



ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ  
ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ ΑΡΑΒΙΔΟΨΗΣ (*ARABIDOPSIS THALIANA*) ΠΟΥ  
ΕΚΦΡΑΖΟΥΝ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *hrpA* ΑΠΟ ΤΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ  
*PSEUDOMONAS SYRINGAE*



ΤΟΥ

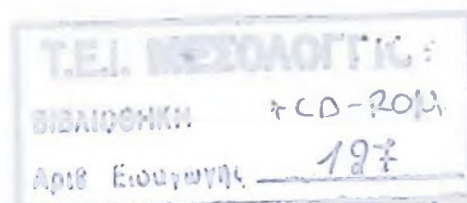
ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΥ ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ - ΑΝΤΩΝΙΟΥ ΧΑΡΙΖΑΝΗ

ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ

Δρ. ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΤΣΙΑΜΗΣ

ΜΕΣΟΛΟΓΓΙ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2007



## Π Ε Ρ Ι Λ Η Ψ Η

Η προσβολή ενός φυτού από ένα φυτοπαθογόνο βακτήριο τις περισσότερες φορές οδηγεί στην εκδήλωση μιας ασθένειας. Η ενεργοποίηση όμως της άμυνας του φυτού ύστερα από την αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών του φυτού ξενιστή και του παθογόνου, σε ορισμένες περιπτώσεις μας δίνει μια αντίδραση υπερευαισθησίας προστατεύοντας τον φυτικό οργανισμό.

Στην εργασία μας χρησιμοποιήσαμε διαγονιδιακά φυτά Αραβίδουψης (*Arabidopsis thaliana*) που εκφράζουν το γονίδιο *hrpA* τα οποία και μολύνθηκαν με το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae pv. tomato*, στέλεχος DC3000. Υπό φυσιολογικές συνθήκες θα περιμέναμε την εκδήλωση ασθένειας. Η έκφραση όμως της πρωτεΐνης *hrpA* στα φυτικά κύτταρα μας έδωσε την αντίδραση υπερευαισθησίας.

Προκειμένου να εξετάσουμε τα γενετικά τροποποιημένα φυτά Αραβίδουψης, προχωρήσαμε στο μοριακό χαρακτηρισμό τους με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης. Απομονώσαμε καθαρό DNA από φύλλα του φυτού και χρησιμοποιήσαμε εξειδικευμένους εκκινητές ώστε να ενισχύσουμε το γονίδιο *hrpA* από το γονιδίωμα του φυτού. Με την πολλαπλή αντιγραφή του παραπάνω γονιδίου και την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης πιστοποιείται η παρουσία του συγκεκριμένου γονιδίου στο φυτό.

**“Μπορούμε να βεβαιώσουμε  
κατηγορηματικά πως τίποτα σπουδαίο δεν  
έχει επιτευχθεί στον κόσμο χωρίς πάθος...”**

**ΓΚΕΟΡΓΚ ΧΕΓΚΕΛ**

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στο Δρ. Γεώργιο Τσιάμη που όποτε τον χρειαστήκαμε ήταν δίπλα μας. Χωρίς τη βοήθειά του ίσως να μην τελείωνε ποτέ αυτό το τόσο ενδιαφέρον και φιλόδοξο πείραμα. Επίσης θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τον κ. Κώστα Μπούρτζη και την πανεπιστημιακή σχολή Αγρινίου για την παραχώρηση των εργαστηριακών εγκαταστάσεων και του εξοπλισμού για την πραγματοποίηση των πειραμάτων της παρούσας μελέτης.

Οι υποψήφιοι διδάκτορες Σαπουντζής Π., Ιωαννίδης Π., Σιώζος Σ. και Κατσαβέλη Κ. μας στήριξαν και μας βοήθησαν σε ό,τι τους ζητήσαμε όλες αυτές τις ώρες που περάσαμε μαζί στο εργαστήριο. Σας ευχαριστούμε πολύ.

Τέλος θέλουμε να πούμε το μεγαλύτερο ευχαριστώ στις οικογένειές μας που μας στήριξαν και θα μας στηρίζουν για πάντα σε ό,τι κι αν κάνουμε. Το λιγότερο που μπορούμε να κάνουμε είναι να σας αφιερώσουμε αυτή την εργασία.

# Π Ε Ρ Ι Ε Χ Ο Μ Ε Ν Α

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	2
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....	4
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο.....	7
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	
1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ.....	8
1.2 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΟΥ PSEUDOMONAS SYRINGAE .....	9
1.3. ΘΕΩΡΗΜΑ FLOR, Η ΥΠΟΘΕΣΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΠΡΟΣ ΓΟΝΙΔΙΟ .....	11
1.4 ΓΟΝΙΔΙΑ ΜΗ-ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ (arv GENES) .....	12
1. 5 ΤΟ ΕΚΚΡΙΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΥΠΟΥ III ΚΑΙ ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ hrp .....	16
1. 6 ΓΟΝΙΔΙΑ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ (R GENES) .....	19
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο.....	22
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	
2.1 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΑΠΟΘΕΜΑΤΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.....	23
2.2 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ, ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ.....	23
2.3 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΦΥΤΩΝ ΑΡΑΒΙΔΟΨΗΣ. ....	24
2.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΕΓΑΛΟΜΟΡΙΑΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΦΥΤΙΚΟ ΙΣΤΟ ΑΡΑΒΙΔΟΨΗΣ.....	24
2.5 ΜΕΘΟΔΟΣ PCR.....	26
2.6 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ .....	30
2.7 ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ.....	30
2.8 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ PCR .....	30

2.9 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	31
2.10 ΜΟΛΥΝΣΗ ΑΡΑΒΙΔΟΨΗΣ ΜΕ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ .....	31
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο.....</b>	<b>33</b>
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	
3.1 ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ	
ΑΡΑΒΙΔΟΨΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ .....	34
3.2 ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΔΙΑΓΟΝΙΑΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ	
ΑΡΑΒΙΔΟΨΗΣ.....	35
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο.....</b>	<b>42</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο**

**ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

## 1.1. ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

Τα βακτήρια είναι προκαρυωτικοί (prokaryotes) μονοκύτταροι, μικροσκοπικοί και κατά το πλείστον ετερότροφοι οργανισμοί με κυτταρικό τοίχωμα. Παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην οικονομία της φύσης δεδομένου ότι λαμβάνουν μέρος στην αποσύνθεση των οργανικών ουσιών, στη ζύμωση διαφόρων προϊόντων, στον κύκλο του αζώτου, με τη δυνατότητά τους να δεσμεύουν το άζωτο και να μετατρέπουν την αμμωνία σε νιτρικό άζωτο, στον κύκλο του θείου, στη δέσμευση της ηλιακής ενέργειας κ.ά.

Τα μεμονωμένα βακτηριακά κύτταρα είναι αόρατα με το γυμνό μάτι. Φαίνονται πάνω στα θρεπτικά υποστρώματα, όπου τα βακτήρια είναι πολλά μαζί, ως αποικίες. Όλα τα φυτοπαθογόνα βακτήρια είναι ραβδοειδή (κυλινδρικά) με μήκος 0,5 έως 3,5 μm και διάμετρο 0,3 έως 1 μm. Αποτελούνται από το κυτταρικό τοίχωμα, το οποίο περιβάλλεται από μια γλοιώδη ουσία, είναι σταθερό και προσδίδει σχήμα στο κύτταρο. Τα περισσότερα γένη των φυτοπαθογόνων βακτηρίων φέρουν ένα ή περισσότερα μαστίγια με τα οποία μπορούν να έχουν αυτόνομη κίνηση σε υγρά υποