυση μεταλλαγμένων σειρών (Salk lines) με σκοπό το λειτουργικό χαρακτηρισμό του γονιδίου.
5. Πειραματικές δοκιμασίες για την έκφραση του γονιδίου *At5g48310* σε διάφορες χημικές ουσίες που προκαλούν κυτταρικό θάνατο καθώς και σε σάκχαρα και ορμόνες.
6. Επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων στην έκφραση του *At5g48310*.

Με την ανωτέρω προσέγγιση είναι δυνατόν να απαντηθούν ερωτήματα όπως το πού εκφράζεται το γονίδιο *At5g48310*, ποια είναι η λειτουργία του στο φυτό *Arabidopsis thaliana* και πως σχετίζεται αυτή με διάφορες χημικές ενώσεις, ορμόνες και σάκχαρα καθώς και με περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως είναι η υδατική καταπόνηση. Στη συνέχεια, περισσότερα συμπεράσματα είναι δυνατό να εξαχθούν από την περαιτέρω σύγκριση του υπό μελέτη γονιδίου με τα ομόλογά του καθώς και από την ύπαρξη του σε άλλους οργανισμούς. Υπάρχει πολύς δρόμος ακόμα να διανυθεί, ώστε να διαφωτιστεί πλήρως η λειτουργία του. Στο μέλλον σκόπιμο θα είναι να μελετηθεί η ανάπτυξη των φυτών κάτω από συνθήκες σκοταδίου και υπό την επίδραση θερμικής καταπόνησης.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Φυτικό υλικό και συνθήκες ανάπτυξης και καλλιέργειας.

Σαν υλικό για τα πειράματα του μοριακού και λειτουργικού χαρακτηρισμού του γονιδίου *At5g48310* χρησιμοποιήθηκε το φυτό *Arabidopsis thaliana* (οικότυπος *Columbia*). Το *A. thaliana* είναι ένα σταυρανθές το οποίο ανήκει στην οικογένεια *Brassicaceae*. Ενδείκνυται ιδιαίτερα για πειράματα βασικής έρευνας στα φυτά λόγω του μικρού μεγέθους, του μικρού κύκλου ζωής του, του μικρού γονιδιώματος, του μεγάλου αριθμού σπερμάτων που παράγει και των σχετικά εύκολων συνθηκών ανάπτυξής του. Έχοντας ειδικευτεί για εαρινή εφημερία, ήταν εύκολο να ανακαλυφθούν αρκετά εργαστηριακά στελέχη που χρειάζονται περίπου έξι εβδομάδες από τη βλάστηση των σπερμάτων μέχρι την παραγωγή ώριμων σπερμάτων. Επιπλέον η παραγωγή μεγάλου αριθμού σπερμάτων διευκολύνει τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων σε πειράματα γενετικής. Τέλος ο μετασχηματισμός του *Arabidopsis*, έχει γίνει διαδικασία ρουτίνας, χρησιμοποιώντας το βακτήριο *Agrobacterium tumefaciens* για την άμεση μεταφορά DNA στο γονιδίωμα του φυτού. Η απλούστατη τεχνική μετασχηματισμού της εμβάπτισης των ανθικών φορέων έχει αντικαταστήσει την ανάγκη για ιστοκαλλιέργειες και αναγέννησης του φυτού που εφαρμόζονταν παλαιότερα.

2.1.1 Συνθήκες καλλιέργειας του *Arabidopsis thaliana*.

Η ανάπτυξη των φυτών, έγινε τοποθετώντας σπέρματα *Arabidopsis thaliana* (οικότυπος *Columbia*) σε μείγμα χώματος (5 μέρη humo: 1 μέρος τύρφης: 1 μέρος βερμικουλίτη) σε κλίβανο επώασης ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία 22 °C, υγρασία 40% και με φωτοπερίοδο 16 ώρες φως / 8 ώρες σκοτάδι). Για την ανάπτυξη των φυτών κάτω από ασηπτικές συνθήκες, τα σπέρματα ενυδατώθηκαν για 48 ώρες στους 4 °C και κατόπιν αποστειρώθηκαν σε υδατικό διάλυμα αιθανόλης 70% κ.ο. για 3 λεπτά και εν συνεχεία σε υδατικό διάλυμα χλωρίνης 25% κ.ο για 5 λεπτά αντίστοιχα και ακολούθως ξεπλύθηκαν με αποστειρωμένο dH₂O για 1 λεπτό. Το ξέπλυμα των σπερμάτων επαναλήφθηκε άλλες 4 φορές. Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες και μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής (laminar flow) σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα MS. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε κλίβανο

επώασης ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία 22 °C, υγρασία 40% και με φωτοπερίοδο 16 ώρες φως / 8 ώρες σκοτάδι).

2.2 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από φυτά *Arabidopsis thaliana*.

Φρέσκο φυτικό υλικό (2 φύλλα από τη ροζέτα του *Arabidopsis thaliana*) ομογενοποιήθηκε παρουσία υγρού αζώτου σε κατάλληλο γουδί λειοτρίβησης. Ακολούθησε ομογενοποίηση του ιστού με ίσου όγκου διάλυμα εκχύλισης CTAB (προθερμασμένο στους 65 °C). Ελαφριά ανακίνηση και επώαση στο υδατόλουτρο στους 65 °C για 20 λεπτά. Στη συνέχεια για καθαρισμό προστέθηκε ίσος όγκος χλωροφορμίου - ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) και έντονη ανάμειξη. Φυγοκέντρωση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 2 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο. Προστέθηκαν 0,7 του όγκου ισοπροπανόλη. Ήπια ανακίνηση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρωση για 15 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και στο ίζημα που δημιουργήθηκε έγινε ξέπλυμα με 0,5 του όγκου κρύα αιθανόλη 75% κ.ο. Ήπια ανακίνηση και απομάκρυνση όλης της ποσότητας της αιθανόλης. Το δείγμα αφέθηκε στον πάγο να στεγνώσει για 20 λεπτά με ανοικτό το καπάκι. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 50 µl αποστειρωμένο ddH₂O.

2.3 Απομόνωση γονιδιωματικού RNA από το φυτό *Arabidopsis thaliana*.

Φρέσκο φυτικό υλικό (ολόκληρα φυτά ή τμήματα διαφόρων οργάνων του *Arabidopsis thaliana*) ομογενοποιήθηκε παρουσία υγρού αζώτου σε κατάλληλο γουδί λειοτρίβησης. Ακολούθησε ομογενοποίηση του ιστού με 400 µl διαλύματος ομογενοποίησης (HOMO) και 400 µl φαινόλης (pH= 8). Έντονη ανάμειξη του μείγματος. Φυγοκέντρωση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο. Προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης - χλωροφορμίου - ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1) και έντονη ανάμειξη. Επαναλήφθηκε φυγοκέντρωση για 3 λεπτά. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωληνάριο, χωρίς να διαταραχθεί η ενδιάμεση φάση. Προσθήκη ξανά ίσου όγκου φαινόλης - χλωροφορμίου - ισοαμυλικής αλκοόλης. Έντονη ανάμειξη. Επανάληψη της φυγοκέντρωσης. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωληνάριο και προσθήκη 400 µl χλωροφορμίου

- ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) και έντονη ανάμειξη. Φυγοκέντρωση για 2 λεπτά. Επανάληψη της προσθήκης χλωροφορμίου - ισοαμυλικής αλκοόλης και φυγοκέντρωση. Ακολούθησε κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων με την προσθήκη στο υπερκείμενο 800 μl παγωμένης αιθανόλης (100% κ.ο.) και 1/10 του όγκου 3 M CH_3COONa pH 4,7. Ακολούθησε επώαση στους -20°C για 12 ώρες και φυγοκέντρωση του δείγματος στις 13.000 στροφές/λεπτό για 15 λεπτά στους 4°C . Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και στο ίζημα προστέθηκε 500 μl αιθανόλης 75% κ.ο. Ακολούθησε φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στις 13.000 στροφές/λεπτό στους 4°C . Απομάκρυνση όλης της ποσότητας της αιθανόλης, ενώ το δείγμα αφέθηκε στον πάγο να στεγνώσει για 20 λεπτά με ανοικτό το καπάκι. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 50 μl αποστειρωμένου ddH_2O . Για να ελεγχθεί η συγκέντρωση αλλά και η ποιότητα των νουκλεϊκών οξέων που απομονώθηκαν ακολούθησε ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης.

Για την απομόνωση καθαρού RNA ακολούθησε επίδραση με ένζυμο DNAase στο δείγμα. Ποσότητα ολικού RNA ίση με 20 μg (η συγκέντρωση του υπολογίστηκε από το πήκτωμα αγαρόζης συγκρινόμενο με κατάλληλο μάρτυρα γνωστής συγκέντρωσης) προστέθηκε σε σωληνάριο Eppendorf. Ακολούθησε προσθήκη 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος DNAase 10X της εταιρείας Biolabs, 1 unit ενζύμου DNAase (10 unit/μl) και ddH_2O για τελικό όγκο 50 μl. Τα αντιδραστήρια επώαστηκαν στους 37°C , για 15 λεπτά. Εν συνεχεία προστέθηκε 1 μl EDTA 0,5 M και το σωληνάριο τοποθετήθηκε στους 65°C για 12 λεπτά. Ακολούθησε η προσθήκη 85 μl ddH_2O , 150 μl ισοπροπανόλη (100% κ.ο.) και 15 μl διαλύματος οξικού αμμωνίου 5 M. Παραμονή για 12 ώρες στους -20°C . Φυγοκέντρωση του δείγματος στις 10.000 στροφές/λεπτό για 20 λεπτά στους 4°C . Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και στο ίζημα προστέθηκε 1 ml αιθανόλης 75% κ.ο. Ακολούθησε φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στις 10.000 στροφές/λεπτό στους 4°C . Απομάκρυνση όλης της ποσότητας της αιθανόλης και το δείγμα αφέθηκε στον πάγο να στεγνώσει για 20 λεπτά με ανοικτό το καπάκι. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 50 μl αποστειρωμένου ddH_2O . Για να ελεγχθεί η συγκέντρωση αλλά και η ποιότητα του ολικού RNA που απομονώθηκε ακολούθησε ανάλυσή του σε πήκτωμα αγαρόζης.

2.4 Βακτηριακά κύτταρα και μετασχηματισμός.

α) Προετοιμασία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E.coli*.

Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί παραλλαγή του πρωτοκόλλου που περιγράφεται από τους Cohen και συνεργάτες (1972). Μονή αποικία κατάλληλου βακτηριακού στελέχους *E.coli* (DH5a) αναπτύχθηκε σε 10 ml υγρού θρεπτικού υποστρώματος LB για 12 ώρες στους 37 °C υπό ανάδευση. Το βακτηριακό αυτό στέλεχος χρησιμοποιείται συνήθως για την κλωνοποίηση πλασμιδίων, έχοντας υψηλή ικανότητα μετασχηματισμού. Εμβολιασμός 1 ml της παραπάνω καλλιέργειας σε κωνική φιάλη που περιέχει 200 ml θρεπτικού υποστρώματος LB. Η καλλιέργεια αναπτύχθηκε στους 37 °C υπό ανάδευση, έως ότου η οπτική πυκνότητα της φτάσει $OD_{550} = 0,5$. Η καλλιέργεια τοποθετήθηκε για 5 λεπτά στον πάγο και στη συνέχεια τα βακτηριακά κύτταρα κατακρημνίστηκαν με φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 6.000 στροφές/λεπτό στους 4 °C. Το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 80 ml παγωμένου διαλύματος Buffer 1. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 6.000 στροφές/λεπτό στους 4 °C. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 8 ml παγωμένου διαλύματος Buffer 2 και τοποθετήθηκε στον πάγο για 15 λεπτά. Το δείγμα, αφού αναμείχθηκε πολύ καλά, μοιράστηκε σε φιαλίδια Eppendorf (aliquots των 200 µl) και καταψύχθηκε αμέσως σε υγρό άζωτο. Η διατήρηση των «δεκτικών» πλέον βακτηριακών κυττάρων, για μακρά χρονικά διαστήματα ήταν δυνατή με την αποθήκευσή τους στους -80 °C.

β) Αποθήκευση για μεγάλα χρονικά διαστήματα βακτηριακών κυττάρων.

Μονή αποικία βακτηριακού στελέχους, το οποίο επρόκειτο να αποθηκευτεί, αναπτύχθηκε σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα LB (παρουσία κατάλληλων αντιβιοτικών) στους 37 °C για 12 ώρες, όσον αφορά το *E.coli* και στους 28 °C για 24 ώρες όσον αφορά το *Agrobacterium tumefaciens*. Ποσότητα 700 µl από την καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο Eppendorf. Ακολούθησε προσθήκη 400 µl υδατικού διαλύματος (πρόσφατα αποστειρωμένης) γλυκερόλης 60% κ.ο. Ανάμιξη του δείγματος και άμεση αποθήκευση στους -80 °C. Τα βακτήρια παραμένουν ζωντανά για τουλάχιστον 10 χρόνια.

γ) Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E.coli* με πλασμιδιακό DNA με θερμική καταπόνηση.

Η διαδικασία του μετασχηματισμού περιελάμβανε τα εξής στάδια: Σε 200 μl δεκτικών κυττάρων DH5a προστέθηκε 10-50 ng πλασμιδιακού DNA. Ήπια ανακίνηση και επώαση στον πάγο για 15 λεπτά. Ακολούθησε θερμική καταπόνηση, με τοποθέτηση σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 42 °C για 90 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια προστέθηκε 1 ml αποστειρωμένου υγρού θρεπτικού υποστρώματος LB, ανάμιξη του δείγματος, επώαση για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν επώαση σε υδατόλουτρο για 1 ώρα στους 37 °C. Τα κύτταρα κατακρημνίστηκαν σε φυγόκεντρο (μέγιστη ταχύτητα/λεπτό). Κατάλληλη ποσότητα κυττάρων (γύρω στα 30 μl) επιστρώθηκε με γυάλινη ράβδο σε τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα LB, που περιείχε ως δείκτη επιλογής αντιβιοτικό (χλωραμφαινικόλη ή καναμυκίνη). Εν συνεχεία τα τρυβλία επώαστηκαν ανάποδα για 12-16 ώρες στους 37 °C.

2.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από την *E.coli* με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου που περιγράφεται από τους Birnboim και Doly (1979). Μονή βακτηριακή αποικία, που περιείχε το προς απομόνωση πλασμίδιο, καλλιεργήθηκε σε 5 ml υγρό θρεπτικό υπόστρωμα LB στους 37 °C για 12 ώρες υπό ανάδευση και με την προσθήκη 5 μl κατάλληλου αντιβιοτικού. Στη συνέχεια 1,5 ml της καλλιέργειας μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο Eppendorf και φυγοκεντρήθηκε για 1 λεπτό στις 12.000 στροφές/λεπτό. Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 200 μl διαλύματος Solution 1. Προσθήκη 200 μl διαλύματος λύσης Solution 2. Έντονη ανάμιξη για 20 δευτερόλεπτα. Προσθήκη 150 μl διαλύματος Solution 3. Ανάμιξη και επώαση στον πάγο για 15 λεπτά. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε 10 λεπτά στις 12.000 στροφές/λεπτό. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρό φιαλίδιο Eppendorf. Προσθήκη 2 μl διαλύματος 10 mg/ml RNase A. Ισχυρή ανάδευση σε vortex και επώαση για 10 - 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε προσθήκη διπλάσιου όγκου (περίπου 1ml) 100% αιθανόλης. Ανάμιξη με vortex και φυγοκέντρηση του δείγματος για 5 λεπτά στις 12.000 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο

απομακρύνθηκε και προστέθηκε 200 μ l - 500 μ l υδατικού διαλύματος αιθανόλης 70%. Το δείγμα αναμίχθηκε ισχυρά σε vortex και ακολούθησε φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στις 12.000 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Η αλκοόλη απομακρύνθηκε και αφού στέγνωσε το δείγμα διαλυτοποιήθηκε σε 30 μ l ddH₂O.

2.6 Ανάλυση δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων (DNA) σε πήκτωμα αγαρόζης.

Η ανάλυση κλασμάτων νουκλεϊκών οξέων διαφορετικού μεγέθους και διαφορετικών διαμορφώσεων έγινε χρησιμοποιώντας την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Ο διαχωρισμός γραμμικών μορίων DNA είναι ανάλογος προς το μέγεθος των μορίων. Τα μόρια των νουκλεϊκών οξέων έγιναν ορατά στην αγαρόζη με τη βοήθεια χρωστικής που παρεμβλήθηκε μεταξύ των βάσεων του DNA. Η χρωστική αυτή ονομάζεται βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) και έχει την ιδιότητα να φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός. Η συγκέντρωση της αγαρόζης εξαρτάται από το μέγεθος των μορίων που πρόκειται να διαχωριστούν. Συνήθως ποικίλει από 0,7% έως 2% αγαρόζη (w/v).

Κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης προστέθηκε σε διάλυμα 1X TAE. Θέρμανση του διαλύματος σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρις ότου διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη και το διάλυμα καταστεί ομογενές. Το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε κατάλληλο δοχείο συσκευής ηλεκτροφόρησης με την ανάλογη χτένα και αφέθηκε να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου. Στα δείγματα που επρόκειτο να αναλυθούν προστέθηκε κατάλληλη κατά περίπτωση, ποσότητα χρωστικής COL1. Μετά την πήξη απομακρύνθηκε η χτένα και προστέθηκε κατάλληλος όγκος 1X TAE, που αποτέλεσε και το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στις ειδικές θέσεις του πηκτώματος και έλαβε χώρα η ηλεκτροφόρηση παρουσία συνεχούς τάσης 50-120 V, που ποικίλει ανάλογα με την επιθυμητή ταχύτητα διαχωρισμού, το μέγεθος του πηκτώματος και την περιεκτικότητα του σε αγαρόζη. Εν συνεχεία το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε φωτοστεγές δοχείο που περιείχε υδατικό διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου και βάφτηκε για 15 λεπτά. Ακολούθησε παρατήρηση και φωτογράφιση του πηκτώματος σε όργανο UV ακτινοβολίας. Εφόσον ο διαχωρισμός του κλάσματος, που επρόκειτο να απομονωθεί από τα υπόλοιπα ήταν ικανοποιητικός, η ζώνη του κλάσματος αφαιρέθηκε με τη βοήθεια νυστεριού. Το κομμάτι του πηκτώματος τοποθετήθηκε σε φιαλίδιο Eppendorf 0,5 ml και ακολούθησε

καθαρισμός του DNA από το πήκτωμα αγαρόζης με τη βοήθεια kit της MACHEREY-NAGEL.

2.7 Πέψη νουκλεϊκών οξέων με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

Συνήθως οι πέψεις δειγμάτων DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες λαμβάνουν χώρα σε σχετικά μικρούς όγκους από 20-50 μl . Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιελάμβανε τα εξής: Σε φιαλίδιο Eppendorf προστέθηκε κατάλληλος όγκος ddH₂O, 1/10 του όγκου 10X του κατάλληλου κατά περίπτωση ρυθμιστικού διαλύματος (ανάλογα με το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε), το προς εξέταση DNA και τέλος το ένζυμο περιορισμού (Πίνακας 2.1). Ανάμειξη του δείγματος και επώαση από 1-12 ώρες στους 37 °C σε υδατόλουτρο. Η άριστη θερμοκρασία δράσης διαφέρει μεταξύ των ενζύμων περιορισμού. Η πλειονότητα όμως λειτουργεί άριστα στους 37 °C.

Πίνακας 2.1 Ενδεικτική διαδικασία πέψης δείγματος DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

10X ρυθμιστικό διάλυμα	10%
Δείγμα DNA	μέγιστο 80%
Περιοριστική ενδονουκλεάση	μέγιστο 10%
ddH ₂ O	μέχρι 100%

2.8 Συγκόλληση τμημάτων DNA φυτικής προέλευσης σε πλασμιδιακό φορέα.

Η αντίδραση συγκόλλησης είναι μια αντίδραση κατά την οποία δίκλωνα μόρια DNA, με κολλώδη (5' ή 3' εξέχοντα άκρα) ή τυφλά άκρα ενώνονται μεταξύ τους. Η αντίδραση συγκόλλησης πραγματοποιήθηκε κάτω από συνθήκες που ευνοούν το σχηματισμό τέτοιων μορίων χιμαιρών. Η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων DNA και η χρήση αλκαλικής φωσφατάσης (στην περίπτωση που ο φορέας έχει κοπεί με ένα ένζυμο περιορισμού) διευκόλυναν κατά κανόνα το σχηματισμό τέτοιων μορίων.

2.8.1 Ενοποίηση τμημάτων με κολλώδη άκρα.

Ο πλασμιδιακός φορέας καθώς και το επιθυμητό DNA απομονώθηκαν και καθαρίστηκαν από πήκτωμα αγαρόζης όπως περιγράφηκε. Ο τελικός όγκος στον οποίο έλαβε χώρα η αντίδραση ήταν συνήθως 20 μl . Σε φιαλίδιο Eppendorf που βρισκόταν στον πάγο προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα DNA από τον πλασμιδιακό φορέα και από το ένθετο. Επιδιώχθηκε η αναλογία μορίων πλασμιδιακού φορέα και ενθέτου να είναι 1:1. Ο όγκος αυτών των δύο δεν έπρεπε να ξεπερνά τα 17 μl . Προσθήκη 2 μl 10X ρυθμιστικού διαλύματος TAKARA της αντίδρασης και εν συνεχεία ακολούθησε προσθήκη 1 μl DNA T4 λιγάσης (0,1 U/ μl , TAKARA). Ανάμιξη του δείγματος και επώαση του στους 14 °C για 4-12 ώρες.

2.9 Ανάλυση του γονιδίου *At5g48310* και των ομολόγων του με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).

Ένα γενικό πρωτόκολλο για την ενίσχυση τμημάτων DNA ήταν το ακόλουθο:

Συστατικά αντίδρασης	Πυκνό διάλυμα	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
Ρυθμιστικό διάλυμα PCR	10 x	5 μl	1x
dNTPs	10 mM	1,5 μl	300 μM
Ανωφορικός εκκινητής	10 μM	1,5 μl	300 nM
Κατωφορικός εκκινητής	10 μM	1,5 μl	300 nM
DNA μήτρα	-	-	100 ng
Taq polymerase (Invitrogen)	8,7 units/ μl	0,3 μl	2,6 units
ddH ₂ O	-	Έως 50 μl	-

Τα συστατικά της αντίδρασης τοποθετήθηκαν σε σωληνάριο χωρητικότητας 0,5 ml, κατάλληλο για αντιδράσεις PCR, στους 4 °C. Μόλις προστέθηκαν όλα, αναμείχθηκαν καλά, φυγοκεντρήθηκαν για λίγο και τοποθετήθηκαν σε κυκλοποιητή MJ Research PTC-200, ο οποίος ήταν προγραμματισμένος με το κατάλληλο πρόγραμμα.

Οι κύκλοι επιλέχθηκαν με βάση το ακόλουθο πρότυπο:

1 x	Αποδιάταξη του DNA μήτρα για 3 λεπτά, στους 94 °C.
10 x	Αποδιάταξη στους 94 °C, για 30''. Υβριδισμός εκκινητών συνήθως στους 45 – 65 °C ⁽¹⁾ , για 30''. Επιμήκυνση στους 72 °C ή 68 °C ⁽²⁾ , για 45'' έως 8 λεπτά. ⁽³⁾
15-20 x	Αποδιάταξη στους 94 °C, για 30''. Υβριδισμός εκκινητών συνήθως στους 45 – 65 °C ⁽¹⁾ , για 30''. Επιμήκυνση στους 72 °C ή 68 °C ⁽²⁾ , για 45'' έως 8 λεπτά ⁽³⁾ + 5'' ανά κύκλο.
1 x	Τελική επιμήκυνση προϊόντος στους 72 °C, για 7 λεπτά.

⁽¹⁾ Η θερμοκρασία υβριδισμού εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης (T_m) των εκκινητών, η οποία υπολογίζεται από τον τύπο: $T_m = (A+T)*2 + (G+C)*4$ °C.

⁽²⁾ Η θερμοκρασία επιμήκυνσης εξαρτάται από το μήκος των προϊόντων που αναμένονται. Για προϊόντα μέχρι 3 kb είναι 72 °C, ενώ για προϊόντα μεγαλύτερα είναι 68 °C.

⁽³⁾ Ο χρόνος επιμήκυνσης εξαρτάται από το μέγεθος του τμήματος DNA που ενισχύεται.

Οι PCR αντιδράσεις αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8% - 2% και αποθηκεύτηκαν στους -20 °C. Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR της παρούσας εργασίας δίνονται στον Πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR.

S48310-F1:	5' -d[CAGCGAAAACCTTAGAGGCACAG]-3'
S48310-R1:	5' -d[CAGCCATTTCCAAGATCCATCC]-3'
48310pGusF:	5' -d[TTGAGGATCCTTGTTAGCCGATTGTAGTTGG]-3'
48310pGusR:	5' -d[TTGACCATGGAGTTTTTCTCAGCTTGG]-3'

2.9.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε αποικίες *E.coli* - COLONY PCR.

Ο γρήγορος έλεγχος των τμημάτων DNA που είχαν εισέλθει σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς στο βακτήριο *E.coli*, έγινε με εφαρμογή της μεθόδου της

αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε αποικίες *E.coli*. Το πλασμίδιο έπρεπε να είναι υψηλού βαθμού αντιγραφής (high copy number). Διαφορετικά η παρουσία μιας αλληλουχίας και το μήκος της μπορούσε να καθοριστεί με την ανάπτυξη κάθε μιας αποικίας σε υγρή καλλιέργεια, απομόνωση του πλασμιδίου με διάφορα πρωτόκολλα που έχουν αναφερθεί και πέψεις του πλασμιδίου με διάφορα ένζυμα περιορισμού που αποκόπτουν την προς ανάλυση αλληλουχία και εν συνεχεία προχωρούν στο διαχωρισμό των τμημάτων που έχουν προκύψει με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης, διαδικασία σαφώς πιο χρονοβόρα.

Τυπική Αντίδραση COLONY PCR.

Ανάμιξη των αντιδραστηρίων σε πάγο. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής: 40,05 µl αποστειρωμένου ddH₂O, 5 µl 10X PCR buffer Invitrogen (500 mM KCl, 100 mM Tris - HCl (pH 9), 1% TritonX 100), 0,75 µl 100 mM MgCl₂, 1 µl 10 mM dNTPs (10 mM από dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 1,5 µl 10 µM forward primer, 1,5 µl 10 µM reverse primer, 0,2-1 µl Taq polymerase. Σε κάθε σωληνάριο της PCR που περιείχε τα αντιδραστήρια, προστέθηκε μικρή ποσότητα της αποικίας προς εξέταση. Αυτό επιτεύχθηκε με χρήση κίτρινου tip, αυτόματης πιπέτας που ακουμπούσε την αποικία και εν συνεχεία εμβαπτιζόταν στο μείγμα αντιδραστηρίων, ακολουθώντας ανάμιξη με πιπετάρισμα. Επαρκής ανάμιξη θα είχε ως αποτέλεσμα την ολοκληρωτική κυτταρική λύση και μεγάλη συγκέντρωση προϊόντος αντίδρασης. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν ειδικά μόρια ως προς την εξεταζόμενη αλληλουχία που φαίνονται στον Πίνακα 2.2 (48310pGusF και 48310pGusR). Εν συνεχεία τα σωληνάρια τοποθετήθηκαν σε κυκλοποιητή στον οποίο εισήχθη το πρόγραμμα που παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.3.

Πίνακας 2.3 Συνθήκες για τη μέθοδο της Colony PCR.

Αριθμός κύκλων	Χρόνος / θερμοκρασία T °C
1 κύκλος	5 λεπτά στους 94 °C
30 - 40 κύκλοι	0,30 λεπτά στους 94 °C
	0,30 λεπτά στους T °C (θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών) ⁽¹⁾
	1,30 λεπτά στους 72 °C
1 κύκλος	5 λεπτά στους 72 °C

⁽¹⁾ Η θερμοκρασία ήταν 53 °C για τη συγκεκριμένη αντίδραση και τους συγκεκριμένους εκκινητές.

2.9.2 Ενίσχυση του DNA ένθετου με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης Touchdown (TD - PCR).

Είναι μια μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με την οποία οι εκκινητές αποφεύγουν την ενίσχυση μη ειδικών αλληλουχιών (Korbie and Mattick 2008). Η θερμοκρασία υβριδισμού στα πρώτα βήματα ήταν πιο υψηλή από τη θερμοκρασία τήξης των εκκινητών και βαθμιαία μειώθηκε μέχρι να φτάσει τη βέλτιστη θερμοκρασία τους. Έτσι με αυτό τον τρόπο επιτρέπεται η ενίσχυση του επιθυμητού προϊόντος (Don και συνεργάτες 1991). Επίσης όλη η αντίδραση έγινε στον πάγο και ο συνολικός αριθμός των κύκλων της PCR ήταν 34. Παράμετροι οι οποίοι απέτρεψαν την εμφάνιση μη ειδικών ζωνών στο πήκτωμα. Οι συνθήκες για τη μέθοδο της Touchdown PCR ήταν οι ακόλουθες:

1. 94 °C για 2 λεπτά.
2. 94 °C για 30''.
3. 59 °C για 30'', μειωμένο κατά 0,5 °C για κάθε κύκλο.
4. 72 °C για 1.30'.
5. Επανάληψη των βημάτων 2-4 για άλλες 14 φορές.
6. 94 °C για 30''.
7. 53 °C για 30''.
8. 72 °C για 1.30'.
9. Επανάληψη των βημάτων 6-8 για άλλες 19 φορές.
10. 72 °C για 5 λεπτά.
11. 14 °C για πάντα.

2.9.3 Ανάλυση του γονιδίου *At5g48310* με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης της ανάστροφης μεταγραφής (RT – PCR).

Η διαδικασία της RT – PCR περιλαμβάνει δύο βήματα: Αρχικά παράγεται μονόκλωνο cDNA, με τη βοήθεια του ενζύμου της ανάστροφης μεταγραφάσης χρησιμοποιώντας ως μήτρα αγγελιοφόρο RNA και στη συνέχεια, το μονόκλωνο cDNA χρησιμεύει ως μήτρα για να γίνει μια συνηθισμένη PCR αντίδραση. Με την συμβατική PCR τα αποτελέσματα δεν ήταν τόσο ικανοποιητικά λόγω πιθανής

επιμόλυνσης. Έτσι ακολουθήθηκε η διαδικασία της ανάστροφης μεταγραφής RNA διαγονιδιακών φυτών του *Arabidopsis thaliana* (Reverse Transcription).

Αρχικά απομονώθηκε ολικό RNA από διάφορους φυτικούς ιστούς. Σε περίπου 20 µg από κάθε δείγμα ολικού RNA, επέδρασε το ένζυμο DNάση I, ώστε να καταστρέψει το DNA. Τα συστατικά της αντίδρασης και οι τελικές συγκεντρώσεις ήταν τα ακόλουθα:

Συστατικά αντίδρασης	Πυκνό διάλυμα	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
Ρυθμιστικό διάλυμα DNάσης I	10x	5 µl	1x
DNάση I (Biolabs)	2 units/µl	0,2 µl	0,4 units
Ολικό RNA	-	20 µl	20 µg
ddH ₂ O	-	Έως 50 µl	-

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 37 °C για 15 λεπτά. Προστέθηκε 1 µl 0,5 M EDTA το οποίο εμπόδισε την αποικοδόμηση. Ακολούθησε επώαση της αντίδρασης στους 65 °C για 15 λεπτά. Κατόπιν προστέθηκε 15 µl 5M NH₄OAc, 85 µl ddH₂O και 150 µl ισοπροπανόλης. Ακολούθησε κατακρήμνιση στους -20 °C για 12 ώρες. Το ολικό RNA καθίζησε στις 13.000 στροφές/λεπτό για 20 λεπτά στους 4 °C. Καθαρίστηκε με 1 ml 75% αιθανόλης, φυγοκεντρήθηκε για άλλα 10 λεπτά και διαλύθηκε σε 50 µl ddH₂O. Από αυτά, 1 µl αναλύθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης, για να επιβεβαιωθεί η ακεραιότητα του RNA και η πλήρης καταστροφή του DNA. Στη συνέχεια μετρήθηκε η συγκέντρωση του RNA με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου.

Ολικό RNA 2,5 µg, ελεύθερο από DNA, μεταγράφηκε ανάστροφα σε μονόκλωνο cDNA. Η διαδικασία έγινε σε δύο βήματα. Στο πρώτο βήμα το ολικό RNA, ελεύθερο από DNA και ο εκκινητής του ενζύμου της ανάστροφης μεταγραφής αποδιατάχθηκαν στους 65 °C για 5 λεπτά και μετά τοποθετήθηκαν στους 4 °C.

Τα συστατικά και οι συγκεντρώσεις σε αυτό το βήμα δίδονται από τον ακόλουθο πίνακα:

Συστατικά πρώτου βήματος	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
Εκκινητής Oligo dT17	0,5 µl	2 pmol
dNTPs (10 mM)	1 µl	1 mM
Ολικό RNA, ελεύθερο από DNA	4 µl	1 – 5 µg
ddH ₂ O	4,5 µl	

Στο δεύτερο βήμα προστέθηκαν τα ακόλουθα συστατικά στο σωλήνα Eppendorf του πρώτου βήματος:

Συστατικά δεύτερου βήματος	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
5x Ρυθμιστικό διάλυμα ανάστροφης μεταγραφάσης	4 µl	1x
Αναστολέας RNάσης	0,5 µl	20 units
PrimeScript TM Ανάστροφη μεταγραφάση	1 µl	100 – 200 units
ddH ₂ O	4,5 µl	
Τελικός όγκος πρώτου και δεύτερου βήματος 20 µl		

Η αντίστροφη μεταγραφή πραγματοποιήθηκε αρχικά στους 42 °C για 60 λεπτά και κατόπιν στους 70 °C για άλλα 15 λεπτά και διατηρήθηκε στους 4 °C. Για μακρά φύλαξη τα δείγματα διατηρήθηκαν στους –20 °C αφού προστέθηκαν 30 µl ddH₂O. Από το συνολικό όγκο των 20 µl της προηγούμενης αντίδρασης, μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για PCR 1-5 µl.

2.10 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων *Agrobacterium tumefaciens* με τη μέθοδο ψύξης-τήξης.

Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί παραλλαγή του πρωτοκόλλου που περιγράφεται από τους Holsters και συνεργάτες (1978) και Weigel και Glazebrook (2006). Μονή αποικία κατάλληλου βακτηριακού στελέχους

Agrobacterium (C58C1Rif^R pGV3101) αναπτύχθηκε στους 28 °C σε 5 ml θρεπτικό υπόστρωμα LB για 12 ώρες. 2 ml από την αρχική καλλιέργεια μεταφέρθηκαν σε κωνική φιάλη που περιείχε 50 ml θρεπτικού υποστρώματος LB. Η καλλιέργεια αναπτύχθηκε στους 28 °C έως ότου η Οπτική Πυκνότητα της να φτάσει OD₅₅₀ = 0,6. Η καλλιέργεια τοποθετήθηκε για 10 λεπτά στον πάγο και τα βακτηριακά κύτταρα κατακρημνίστηκαν με φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 3.000 στροφές/λεπτό στους 4 °C. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 1 ml 20 mM παγωμένου CaCl₂ και τα δείγματα των 0,1 ml μοιράστηκαν σε φιαλίδια Eppendorf και καταψύχθηκαν αμέσως με τη βοήθεια υγρού αζώτου. Η διατήρηση των δεκτικών πλέον κυττάρων για μεγάλα χρονικά διαστήματα ήταν δυνατή με την αποθήκευσή τους στους -80 °C. Σε 100 ml δεκτικών κυττάρων προστέθηκε 1 μg πλασμιδιακού DNA. Το μίγμα επώαστηκε για 5 λεπτά στον πάγο. Ακολούθησε πάγωμα του δείγματος για 5 λεπτά σε υγρό άζωτο. Εν συνεχεία επώαση για 5 λεπτά στους 37 °C. Προσθήκη 1 ml θρεπτικού υποστρώματος LB και επώαση για 2-4 ώρες στους 28 °C υπό ανάδευση. Φυγοκέντρηση του δείγματος για 30 δευτερόλεπτα στις 13.000 στροφές/λεπτό και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 100 μl θρεπτικού υποστρώματος LB. Όλη η ποσότητα του δείγματος επιστρώθηκε σε τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα LB, που περιείχε ως δείκτες επιλογής κατάλληλα αντιβιοτικά για την επιλογή τόσο του πλασμιδίου Ti του *Agrobacterium* όσο και του πλασμιδιακού φορέα. Επώαση των τρυβλίων για 36-48 ώρες σε επωαστικό θάλαμο των 28 °C.

2.11 Σταθερός μετασχηματισμός *Arabidopsis thaliana* με το *Agrobacterium tumefaciens* μέσω ανάπτυξης φυτών και εμφύτωσης με το κατάλληλο στέλεχος *Agrobacterium*.

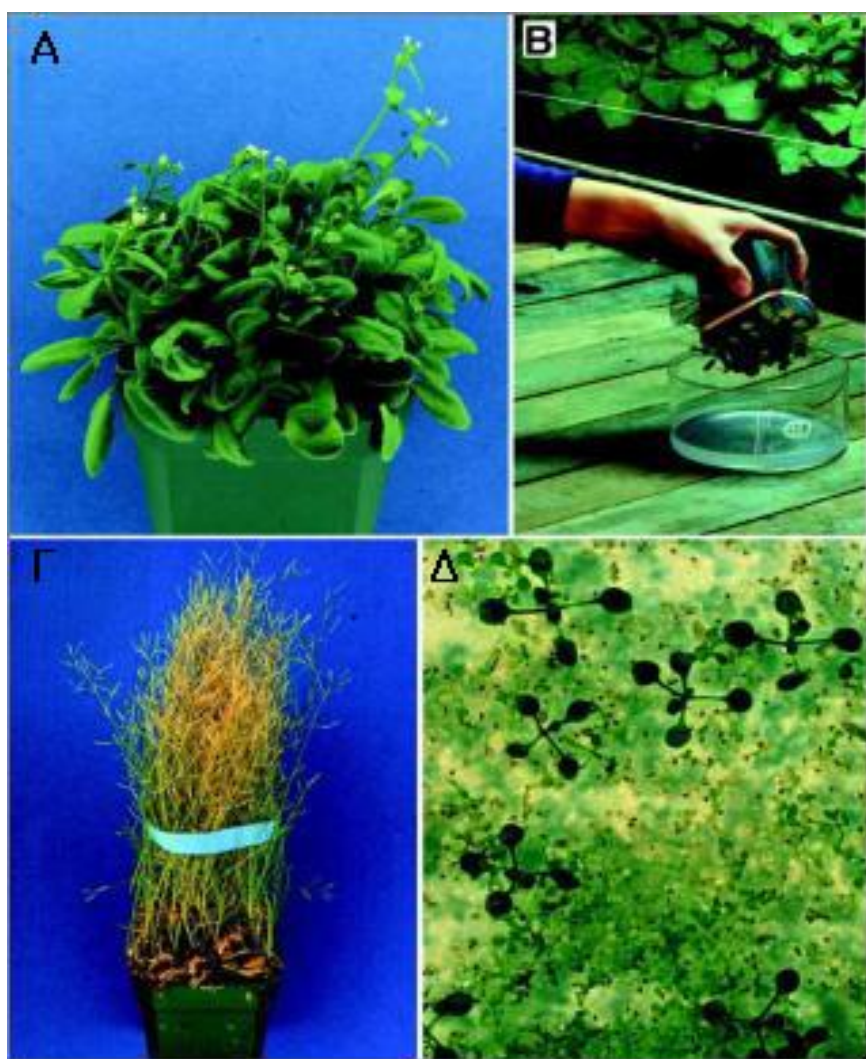
Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου που περιγράφεται από τους Bechtold και συνεργάτες (1993). Είναι προσαρμοσμένη για τη χρησιμοποίηση του οικότυπου *Columbia*. Το ποσοστό επιτυχίας σταθερού μετασχηματισμού ποικίλει ανάλογα με το μέγεθος και το αναπτυξιακό στάδιο των φυτών. Άλλοι σημαντικοί παράγοντες που καθορίζουν τον αριθμό των μετασχηματισμένων φυτών που προκύπτουν, είναι η πυκνότητα της καλλιέργειας, το στέλεχος του *Agrobacterium* και οι συνθήκες ανάπτυξης των φυτών μετά το μετασχηματισμό. Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο αυτή, 95% περίπου των φυτών δίνουν

μετασχηματισμένα σπέρματα. Το ποσοστό των μετασχηματισμένων σπερμάτων για κάθε φυτό μπορεί να φτάσει το 1 ανά 25 σπέρματα.

Η ανάπτυξη των φυτών, έγινε με την τοποθέτηση σπερμάτων *Arabidopsis thaliana* (οικότυπος Columbia) σε ξεχωριστά δοχεία 7 cm x 7 cm σε πυκνότητα 4 σπέρματα/δοχείο. Όταν τα φυτά έφτασαν σε ένα ύψος 10-15 cm και τα πρώτα άνθη είχαν σχηματιστεί (μετά από περίπου 4 εβδομάδες) τότε ήταν έτοιμα για μετασχηματισμό. Αναπτύχθηκε μία καλλιέργεια με το κατάλληλο στέλεχος *Agrobacterium* (που έφερε την επιθυμητή κατασκευή του δυαδικού φορέα) σε 5 ml θρεπτικού υποστρώματος LB για 16 ώρες στους 28 °C. Ποσότητα 1 ml από την καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε 500 ml θρεπτικό υπόστρωμα LB και αναπτύχθηκε στους 28 °C υπό ανάδευση, μέχρις ότου η Οπτική Πυκνότητα να φτάσει OD₆₀₀= 2,0. Τα βακτηριακά κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στις 5.000 στροφές σε θερμοκρασία δωματίου και επαναδιαλύθηκαν σε 1000 ml διαλύματος εμβάπτισης (IM). Η καλλιέργεια αφέθηκε να αναπτυχθεί για άλλες 2 ώρες. Η καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε δοχείο ζέσεως χωρητικότητας 500 ml.

Ένα δοχείο που περιείχε 4 αναπτυγμένα φυτά αναποδογυρίστηκε και τα φυτά εμβάπτιστηκαν μέσα στην καλλιέργεια του *Agrobacterium* για 2 λεπτά (Εικόνα 2.1). Δόθηκε προσοχή ώστε τα φυτά να βυθίζονται ολόκληρα μέσα στην καλλιέργεια του *Agrobacterium*, συμπεριλαμβανομένης της ροζέτας και των δευτερογενών βλαστών που εμφανίζονταν στη βάση της ροζέτας. Σημαντικό ήταν τα φυτά να είχαν ποτιστεί μια μέρα πριν την εμβάπτιση, ώστε τα στόματα τους να ήταν ανοιχτά και το χώμα καλά ενυδατωμένο ώστε να απορροφήσει όσο το δυνατό λιγότερη καλλιέργεια *Agrobacterium*. Σε αντίθετη περίπτωση το μολυσμένο χώμα θα παρεμπόδιζε την ανάπτυξη των φυτών. Τα φυτά αφού στέγνωσαν με διηθητικό χαρτί, καλύφθηκαν με πλαστικό κάλυμμα για 24 ώρες έτσι ώστε να διατηρήσουν υψηλή υγρασία και μεταφέρθηκαν σε κλίβανο επώασης ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία 22 °C, υγρασία 40% και με φωτοπερίοδο 16 ώρες φως/8 ώρες σκοτάδι). Τα φυτά παρέμειναν στις παραπάνω συνθήκες μέχρι να κλείσουν τον κύκλο ζωής τους. Μόλις τα φυτά αφυδατώθηκαν, έγινε η συγκομιδή των σπερμάτων τους. Η επιλογή των μετασχηματισμένων φυτών της πρώτης διαγονιδιακής (T1) γενιάς, έγινε ως εξής: Σπέρματα T1 γενιάς αποστειρώθηκαν και επιστρώθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα επιλογής. Τα τρυβλία μεταφέρθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία 22 °C, υγρασία 40% και με φωτοπερίοδο 16 ώρες φως/8 ώρες σκοτάδι). Τα τρυβλία επώαστηκαν σε αυτές τις συνθήκες για 14 ημέρες. Μετά από 5-

7 ημέρες τα μετασχηματισμένα σπέρματα αναπτύχθηκαν σε σκούρα πράσινα φυτά και είχαν φυσιολογικό φαινότυπο. Η ρίζα τους ήταν κοντή αλλά φυσιολογική. Τα μη μετασχηματισμένα σπέρματα ανέπτυξαν πολύ κοντό ριζικό σύστημα και είχαν ανοιχτές πράσινες ή υποκίτρινες κοτυληδόνες. Μετά τη δέκατη ημέρα ο διαχωρισμός των μετασχηματισμένων φυτών από τα μη μετασχηματισμένα ήταν πλέον εμφανής. Τα μετασχηματισμένα φυτά ανέπτυξαν δεύτερο ζευγάρι φύλλων, ενώ η ανάπτυξη των μη μετασχηματισμένων επιβραδύνθηκε και τελικά νεκρώθηκαν. Μετά την επιλογή, τα μετασχηματισμένα φυτά μεταφέρθηκαν στο χώμα, όπου και παρέμειναν μέχρις ότου έκλεισαν τον κύκλο ζωής τους.



Εικόνα 2.1 Εισαγωγή DNA σε κύτταρα *Arabidopsis thaliana* με εμφύσηση υπό κενό. Α) Φυτό *Arabidopsis thaliana*. Β) Εμφύσηση μέσα σε καλλιέργεια *Agrobacterium*. Γ) Δέσιμο του φυτού για συλλογή σπερμάτων. Δ) Επιλογή μετασχηματισμένων φυτών πρώτης διαγονιδιακής γενιάς.

2.12 Στερέωση και χρώση GUS ολόκληρων φυτών και οργάνων του φυτού *Arabidopsis thaliana*.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου που περιγράφεται από τον Jefferson (1987). Ολόκληρα φυτά και όργανα *Arabidopsis thaliana* τοποθετήθηκαν σε διάλυμα 90% ακετόνης στους 4 °C και επώστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Ανά 5 λεπτά τα φιαλίδια ανακινούνταν ήπια. Στο στάδιο αυτό πραγματοποιήθηκε μερική στερέωση του ιστού. Η ακετόνη αφαιρέθηκε και οι ιστοί ξεπλύθηκαν με διάλυμα ξεπλύματος RS (Rinse Solution) προκειμένου να απομακρυνθεί πλήρως η ακετόνη (προαιρετικά το ξέπλυμα των ιστών μπορούσε να γίνει και με dH₂O). Προσθήκη διαλύματος χρώσης GSS (Gus Staining Solution) μέχρι ο ιστός να καλυφθεί πλήρως. Επώαση στους 37 °C για 1-24 ώρες ανάλογα με τον ιστό και την ενζυμική δραστητικότητα. Στην παρούσα μελέτη η χρώση πραγματοποιήθηκε για χρονικό διάστημα 16 ωρών. Αφαίρεση του GSS και σταδιακή αφυδάτωση του ιστού με την τοποθέτηση του σε διαλύματα 20%, 35%, 50%, 70%, 90% και 100% αλκοόλης για 30 λεπτά αντίστοιχα στους 4 °C. Οι ιστοί με αυτόν τον τρόπο αποχρωματίστηκαν, καθώς έγινε μια σταδιακή απομάκρυνση της χλωροφύλλης και η εμφάνιση του μπλε χρώματος ήταν πιο έντονη. Επαναφορά του ιστού και διατήρησή του στους 4 °C σε υδατικό διάλυμα αλκοόλης 70%. Παρατήρηση και φωτογράφιση σε στερεοσκόπιο.

2.13 Ιστοειδική μελέτη του υποκινητή του γονιδίου *At5g48310*.

Προκειμένου να δημιουργηθεί η κατασκευή για το σταθερό μετασχηματισμό φυτών *Arabidopsis thaliana*, έπρεπε το τμήμα των 1368 ζευγών βάσεων που περιείχε τον υποκινητή του γονιδίου *At5g48310*, να κλωνοποιηθεί στον πλασμιδιακό φορέα pCAMBIA 1301, αναρροϊκά του γονιδίου αναφοράς GUS (β-γλουκουρονιδάσης). Για το σκοπό αυτό ολικό γονιδιωματικό DNA απομονώθηκε από φυτά *Arabidopsis thaliana* με τη μέθοδο της φαινόλης. Το DNA χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την ενίσχυση της ρυθμιστικής περιοχής του γονιδίου *At5g48310* με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Σχεδιάστηκαν γι' αυτό το λόγο ζεύγος εκκινητών 48310pGusF (BamHI) (5'-TTGAGGATCCTTGTAGCCGATTGTAGTTGG-3') και Tm=54 και 48310pGusR (NcoI) (5'-TTGACCATGGAGTTTTTCTCAGCTTGG-

3') και $T_m=55$ οι οποίοι ενίσχυσαν εκλεκτικά ολόκληρη την περιοχή 1250 ζ.β. που αποτελεί την 5' ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου *At5g48310*.

Στο 5' άκρο κάθε εκκινητή προστέθηκε αλληλουχία νουκλεοτιδίων που αναγνωρίζεται ειδικά από μια περιοριστική ενδονουκλεάση που εξυπηρετεί την κλωνοποίηση του τμήματος gDNA στον pCAMBIA 1301 φορέα κλωνοποίησης (αναφέρονται στην παρένθεση). Η συγκεκριμένη αντίδραση πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 100 μ l. Συνήθως τέτοιου είδους αντιδράσεις πραγματοποιούνταν σε τελικό όγκο 20-50 μ l, όμως, στη συγκεκριμένη περίπτωση έπονταν αντιδράσεις ενζυμικών πέψεων και απομόνωση από πήκτωμα αγαρόζης, οπότε ήταν απαραίτητη αρκετή ποσότητα προϊόντος της αντίδρασης πολυμεράσης. Η σύσταση του μείγματος της αντίδρασης περιείχε 3 μ l γονιδιωματικό DNA, 30 pmol για τον κάθε ειδικό εκκινητή, dNTPs (10 mM), 10X PCR buffer και 5U High Fidelity Polymerase. Οι συνθήκες της PCR ήταν οι ακόλουθες: Το πρόγραμμα ξεκίνησε με ένα αρχικό στάδιο 2 λεπτών στους 94 °C και ακολούθησαν 35 κύκλοι, ο καθένας από τους οποίους περιελάμβανε 30 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία αποδιάταξης στους 94 °C, 30 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία 50 °C κατά την οποία τα μόρια εκκινητές σχημάτιζαν δεσμούς υδρογόνου στις συμπληρωματικές θέσεις των μορίων DNA και 2 λεπτά στους 72 °C όπου σχηματίστηκαν οι νέες πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε με ένα τελικό βήμα στους 72 °C για 10 λεπτά. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε κυκλοποιητή Peltier Thermal Cycler (PTC-200). Μετά την ενίσχυση της συγκεκριμένης περιοχής με PCR, ο κλώνος υπέστη πέψη με τα ένζυμα περιορισμού BamHI και NcoI. Το ένθετο τμήμα του, των 1250 ζ.β. που περιείχε και τον υποκινητή του γονιδίου ανακτήθηκε από πήκτωμα αγαρόζης 1% χαμηλού σημείου τήξεως. Ταυτόχρονα, έγινε πέψη με τα ίδια ένζυμα του πλασμιδιακού φορέα pCAMBIA 1301, ο οποίος ανακτήθηκε από πήκτωμα αγαρόζης με τον ίδιο τρόπο. Στη συνέχεια έγινε αντίδραση ενοποίησης των άκρων του φορέα pCAMBIA 1301 BamHI/NcoI με το ένθετο τμήμα που είχε απομονωθεί. Το προϊόν της αντίδρασης ενοποίησης των άκρων χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων *E.coli*. Στις αποικίες που προέκυψαν έγινε έλεγχος με την τεχνική της Colony-PCR, χρησιμοποιώντας ως μόρια εκκινητές το ζεύγος 48310pGusF (BamHI) και 48310pGusR (NcoI) που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάκτηση της περιοχής του υποκινητή του γονιδίου *At5g48310* από ολικό γονιδιωματικό DNA. Από τις αποικίες που έδωσαν το επιθυμητό προϊόν επιλέχθηκαν τυχαία δύο, από τις οποίες πραγματοποιήθηκε απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο της αλκαλικής

λύσης. Το πλασμιδιακό DNA υπέστη πέψεις με τα ένζυμα περιορισμού BamHI/NcoI προκειμένου να πιστοποιηθεί η ύπαρξη του σωστού ένθετου. Κατά αυτό τον τρόπο προέκυψε κατασκευή που περιείχε την περιοχή του υποκινητή του γονιδίου.

Η μελέτη της ιστοειδικής έκφρασης του γονιδίου έγινε δημιουργώντας σταθερά μετασχηματισμένα φυτά *Arabidopsis*. Η επίτευξη του σκοπού αυτού πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της εμφύσησης φυτών *Arabidopsis thaliana* σε καλλιέργεια *Agrobacterium tumefaciens*. Μετά τη διείσδυση τα φυτά αφέθηκαν να ολοκληρώσουν τον κύκλο ζωής τους και ακολούθησε η συγκομιδή σπερμάτων. Τα σπέρματα επιστρώθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα επιλογής και αφέθηκαν να βλαστήσουν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών καλλιέργειας. Κατά αυτόν τον τρόπο επιλέχθηκαν 8-12 ανεξάρτητα μετασχηματισμένα φυτά T1 γενιάς, τα οποία καλλιεργήθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών ανάπτυξης, μέχρις ότου να κλείσουν το βιολογικό τους κύκλο. Από τα φυτά αυτά έγινε συγκομιδή των σπερμάτων της T2 μετασχηματισμένης γενιάς, μέρος των οποίων επιστρώθηκε και πάλι σε τρυβλία θρεπτικού υποστρώματος επιλογής (καναμυκίνη 50 mg/L), προκειμένου να διαχωριστούν τα μη μετασχηματισμένα φυτά μετά τη διάσχιση του γονιδίου. Μετά τη συλλογή των σπερμάτων της T2 γενιάς ακολούθησε ο ποιοτικός προσδιορισμός του γονιδίου αναφοράς στα διαγονιδιακά φυτά, προκειμένου να προσδιοριστεί η ιστοειδική έκφραση του γονιδίου. Στα μετασχηματισμένα φυτά που προέκυψαν έγινε χρώση σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια και ιστούς με X-Gluc και παρατήρηση σε στερεοσκόπιο.

2.14 Έκφραση του *At5g48310* στην υδατική καταπόνηση.

Η ανάπτυξη των φυτών επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από ένα συνδυασμό περιβαλλοντικών καταπονήσεων, όπως η υψηλή θερμοκρασία, η ξηρασία ή η υψηλή αλατότητα. Προκειμένου να μελετηθεί η έκφραση του γονιδίου *At5g48310* σε συνθήκες καταπόνησης όπως η ξηρασία ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο.

Σύμφωνα με αυτό το πρωτόκολλο 150 σπέρματα, από 3 σειρές διαγονιδιακών φυτών και φυτών αγρίου τύπου αντίστοιχα, φυτεύτηκαν στο χώμα σε ειδικά δοχεία και αναπτύχθηκαν κάτω από κανονικές συνθήκες για 15 ημέρες. Τότε το πότισμα διακόπηκε και μετά από 10 ημέρες ξηρασίας τα φυτά φωτογραφήθηκαν. Τα δοχεία

είχαν ζυγιστεί προηγουμένως και μετά το πότισμα, ώστε να εξασφαλιστούν όμοιες συνθήκες ανάπτυξης των φυτών.

2.15 Επίδραση με το χημικό ισοξαμπέν.

Το ισοξαμπέν που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρείας Sigma – Aldrich και διαλύθηκε σε DMSO. Έτσι ακολουθήθηκαν δύο βασικά πρωτόκολλα μελέτης αυτού. Το πρώτο αφορά στον ψεκασμό των φυτών με ισοξαμπέν διαφορετικής συγκέντρωσης.

1. 150 σπέρματα φυτεύτηκαν στο χώμα στις 05-03-2009.
2. Τα φυτά αναπτύχθηκαν για 2 ημέρες κάτω από κανονικές συνθήκες.
3. Τα φυτά ψεκάστηκαν με 0.2 nM ισοξαμπέν στις 07-03-2009.
4. Τα φυτά ψεκάστηκαν με 1 nM ισοξαμπέν στις 09-03-2009.
5. Τα φυτά ψεκάστηκαν με 2 nM ισοξαμπέν στις 12-03-2009.
6. Τα φυτά ψεκάστηκαν με 4 nM ισοξαμπέν στις 14-03-2009.
7. Τα φυτά ψεκάστηκαν με 4 nM ισοξαμπέν στις 16-03-2009.
8. Τα φυτά επηρεάστηκαν σημαντικά.
9. Ο ψεκασμός σταμάτησε.
10. Τα φυτά φωτογραφήθηκαν 14 ημέρες αργότερα στις 30-03-2009.

Ακολούθησε μια παραλλαγή του πρώτου πρωτοκόλλου στο χώμα όπου ο ψεκασμός έγινε σε αρτίβλαστα αυτή τη φορά. Χρησιμοποιήθηκε διάλυμα ισοξαμπέν συγκέντρωσης 2 μ M για ψεκασμό κάθε δεύτερη μέρα. Συνολικά έγιναν πέντε ψεκασμοί.

Το δεύτερο πρωτόκολλο, αφορά πειράματα σε τρυβλία θρεπτικού υποστρώματος με προσθήκη ισοξαμπέν. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις ισοξαμπέν μέσα σε τρυβλία ώστε να διαφανεί η έκφραση του υπό ανίχνευση γονιδίου. Σπέρματα, από τα ομόζυγα φυτά N7-1-4, N7-2-1, από το ετερόζυγο N8-1-11 και από Columbia, επιστρώθηκαν σε σειρά σε τρυβλία MS (τρυβλία ελέγχου) και MS με προσθήκη ισοξαμπέν τελικής συγκέντρωσης 1 nM και 4 nM. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε όρθια θέση ώστε να παρατηρηθούν ευδιάκριτα τυχόν διαφορές στις ρίζες και στο βλαστό. Στη συνέχεια παρέμειναν σε κλίβανο επώασης ελεγχόμενων συνθηκών. Το πείραμα έγινε σε

συνθήκες φωτός και σκοταδιού. Το πείραμα στο σκοτάδι πραγματοποιήθηκε αφού προηγουμένως τα τρυβλία έμειναν 5 ώρες στο φως ώστε να ξεκινήσει η διαδικασία της βλάστησης.

Δοκιμάστηκε η προσθήκη και μεγαλύτερης συγκέντρωσης ισοξαμπέν. Έτσι επιστρώθηκαν σπέρματα από τις παραπάνω σειρές φυτών σε τρυβλία MS (δεν τοποθετήθηκαν σε όρθια θέση) με ισοξαμπέν τελικής συγκέντρωσης 20 nM. Λόγω της μεγάλης του τοξικότητας δοκιμάστηκε η προσθήκη ισοξαμπέν και σε αραιώσεις 50 pM, 5 pM, 0,5 pM αντίστοιχα.

2.16 Επίδραση με το χημικό αμινοτριαζόλη.

Στην παρούσα εργασία, σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό MS και προσθήκη αμινοτριαζόλης (AT) τελικής συγκέντρωσης 7 μ M και 9 μ M, επιστρώθηκαν 50 σπέρματα από το ομόζυγο N7-2-1 και από το αγρίου τύπου WT.

2.17 Επίδραση της ορμόνης γιββερελίνης.

Σε τρυβλία χωρισμένα σε δύο ίσα τμήματα, με θρεπτικό υλικό MS και προσθήκη γιββερελίνης (GA) τελικής συγκέντρωσης 50 μ M (χρησιμοποιήθηκε όγκος 300 μ l από αρχικό διάλυμα 10 mM) επιστρώθηκαν 50 σπέρματα. Στο ένα τμήμα του τρυβλίου το ομόζυγο N7-2-1 και στο άλλο το Columbia. Σαν μάρτυρας-τρυβλία ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία με θρεπτικό υλικό MS.

2.18 Έκφραση του *At5g48310* σε τρυβλία με διαφορετικά σάκχαρα.

Σύμφωνα με τις μελέτες που έγιναν με τη χρήση του Genevestigator στο *Arabidopsis thaliana* και επειδή το υπό ανίχνευση γονίδιο πιστεύεται ότι σχετίζεται με τη μεταφορά σακχάρων έγιναν πειράματα χρησιμοποιώντας διαφορετικά σάκχαρα. Για το σκοπό αυτό ετοιμάστηκαν τρυβλία θρεπτικού υλικού MS χρησιμοποιώντας διάφορα σάκχαρα όπως, σακχαρόζη, γλυκόζη και ραμνόζη 3% αντίστοιχα. Ακολούθησαν τρυβλία με αραιώσεις 1x, 1/100, 1/1000 και 1/5000. Συνολικά

ετοιμάστηκαν 16 τρυβλία για τον έλεγχο του ομόζυγου φυτού N7-2-1 και του αγρίου τύπου.

Μια άλλη προσέγγιση έγινε σε τρυβλία MS χωρισμένα σε δύο ίσα τμήματα στα οποία προστέθηκε σακχαρόζη ή γλυκόζη 1%. Έγιναν οι ίδιες αραιώσεις που αναφέρθηκαν στην προηγούμενη παράγραφο και το κάθε τμήμα του τρυβλίου επιστρώθηκε με σπέρματα Columbia και N7-2-1 αντίστοιχα.

Σε άλλη πειραματική προσέγγιση που πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες σκοταδιού, σε τρυβλία MS χωρισμένα σε δύο ίσα τμήματα, προστέθηκε μικρότερη συγκέντρωση σακχαρόζης και συγκεκριμένα 0,1%. Επιστρώθηκαν με σπέρματα Columbia, N7-1-4, N7-2-1 και N8-1-11 στη σειρά και τοποθετήθηκαν κατακόρυφα στο σκοτάδι σε κλίβανο ελεγχόμενων συνθηκών. Συγκεκριμένα μετά από 24 ώρες καλύφθηκαν με πλαστικό διάφανο καπάκι και την 4η μέρα ξεσκεπάστηκαν.

Αντίστοιχα σε ένα άλλο πρωτόκολλο που έγινε στο φως, σπέρματα Columbia, N7-1-4, N7-2-1 και N8-1-11 επιστρώθηκαν σε θρεπτικό υλικό με σακχαρόζη 0,05% αυτή τη φορά.

2.19 Υδατικά διαλύματα και θρεπτικά υποστρώματα βακτηριακών κυττάρων.

2.19.1 Θρεπτικά υποστρώματα και αντιδραστήρια για τη δημιουργία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων και το μετασχηματισμό τους.

LB υγρό θρεπτικό υπόστρωμα:

0,5% (w/v) Yeast extract, 1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) τρυπτόνη. Στην περίπτωση στερεού θρεπτικού υποστρώματος προστέθηκε 2% (w/v) άγαρ (microbiological grade). Αποστείρωση.

Buffer 1:

30 mM KOAc, 100 mM RbCl₂, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 15% γλυκερόλη, ρύθμιση του pH στο 5,8 με 0,2 N Acetic acid. Αποστείρωση.

Buffer 2:

10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl₂, 15% γλυκερόλη, ρύθμιση του pH στο 6,5 με 0,2 N Acetic acid. Αποστείρωση.

LB υγρό θρεπτικό υπόστρωμα με επιλογή σε αντιβιοτικό (καναμυκίνη):

Όπως το LB αλλά με προσθήκη 50 mg/ml καναμυκίνη.

2.19.2 Διαλύματα στερέωσης και χρώσης GUS των φυτών.Διάλυμα Χρώσης GSS (Gus Staining Solution):

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (100 mM) με pH 7 το οποίο αποτελούνταν από 1 M NaH_2PO_4 και 1 M Na_2HPO_4 (προσθήκη 1154 μl 1 M Na_2HPO_4 και 846 μl NaH_2PO_4 σε 20 ml dH_2O). Στο διάλυμα που προέκυψε προστέθηκε 400 μl 0,1 M FerriCyanide $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 400 μl 0,1 M FerroCyanide $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 200 μl 10% (v/v) διαλύματος Triton X-100 και 19 ml dH_2O . Για την παρασκευή διαλύματος με X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-Glucuronide sodium salt) χρησιμοποιήθηκε κατάλληλη ποσότητα του παραπάνω διαλύματος στο οποίο προστέθηκε 1-2 mg/ml X-Gluc. Ακολούθησε καλή ανάμειξη. Αποθήκευση στους -20°C για 1-2 χρόνια.

Διάλυμα Ξεπλύματος RS (Rinse Solution):

Όπως και το GSS αλλά χωρίς X-Gluc.

2.19.3 Διαλύματα απομόνωσης πλασμιδιακού DNA.Solution 1:

10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl pH 8.

Solution 2:

1% (w/v) SDS, 0,2 M NaOH.

Solution 3:

2 M Glacial Acetic Acid pH 5,6, Potassium Acetate 3 M. Διατήρηση στους 4°C .

10 mg/ml RNase A: Αποθήκευση στους -20°C .

2.19.4 Διαλύματα απομόνωσης RNA και γονιδιωματικού DNA.2x CTAB διάλυμα εκχύλισης DNA:

100 mM Tris-Cl pH 8, 20 mM EDTA pH 8, 1,4 M NaCl, 2% (w/v) CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide), 1% (w/v) PVP 40000 (polyvinyl pyrrolidone). Αποστείρωση και αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου.

SEVAG:

Phenol/chloroform/isoamyl alcohol (48:48:4) ή chloroform/isoamyl alcohol (24:1)

HOMO διάλυμα ομογενοποίησης:

100 mM Tris-HCl pH 9,5, 0,5% (w/v) SDS. Αποστείρωση.

2.19.5 Διαλύματα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αгарόζης.50x TAE ρυθμιστικού διαλύματος:

24,2 g (w/v) Tris-base, 100 ml/L 0,5 M EDTA pH 8, 57,1 ml/L CH₃COOH.

COL1 Διάλυμα Χρωστικών:

5x μητρικό διάλυμα χρωστικών 1,25% (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης, 1,25% (w/v) κυανολοξυλένιο σε dH₂O. Το COL1 είχε τελική συγκέντρωση 1X διαλύματος χρωστικών, 50% (w/v) σουκρόζης.

Βρωμιούχο Αιθίδιο:

5 mg/ml σε dH₂O. Το διάλυμα διατηρήθηκε σε φωτοστεγές μπουκάλι σε θερμοκρασία δωματίου.

2.19.6 Διαλύματα για αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης.10x Ρυθμιστικό διάλυμα DNάσης I:

400 mM Tris-HCl, 100 mM MgSO₄, 10 mM CaCl₂, pH 8.

5x Ρυθμιστικό διάλυμα ανάστροφης μεταγραφής:

250 mM Tris-HCl, 200 mM KCl, 25 mM MgCl₂, 2,5% Tween 20 (v/v), pH 8,3.

10x Ρυθμιστικό διάλυμα PCR:

100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, pH 8,3.

2.19.7 Διαλύματα και θρεπτικά υποστρώματα μετασχηματισμού φυτών *Arabidopsis thaliana*.Διάλυμα Εμβάπτισης (IM):

Σε ένα λίτρο dH₂O διαλύθηκαν 2,2 g MS θρεπτικό διάλυμα αλάτων, 1X B5 βιταμίνες (από 1000X), 50 g σουκρόζη, 0,5 g MES και το pH ρυθμίστηκε στο 5,7 με KOH. Το

διάλυμα αποστειρώθηκε. Ακολούθησε προσθήκη 0,01 mg/L BA (Benzylaminopurine) και 20 µl Silwet L-77 (OSI Specialties).

Stock βιταμινών 1000X B5:

1000 mg ινοσιτόλη, 100 mg θειαμίνη, 10 mg νικοτινικό οξύ, 10 mg πυροδοξίνη σε 10 ml ddH₂O. Αποθήκευση στους -20 °C.

Θρεπτικό διάλυμα MS για την ανάπτυξη *Arabidopsis thaliana*:

Για 1 L θρεπτικού διαλύματος (4,3 g/L MS θρεπτικό διάλυμα αλάτων, 0,5 g MES, 10 g σουκρόζη και 1 ml διάλυμα βιταμινών B5 (1000X), ρύθμιση του pH στο 5,7 με KOH, 0,8% (w/v) Difco Bacto άγαρ. Αποστείρωση.

Θρεπτικό διάλυμα MS με επιλογή σε αντιβιοτικό (καναμυκίνη/υγρομυκίνη):

Όπως το MS αλλά μετά την αποστείρωση προσθήκη 50 mg/ml καναμυκίνης ή υγρομυκίνης.

2.20 Υπολογιστική ανάλυση και κατασκευή φυλογενετικού δέντρου.

Η ανάλυση της αλληλουχίας του DNA και των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), ενώ η αναζήτηση των συντηρημένων μοτίβων μέσω του προγράμματος (CDD Conserved Domain Database) από το διαδικτυακό τόπο του NCBI. Ακόμη με τη μέθοδο COBALT του NCBI δημιουργήθηκε το φυλογενετικό δέντρο. Μια εκτίμηση για τον υποκυτταρικό εντοπισμό των πρωτεϊνών με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος WoLFPSORT (<http://www.wolfpsort.org/>) και του PSORT (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/>). Οι αμινοξικές αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν, αναζητήθηκαν και βρέθηκαν στο διαδικτυακό τόπο (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) και στοιχήθηκαν με τη μέθοδο CLUSTAL W του EBI (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Ανάλυση της πρωτοταγούς δομής των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με χρήση του προγράμματος ExPASy (<http://expasy.org/tools/>). Για την *in silico* μελέτη της ιστοειδικής έκφρασης του γονιδίου, χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων Genevestigator (<https://www.genevestigator.ethz.ch/gv/index.jsp>) η οποία περιλαμβάνει πληροφορίες από μικροσυστοιχίες RNA (RNA microarrays) για το σύνολο των γονιδίων του *Arabidopsis thaliana*. Η ανάκτηση των μεταλλαγμένων σειρών *Arabidopsis thaliana* έγινε από το διαδικτυακό τόπο SIGnAL (Salk Institute Genomic Analysis Laboratory)

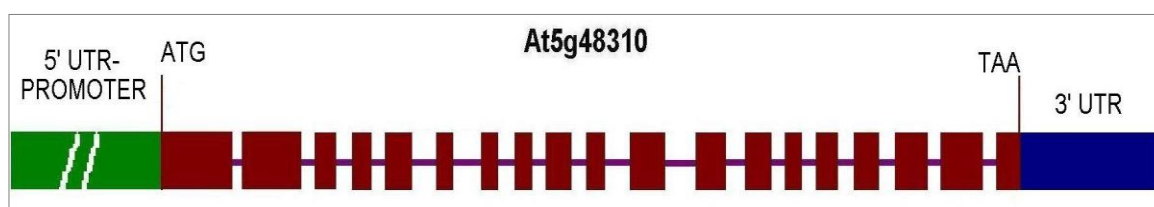
(<http://signal.salk.edu/>). Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου σε σχέση με τους εκκινητές πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα TSSP/Prediction of PLANT Promoters (RegSite Plant DB, Softberry Inc.)

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Η αλληλουχία του γονιδίου *At5g48310* του *Arabidopsis thaliana*, *in silico* με πακέτα επεξεργασίας βιολογικών δεδομένων.

Η παρούσα μελέτη, είχε σαν σκοπό το μοριακό και λειτουργικό χαρακτηρισμό του γονιδίου *At5g48310* του φυτού *Arabidopsis thaliana*. Το γονίδιο υπάρχει στο 5^ο χρωμόσωμα του φυτού *Arabidopsis thaliana* και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη άγνωστης λειτουργίας.

Προκειμένου να γίνει η μοριακή ανάλυση του γονιδίου έπρεπε να αναζητηθεί η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του, καθώς και η αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από αυτό. Για το σκοπό αυτό ανευρέθηκαν οι παραπάνω αλληλουχίες στο δικτυακό τόπο της TAIR (<http://www.arabidopsis.org>). Το γονίδιο *At5g48310* έχει καταχωρηθεί στην GenBank με Accession no. NM_124206, οργανώνεται σε 19 εξώνια με συνολική κωδική περιοχή νουκλεοτιδίων (cDNA) 3471 ζ.β. (ζεύγη βάσεων) και είναι υπεύθυνο για την έκφραση πρωτεϊνικού προϊόντος 1156 αμινοξέων. Η πιθανή ρυθμιστική περιοχή (υποκινητής) του γονιδίου εκτείνεται από το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης (ATG) μέχρι το 3' UTR του προηγούμενου γονιδίου *At5g48320* και καταλαμβάνει έκταση μήκους 1368 ζεύγη βάσεων (Εικόνα 3.1). *In silico* ανάλυση, με το υπολογιστικό πρόγραμμα PlantPromoterDB της 1,5 Kb περιοχής άνωθεν του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης της κωδικής περιοχής του γονιδίου παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.2. Η ανάλυση αποκάλυψε την παρουσία ενός πιθανού TATA box, περίπου 330 βάσεις από το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης (ATG), σημείο σύνδεσης του TFII μεταγραφικού παράγοντα και μια αλληλουχία CCAAT-box που αντιπροσωπεύει τη θέση στην οποία προσδένονται οι C/EBP μεταγραφικοί παράγοντες.



Εικόνα 3.1 Σχηματική απεικόνιση της νουκλεοτιδικής περιοχής του γονιδίου *At5g48310*. Με πράσινο παραλληλόγραμμο αναπαριστάται η ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου, με κόκκινο οι περιοχές των εξωνίων, ενώ με λεπτή γραμμή τα εσώνια. Το μπλε παραλληλόγραμμο αναπαριστά την 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου (3' UTR). Η αλληλουχία του γονιδίου δίνεται στο Παράρτημα 1.

```

ttccaatttttgaatttagatgtttatagaattttcttttagataacccaaaagtttaaacttttgaagaa
aacaagacaattttgtacaatactataatatacataccatagctaaataaaaaatattgtcaccaattttgt
tttcttacggcaaaaataataatctgactaaaatatcttctcaagagttcaagtccttgtgaataata
aacgacaaaaataaattaattgtgacaacagtggtttaaaagtccttcaaaatttaataaattaattgcg
gaaaaaagtatccttcaataatacgaaaagtggaacagtggtcaaaactagccggttgccattatTTTT
ttccaaaacagccgctcctctcctttctctctctctcagcttctcctcaagcattatcgaaccaagctga
gaaaaaactccATGGCTCAACTTCAACGACCTCG

```

Εικόνα 3.2 Νουκλεοτιδική ακολουθία τμήματος (419 ζ.β.) της 5' ρυθμιστικής περιοχής του γονιδίου *At5g48310* του *Arabidopsis thaliana*. Η κωδική περιοχή του γονιδίου υποδεικνύεται με κεφαλαία γράμματα και το σημείο έναρξης της μετάφρασης (ATG) είναι υπογραμμισμένο με μπλε χρώμα. Η αρχή της αντιγραφής υποδεικνύεται ως a μπλε χρώματος. Με κόκκινο χρώμα και υπογράμμιση, σημειώνεται το πιθανό TATA-box περίπου 330 ζ.β. πριν το ATG ενώ με πράσινο χρώμα το πιθανό CCAAT – box. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα TSSP / Prediction of PLANT Promoters (RegSite Plant DB, Softberry Inc.).

3.1.1 Χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το γονίδιο *At5g48310* στο *Arabidopsis thaliana*.

Προκειμένου να μελετηθεί *in silico* η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *At5g48310*, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας της. Η ανάλυση BLAST αποκάλυψε ότι η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο, είναι μια μη χαρακτηρισμένη πρωτεΐνη (Εικόνα 3.3). Παρουσίασε ομοιότητα σε αλληλουχία αμινοξέων, μεταξύ άλλων με μια υποθετική πρωτεΐνη στο *Arabidopsis lyrata* (91%), με μια συντηρημένη υποθετική πρωτεΐνη στο *Ricinus communis* (92%), με πρωτεΐνη στο *Vitis vinifera* (99%), με πρωτεΐνη στο *Populus trichocarpa* (99%), με πρωτεϊνικό προϊόν στο *Vitis vinifera* (76%), με πρωτεΐνη στο *Oryza sativa* (74%), στη *Selaginella moellendorffii* (76%), στη *Physcomitrella patens* (75%), στο *Sorghum bicolor* (69%).

Sequences producing significant alignments:

		<u>Score</u> <u>(Bits)</u>
NP_199642.1	At5g48310 [Arabidopsis thaliana]	2393
XP_002865626.1	hypothetical protein ARALYDRAFT_917723 [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]	1906
XP_002524561.1	conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	1348
XP_002266311.1	PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vinifera]	1330
XP_002321215.1	predicted protein [Populus trichocarpa]	1314
CBI28492.3	unnamed protein product [Vitis vinifera]	1288
EEC72685.1	hypothetical protein OsI_06252 [Oryza sativa Indica Group]	950
EEE56503.1	hypothetical protein OsJ_05771 [Oryza sativa Japonica Group]	950
XP_002970473.1	hypothetical protein SELMODRAFT_93144 [Selaginella moellendorffii]	874
XP_001765126.1	predicted protein [Physcomitrella patens subsp. patens]	862
NP_194192.2	uncharacterized protein [Arabidopsis thaliana] At4g24610	808
XP_002453483.1	hypothetical protein SORBIDRAFT_04g006710 [Sorghum bicolor]	792
NP_201347.2	uncharacterized protein [Arabidopsis thaliana] At5g65440	678

Εικόνα 3.3 Η ανάλυση BLAST για την πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *At5g48310*. Παρουσιάζονται οι πρώτες 13 πρωτεΐνες που εμφανίζουν τη μεγαλύτερη ομολογία. Μεταξύ αυτών και οι ομόλογες του πρωτεΐνες, των γονιδίων *At4g24610* και *At5g65440* του *Arabidopsis thaliana*.

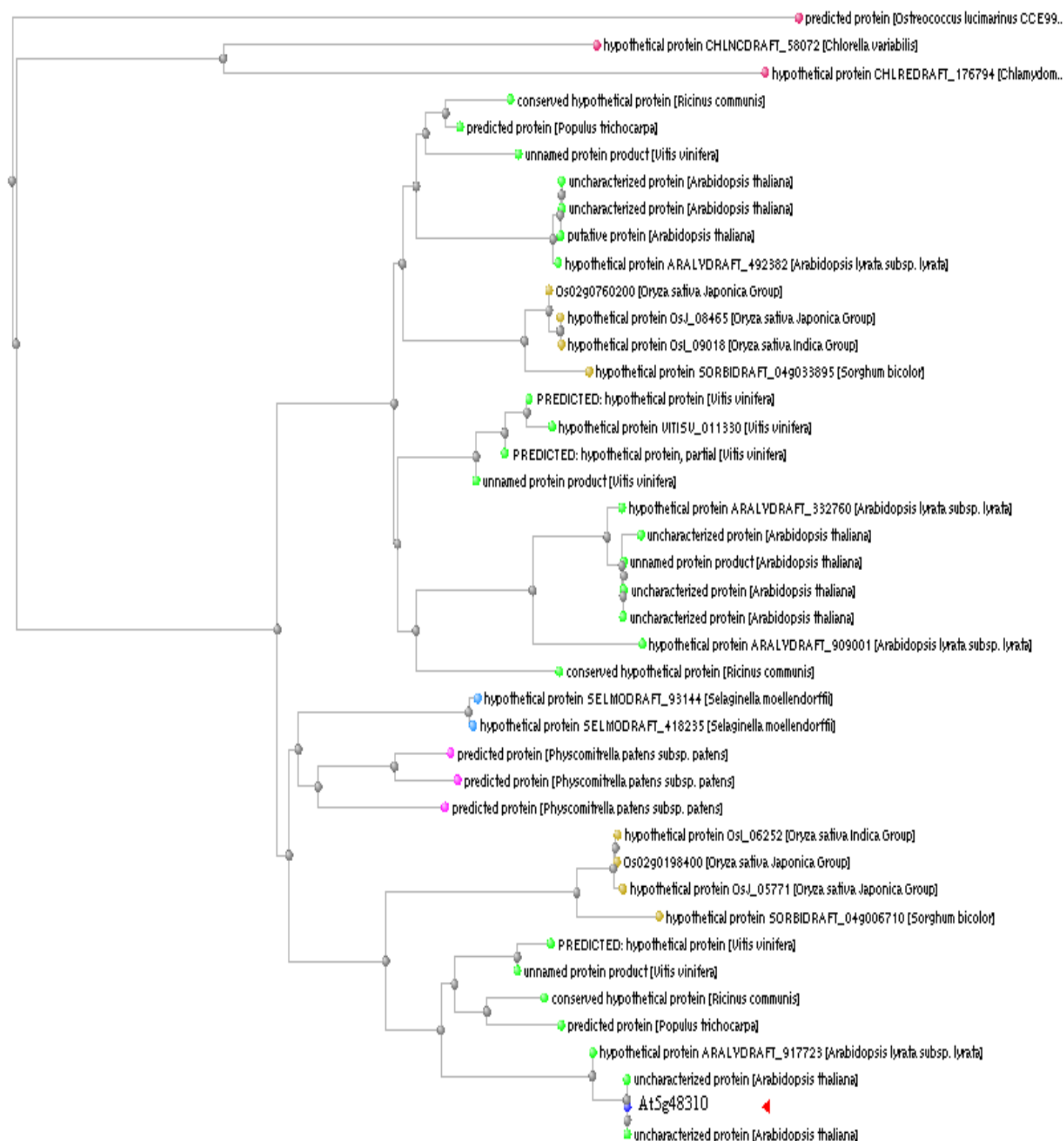
Με βάση την ευθυγράμμιση ολόκληρου του μήκους της αλληλουχίας των αμινοξέων των πρωτεϊνών που παρουσίασαν τη μεγαλύτερη ομοιότητα, με τη μέθοδο

COBALT, δημιουργήθηκε φυλογενετικό δέντρο για να εξεταστεί η εξελικτική τους σχέση (Εικόνα 3.4). Όπως φαίνεται και στο φυλογενετικό δέντρο η πρωτεΐνη At5g48310, ομαδοποιείται σε κοινό υποκλάδο με άλλες μη χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες από το *Arabidopsis thaliana*. Ο κύριος κλάδος περιείχε επίσης πρωτεΐνες από το *Arabidopsis thaliana*, το *Arabidopsis lyrata*, το *Ricinus communis*, το *Vitis vinifera*, το *Populus trichocarpa*, το *Sorghum bicolor*, πρωτεΐνες από το *Oryza sativa*, τη *Physcomitrella patens*, τη *Selaginella moellendorffii*. Σε διαφορετικό κλάδο ομαδοποιήθηκαν υποθετικές πρωτεΐνες από τη *Chlorella variabilis* και το *Chlamydomonas reinhardtii* ενώ άλλος κλάδος περιείχε μια πρωτεΐνη από το *Ostreococcus lucimarinus*.

Η πρωτοταγής ανάλυση της πρωτεΐνης με πρόγραμμα του ExPASy ανέδειξε το μοριακό της βάρος MW= 131658.9 και το ισοηλεκτρικό της σημείο pI= 5,72. Τέλος, για να ερευνηθεί ο πιθανός υποκυτταρικός εντοπισμός της πρωτεΐνης, χρησιμοποιήθηκαν τα υπολογιστικά προγράμματα όπως το PSORT και το WolfPSORT. Η πρόβλεψη των παραπάνω προγραμμάτων υπέδειξε ότι η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο At5g48310 πιθανόν να εδράζει στην πλασματική μεμβράνη.

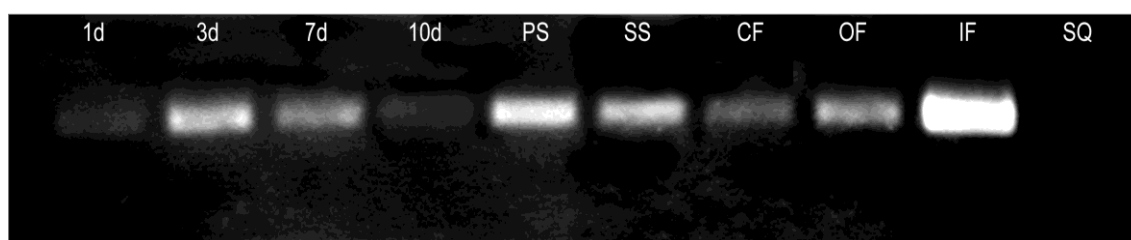
3.2 Μελέτη της αναπτυξιακής έκφρασης του At5g48310 του *Arabidopsis thaliana*.

Προκειμένου να μελετηθεί το αναπτυξιακό πρότυπο έκφρασης του γονιδίου At5g48310 του *Arabidopsis thaliana* απομονώθηκε ολικό RNA από ιστούς Columbia σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια, με τη μέθοδο της φαινόλης και στη συνέχεια μετατράπηκε σε cDNA με τη μέθοδο της ανάστροφης μεταγραφής (βλέπε υλικά και μέθοδοι, παρ. 2.9.3). Επακολούθησε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), με μήτρα το μονόκλωνο cDNA και εκκινητές τους S48310-F1 και S48310-R1. Κατά τη συγκεκριμένη PCR αντίδραση η αρχική αποδιάταξη πραγματοποιήθηκε στους 94 °C για 2 λεπτά και ακολούθησαν 40 κύκλοι στους οποίους γινόταν επαναδιάταξη στους 57 °C για 30 δευτερόλεπτα, ενώ η επιμήκυνση πραγματοποιήθηκε στους 72 °C για 1 λεπτό. Η τελική επιμήκυνση έγινε στους 72 °C για 7 λεπτά.



Εικόνα 3.4 Φυλογενετική ανάλυση της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το γονίδιο *At5g48310* και των ομόλογων της από διάφορους οργανισμούς με βάση την ευθυγράμμιση COBALT ολόκληρου του μήκους της αλληλουχίας των αμινοξέων των πρωτεϊνών. Με κόκκινο βέλος υποδεικνύεται η υπό εξέταση πρωτεΐνη.

Το αναμενόμενο προϊόν ήταν μεγέθους 582 βάσεων. Η ανάλυση σε πήκτωμα αгарόζης 1,25% φαίνεται στην Εικόνα 3.5. Το γονίδιο *At5g48310* εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στις ταξιανθίες και σε μικρότερο στους βλαστούς, στα άνθη και στα νεαρά φυτά, ενώ δεν εκφράζεται καθόλου στις καρποταξίες (γονιμοποιημένες σπερματικές βλάστες). Το έντονο σήμα στις ταξιανθίες οφείλεται στους αναπτυσσόμενους βλαστούς.



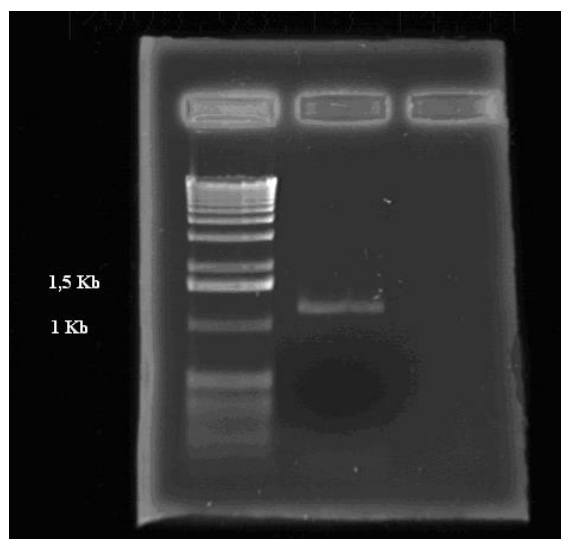
Εικόνα 3.5 Προϊόν PCR με μήτρα cDNA από φυτικό ιστό 1 μέρα μετά τη βλάστηση (1d), 3 (3d), 7 (7d) και 10 (10d) ημέρες αντίστοιχα, πρωτογενούς (PS) και δευτερογενούς (SS) βλαστού, νεαρά - κλειστά άνθη (CF), ώριμα - ανοικτά άνθη (OF), ταξιανθίες (IF) και καρποταξίες (SQ). Παρατηρείται έντονη έκφραση στις ταξιανθίες και στους βλαστούς.

3.3 Ιστοειδική μελέτη του υποκινητή του γονιδίου *At5g48310* του *Arabidopsis thaliana in planta*.

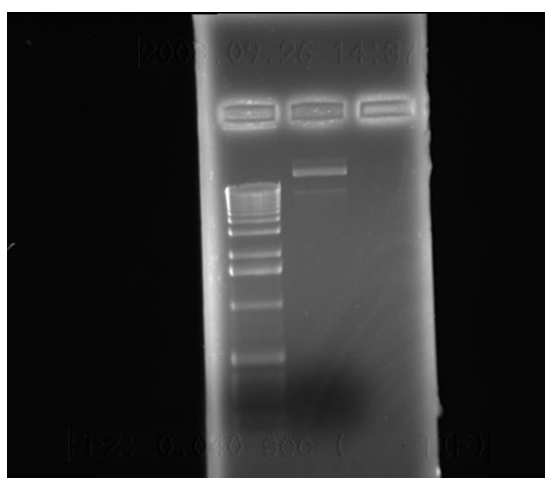
Προκειμένου να μελετηθεί η ιστοειδική έκφραση του γονιδίου *At5g48310 in planta*, τμήμα της 5' ρυθμιστικής περιοχής του γονιδίου άνωθεν του κωδικονίου ATG, κλωνοποιήθηκε στον ειδικό πλασμιδιακό φορέα pCAMBIA 1301 αναρροϊκά του γονιδίου της β-γλουκουρονιδάσης (GUS). Πιο συγκεκριμένα, το τμήμα των 1250 ζευγών βάσεων που περιείχε και τον υποκινητή του γονιδίου ενισχύθηκε με τη βοήθεια του ζεύγους εκκινητών 48310pGusF και 48310pGusR και κλωνοποιήθηκε στο φορέα pCAMBIA 1301 με μεταγραφική σύντηξη αναρροϊκά του γονιδίου της β-γλουκουρονιδάσης (GUS).

Η ενίσχυση του συγκεκριμένου τμήματος DNA έγινε με αντίδραση Touchdown PCR. Οι συνθήκες αναφέρθηκαν στα υλικά και μέθοδοι παράγραφο 2.9.2. Η ανάλυση σε πήκτωμα αгарόζης 0,8% φαίνεται στην Εικόνα 3.6. Αυτό το προϊόν αφού προηγουμένως καθαρίστηκε από το πήκτωμα, υποβλήθηκε σε πέψη με τα ένζυμα

περιορισμού BamHI και NcoI. Και ο πλασμιδιακός φορέας pCAMBIA 1301 έπρεπε όμως να απομονωθεί από τα κύτταρα *E.coli* με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης (Εικόνα 3.7) και να υποστεί πέψη με τα ίδια ένζυμα.

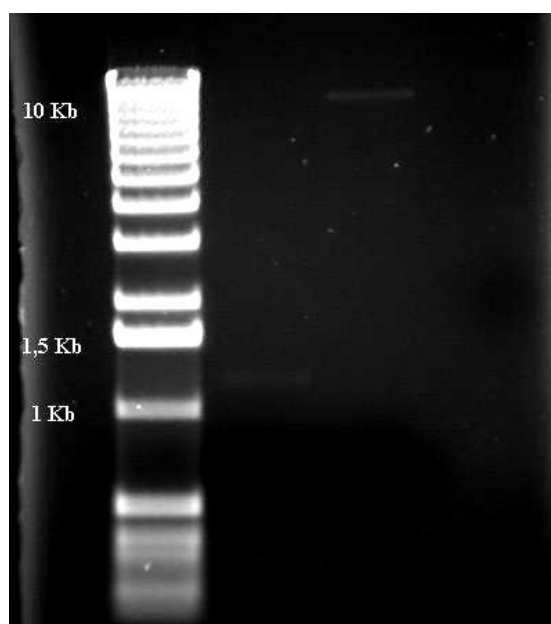


Εικόνα 3.6 Ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8% του ενισχυμένου τμήματος του DNA από την TD – PCR (Touchdown PCR). Ως δείκτης μοριακών βαρών (MB) στις εικόνες χρησιμοποιήθηκε ο 1Kb DNA Ladder. Οι αριθμοί αριστερά της φωτογραφίας αντιπροσωπεύουν τα σχετικά μοριακά βάρη των αντίστοιχων ζωνών σε ζεύγη βάσεων (bp). Η ζώνη του 1,1 Kb υποδεικνύει την ύπαρξη του επιθυμητού τμήματος DNA του *At5g48310*.



Εικόνα 3.7 Ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8% του άκοπου πλασμιδίου pCAMBIA 1301 (12.000 Kb).

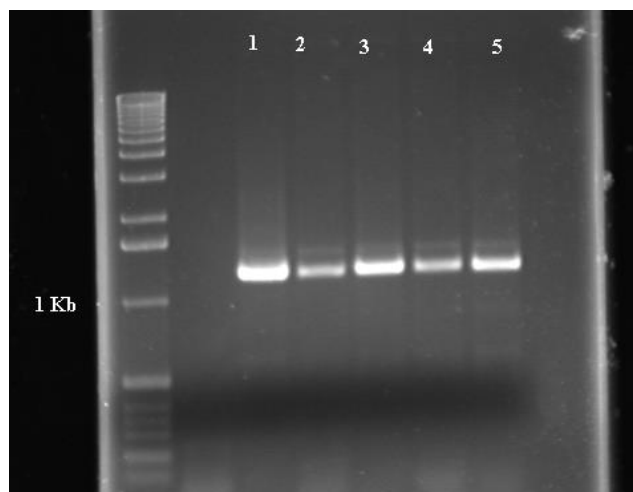
Ο πλασμιδιακός φορέας καθώς και το επιθυμητό DNA απομονώθηκαν και καθαρίστηκαν από το πήκτωμα αγαρόζης όπως περιγράφηκε νωρίτερα στην παράγραφο 2.6 (Εικόνα 3.8). Ακολούθησε ενοποίηση των τμημάτων και ο ανασυνδυασμένος πλασμιδιακός κλώνος που προέκυψε μετασχημάτισε δεκτικά βακτηριακά κύτταρα *E.coli* (DH5a). Για την επαλήθευση της εισαγωγής του τμήματος DNA (ένθετου) του πλασμιδιακού κλώνου στο βακτήριο *E.coli*, εφαρμόστηκε η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε αποικίες *E.coli* (Colony PCR) που αναφέρθηκε στην παράγραφο 2.9.1 (Εικόνα 3.9).



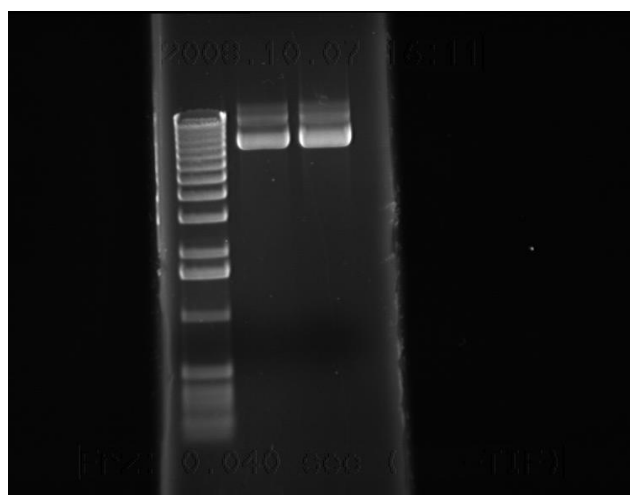
Εικόνα 3.8 Ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8% του τμήματος DNA και του πλασμιδιακού φορέα pCambia 1301 που ενοποιήθηκαν, μετά από καθαρισμό των ζωνών τους από το πήκτωμα της αγαρόζης. Οι ζώνες αν και αχνές υποδεικνύουν την επιτυχή απομόνωση των παραπάνω από το πήκτωμα.

Το πλασμιδιακό DNA (12.000 Kb) απομονώθηκε (Εικόνα 3.10) και υπέστη πέψη με τα ένζυμα περιορισμού BamHI και NcoI (Εικόνα 3.11) προκειμένου να πιστοποιηθεί η ύπαρξη του σωστού ένθετου που αποτελεί το τμήμα του υποκινητή που ενισχύθηκε. Κατά αυτό τον τρόπο προέκυψε κατασκευή που περιείχε την πιθανή περιοχή του υποκινητή του γονιδίου *At5g48310* αναρροϊκά του γονιδίου αναφοράς της β-γλουκουρονιδάσης. Στην Εικόνα 3.12 παρουσιάζεται διαγραμματικά, η κατασκευή που δημιουργήθηκε στο φορέα pCambia 1301 στον οποίο έχει

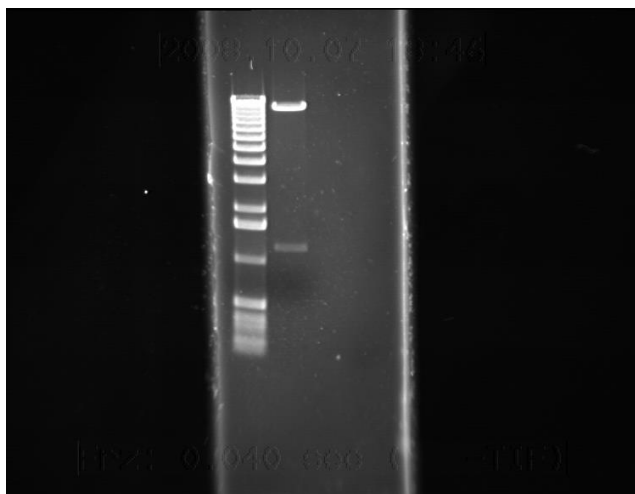
κλωνοποιηθεί τμήμα της ρυθμιστικής περιοχής - υποκινητής του γονιδίου *At5g48310* (1250 ζ.β.).



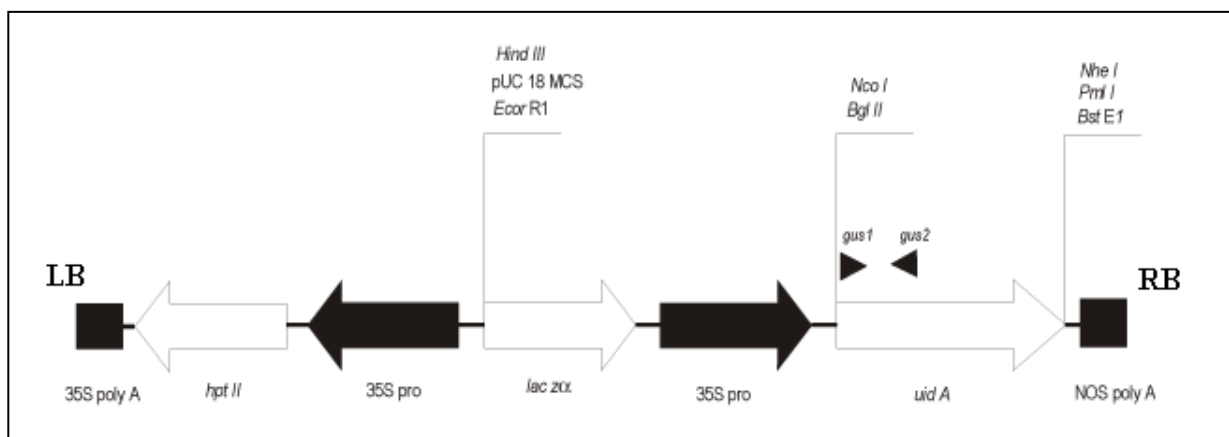
Εικόνα 3.9 Ανάλυση σε πήκτωμα αгарόζης της ύπαρξης του σωστού ένθετου, κατά την εισαγωγή του ανασυνδυασμένου κλώνου pCAMBIA 1301 - pGUS 48310 σε δεκτικά βακτηριακά κύτταρα *E.coli* (DH5a). Η ανίχνευση έγινε σε πέντε αποικίες *E.coli*, με την αντίδραση της Colony PCR, οι οποίες και έδωσαν την επιθυμητή ζώνη.



Εικόνα 3.10 Ανάλυση σε πήκτωμα αгарόζης του πλασμιδιακού κλώνου pCAMBIA 1301 - pGUS 48310 μετά από απομόνωση από δύο υγρές καλλιέργειες (ΚΑΛ 1 και ΚΑΛ 3) θρεπτικού υποστρώματος LB με αντιβιοτικό (καναμυκίνη).



Εικόνα 3.11 Ανάλυση σε πήκτωμα αгарόζης της αντίδρασης πέψης του ανασυνδυασμένου pCAMBIA 1301 - pGUS 48310 (ΚΑΛ 3) με τα ένζυμα περιορισμού BamHI και NcoI.



Εικόνα 3.12 Ο πλασμδιακός φορέας pCAMBIA 1301 στον οποίο έχει κλωνοποιηθεί τμήμα της ρυθμιστικής περιοχής - υποκινητής του γονιδίου *At5g48310* αναρροϊκά του γονιδίου αναφοράς της β-γλουκουρονιδάσης. Οι εκκινητές συμβολίζονται με *gus 1* και *gus 2*. Τα βέλη δείχνουν τη θέση της πολυκλωνοποίησης. Οι ρυθμιστικές ακολουθίες (όπως οι υποκινητές) φαίνονται με βέλη μαύρου χρώματος και με άσπρο οι κωδικές περιοχές. *hpt II* = υγρομυκίνη, MCS = θέση πολυκλωνοποίησης, *lacza* = υπομονάδα βακτηριακής λακτάσης, *uid A* = β - γλουκουρονιδάση, *NOS* = συνθάση της νοπαλίνης.

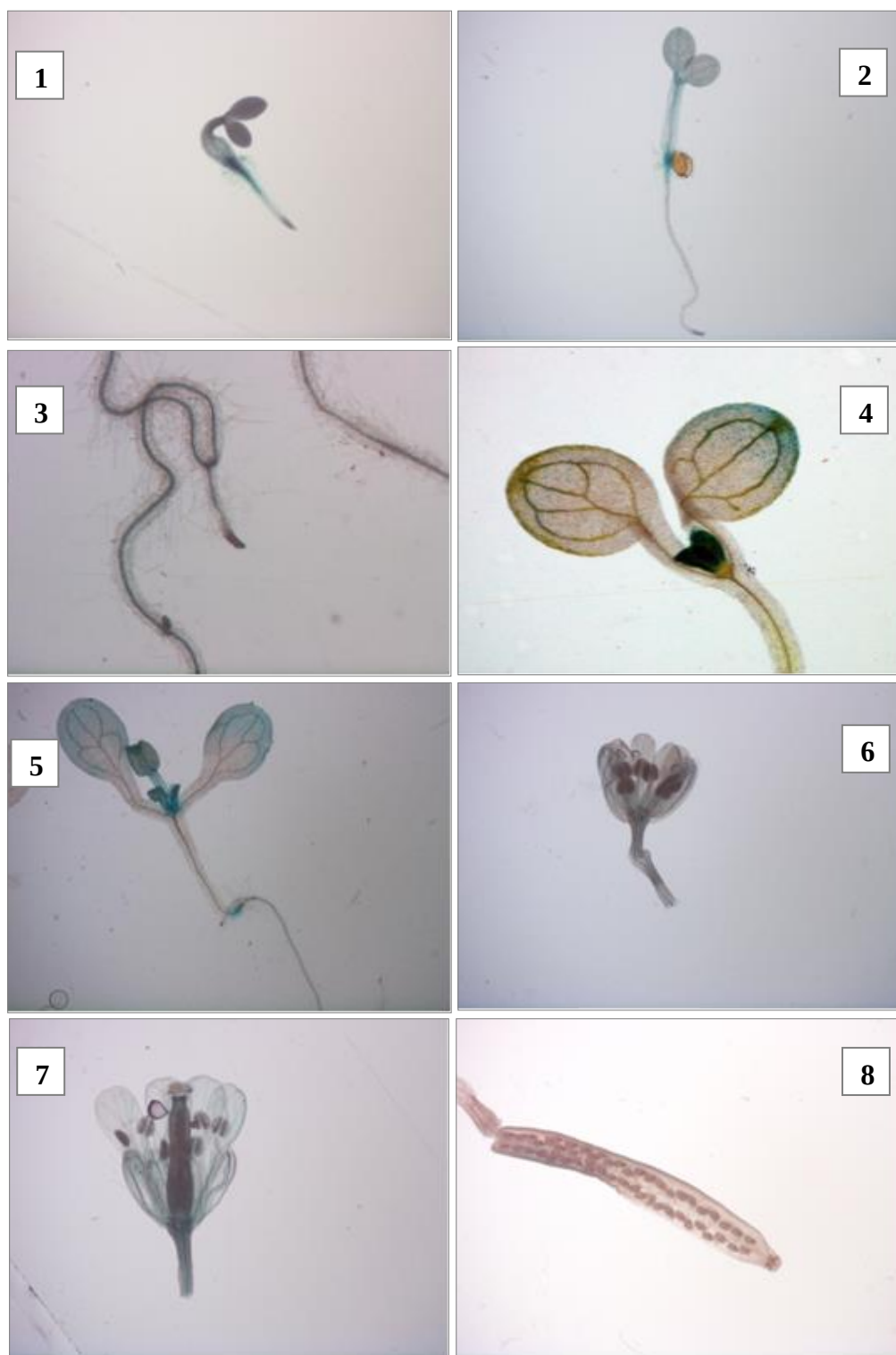
Με την κατασκευή του πλασμιδιακού φορέα μεταγραφικής σύντηξης της Εικόνας 3.12 μετασχηματίστηκαν φυτά *Arabidopsis thaliana* με τη βοήθεια του *Agrobacterium tumefaciens*. Στα μετασχηματισμένα φυτά (T2) γενιάς που προέκυψαν έγινε χρώση σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια και ιστούς με X-Gluc (βλέπε Υλικά και Μέθοδοι παράγραφο 2.13). Στην Εικόνα 3.13 παρουσιάζεται η ιστοειδική έκφραση της κατασκευής pGUS 48310 σε διάφορους ιστούς διαγονιδιακών φυτών *Arabidopsis thaliana*. Το πρότυπο έκφρασης περιορίστηκε σε ανοικτά άνθη φυτών. Μεγάλη έκφραση στις ταξιανθίες. Σε νεαρά φυτά 3 ημερών μεγάλη έκφραση εντοπίστηκε στον κεντρικό κύλινδρο της ρίζας και στο υποκότυλο, ενώ μικρή έκφραση υπήρχε στο ακραίο μερίστωμα της ρίζας και τις κοτυληδόνες. Σε φυτά που βρίσκονταν στην αναπαραγωγική φάση εμφανίστηκε έντονη έκφραση σε όλο το αγγειακό σύστημα του βλαστού, των φύλλων, στα πέταλα και στα σέπαλα των ανθέων. Καθόλου έκφραση στις γονιμοποιημένες σπερματικές βλάστες (καρποταξίες) και στους ανθήρες.

3.4 Λειτουργικός χαρακτηρισμός του γονιδίου *At5g48310* στο *Arabidopsis thaliana*.

Προκειμένου να μελετηθεί η λειτουργία του γονιδίου *in planta*, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του φυτού *Arabidopsis thaliana* κρίθηκε σκόπιμο να εξεταστούν μεταλλαγμένες σειρές φυτών για το υπό εξέταση γονίδιο καθώς και για τα ομόλογα προς αυτό γονίδια. Για το σκοπό αυτό αποκτήθηκαν μεταλλαγμένα σπέρματα του φυτού *Arabidopsis*, από το διαδικτυακό τόπο της SIGnAL (Salk Institute Genomic Analysis Laboratory), τα οποία περιείχαν ένθεση T-DNA στην κωδική περιοχή του γονιδίου *At5g48310*. Στον Πίνακα 3.1 παρουσιάζονται οι κωδικές ονομασίες των μεταλλαγμένων σειρών (Salk lines) που αποκτήθηκαν καθώς και το αντίστοιχο γονίδιο στο οποίο είχε γίνει η ένθεση του T-DNA.

3.4.1 Φαινοτυπική ανάλυση μεταλλαγμένων σειρών στο *Arabidopsis thaliana*.

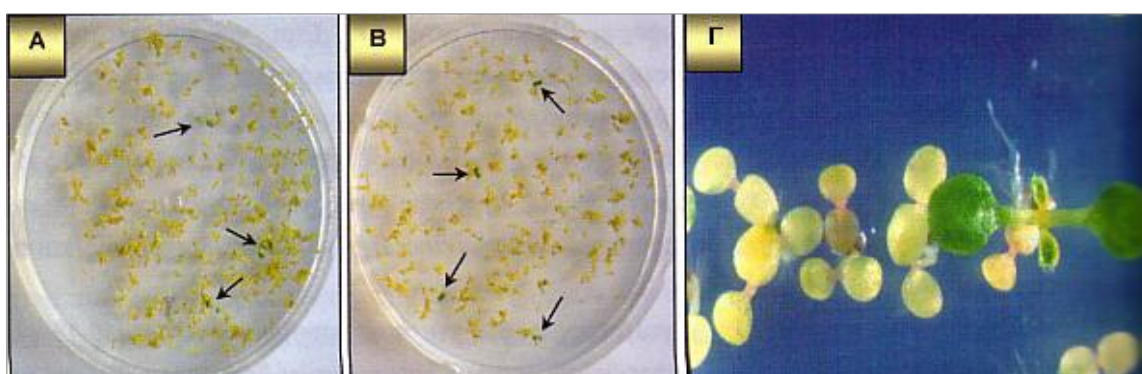
Τα μεταλλαγμένα αυτά σπέρματα των σειρών που φαίνονται στον Πίνακα 3.1, στρώθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα MS και έγινε επιλογή σε θρεπτικό MS με αντιβιοτικό καναμυκίνη (Εικόνα 3.14).



Εικόνα 3.13 Ιστοειδική έκφραση του At5g48310 γονιδίου, At48310-PROM-GUS σε διάφορους ιστούς και σε διαφορετικές σειρές διαγονιδιακών φυτών *Arabidopsis thaliana*. 1), 2) Αντιπροσωπευτικό πρότυπο έκφρασης σε ολόκληρα φυτά 2 και 3 ημερών, 3) πρωτογενής ρίζα και πλάγιες ρίζες, 4) ακραίο μερίστωμα βλαστού, νέα φύλλα, 5) φυτό 11 ημερών, έκφραση στο υποκότυλο, 6) κλειστός ανθός, αγγειακό σύστημα του βλαστού, 7) ανοικτός ανθός, διακρίνεται το πρότυπο έκφρασης στα αγγεία των πετάλων και 8) στις ώριμες σπερματικές βλάστες (καρποταξίες) δεν υπήρχε έκφραση.

Πίνακας 3.1 Τα μεταλλαγμένα στελέχη *Arabidopsis thaliana* που έφεραν ένθεση T-DNA.

Salk line	Γονίδιο το οποίο έχει την ένθεση T-DNA
032782.19.90 (N2)	<i>At5g48310</i> υποκινητής
134597.42.05 (N7)	<i>At5g48310</i> κωδική περιοχή
134598.25.50 (N8)	<i>At5g48310</i> κωδική περιοχή
106731.51.70.x	<i>At4g24610</i>
112759C	<i>At5g65440</i>
021272C	<i>At5g65440</i>
WiscDsLox477-480C5	<i>At4g24610</i>

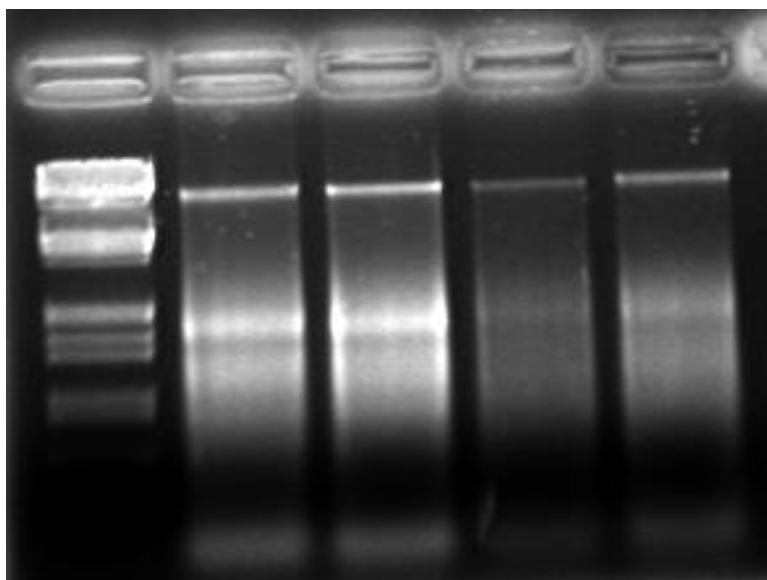


Εικόνα 3.14 Βλαστάνοντα σπέρματα μετασχηματισμένων φυτών *Arabidopsis thaliana*, επιστρωμένα σε θρεπτικό υπόστρωμα επιλογής MS, παρουσία 50 µg/ml καναμυκίνης. Α), Β) Τα βέλη υποδεικνύουν τα μετασχηματισμένα σπέρματα που έδωσαν φυσιολογικά φυτά (σκούρο πράσινο χρώμα) και ήταν ανθεκτικά στο αντιβιοτικό καναμυκίνη. Τα μη μετασχηματισμένα φυτά είχαν χρώμα υποκίτρινο και νεκρώνονταν μετά από 10 ημέρες στο υπόστρωμα επιλογής. Γ) Λεπτομέρεια των μετασχηματισμένων φυτών.

Το μεταλλαγμένο στέλεχος N2 είχε 15% ανθεκτικότητα (5/33), το N7 είχε 12,5% ανθεκτικότητα (5/40) και το N8 75% ανθεκτικότητα (15/20).

3.4.2 Γονοτυπική ανάλυση μεταλλαγμένων σειρών στο *Arabidopsis thaliana*.

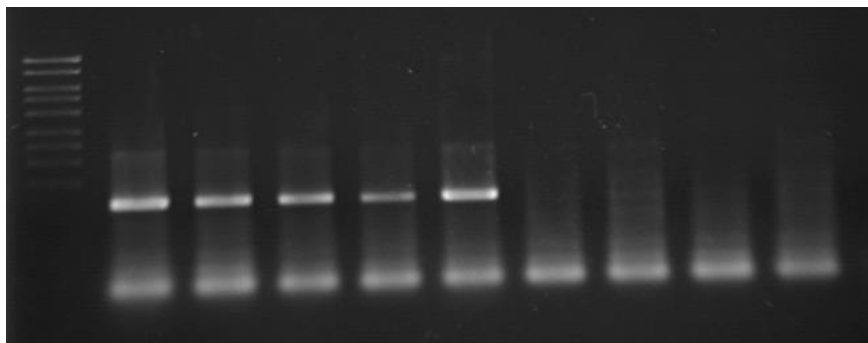
Από τα φυτά που μεταφέρθηκαν στο χώμα και είχε γίνει αρχικά επιλογή με καναμυκίνη, έγινε απομόνωση γονιδιωματικού DNA με τη μέθοδο CTAB της παραγράφου 2.2 (Εικόνα 3.15). Για την εύρεση ομόζυγων και ετερόζυγων φυτών ως προς την ένθεση, το DNA αυτό χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την πραγματοποίηση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ώστε να ενισχυθεί η αγρίου τύπου - WT ζώνη (1100 ζ. β.) (Εικόνα 3.16) και η ένθεση - LB (636 ζ. β.) από τα φυτά (Εικόνα 3.17). Έτσι σχεδιάστηκε και παραγγέλθηκε ένα ζεύγος εκκινητών για τα φυτά της N7 και N8 σειράς. Με τα φυτά της N2 σειράς δεν έγιναν περαιτέρω πειράματα.



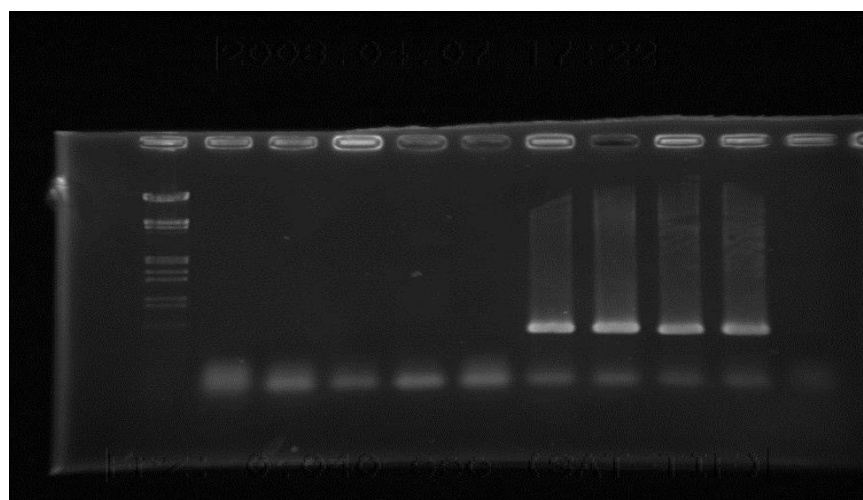
Εικόνα 3.15 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από 4 διαφορετικά φυτά N8 σειράς με τη μέθοδο CTAB.

Έτσι από τις αντιδράσεις PCR, όπως φαίνεται και στις Εικόνες 3.16 και 3.17, προέκυψαν 3 ετερόζυγα N8 φυτά και 6 ομόζυγα από τα N7. Από τα φυτά αυτά

συλλέχθηκαν σπέρματα και επιστρώθηκαν σε θρεπτικό υλικό MS και σε υπόστρωμα επιλογής με καναμυκίνη (μόνο τα N8).



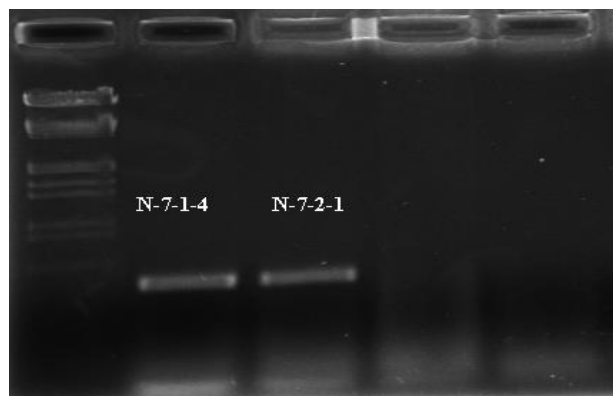
Εικόνα 3.16 Προϊόν αντίδρασης PCR για την εύρεση της αγρίου τύπου ζώνης. Φαίνεται ο σχηματισμός της ζώνης 1100 ζ.β. Οι πέντε πρώτες ζώνες είναι αντιπροσωπευτικές των φυτών της N8 σειράς (ετερόζυγα). Οι αμέσως επόμενες είναι των φυτών της N7 σειράς (ομόζυγα). Ο μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο High range ladder.



Εικόνα 3.17 Προϊόν αντίδρασης PCR για εύρεση της ένθεσης. Οι ζώνες που φαίνονται είναι 636 ζ.β. και απεικονίζουν τα ομόζυγα φυτά της N7 σειράς. Ο μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο Hind III/EcoRI ladder.

Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στο χώμα χωρίς κανένα φαινότυπο. Τα N8-1 και τα N8-3 ήταν ανθεκτικά στην καναμυκίνη. Επακολούθησε απομόνωση DNA από τους απογόνους των N7-1, N7-2, N7-3, από το N8-1 και το N8-2. Το DNA, από τα

φύλλα της ροζέτας και το ζεύγος των εκκινητών χρησιμοποιήθηκαν σε αντιδράσεις PCR. Επιλέχθηκαν 4 φυτά από την κάθε μια σειρά των παραπάνω N7-1, N7-2, N7-3, 12 φυτά από το N8-1 και 8 φυτά από το N8-2. Από τις PCR αντιδράσεις προέκυψαν δύο φυτά ομόζυγα, τα N7-1-4 και N7-2-1, τα οποία και έδωσαν μπάντα ένθεσης (Εικόνα 3.18). Από τα N8-2, ένα φυτό ήταν αγρίου τύπου (WT) και 7 ετερόζυγα. Και από τα N8-1 υπήρχαν 5 ετερόζυγα φυτά.



Εικόνα 3.18 Προϊόν αντίδρασης PCR για την εύρεση της ένθεσης. Οι ζώνες που φαίνονται είναι 636 ζ.β. και απεικονίζουν τα ομόζυγα φυτά της N7 σειράς. Ο μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο Hind III/EcoRI ladder.

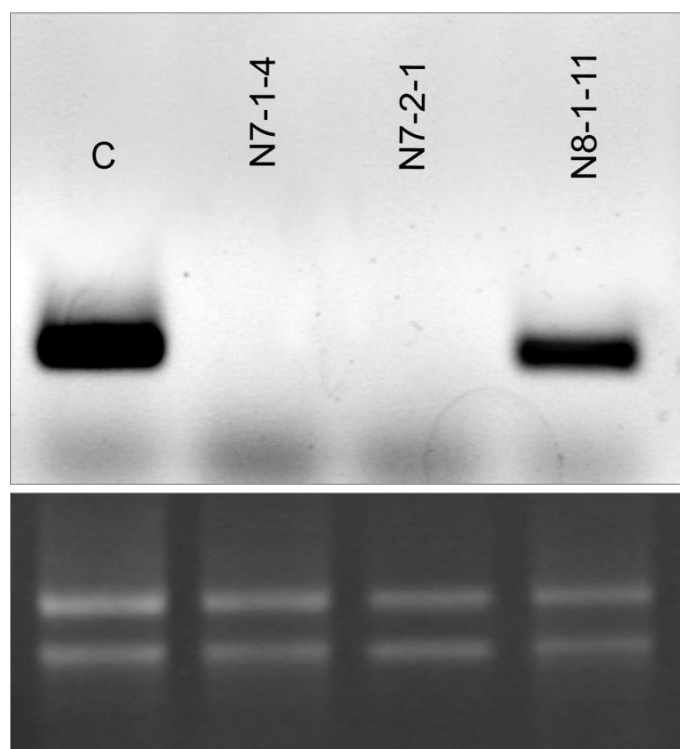
Επιπλέον επιστρώθηκαν σε θρεπτικό υλικό MS οι σειρές των ομόλογων γονιδίων που φαίνονται στον Πίνακα 3.1. Μεταφυτεύτηκαν στο χώμα και σχεδιάστηκε ένα ζεύγος εκκινητών για το κάθε γονίδιο, οι 5g65440 F9, 5g65440 R9 και 5g65440 F2, 5g65440 R2. Έγινε απομόνωση γονιδιωματικού DNA από 15 φυτά συνολικά. Από την ανάλυση δεν προέκυψε κανένα ομόζυγο φυτό, ούτε παρατηρήθηκε κάποιος φαινότυπος με αποτέλεσμα να σταματήσει η περαιτέρω ανάλυση αυτών.

3.4.3 Ανάλυση διαγονιδιακών σειρών στο *Arabidopsis thaliana* με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης της ανάστροφης μεταγραφής (RT – PCR).

Απομονώθηκε RNA, με τη μέθοδο της φαινόλης (βλέπε παράγραφο 2.3), από άνθη Columbia και από τα N7-1-4, N7-2-1, N8-1-11. Στη συνέχεια

πραγματοποιήθηκε η αντίδραση της DNάσης I, ώστε να καταστραφεί το DNA που είχε απομονωθεί κατά την απομόνωση του ολικού RNA. Το ολικό RNA, ελεύθερο από DNA, μεταγράφηκε ανάστροφα, χρησιμοποιώντας την PrimeScript™ Ανάστροφη μεταγραφάση και τον εκκινητή Oligo dT17. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργήθηκαν μονόκλιωνα cDNA, τα οποία αντιστοιχούσαν στα γονίδια που εκφράστηκαν στο *Arabidopsis thaliana*, αφού ο εκκινητής ήταν συμπληρωματικός με την polyA⁺ ουρά των mRNA. Επακολούθησε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, με μήτρα το μονόκλιωνα cDNA και εκκινητές τους 18SRNA-F και 18SRNA-R αρχικά για ισοστάθμιση (σταντάρισμα) των ποσοτήτων και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν οι S48310-F και S48310-R.

Όταν τα προϊόντα της RT - PCR αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8% μια ζώνη έντονα διακριτή εμφανίστηκε στο control και στο N8-1-11. Το μεταγράφημα στο ετερόζυγο N8-1-11 ήταν λιγότερο από εκείνο στο control. Στα N7-1-4 και N7-2-1 δεν παράχθηκε καθόλου (Εικόνα 3.19), γεγονός που επιβεβαίωσε την ομοζυγωτία των διαγονιδιακών φυτών της N7 σειράς.



Εικόνα 3.19 Ανάλυση των προϊόντων της RT - PCR (άνω) και τα αντίστοιχα RNA αυτών (κάτω μέρος εικόνας). Το C (control) αντιστοιχεί στα φυτά αγρίου τύπου. Στα N7-1-4 και N7-2-1 δεν παράχθηκε καθόλου μεταγράφημα.

3.5 Έκφραση του *At5g48310* παρουσία χημικών ουσιών που προκαλούν κυτταρικό θάνατο.

3.5.1 Έκφραση του *At5g48310* παρουσία ισοξαμπέν.

Σύμφωνα με τις μελέτες που έγιναν με τη χρήση του Genevestigator στο *Arabidopsis thaliana* (βλέπε Εικόνα 1.4), παρατηρήθηκε μεγάλη έκφραση του υπό εξέταση γονιδίου στη χημική ουσία ισοξαμπέν και στην αμινοτριαζόλη, σε θρεπτικά συστατικά όπως σακχαρόζη και γλυκόζη και σε συνθήκες περιβαλλοντικής καταπόνησης. Έτσι κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθούν περαιτέρω.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις ισοξαμπέν μέσα σε τρυβλία ώστε να διαφανεί η έκφραση του υπό ανίχνευση γονιδίου. Σπέρματα, από τα ομόζυγα N7-1-4 και N7-2-1, από το ετερόζυγο N8-1-11 και από Columbia, επιστρώθηκαν σε σειρά σε τρυβλία MS (τρυβλία ελέγχου) και MS με προσθήκη ισοξαμπέν τελικής συγκέντρωσης 1 nM και 4 nM. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε όρθια θέση ώστε να παρατηρηθούν ευδιάκριτα τυχόν διαφορές στις ρίζες και στο βλαστό. Το πείραμα έγινε σε συνθήκες φωτός και σκότους. Στα τρυβλία που τοποθετήθηκαν στο φως δεν παρατηρήθηκαν διαφορές.

Συγκεκριμένα στα τρυβλία με το ισοξαμπέν παρατηρήθηκε γενικά μειωμένη ανάπτυξη των αρτίβλαστων συγκριτικά με τα τρυβλία ελέγχου, χωρίς όμως να ανιχνευθούν μορφολογικές διαφορές στις διαφορετικές σειρές. Αντιθέτως στα τρυβλία ελέγχου στο σκοτάδι παρατηρήθηκε διαφορά στο μέγεθος της ρίζας. Στα ομόζυγα οι ρίζες ήταν μεγαλύτερες ενώ στο ετερόζυγο ήταν ίδιες με του αγρίου τύπου.

Δοκιμάστηκε η προσθήκη και μεγαλύτερης συγκέντρωσης ισοξαμπέν. Έτσι επιστρώθηκαν σπέρματα από τις παραπάνω σειρές σε τρυβλία MS (όχι όρθια) με ισοξαμπέν τελικής συγκέντρωσης 20 nM. Η συγκέντρωση του ισοξαμπέν ήταν αποτρεπτική με αποτέλεσμα να προκληθεί θάνατος των φυτών.

Λόγω της μεγάλης του τοξικότητας δοκιμάστηκε η προσθήκη ισοξαμπέν σε αραιώσεις 50 pM, 5 pM, 0,5 pM. Παρατηρήθηκε ότι ανάπτυξη υπήρχε μόνο στο τρυβλίο με συγκέντρωση 0,5 pM, αν και φαινοτυπικά δεν υπήρχαν διαφορές ανάμεσα στο ομόζυγο και στο αγρίου τύπου.

Έτσι κρίθηκε σκόπιμο τα πειράματα να συνεχιστούν στο χώμα και σε δοχεία (pots) όπου φυτεύτηκαν 150 σπέρματα από την κάθε σειρά. Αφού βλάστησαν, στα φυτά πλέον, έγινε ψεκασμός με ισοξαμπέν τελικής συγκέντρωσης 0,2 nM, 1 nM, 2nM

και 4 nM, ανά δύο ημέρες έως ότου ανασταλεί η ανάπτυξη τους, οπότε και σταμάτησε ο ψεκασμός. Από αυτό το σημείο και μετά ξεκίνησε η επανάκαμψη τους και μετά από διάστημα δύο εβδομάδων έγινε η φωτογράφιση τους (Εικόνα 3.20). Το αποτέλεσμα ήταν τα ομόζυγα φυτά της N7 σειράς να εμφανίζονται λιγότερο ευαίσθητα στο ισοξαμπέν, ενώ τα ετερόζυγα N8 παρουσίασαν μια ενδιάμεση ανθεκτικότητα σε σχέση με τα N7 και τα αγρίου τύπου.

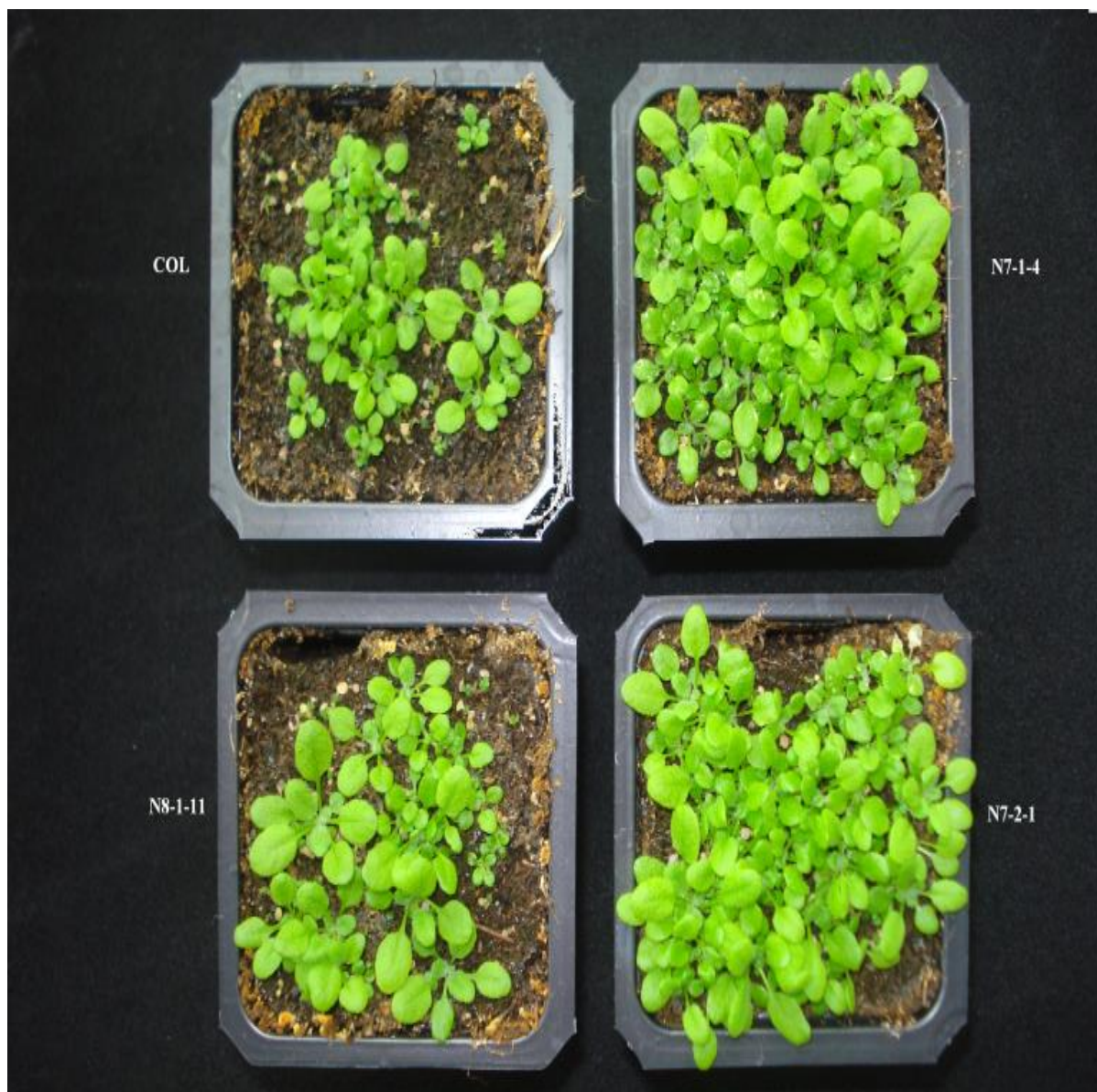
Ακολούθησε ένα δεύτερο πρωτόκολλο στο χόμα όπου ο ψεκασμός έγινε σε αρτίβλαστα. Χρησιμοποιήθηκε διάλυμα ισοξαμπέν συγκέντρωσης 2 μ M για ψεκασμό κάθε δεύτερη μέρα του πειράματος. Συνολικά έγιναν πέντε ψεκασμοί. Αποτέλεσμα ήταν να παρατηρηθεί μια μικρού βαθμού ανθεκτικότητα στα φυτά της N7 σειράς.

3.5.2 Έκφραση του *At5g48310* παρουσία αμινοτριαζόλης.

Η αμινοτριαζόλη (AT) είναι ένας ισχυρός αναστολέας της συνθάσης της καταλάσης, η οποία μειώνει τη δραστηριότητα της καταλάσης και προκαλεί ενδογενή συσσώρευση του υπεροξειδίου του υδρογόνου που τελικά οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο. Μπορεί να εφαρμοστεί σε ολόκληρα φυτά με ψεκασμό είτε να προστεθεί στο θρεπτικό υλικό ανάπτυξης. Στην παρούσα εργασία, σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό MS και προσθήκη AT τελικής συγκέντρωσης 7 μ M και 9 μ M, επιστρώθηκαν 50 σπέρματα από το ομόζυγο N7-2-1 και από το WT χωρίς να παρατηρηθεί φαινοτυπικά καμία διαφορά στην ανάπτυξή τους.

3.6 Έκφραση του *At5g48310* σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης.

Η ανάπτυξη των φυτών επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από ένα συνδυασμό περιβαλλοντικών καταπονήσεων, όπως η υψηλή θερμοκρασία, η ξηρασία ή η υψηλή αλατότητα. Τα φυτά πρέπει να προσαρμόζονται σε αυτές τις καταπονήσεις για να επιβιώσουν. Οι προσαρμοστικές αντιδράσεις στην ξηρασία πρέπει να συντονίζονται σε μοριακό, κυτταρικό και καθολικό φυτικό επίπεδο. Η ξηρασία προκαλεί την παραγωγή της φυτοορμόνης ABA (αμπισισικό οξύ), η οποία προκαλεί το κλείσιμο των στομάτων και προάγει την έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων για την ξηρασία.



Εικόνα 3.20 Έκφραση του *At5g48310* στο χώμα, σε φυτά 25 ημερών, μετά από ψεκασμό με ισοξαμπέν. Τα ομόζυγα της N7 σειράς (N7-1-4 πάνω δεξιά και N7-2-1 κάτω δεξιά) εμφανίζονται λιγότερο ευαίσθητα στο ισοξαμπέν, ενώ τα ετερόζυγα N8 (N8-1-11 κάτω αριστερά) παρουσιάζουν μια ενδιάμεση ανθεκτικότητα σε σχέση με τα N7 και τα αγρίου τύπου (COL πάνω αριστερά).

Πιστεύεται γενικά ότι οι ρίζες αντιλαμβάνονται πρώτα ένα σήμα ξηρασίας όταν η έλλειψη νερού φθάνει σε ένα συγκεκριμένο επίπεδο. Προκειμένου να μελετηθεί η έκφραση του γονιδίου *At5g48310* σε συνθήκες καταπόνησης, όπως η ξηρασία, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της παραγράφου 2.14.

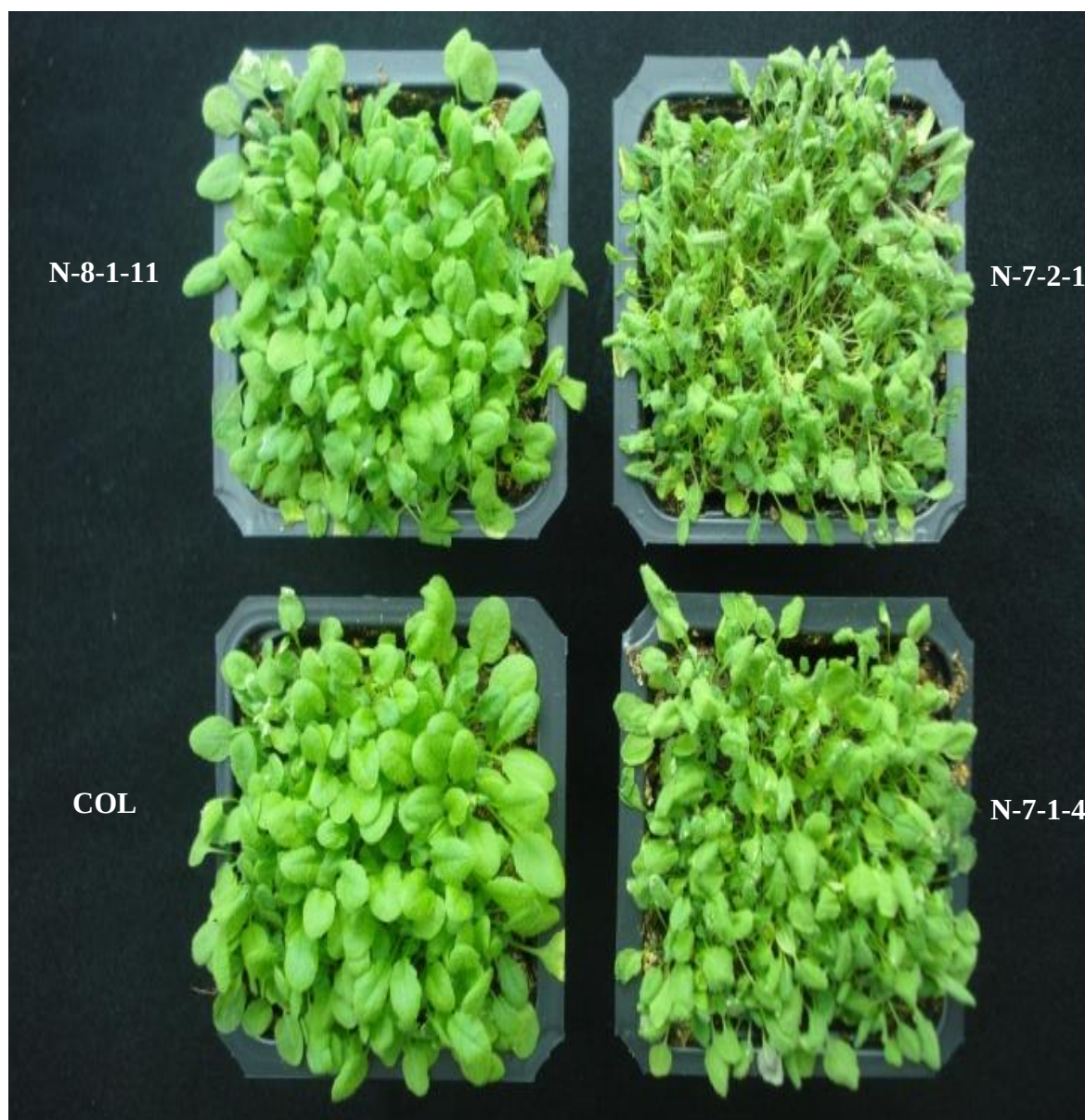
Κατά την υδατική καταπόνηση αρχικά, επηρεάστηκε η ανάπτυξη των φυτών, με αποτέλεσμα να περιοριστεί η βλάστηση. Με τον περιορισμό της βλάστησης το φυτό θεωρείται ότι εξοικονομεί νερό, ώστε να αποφευχθεί ο κίνδυνος της αφυδάτωσης (Klamkowski and Treder 2006 και Xu and Zhou 2008). Σύμφωνα με το πρωτόκολλο τα διαγονιδιακά φυτά εμφανίστηκαν ευαίσθητα στην ξηρασία συγκριτικά με τα WT και τα ετερόζυγα φυτά (Εικόνα 3.21).

3.7 Έκφραση του *At5g48310* παρουσία της ορμόνης γιββερελλίνης.

Έτσι σε τρυβλία χωρισμένα σε δύο ίσα τμήματα, με θρεπτικό υλικό MS και προσθήκη γιββερελλίνης (GA) τελικής συγκέντρωσης 50 μ M, επιστρώθηκαν 50 σπέρματα. Στο ένα τμήμα του τρυβλίου το ομόζυγο N7-2-1 και στο άλλο το Columbia. Σαν μάρτυρας-τρυβλία ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία με θρεπτικό υλικό MS. Ωστόσο δεν παρατηρήθηκαν φαινοτυπικές διαφορές.

3.8 Έκφραση του *At5g48310* παρουσία διαφορετικών σακχάρων.

Σύμφωνα με τις μελέτες που έγιναν με τη χρήση του Genevestigator στο *Arabidopsis thaliana* και επειδή το υπό ανίχνευση γονίδιο πιστεύεται ότι σχετίζεται με τη μεταφορά σακχάρων έγιναν πειράματα χρησιμοποιώντας διαφορετικά σάκχαρα. Για το σκοπό αυτό ετοιμάστηκαν τρυβλία θρεπτικού υλικού MS προσθέτοντας 3% σε διάφορα σάκχαρα όπως σακχαρόζη, γλυκόζη και ραμνόζη και σε διαφορετικές αραιώσεις κάθε φορά (αναφέρθηκαν αναλυτικά στην παράγραφο 2.18). Ωστόσο δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μορφολογικές διαφορές στην ανάπτυξη των φυτών στα διάφορα τρυβλία



Εικόνα 3.21 Έκφραση του *At5g48310* σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης σε φυτά 25 ημερών. Δεξιά φαίνονται τα ομόζυγα διαγονιδιακά φυτά N7 (πάνω το N7-2-1 και κάτω το N7-1-4) τα οποία ήταν ευαίσθητα στην ξηρασία. Όπως φαίνεται τα φυτά αγρίου τύπου COL εμφανίζονται πιο ανθεκτικά. Τα N8-1-11 ήταν τα ετερόζυγα διαγονιδιακά φυτά.

Μια άλλη προσέγγιση έγινε σε τρυβλία MS χωρισμένα σε δύο ίσα τμήματα στα οποία προστέθηκε σακχαρόζη ή γλυκόζη 1%. Έγιναν συγκεκριμένες αραιώσεις (βλέπε Υλικά και Μέθοδοι παράγραφος 2.18) και το κάθε τμήμα του τρυβλίου επιστρώθηκε με σπέρματα Columbia και N7-2-1 αντίστοιχα. Παρατηρήθηκε καλύτερη ανάπτυξη στο τρυβλίο με τη σακχαρόζη σε αντίθεση με εκείνο της γλυκόζης. Συγκεκριμένα στις αραιώσεις 1x και 1/100 παρατηρήθηκε ότι ο αριθμός και το μέγεθος των ριζών ήταν μεγαλύτερα συγκριτικά με εκείνα των άλλων τρυβλίων.

Σε άλλη πειραματική προσέγγιση που πραγματοποιήθηκε σε αρτίβλαστα και σε συνθήκες σκότους, σε τρυβλία MS χωρισμένα σε δύο ίσα τμήματα, προστέθηκε μικρότερη συγκέντρωση σακχαρόζης και συγκεκριμένα 0,1%. Επιστρώθηκαν με σπέρματα Columbia, N7-1-4, N7-2-1 και N8-1-11 στη σειρά και τοποθετήθηκαν όρθια στο σκοτάδι σε κλίβανο ελεγχόμενων συνθηκών. Συγκεκριμένα μετά από 24 ώρες καλύφθηκαν με πλαστικό διάφανο καπάκι και την 4η ημέρα ξεσκεπάστηκαν. Παρατηρήθηκε ότι το υποκότυλο ήταν ίδιο στα φυτά όλων των σειρών, αλλά οι ρίζες στα ομόζυγα φυτά ήταν πιο μακριές από αυτές των ετερόζυγων και των Columbia.

Αντίστοιχα σε ένα άλλο πρωτόκολλο που έγινε όμως στο φως, σπέρματα Columbia, N7-1-4, N7-2-1 και N8-1-11 επιστρώθηκαν σε θρεπτικό υλικό με σακχαρόζη 0,05% αυτή τη φορά. Αποτέλεσμα ήταν τα αγρίου τύπου φυτά να εμφανίζονται πιο σθεναρά, με μακρύτερες, πιο δυνατές και χοντρές ρίζες από τα αντίστοιχα διαγονιδιακά.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία, είχε σαν σκοπό τη μοριακή και λειτουργική ανάλυση του γονιδίου *At5g48310* από το *Arabidopsis thaliana*. Το συγκεκριμένο γονίδιο είναι άγνωστης λειτουργίας. Δεν είναι γνωστό το που εντοπίζεται και ποια είναι η λειτουργία του. Έτσι για αυτόν το λόγο κρίθηκε σκόπιμο και ενδιαφέρον να μελετηθεί η λειτουργία του. Αρχικά αναλύθηκαν *in silico* οι νουκλεοτιδικές και οι αμινοξικές αλληλουχίες του με προγράμματα επεξεργασίας βιολογικών δεδομένων. Στη συνέχεια εφαρμόστηκαν μία σειρά από μοριακές και γενετικές προσεγγίσεις, αλλά και πειραμάτων *in planta* ανάλυσης διαγονιδιακών φυτών, προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο λειτουργικός ρόλος του γονιδίου και της πρωτεΐνης που αυτό κωδικοποιεί στα φυτά.

Η *in silico* ανάλυση έδειξε ότι το γονίδιο *At5g48310* (cDNA 3471 ζ.β), κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 1156 αμινοξέων. Το γονίδιο παρουσιάζει ομολογία με έναν αριθμό πρωτεϊνών από φυτικούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Μεγαλύτερη ομολογία εμφανίζει με μια πρωτεΐνη στο *Vitis vinifera* (99%) και με μια πρωτεΐνη στο *Populus trichocarpa* (99%). Όπως φαίνεται και στο φυλογενετικό δέντρο (Εικόνα 3.4) η πρωτεΐνη *At5g48310*, ομαδοποιείται σε κοινό υποκλάδο με άλλες μη χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες από το *Arabidopsis thaliana*. Ο κύριος κλάδος περιέχει επίσης πρωτεΐνες από το *Arabidopsis thaliana*, το *Arabidopsis lyrata*, το *Ricinus communis*, το *Vitis vinifera*, το *Populus trichocarpa*, το *Sorghum bicolor*, πρωτεΐνες από το *Oryza sativa*, την *Physcomitrella patens*, τη *Selaginella moellendorffii*, υποδηλώνοντας έτσι μία κοινή εξελικτική πορεία και πιθανώς λειτουργία.

Στο *Arabidopsis thaliana* εντοπίστηκαν δύο ομόλογες ακολουθίες, η *At5g65440* και η *At4g24610*. Παρόλα αυτά όμως και δεδομένης της στενής φυλογενετικής σχέσης τους, η πιθανή εμπλοκή των ομόλογων αυτών γονιδίων και η μη εκδήλωση φαινοτύπου δεν μπορεί να αποκλειστεί και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Η ανάλυση με προγράμματα επεξεργασίας βιολογικών δεδομένων, για την πιθανή τοπολογία της πρωτεΐνης *At5g48310* ανέδειξε την πλασματική μεμβράνη ως πιθανό οργανίδιο στο οποίο εντοπίζεται η συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Παρόλα αυτά κρίθηκε σκόπιμο να γίνουν *in planta* πειράματα υποκυτταρικού εντοπισμού σε διαγονιδιακά φυτά *Arabidopsis thaliana* που ίσως οδηγήσουν σε σοβαρές ενδείξεις αποτελεσμάτων όσον αφορά στην τοπολογία της πρωτεΐνης. Η δημιουργία περισσότερων κατασκευών (C-μεταφραστικής σύντηξης του cDNA της *At5g48310* με την GFP πρωτεΐνη) είναι απαραίτητη προκειμένου να διαλευκανθεί ο υποκυτταρικός εντοπισμός της συγκεκριμένης πρωτεΐνης.

Τα αποτελέσματα μικροσυστοιχιών mRNA από βάσεις δεδομένων υποδεικνύουν την έκφραση του γονιδίου *At5g48310* κυρίως στην άκρη της ρίζας και στις κορυφές των βλαστών, αλλά και στο υποκότυλο των νεαρών αρτίβλαστων και στις ταξιανθίες. Η μελέτη της αναπτυξιακής έκφρασης του *At5g48310* έδειξε ότι το γονίδιο εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στις ταξιανθίες και σε μικρότερο στους βλαστούς, στα άνθη και στα νεαρά φυτά. Το έντονο σήμα στις ταξιανθίες οφείλεται στους αναπτυσσόμενους βλαστούς.

In planta ιστοειδική μελέτη της έκφρασης του γονιδίου σε διαγονιδιακά φυτά *Arabidopsis thaliana* που είχαν μετασχηματιστεί με την κατασκευή *At48310-PROM-GUS* φανέρωσε πως το πρότυπο της έκφρασης περιοριζόταν σε ανοικτά άνθη φυτών. Μεγάλη έκφραση στις ταξιανθίες. Σε νεαρά φυτά 3 ημερών το πρότυπο έκφρασης εντοπίστηκε στον κεντρικό κύλινδρο της ρίζας και στο υποκότυλο ενώ σε μικρό βαθμό υπήρχε στο ακραίο μερίστωμα της ρίζας και τις κοτυληδόνες. Σε φυτά που βρίσκονταν στην αναπαραγωγική φάση εμφανίστηκε έντονη έκφραση σε όλο το αγγειακό σύστημα του βλαστού, των φύλλων, στα πέταλα και στα σέπαλα των ανθέων. Καθόλου έκφραση στις γονιμοποιημένες σπερματικές βλάστες και στους ανθήρες.

Σύμφωνα με τις πληροφορίες από το Genevestigator και συγκεκριμένα από τις μικροσυστοιχίες RNA, για το *At5g48310*, φαίνεται ότι επηρεάζεται η έκφραση του από την παρουσία νερού και έτσι δόθηκε το έναυσμα για περαιτέρω μελέτη. Μελέτες που έγιναν σε διαγονιδιακά φυτά που υπερεκφράζουν τον CBF4, ένα μεταγραφικό παράγοντα που είναι παρών στο χρωμόσωμα No 5, έδειξαν ότι τα διαγονιδιακά φυτά είναι πιο ανθεκτικά στην ξηρασία από αυτά των μαρτύρων (φυτά αγρίου τύπου). Στα φυτά η χαμηλή θερμοκρασία και η ξηρασία ενεργοποιούν μια σειρά γονιδίων που περιέχουν στοιχεία C επαναλήψεων ανταποκρινόμενα στην ξηρασία (Haake και συνεργάτες 2002).

Σύμφωνα με τους Yu και συνεργάτες (2008) τα διαγονιδιακά φυτά με ανθεκτικότητα στην ξηρασία (*edt1*) που κωδικοποιούνται από το *HDG11* γονίδιο παρουσιάζουν ένα πιο εκτεταμένο ριζικό σύστημα από τον άγριο τύπο, με βαθύτερες ρίζες και περισσότερες πλάγιες ρίζες και δείχνουν μια μειωμένη πυκνότητα στοματίων στα φύλλα. Η περιβαλλοντική καταπόνηση της ξηρασίας προκαλεί την παραγωγή της φυτοορμόνης ABA, η οποία είναι εκείνη που δίνει το ερέθισμα για κλείσιμο των στοματίων. Τα γονίδια που ανταποκρίνονται στην ξηρασία μπορούν να χωριστούν σε δύο ομάδες. Σε γονίδια που εμπλέκονται στην προστασία των

κυττάρων και σε αυτά που συμμετέχουν στη ρύθμιση άλλων γονιδίων (πρωτεϊνικές κινάσες, μεταγραφικοί παράγοντες) για απόκριση στην ξηρασία (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 2000, Urano και συνεργάτες 2008). Οι μηχανισμοί αντίστασης στην ξηρασία μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες: διαφυγή από την ξηρασία (ικανότητα του φυτού να ολοκληρώσει τον κύκλο ζωής του πριν δημιουργηθούν σοβαρές ελλείψεις σε νερό), αποφυγή από την ξηρασία (διατήρηση του αποθέματος σε νερό μέσω της αύξησης του βάθους της ριζοβολίας, ικανού ριζικού συστήματος, μείωση της απώλειας νερού από τα στόματα) και ανθεκτικότητα σε αυτήν (Mitra 2001, Trijatmiko 2005). Στο *Arabidopsis* υπάρχουν τρία διαφορετικά ανεξάρτητα μονοπάτια ρύθμισης της ανθεκτικότητας στην ξηρασία. Το πρώτο βασίζεται στο ABA, το δεύτερο ρυθμίζεται από το μεταγραφικό παράγοντα DREB2A και το τρίτο ρυθμίζει την γονιδιακή έκφραση του ERD1 σύμφωνα με τους Catala και συνεργάτες (2007).

Η μοριακή βάση της ώσμωσης στα φυτά παραμένει άγνωστη. Μελέτη των Maruyama και Yamaguchi-Shinozaki (2007) και αντίστοιχη των Kumar και συνεργάτες (2012) παρουσιάζει μια κινάση της ιστιδίνης (AHK1) στο *Arabidopsis* να λειτουργεί σαν αισθητήρας ώσμωσης, η υπερέκφραση της οποίας βελτιώνει την ανθεκτικότητα των φυτών στην ξηρασία (θετικός ρυθμιστής). Φαινοτυπικά αυτά τα διαγονιδιακά φυτά, στην πρώτη μελέτη, κάτω από κανονικές συνθήκες δεν επηρεάζονται στην ανάπτυξη και στη μορφολογία. Όμως κάτω από συνθήκες ξηρασίας λιγότερα φυτά *ahk1* επιβιώνουν συγκριτικά με τα αγρίου τύπου. Δείχνει ξεκάθαρη ευαισθησία στην ξηρασία για το *ahk1*. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης φαίνεται να ταυτίζονται με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης. Καθώς στην παρούσα εργασία, υπό κανονικές συνθήκες, αν και μορφολογικά δεν βρέθηκε κάποιος φαινότυπος που να επιβεβαιώνει την ομοζυγωτία των μεταλλαγμάτων, ωστόσο στο αντίστοιχο πείραμα με την ξηρασία τα ομόζυγα φυτά ήταν εμφανώς πιο ευαίσθητα από τα αντίστοιχα του αγρίου τύπου. Η ομοζυγωτία των N7 φυτών ταυτοποιήθηκε εξάλλου, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της RT-PCR, με τη μη ύπαρξη μεταγραφήματος στα ομόζυγα διαγονιδιακά φυτά.

Το ισοξαμπέν είναι μια συνθετική χημική ένωση, ένας ειδικός αναστολέας της βιοσύνθεσης της κυτταρίνης. Είναι εκλεκτικά φυτοτοξικό στα δικοτυλήδονα φυτά ενώ τα περισσότερα μονοκοτυλήδονα είδη είναι ανθεκτικά. Αναστέλλει το υποκότυλο και την επιμήκυνση της ρίζας σε αρτίβλαστα που μεγαλώνουν στο σκοτάδι. Φαινολικά παράγωγα συγκεντρώνονται και τα αρτίβλαστα τελικά πεθαίνουν σε

συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 5 nM. Στο φως τα αρτίβλαστα βλαστάνουν παρουσία του ισοξαμπέν αλλά η ανάπτυξη του υποκότυλου και του μεριστώματος της ρίζας και του βλαστού εμποδίζεται, με αποτέλεσμα τα αρτίβλαστα να γίνονται νεκρωτικά και να πεθαίνουν (Desprez και συνεργάτες 2002).

Φυτά που έφεραν μετάλλαξη απώλειας λειτουργίας του γονιδίου CESA ήταν υπερευαίσθητα σε συγκεντρώσεις ισοξαμπέν 2 nM. Το γονιδίωμα του *Arabidopsis* κωδικοποιεί δέκα ισομορφές της συνθάσης της κυτταρίνης (CESA) (Somerville 2006). Ανάπτυξη των φυτών σε 20 nM ισοξαμπέν έχει ως αποτέλεσμα διογκωμένα οργανίδια σε όλα τα μέρη του φυτού (DeBolt και συνεργάτες 2007). Στην παρούσα Διπλωματική Εργασία παρουσία του φυτοφαρμάκου ισοξαμπέν τα ομόζυγα φυτά της N7 σειράς εμφανίζονται λιγότερο ευαίσθητα στο ισοξαμπέν, ενώ τα ετερόζυγα N8 παρουσίασαν μια ενδιάμεση ανθεκτικότητα σε σχέση με τα N7 και τα αγρίου τύπου φυτά.

Το ισοξαμπέν προκαλεί καθυστερημένο χρόνο άνθισης στα ομόζυγα για το γονίδιο *ixr1-1* φυτά (Roux και συνεργάτες 2004). Αρτίβλαστα ομόζυγα για το *ixr2-1* δείχνουν μια αυξημένη ανθεκτικότητα στο χημικό όπως φαίνεται από την έλλειψη αναστολής της ανάπτυξης του υποκότυλου στο σκοτάδι σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από 5 nM (Scheible και συνεργάτες 2001). Υψηλότερες συγκεντρώσεις αναστέλλουν επιπλέον την ανάπτυξη του υποκότυλου (Desprez και συνεργάτες 2002).

Η καταλάση στα φυτά βρίσκεται στα υπεροξεισώματα. Συγκέντρωση 1 mM αμινοτριαζόλης (AT) μειώνει το περιεχόμενο σε χλωροφύλλη. Η απενεργοποίηση της καταλάσης προκαλεί την ενδογενή συγκέντρωση τοξικών ριζών οξυγόνου και ως αποτέλεσμα την κυτταρική βλάβη (Kang και συνεργάτες 1998, Jannat και συνεργάτες 2011).

Σε άλλη έρευνα, σε αρτίβλαστα που αναπτύσσονται σε τρυβλία με θεραπευτικό υλικό και προσθήκη 7 και 9 mM AT αντίστοιχα, παρατηρείται χλώρωση των φυτών και θάνατος των κοτυληδόνων 12 ημέρες μετά τη βλάστηση. Φυτά αγρίου τύπου πεθαίνουν όταν μεγαλώνουν σε συγκεντρώσεις 7 mM AT και όλα τα φυτά πεθαίνουν σε 9 mM AT. Άρα είναι γεγονός ότι η ενεργότητα της καταλάσης μειώνεται το ίδιο (Gechev και συνεργάτες 2005). Στην παρούσα Διπλωματική Εργασία δεν παρατηρήθηκαν μορφολογικές διαφορές στα φυτά.

Στα ανώτερα φυτά, τα σάκχαρα διαδραματίζουν σημαντικό φυσιολογικό και αναπτυξιακό ρόλο, για παράδειγμα στην ανάπτυξη του βλαστού, στην άνθιση, στην ανάπτυξη του σπόρου και στο θάνατο. Η αφαίρεση των σακχάρων σε αρτίβλαστα

Arabidopsis κάτω από συνθήκες σκότους καταστέλλουν την ανάπτυξη των φύλλων (Morita - Yamamuro και συνεργάτες 2004). Σύγκριση ανάμεσα στην ανάπτυξη της ρίζας και στην ανάπτυξη αρτίβλαστων αγρίου τύπου που αναπτύσσονται σε θρεπτικά υλικά με διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκόζης 0-5% (Mishra και συνεργάτες 2009), έδειξε ότι το μέγεθος των φυτών και της ρίζας αυτών αυξανόταν σε συγκέντρωση μέχρι 3%, αλλά σε συγκεντρώσεις 5% το μέγεθος αυτών μειώνεται. Σε μελέτη που έγινε σε αρτίβλαστα, τα υψηλά επίπεδα σακχάρων στο θρεπτικό υλικό (Jang και συνεργάτες 1997, Rognoni και συνεργάτες 2007) αναστέλλουν την επιμήκυνση του υποκότυλου στο σκοτάδι και το άνοιγμα των κοτυληδόνων κατά την παραμονή τους στο φως (Dijkwel και συνεργάτες 1997, Ohto και συνεργάτες 2001).

ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Το γονίδιο *At5g48310* του φυτού *Arabidopsis thaliana*, κωδικοποιεί πρωτεΐνη 1156 αμινοξέων η οποία είναι άγνωστης λειτουργίας. Εμφανίζει μεταξύ άλλων ομολογία με δύο πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *At5g65440* και *At4g24610* στο *Arabidopsis thaliana* και χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης.
2. Η ανάλυση με προγράμματα επεξεργασίας βιολογικών δεδομένων, για την πιθανή τοπολογία της πρωτεΐνης *At5g48310* ανέδειξε την πλασματική μεμβράνη ως πιθανό οργανίδιο στο οποίο εντοπίζεται η συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Παρόλα αυτά κρίνεται σκόπιμο να γίνουν *in planta* πειράματα υποκυτταρικού εντοπισμού σε διαγονιδιακά φυτά *Arabidopsis thaliana* που θα οδηγήσουν σε ξεκάθαρα αποτελέσματα όσον αφορά την τοπολογία της πρωτεΐνης.
3. Τα πειράματα ιστοειδικής έκφρασης *in planta* μετά από σταθερό μετασχηματισμό φυτών *Arabidopsis thaliana* με την κατασκευή που έφερε την πιθανή ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου άνωθεν του γονιδίου της β-γλουκουρονιδάσης (GUS), υπέδειξαν για το *At5g48310* μεγάλη έκφραση στις ταξιανθίες και σε όλο το αγγειακό σύστημα του βλαστού, των φύλλων, στα πέταλα και στα σέπαλα των ανθέων.
4. Η ανάλυση μεταλλαγμένων σειρών (salk lines) του υπό μελέτη γονιδίου έδειξε ότι αν και δεν υπήρχε φαινότυπος υπό κανονικές συνθήκες, ωστόσο στα ομόζυγα διαγονιδιακά φυτά των σειρών N7-1-4 και N7-2-1 δεν παράχθηκε καθόλου μεταγράφημα.
5. Τα συγκεκριμένα διαγονιδιακά φυτά εκφράζονται υπό την παρουσία τοξικών χημικών ενώσεων. Τα ομόζυγα της N7 σειράς εμφανίζονται ανθεκτικά στο ισοξαμπέν, ενώ τα ετερόζυγα N8 παρουσιάζουν μια ενδιάμεση ανθεκτικότητα σε σχέση με τα N7 και τα αγρίου τύπου.
6. Έκφραση του *At5g48310* σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης. Τα ομόζυγα διαγονιδιακά φυτά N7 είναι ευαίσθητα στην ξηρασία.
7. Πρέπει να μελετηθεί η απόκριση στην καταπόνηση των διαγονιδιακών φυτών παρουσία υψηλής θερμοκρασίας.
8. Πρέπει να μελετηθεί περαιτέρω ο ρόλος των σακχάρων στην έκφραση των φυτών, καθώς δεν εξάχθηκε κάποιο ξεκάθαρο αποτέλεσμα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. & Lipman D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. **25**(17), 3389-3402.
2. Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**(6814), 796-815.
3. Atmakuri K., Cascales E. & Christie P.J. (2004) Energetic components VirD4, VirB11 and VirB4 mediate early DNA transfer reactions required for bacterial type IV secretion. *Molecular Microbiology* **54**(5), 1199-1211.
4. Bechtold N., Ellis J. & Pelletier G. (1993) In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série 3, Sciences de la vie* **316**(10), 1194-1199.
5. Berardini T.Z., Mundodi S., Reiser L., Huala E., Garcia-Hernandez M., Zhang P., Mueller L.A., Yoon J., Doyle A., Lander G., Moseyko N., Yoo D., Xu I., Zoeckler B., Montoya M., Miller N., Weems D. & Rhee S.Y. (2004) Functional Annotation of the Arabidopsis genome using controlled vocabularies. *Plant Physiology* **135**(2), 745-755.
6. Bevan M. & Walsh S. (2004) Positioning *Arabidopsis* in plant biology. A key step toward unification of plant research. *Plant Physiology* **135**(2), 602-606.
7. Bevan M. & Walsh S. (2005) The *Arabidopsis* genome: A foundation for plant research. *Genome Research*. **15**(12), 1632-1642.
8. Birnboim H.C. & Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*. **7**(6), 1513-1523.
9. Burr T.J. & Katz B.H. (1983) Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 from grapevine galls and sap, and vineyard soil. *Phytopathology* **73**, 163-165.
10. Catala R., Ouyang J., Abreu I.A., Hu Y., Seo H., Zhang X. & Chua N.H. (2007) The *Arabidopsis* E3 SUMO ligase SIZ1 regulates plant growth and drought responses. *The Plant Cell* **19**(9), 2952-2966.
11. Christie P.J., Ward J.E., Winans S.C. & Nester E.W. (1988) The *Agrobacterium tumefaciens* virE2 gene product is a single-stranded-DNA-binding protein that associates with T-DNA. *Journal of Bacteriology* **170**(6), 2659-2667.

12. Christie W.W., Brechany E.Y. & Shukla V.K. (1989) Analysis of seed oils containing cyclopentenyl fatty acids by combined chromatographic procedures. *Lipids* **24**(2), 116-120.
13. Chyi Y.S., Jorgensen R.A., Goldstein D., Tanksley S.D. & Loaiza-Figueroa F. (1986) Locations and stability of *Agrobacterium*-mediated T-DNA insertions in the *Lycopersicon* genome. *Molecular and General Genetics* **204**(1), 64-69.
14. Cohen S.N., Chang A.C. & Hsu L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **69**(8), 2110-2114.
15. De Cleene M. & De Ley J. (1976) The host range of crown gall. *The Botanical Review* **42**(4), 389-466.
16. De Cleene M. (1985) The susceptibility of monocotyledons to *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Phytopathology* **113**(1), 81-89.
17. De Silva K., Laska B., Brown C., Sederoff H.W. & Khodakovskaya M. (2011) *Arabidopsis thaliana* calcium-dependent lipid-binding protein (AtCLB): a novel repressor of abiotic stress response. *Journal of experimental botany* **62**(8), 2679-2689.
18. Deacon J. (2002) Biology and control of Crown Gall (*Agrobacterium tumefaciens*). University of Edinburgh - Institute of Cell and Molecular Biology.
19. DeBolt S., Gutierrez R., Ehrhardt D.W. & Somerville C. (2007) Nonmotile cellulose synthase subunits repeatedly accumulate within localized regions at the plasma membrane in *Arabidopsis* hypocotyl cells following 2,6-Dichlorobenzonitrile treatment. *Plant Physiology* **145**(2), 334-338.
20. Desprez T., Vernhettes S., Fagard M., Refrégier G., Desnos T., Aletti E., Py N., Pelletier S. & Höfte H. (2002) Resistance against herbicide isoxaben and cellulose deficiency caused by distinct mutations in same cellulose synthase isoform CESA6. *Plant Physiology* **128**(2), 482-490.
21. Dijkwel P.P., Huijser C., Weisbeek P.J., Chua N.H. & Smeekeens S.C.M. (1997) Sucrose control of phytochrome A signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **9**(4), 583-595.

22. Don R.H., Cox P.T., Wainwright B.J., Baker K. & Mattick J.S. (1991) 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research* **19**(14), 4008.
23. Dym O., Albeck S., Unger T., Jacobovitch J., Branzburg A., Michael Y., Frenkiel-Krispin D., Wolf S.G. & Elbaum M. (2008) Crystal structure of the *Agrobacterium* virulence complex VirE1-VirE2 reveals a flexible protein that can accommodate different partners. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**(32), 11170-11175.
24. Escudero J., Den Dulk-Ras A., Regensburg-Tuïnk T.J & Hooykaas P.J.J. (2006) VirD4-independent transformation by CloDF13 evidences an unknown factor required for the genetic colonization of plants via *Agrobacterium*. *Molecular Microbiology* **47**(4), 891-901.
25. García-Rodríguez F.M., Schrammeijer B. & Hooykaas P.J.J. (2006) The *Agrobacterium* VirE3 effector protein: a potential plant transcriptional activator. *Nucleic Acids Research*. **34**(22), 6496-6504.
26. Gechev T.S., Minkov I.N. & Hille J. (2005) Hydrogen peroxide-induced cell death in *Arabidopsis*: Transcriptional and mutant analysis reveals a role of an oxoglutarate-dependent dioxygenase gene in the cell death process. *IUBMB Life* **57**(3), 181-188.
27. Gelvin S.B. (2003) *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the Biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**(1), 16-37.
28. Gietl C., Koukolíková-Nicola Z. & Hohn B. (1987) Mobilization of T-DNA from *Agrobacterium* to plant cells involves a protein that binds single-stranded DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**(24), 9006-9010.
29. Giraud E., Ho L.H., Clifton R., Carroll A., Estavillo G., Tan Y.F., Howell K.A., Ivanova A., Pogson B.J., Millar A.H. & Whelan J. (2008) The Absence of ALTERNATIVE OXIDASE1a in *Arabidopsis* Results in Acute Sensitivity to Combined Light and Drought Stress. *Plant Physiology* **147**(2), 595-610.

30. Haake V., Cook D., Riechmann J.L., Pineda O., Thomashow M.F. & Zhang J.Z. (2002). Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **130**(2), 639-648.
31. Heim D.R., Skomp J.R., Tschabold E. & Larrinua I.M. (1990) Isoxaben inhibits the synthesis of acid insoluble cell wall materials in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **93**(2), 695-700.
32. Ho L.H., Giraud E., Uggalla V., Lister R., Clifton R., Glen A., Thirkettle-Watts D., Van Aken O. & Whelan J. (2008) Identification of Regulatory Pathways Controlling Gene Expression of Stress-Responsive Mitochondrial Proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **147**(4), 1858-1873.
33. Holsters M., Silva B., Van Vliet F., Hernalsteens J.P., Genetello C., Van Montagu M. & Schell J. (1978) In vivo transfer of the Ti-plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* to *Escherichia coli*. *Molecular & General Genetics*. **163**(3), 335-338.
34. Horan K., Jang C., Bailey-Serres J., Mittler R., Shelton C., Harper J.F., Zhu J.K., Cushman J.C., Gollery M. & Girke T. (2008) Annotating genes of known and unknown function by large-scale coexpression analysis. *Plant Physiology* **147**(1), 41-57.
35. Huggenberger F., Jennings E., Ryan P. & Burrow K. (1982) EL-107, a new selective herbicide for use in cereal. *Proceedings of British Crop Protection Conference-Weeds* **1**, 47-52.
36. Hwang H.H., Mysore K.S. & Gelvin S.B. (2006) Transgenic *Arabidopsis* plants expressing *Agrobacterium tumefaciens* VirD2 protein are less susceptible to *Agrobacterium* transformation. *Molecular Plant Pathology* **7**(6), 473-484.
37. Jang J.C., León P., Zhou L. & Sheen J. (1997) Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *The Plant Cell* **9**(1), 5-19.
38. Jannat R., Uraji M., Morofuji M., Hossain M.A., Islam M.M., Nakamura Y., Mori I.C. & Murata Y. (2011) The roles of Catalase2 in abscisic acid signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **75**(10), 2034-2036.

39. Jannat R., Uraji M., Morofuji M., Islam M.M., Bloom R.E., Nakamura Y., McClung C.R., Schroeder J.I., Mori I.C. & Murata Y. (2011) Roles of intracellular hydrogen peroxide accumulation in abscisic acid signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Journal of Plant Physiology* **168**(16), 1919-1926.
40. Jefferson R.A. (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter* **5**(4), 387-405.
41. Jones D.H., Doherty A. & Wu H. (2005) Review of methodologies and a protocol for the *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat. *Plant Methods* **1**(1), 5.
42. Kang K.S., Lim C.J., Han T.J., Kim J.C. & Jin C.D. (1998) Activation of ascorbate-glutathione cycle in *Arabidopsis* leaves in response to aminotriazole. *Journal of Plant Biology* **41**(3), 155-161.
43. Kasuga M., Liu Q., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K. & Shinozaki K. (1999) Improving plant drought, salt and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnology* **17**(3), 287-291.
44. Kerr J.F.R. (1969) An electron-microscope study of liver cell necrosis due to heliotrine. *The Journal of Pathology* **97**(3), 557-562.
45. Klamkowski K. & Treder W. (2006) Morphological and physiological responses of strawberry plants to water stress. *Agriculturae Conspectus Scientificus* **71**(4) 159-165.
46. Klee H.J., White F.F., Iyer V.N., Gordon M.P. & Nester E.W. (1983) Mutational analysis of the virulence region of an *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *Journal of Bacteriology* **153**(2), 878-883.
47. Knight C.J., Bailey A.M., Foster G.D. (2010) Investigating *Agrobacterium*-mediated transformation of *Verticillium alboatrum* on plant surfaces. *PLoS ONE* **5**(10), 13684.
48. Koncz C., Martini N., Mayerhofer R., Koncz-Kalman Z., Körber H., Redei G.P. & Schell J. (1989) High - frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**(21), 8467-8471.

49. Korbie D.J. & Mattick J.S. (2008) Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols* **3**(9), 1452-1456.
50. Krasensky J. & Jonak C. (2012) Drought, salt and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany* **63**(4), 1593-608.
51. Loake G.J., Ashby A.M. & Shaw C.H. (1988) Attraction of *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 towards sugars involves a highly sensitive chemotaxis system. *Journal of General Microbiology* **134**(6), 1427-1432.
52. Maruyama K. & Yamaguchi-Shinozaki K. (2007) An *Arabidopsis* histidine kinase AHK1 functions as an osmosensor and its overexpression improves plant drought-stress tolerance. *Research Highlights*.
53. Mayerhofer R., Koncz-Kalman Z., Nawrath C., Bakkeren G., Cramer A., Angelis K., Redei G.P., Schell J., Hohn B. & Koncz C. (1991) T-DNA integration: a mode of illegitimate recombination in plants. *The EMBO Journal* **10**(3), 697-704.
54. McNeil M., Darvill A.G., Fry S.C. & Albersheim P. (1984) Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annual Review of Biochemistry* **53**, 625-663.
55. Mishra B.S. Singh M., Aggrawal P. & Laxmi A. (2009) Glucose and auxin signaling interaction in controlling *Arabidopsis thaliana* seedlings root growth and development. *PLoS ONE* **4**(2), e4502.
56. Mitra J. (2001) Genetics and genetic improvement of drought resistance of crop plants. *Current Science Association/Indian Academy of Sciences* **80**(6), 758-763.
57. Morita - Yamamuro C., Vernieri P. & Yamaguchi J. (2004) Low sugar status endogenous ABA level and ABA sensitivity in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology* **21**(1), 9-14.
58. Ohto M., Onai K., Furukawa Y., Aoki E., Araki T. & Nakamura K. (2001) Effects of Sugar on Vegetative Development and Floral Transition in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **127**(1), 252-261.

59. Olszewski N., Sun T.P. & Gubler F. (2002) Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism and response pathways. *The Plant Cell* **14** (Suppl.), S61-S80.
60. Parke D., Ornston L.N. & Nester E.W. (1987) Chemotaxis to plant phenolic inducers of virulence genes is constitutively expressed in the absence of the Ti plasmid in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology* **169**(11), 5336-5338.
61. Pitzschke A. & Hirt H. (2010) New insights into an old story: *Agrobacterium*-induced tumour formation in plants by plant transformation. *The EMBO Journal* **29**(6), 1021-1032.
62. Porter S.G., Yanofsky M.F. & Nester E.W. (1987) Molecular characterization of the *virD* operon from *Agrobacterium tumefaciens*. *Nucleic Acids Research* **15**(18), 7503-7517.
63. Rognoni S., Teng S., Arru L., Smeekens S.C.M. & Perata P. (2007) Sugar effects on early seedling development in *Arabidopsis*. *Plant Growth Regulation* **52**(3), 217-228.
64. Roux F., Gasquez J. & Reboud X. (2004) The dominance of the herbicide resistance cost in several *Arabidopsis thaliana* mutant lines. *Genetics* **166**(1), 449-460
65. Scheible W.R., Eshed R., Richmond T., Delmer D. & Somerville C. (2001) Modifications of cellulose synthase confer resistance to isoxaben and thiazolidinone herbicides in *Arabidopsis* *Ixr1* mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**(18) 10079-10084.
66. Sforza P., McMeans G., Medina-Bolivar F., Tillman D., Lacy G., Hansen M.A. & Jelesko J. (2002) Pathogenesis of Crown Gall. Virginia Tech - Department of Plant Pathology, Physiology & Weed Science.
67. Shaw P.E., Hipskind R.A., Schröter H. & Nordheim A. (1989) In *Nucleic Acids and Molecular Biology*. **3**, 120-132.

68. Shinozaki K. & Yamaguchi-Shinozaki K. (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* **3**(3), 217-223.
69. Sivanesan D., Hancock M.A., Villamil Giraldo A.M. & Baron C. (2010) Quantitative analysis of VirB8-VirB9-VirB10 interactions provides a dynamic model of type IV secretion system core complex assembly. *Biochemistry* **49**(21), 4483-4493.
70. Somerville C. (2006) Cellulose synthesis in higher plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **22**, 53-78.
71. Trijatmiko K.R. (2005) Comparative analysis of drought resistance genes in *Arabidopsis* and rice.
72. Tzfira T., Vaidya M. & Citovsky V. (2004) Involvement of targeted proteolysis in plant genetic transformation by *Agrobacterium*. *Nature* **431**(7004), 87-92.
73. Urano K., Maruyama K., Ogata Y., Morishita Y., Takeda M., Sakurai N., Suzuki H., Saito K., Shibata D., Kobayashi M., Yamaguchi-Shinozaki K. & Shinozaki K. (2008) Characterization of the ABA-regulated global responses to dehydration in *Arabidopsis* by metabolomics. *The Plant Journal* **57**(6), 1065-1078.
74. USDOE (U.S. DEPARTMENT OF ENERGY) - Bonneville Power Administration (2000) Isoxaben: Herbicide fact sheet.
75. Vergunst A.C., Miranda C.M. van Lier, Amke den Dulk-Ras & Hooykaas P.J.J. (2003) Recognition of the *Agrobacterium tumefaciens* VirE2 translocation signal by the VirB/D4 transport system does not require VirE11. *Plant Physiology* **133**(3), 978-988.
76. Wang X.C., Smith T.J. & Lau J.T. (1990) Transcriptional regulation of the liver beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase by glucocorticoids. *The Journal of Biological Chemistry* **265**(29), 17849-17853.
77. Weigel D. & Glazebrook J. (2006). Transformation of *Agrobacterium* using the freeze-thaw method. *Cold Spring Harbor Protocols*.

78. Winans S.C., Ebert P.R., Stachel S.E., Gordon M.P. & Nester E.W. (1986) A gene essential for *Agrobacterium* virulence is homologous to a family of positive regulatory loci. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**(21), 8278-8282.
79. Xu Z. & Zhou G. (2008) Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a grass. *Journal of Experimental Botany* **59**(12), 3317-3325.
80. Yanofsky M.F. & Nester E.W. (1986) Molecular characterization of a host-range determining locus from *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology* **168**(1), 244-250.
81. Yu H., Braun P., Yildirim M.A., Lemmens I., Venkatesan K., Sahalie J., Hirozane-Kishikawa T., Gebreab F., Li N., Simonis N., Hao T., Rual J.F., Dricot A., Vazquez A., Murray R.R., Simon C., Tardivo L., Tam S., Svrikapa N., Fan C., de Smet A.S., Motyl A., Hudson M.E., Park J., Xin X., Cusick M.E., Moore T., Boone C., Snyder M., Roth F.P., Barabási A.L., Tavernier J., Hill D.E. & Vidal M. (2008) High-quality binary protein interaction map of the yeast interactome network. *Science* **322**(5898), 104-110.
82. Χατζόπουλος Π. (2001). Βιοτεχνολογία φυτών. Εκδ. Εμβryo. Αθήνα.

Διαδικτυακές βιβλιογραφίες

NCBI centre – (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

ExPASy – (<http://ca.expasy.org/>)

The Arabidopsis Information Resource – (<http://www.arabidopsis.org/>)

Arabidopsis thaliana microarray database and analysis toolbox (Genevestigator) -
(<https://www.genevestigator.ethz.ch/at/index.php?page=home>)

Salk Institute Genomic Analysis Laboratory – (<http://signal.salk.edu/>)

BLAST Homepage – (NCBI) (<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>)

ClustalW – Multiple Sequence Alignment (EBI, United Kingdom)
(<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)

Promoters: (Softberry)-TSSP
(<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=index&group=programs&subgroup=promoter>)

CDD – (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>)

GeneFisher – Interactive PCR Primer Design (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher/>)

TAIR Gene Ontology - (http://arabidopsis.org/home/tair/Genes/Gene_Ontology)

The Institute for Genome Research –
(<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/ath1.shtml>)

WoLFPSORT (<http://www.wolfpsort.org/>)

PSORT (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/>)

<http://www.bios.net>

<http://www.biology.ed.ac.uk>

<http://www.cals.ncsu.edu>

<http://www.chemspider.com>

<http://www.sciencepresse.qc.ca>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Παράρτημα 1 Α) Η αλληλουχία νουκλεοτιδίων του γονιδίου *At5g48310*: Πορτοκαλί κεφαλαία γράμματα εξώνια, μπλε μικρά γράμματα εσώνια, κόκκινα γράμματα 3' και 5' αμετάφραστες περιοχές, μαύρα μικρά γράμματα 5' ρυθμιστική περιοχή (υποκινητής). Σημειώνεται επίσης με μπλε χρώμα το κωδικόνιο έναρξης και το κωδικόνιο λήξης της μετάφρασης. Β) Η αντίστοιχη αλληλουχία των αμινοξέων της πρωτεΐνης.

A) TAActtggccttgacggacatcgctcgagcaacaagatattattgaaattttatggtgttatatac
 ttatatgaaagaattccttaaaatggtctacatttgaaaaaattattcagtaaaacctctttaatttaaat
 aatattggaattttgattttcttataatgtgtattgtaccggataatgaatagttgtagccgattgttag
 ttggagatatattgagcaacgcgatttagctggtccaccccattttcattttcttttaaaagttaatctcttc
 atacaaatttattaaattttgcaatcactaaaacacacataaaattttagcatgtgctatcagttgagaa
 atttgtaaaacctacaaaaattatctgagaaaaatgaaattgtgattttggatgaatgtttcattctacg
 taaaaccatagacgtatatgtgtatagagaaaaaatccatttgatgtgttctatatattttgtaagttaaa
 caaaaataatctgtattacaacacctaataactctaaagctaaaattttaaatcaatccaaaata
 ataaggtataaaaccgtaacatctttatttgaattcaactgaacccttcttcgaccttcgagtgctcgac
 ctatcaattaaacctgagctcttcttacttttaccctgccttccaaactctctagttcgtttgatgtcg
 ctcgaaagactcggttcattttgattttggtccatgtgacaatctttgggtggatctgatcatagagtccga
 tcaggatcgacaccaacaatcaccttttgctaattatagccgaaagtaattgattgaattaaatctttg
 ttcaccgcaatttaatacatttactaaatactcgattactatctcatatctctcttttctcatgattct
 tatcatatatattgtttctgattttaacttttgatttgaaataaagaatgtaacaagttaccttattttt
 aatataattatatcataattttttgacaaaaataaataaattatatcataatttccaatttttgtaatt
 tagatgtttatagaatttcttttagataaccaaaagttaaactttgtaagaaaacaagacaatttgtag
 aatactataatatacataccatagctaaataaaaaatatgtcacaattttgttttcttacggcaaaaata
 ataactgactaaaaatatttccctcaagagttcaagtccttgtgaataataaacgacaaaaataaattaa
 ttgtgacaacagtggttttaaaagtcttcaaaatttaataaatttaattgcggaaaaaagtatccttcaata
 atacgaaaagtggaacagtggtcaaaactagccgttgccattatttttttccaaaacagccgctcctct
 cctttctctctttctcagcttccctcaagcattatcgaaaccaagctgagaaaaaactccATGGCTCAACT
 TCAACGACCTCGCATCAGATCTCCACTCTCCGAGAATCTTCCTCCTTCTACCTTTTCACAACTCCACT
 GAAACGAAACTCAAACCTGTCATCGCCAATCCTCGTAACTCCAACCTCTTAACGATGATGAATCAAACGA
 TAACATGAGTATCGAATCGGTTTCGGATACCGGAGAAGGAAACGAATTGTTATTCTCTGATTACGATGT
 TGAAGATGAAGAGGAAGAAGAAGTGATTGGGAGACGTTACGATGAAGAAGAAGTGTTTGGTGACAAGTC
 GAATTCGAAATTGAATAGAGGAATGTTGAAAGATAAGAATCTGAGAATTGAAGTTCCGTTTATGAATCG
 AAGAGTCACAGATTGTGAATTAGAGCTTCGGAGATTTCGCAATTGAAGAATTCAACTCCAGCTAGTGAACG
 ACGACCACATACTCTGAGTTCTAAGgtaacgattttgtctcattttgagatatattgagcttaatttataa
 ttaaatttcttcttttttagGGTTCGGTGTATTGGGATTTAGAGGATATACGAACTCCAAGTGCTCCACC
 TATAATGGAAAGTGGAAGAAGATAGCATCAGCTTAGAGATTGAAAAGGACATTCAGAAGATTGAGGA
 TGAGATTTGTGGAGAAGCAGGAGTAGAGAGTAGTAAGCAAGAAAGCATGAGAAGCAGTTTACATTTGTA
 TAGAGTTGAAGAATTTGGTGAAAGGTATTTTCCGAATTTAACGAGATTTTTTGTAAATTCGTTCTGCGG
 ACTAGTTTTGATGTGTTAATCATGGTTTGGTGTAGTGTGAAGGACAGTAAACTGTGGAAGATTTCGAA
 AATCTCGGAAATTTGCTCAGATGAATTAGAAGAGTGCCATAGTATCAGgttcagttacttattttatttc
 agaggttataatgaaagagttgaactttattatggtttcttacaataatgtttctaatgacagTGGTCAA
 TATGCTTGGCAAAGTCTTTTGGCATATGATGCTTGTATAAGACTATGTTTGTATGAATGGTCAAAGGGT
 TCTACTGAGGCGTCTGAGTTTCTGCGTGATGAGTGTGCTATTCTTCGAGGTGCATTTGGgtaggggcat
 gtgtttctttatggtttctgagatatattacttatttggtttatgtttgagttattgaaactagtcctttt
 tgtttatgtgtgtttatagTTTGACAAGTTTCTCTTACAACCTCGGGGTGTACGATCGTCTGAGAAAA
 ACAACAATGTGAAAGCGGAGCCAAAGCCATCCTTAAAGTCTAAAAACGTTGTCAGAAAGTTAAGGGTGG
 AAGgtaaactatcagttttctgatgattttgtagctgcctgacatgaatcagatatattataacctcttc
 aattttttattgttttagTAAAGAGACTTCGATTGATACCACAGCGAAAACTTAGAGGCACAGATTTCGC
 TGCGGAGTTTAAATGAATATGCAATAGGAATGGGGCAGAGTATTGCAGACAAGTTTCATCACTTGTA
 AACTGGGATGACTTCTATTAAACAGGCTACCCCTTCAGCAGTTTCAGAAGgttttgcttttgatatttg

gttatgaatttaattttcttaggcggttaatatgtgatttgtccactggtttgacacagtttactaaat
ggaagataacatttgtagataagccctttattgatatgagatgacacgacttattctacctgcagAAC
AATTCTCTTGCTACCTTCAAATGAAGAGCACAGCAGAAGGTGGTCAAATTGAACAAGGATCTTCTGTTT
GTTTGAGTCAGGAAGTGAAGTTACCATGTCTTgtaagttcttttatttctattgaaaatcagtaa
gtgtatgctagtgggtgtttgagaaaattgaattacatgtaaccatagtgtttaaataaatgaaactt
tcatggaaagtaccacaatctagttttatagttttctgagtacatagagttttactcacaactgtcct
tcagCTTTCCTGAGTCCGAAGGCGACGCTCTTATGATAGAAGTTCAAGATAAGAAGAAATCAGTTCAAG
GAAAAGCAATGATTTCTATCAGATCATTAACTGAAAATCCGgtaaatacgccttttagttgtccttcccg
agttaaatctcttccattttgcttctgagaatatgttaactagatatactgaagaaaactctatatttg
tctagAATGATAATGTCAGATGGTGGCCTATATACCATGGTGAACAAGAATGTGTTGGCAAGATCCAGC
TCTTTATTGGTAGACAACACGTCGATGAAGACTGTCACATAAAGgtatgttcttttctccaacacaa
tctccattatctgttttggtcagtgagtttaacttatgttttgcatctctgtatattctagAACGCACC
TGTTGTGGAGACACTAGCATATGATTTGCTACTAGAAGCGGCTACACGTGCCCCAAAATTCATCCTCA
AACTTAAGGCTGGATGGATCTTGGAAATGGCTGTTAAGCGAATTCGCAGATTATTATGGAGTTTCTGA
TTCATATACCAAGTTGAGgtattcataaagatatctcagttagatttcttgtatctattgtaattcgt
ctggaatttagctcaaatatgctgcacaaacttttcagATATCTCTCACATGTAATGAATGTGGCAAC
TCCAACAAAACCTGCTTACAACCTGTTTCATGAGTTACTTGTGCCCATCCTAATGGCTCGAAGTGAGAA
GAGTTTAACCAGACAAGAGgtaattccattttgtttgtaaattgatgaatctgacatctcacaaaaat
catgaacttggattcgaattattgcatttagtttgaaattgctgggtttgttatcttcatggctcct
aggaatatttattgaagacttgttctatttttgcagAAAAGTATCTTAATGGATTGTGAAATAGAGATA
GAAAACCTCATGGCAACTGTTTTTGAGAACTACAAGTCTTAGATGAAAACCTCCCTCAGGATTGGCA
GACATATCTTGTCCGGTGCAAGTATCGGCAACAACAGCACTTCTTCAGCTGTTTCAGGTTTTTACCTC
CTTCATGATATATTGTCTCCAGAAGCACAAGAACTTTGAAGAATTACCTCCAGgtaaaaatatttcaag
ttttcaacaaccttcatatgttctcctatcattaagaaagtctaccactaagagacctttaaactgtt
cttttcaaatagtatcacatttcatacctttaagttgtcttgattttgtaacatatcaaggctatgat
gttcacgattttcttgtcatatggaaaacctactgcagACAGCAGCAAAGAAGAGGTGTGCGAAGCACA
TGGTTGATACCGATGAGTATGTTTCTGCAACTCTGAAGGTTTTCTTTTGGACTCCGTCACAATTTCTA
CAGCCTACCTGAAAATGAAGAATCTTTTCTAATCATAAGCAATGAGATAGAGGCTGATATAAAGATCA
CCAATGAGCATGTACTCCCAAGgtaaaaatgattcaatccgaacaaagaacttacatttgtcatctgggt
ttcatcttgagattatctctgagttcttgatattgatttgggtcttatgttctcattaccttgtttatcgt
tcaagCTCAATCGACCTAGCGAATCTAGCTGCTGTGCTATACAGCACTCAGCTGTGTCACCGGCTCAGA
GCATTTCTGTCAGCAGTTCCACCATCTGCCCACTGCCTCATGTCAATGAGCTTCTCATAGCAGTTTCA
GATTTTGAAAGAAACCTCGATTATGGGGAATCAGgtttgacattatcatttcggaatcaatcacaata
tttgtgggaactcattcttctctttaaccgtttcattttatattacacagCCAGTACATGGTGGTGT
AGACTCTAGGGGGTGTTCACAACCTACATAATGGTTTGGATACATGATATGGAACCTTAGACTACTTGA
CCGATGCAGAGCAGAAAAGgtaaccatcctgataattttgcattgatccttaaaaataaaaaaacctatc
gtgtgactgttaagcacggatggcttgtttttgcagGTTCCATGGTCTGGTGTAAATAACAAATCACTCA
ACATCCCCATTTGCTGAAGACATATATGAGAGAATAAAAGATTCTCTTATAGAGTATGAAGTGGTGATT
AGTCGATGGCCACAATACACATTGATCTTGGAAAATgtaagctacagatttataagtgattagtttgc
gcctaccggataattatcgagactaacttaggtttcactctctttttcatctacacttttgggaagACTG
CTTCAATTGTAGAGAGAGCCATTGTTAAATCACTGGAGAAGCAATACAATGACATTCTAATTCCTTTAA
AAGATAGCATTCCAAAGAGGCTAAATATGCATGTCCAGAAGCTGACAAGAAGGCAATCATCGGTTCTCT
ACTCTCTTCCAACCTCAAgtaagagtcactcatcaatcgtgtacaatagaagtttttacattttctgact
taaggatttgtgttggacatcattcattctctcttgttaaatgcagCTGGGAACCTTCATCAACACAA
TAAAGAGAGTTCTTGATGTTCTACATCCAGAGTTGAGGATATCTTGAGACAATGGGCGTCGTGTCTTC
CTGTTGTAGAAGACAAGAAGTTAATCTTTGGGAGCAGATGAATGTTATCAGCTCTTGCTCAGGACAA
AATACAGAACTACATGCAGGCCGCGGTTGATAAACTCGTTAGCAATgtaagaactgatataacgcctc
gtagcttctgcatttgaatccatgttatgacaatctctctgtatgtgtggatgtttcagACGCAATCAA
ACAAAAACACAAGGCTGAAGAGAAATCTTAGAAGAGATAAAAGACAATGAGAGAGAAGTGGAAGTCCGTG
AACGTATGAAGACGTTATGCTTACAAATCACAGACTCAGTCTCAAATCTGCATGATGTCTTCACAAGTC
AGATATTTGTGGCTTCGTGCCGCCTTTTCTGGGATAGAATGGCACAAGTGGTATTGAAGTTTCTTGAAG
GAAGAAAGGAAAACGAAGTAGGGTACAAAGGCTCTTACTATGCTCTTGGGgtaaaaactaaaaaccttaa
acactaaaccataattagagaatgtgtttgggtgttgaactgagtttgtgatcacttgtgcagATAATT

GAGGACACGTTTCGCATCAGAAATGCAGAGGCTACAAGGGAACTCACTACAAGAGAAGGATATGGAAGCT
 CCTCGTTCGGTTCATTGAGGCACGTTCCATTCTCTCCAGAGACAACAACGCCAATCACTCTTCTTACTTC
 TATGTC**TAA**ttcaatatcttctgttctatttcattcatttgtttgatatatcgtatatataaaaactcccc
 aacaagtcttaaatggctcgttcataataatcataccaagcttcacttttgtcccattgttccga

B) MAQLQRPRIR SPLSENLPSS TFSQSPLKRN SNLSSPILVT PTLNDDDESND NMSIESVSDDT
 GEGNELLFSD YDVEDEEEEEE VIGRRYDEEEE VFGDKSNSKL NRGMLKDKNL RIEVPFMNRR
 VTDCELELRR FALKNSTPAS ERRPHTLSSK GSVYWDLEDI RTPSAPPIME SGQEDSISLE
 IEKDIQKIED EICGEAGVES SKQESMRSSS HLYRVEEFGE RYFPNLTRFF VISFCGLVLM
 CLIMVWCSVK DSKTVEDSKI SEICSDELEE CHSISGQYAW QSLLAYDACI RLCLYEWSKG
 STEASEFLRD ECRILRGAFG LHKFLLQPRG VRSSEKNNNV KAEPKPSLKS KNVVRKLRVE
 VKRLRLIPQR KLRGTDLSRS LMNMQIGMGA EYCRQVSSLV KTGMTSIKQA TLSAVSEEQF
 SCYLQMKSTA EGGQIEQGSS VCLQSGTGSY HVFFPESEGD ALMIEVQDKK KSVQ GKAMIS
 ITSLTENPND NVRWWPIYHG EQECVGKIQL FIGSTTTSDE DCHIKNAPVV ETLAYDLLLE
 AATRAQKFHP QNLRLDGSWK WLLSEFADYY GVSDSYTKLR YLSHVMNVAT PTKTCLQLVH
 ELLVPILMAR SEKSLTRQEK SILMDCEIEI EKLMATVFEN YKSLDENFPS GLADISCPVQ
 VSATTALSSA VQVFTLLHDI LSPEAQETLK NYLQTAACKR CRKHMVDTDE YVSCNSEGFL
 LDSVTISTAY LKMKNLFLII SNEIEADIKI TNEHVLPSI DLANLAADVY STQLCHRLRA
 FLSAVPPSCP LPHVNELLIA VSDFERNLDS WGISPVHGGV DSRGLFHNYI MVWIHDMELR
 LLDRCAEKV PWSGVITNHS TSPFAEDIYE RIKDSLIEYE VVISRWPQYT LILENTASIV
 ERAIVKSLEK QYNDILIPK DSIPKRLNMH VQKLTRRQSS VLYSLPTQLG TFINTIKRVL
 DVLHPRVEDI LRQWASCLPV VEDKKLIFGE QMNVITVLLR TKYRNYMQAA VDKLVSNTQS
 NKNTRLKRIL EEIKDNEREV EVRERMKTLC LQITDSVSNL HDVFTSQIFV ASCRLFWDRM
 AQVVLKFLEG RKENEVGYKG SYVALGIIED TFASEMQLQ GNSLQEKDME APRSVIEARS
 ILSRDNNANH SSYFYV

Παράρτημα 2 Υπόδειγμα ευθυγράμμισης των αμινοξικών αλληλουχιών των ομόλογων πρωτεϊνών, At4g24610 και At5g65440, με την πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο At5g48310 στο *Arabidopsis thaliana*.

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

AT4G24610      --MIPNGELRLPALKVREDRVSPSAPIPVTRTLVADTDVTSDDDMSTNSEDVSLDSSPEN  58
AT5g65440      --MFREAGLRN----IGED-----VDSRWTIGNRKLDKSVPN-  32
AT5G48310      MAQLQRPRIRSPLENLPPSTFSQSPLKRNSNLSSPILVTPTLNDDSNMNSIESVSDT  60
               : . :*                               .. .: .* .:

AT4G24610      SR-----VSSAVGRSYGRNSSYYTYSEVSSSRETIVGAREQTGPRFDGDT  103
AT5g65440      -----ANSGHGFGFRSAPPLSSSIKPVR-AQNLGRNGAKVFG---  69
AT5G48310      GEGNELLFSDYDVEDEEEVIGRRYDEEVFGDKSNSKLNRMGLKDKNLRIEVPFMNRR  120
               *: :. ..      * . . *      . .      *

AT4G24610      EEDESTDSASSTQFSPPAAGRINDGVSQEFDETFSSEEVSDIPSAPPFSGAAEESEEIK  163
AT5g65440      AADDLSDSATSTEVSYEAEACGVRN-----NISSHNEFERRN-----  106
AT5G48310      VTDCELELRRFALKNSTPASERRPHTLSSKGSVYWDLEDIRTPSAPPIMESGQEDSISLE  180
               * : : . . : .      .: :.

AT4G24610      PATSSVQVSEVKTGDC-VESRKTG-----  186
AT5g65440      -----VEAGTSG-----  113
AT5G48310      IEKDIQKIEDEICGEAGVESSKQESMRSSSHLYRVEEFGERYFPNLTRFFVISFCGLVLM  240
               **: .

AT4G24610      -----HFTRPSAASESSGPPDQHPARLPTFHASS-RGPWHAVVSYDACVRLCLHAWSTG  239
AT5g65440      -----RTLNGTSTSTSLP-----RFPTFHASE-QGPWSAMIAYEACVRLCLHSWSTD  160
AT5G48310      CLIMVWCSVKDSKTVEDSKISEICSDLEECHSISGQYAWQSLLAYDACIRLCLYEWSKG  300
               . : : .*      .: * . : .* :::*:**:*::*: **..

```

AT4G24610 -CMEAPMFLENECALLREAFGLQQLLQSEEEELAKRSSQAPHEG-VAPKPKKNIGKMKV 297

AT5g65440 SVSEASYFLNNECTIMRNAFSLQRFFLHSEEEELGKGPSSELVTTET-SVPKSKKTIGKIKL 219

AT5G48310 -STEASEFLRDECRILRGAFGLHKFLLQPRGVRSSSEKNNNVKAEPKPSLKSKNVVRKLRV 359

***. **.:** :.* **.*:::*. . : .: * *.*: : *::

AT4G24610 QVRRVKTVMDGPTGCSISSLKPSLIKFEKIRIHFSNMSTRLFSGWRALRKIHVR--VPAN 355

AT5g65440 QVRRIKMGLDPPPGCNIAATLTVSKEKLEVVRHHIVELNSTLSSGWKAARKVHVTPQVPLN 279

AT5G48310 EVKRLRLIPQ-----RKL RGT----- 375

:*::: : **::

AT4G24610 GSSLPRQSLAYVHASTQYLKQVSGLLKTGVTSLRNNSTSYDIVQETYSCKLRRLKSLAEDN 415

AT5g65440 G-SLSRQSLAYMQAAARYLKQVSKAVKKEIVTSHTPQTYEAVQETYSCSLRKSSPEDD 338

AT5G48310 -DSLRLSLNMNQIGMGAEYCRQVSSLVKTGMTSIKQATLS-AVSEEQFSCYLQMKSTAEGG 433

** : .*. * :*** :*. .: : . : :* :** **:** .*

AT4G24610 AIM-----MQPGSGESHVFFPDSDHGDLLIVEILDPMGKDFGRVLVQLANISED SYVSSD 469

AT5g65440 QIK-----TQPGSGETFIFLPDSLGDLLIEVRDSKAQLLGRVVAQLAAMADD----- 386

AT5G48310 QIEQGSSVCLQSGTGSYHVFFPESEGDALMIEVQDKKKSVOGKAMISITSLTEN----- 487

* *.*:*. .:***:* ** *:*: * . *:*. .: :::

AT4G24610 SNEETIQAEKLRWWSVFREPEHQHVGLQLYIDYSASFDDNSHLKASVAETVAYDLVLE 529

AT5g65440 -----PSEKLRWLPIYHEPEHELIGRIQLTFSYSSSLDEKT--KCGLVAETSAYDLVLE 438

AT5G48310 -----PNDNVRWWPIYHG-EQECVGKIQLFIGSTTTSDDEDCHIKNAPVVETLAYDLLE 540

::** .: : *:: :*:** . : : :* . * .*,** *****:**

AT4G24610 VALKMQRFQQRNLLLYGSWKWLLLEEFATYYGISDVYTKLRYLSYVMDVATPTSDCLHLVH 589

AT5g65440 VAMKAERFQRRNLLFKGPWHWMITRFASYYGVS DAYTRLRYLSYVMDVASPTKDCLDLIH 498

AT5G48310 AATRAQKFHPQNLRLDGSKWLLSEFADYYGVSDSYTKLRYLSHVMNVATPTKTCLQLVH 600

. * : :*: :** : *.*:*: .** ***:* **:*:*:*:*:*:*:*.*.*:*

AT4G24610 DLLTPVIMKGNGKSALSHQENRIINEIKDQIEQILKLVFENYKSLDESSFGSMIDVNVNSA 649

AT5g65440 DFLFPIIMTSNHRVLSHQENRLGEIDEQIQILASAFENYKSLAELSFSGMKDVFESA 558

AT5G48310 ELLVPILMARSEK-SLTRQEKSILMDCEIEIEKLMATVFENYKSLDENFPGLADISCPV 659

::* *:*. . : *:*** :* : . :*: : .***** * **: * : .

AT4G24610 SGVPAPALIPAVKLYTLLHDVLSPEQTHLCHYFQAAAKKRSRRHMGETDEFVANNSEPN 709
 AT5g65440 TGTAPAIESAVKLYGLLNDVLTPEAQLKLCRYFQAASKKRSRRHLLDNDLLNNRSEGV 618
 AT5G48310 QVSATTALSSAVQVFTLLHDILSPEAQETLKNYLQTAACKRCRKHMVDTDEYVSCNSEGF 719
 .:.*: .**::: **:*:*:** * * .*:*:**:*.*:*: :*: : .**

 AT4G24610 FWDMSAMSAAYQKMTMACKNVKNEIYTDIEIQNEDILPSFLDLPNLSASIYSTDLNRLR 769
 AT5g65440 PVDPMVLAASYQKMKSLLSLKNEISTDIAIHDCNVLPSPFIDLPHNSAAIYSVDVCNRLR 678
 AT5G48310 LLDSVTISTAYLKMKNFLIISNEIEADIKITNEHVLPSIDLANLAADVYSTQLCHRLR 779
 * .:::.* **. :.*** :** * : .:*** :**.* :* :**.:*:***

 AT4G24610 AFLVACPPSGPSPTVAELVIATADFQRLDSSWNISPIQGGVDAKELFHLIYIMIWIQDKRL 829
 AT5g65440 EFLLVWPPPGPSPAVVDLVITTADFQRLDSSWHINPIKGGVNAKELFYSYITTWIEEKRR 738
 AT5G48310 AFLSAVPPSCPLPHVNELLIIVSDFERNLDSWGISPVGGVDSRGLFHNYIMVWIHDMEL 839
 ** . **. * * * :*:*:*:*:*:*.** *.*:*:*:*:*: **: ** **: .

 AT4G24610 SLLESCLDKVKWSGVRTQHSTPFVDEMYKRLNETIQDYQVIISRWPYEIFVLESAIAD 889
 AT5g65440 VLYELCKLETSKAC-VEIPGLTSPFVDEMYERLNGTLDEYDIIIRRWPEYAIKLVVAD 797
 AT5G48310 RLLDRCRAEKVPWSGVITNHSTSPFAEDIYERIKDSLIEYEVVISRWPQYTLILENTASI 899
 * : *: :. . * *:*:*:*:*:*: : : :*:*: * *: * :

 AT4G24610 VEKATVEALEKQYADVLSPLKENLAPKKLSFKYVQKLTKRSVIPYVVPDELGILLNSMKR 949
 AT5g65440 SEKAIVEAMEKQFTEILSPLKE---SKIFGLKIVKKFTKGTNPYSPKELGVLNSMKR 854
 AT5G48310 VERAIVKSLEKQYNDILILPKDS-IPKRLNMHVQKLTRQSSVLYSLPTQLGTFINTIKR 958
 *: * :*:*:*:*: :* **: .* :*: : : : * :* :** :*:**

 AT4G24610 MLDVLRPNIEAKFKAWSSCIPDGGNA--APGDRLSEVTVMLRAKFRSYLQAVVEKLVENS 1007
 AT5g65440 VLDILRPSIENRFKSWNSYIPDGENR--VLGERLSEVTVLLRSKFRSYMQUALVEKLAENT 912
 AT5G48310 VLDVLHPRVEDILRQWASCLPVVEDKKLIFGEQMNVITVLLRTKYRNYMQAAVDKLVSN 1018
 :*:*: * : : * * :* : *:*. :*:*:*:*.*:** *:**.*:

 AT4G24610 KLQKTTMLKKILQDSKESVGESDIRSKMNNLKEQLTNTVNLHLSVCETHVFIALSRGYWD 1067
 AT5g65440 RIQSHMKLKTIIHDLRETTAEPDVRNRMSTLKDLLDKTIDHLHGVFLPDVFVAICRGIWD 972
 AT5G48310 QSNKNTRLKRILEEIKDNEREVEVRERMTLCLQITDSVSNLHDVFTSQIFVASCRLFWD 1078
 : :. ** *:*: :. * :*:*.** : :*:**.* :*:** . * **

AT4G24610 RMGQIVLSFLENRKENRAWYKGSRVAVSILDDTFAAQMQLLGNSLREQDLEPPRSIMEV 1127

AT5g65440 RMGQDVLRLLEDKDNVTWHKGPRIAVSVLDEIFATQMQSLLGNGLKPEHLEPPRSMMEI 1032

AT5G48310 RMAQVVVKFLEGRKENEVGYKGSYYALGIIEDTFASEMQRLQGNSLQEKDMEAPRSVIEA 1138

.* ** :.**:* . :**. *:.::: **:**: * **.*: :.:.****:*

AT4G24610 RSILCKDPADNKAKSFYY 1145

AT5g65440 RSMLCKDSTDYREGGYNY 1050

AT5G48310 RSILSRDNNANHSSYFYV 1156

**:*.:* : :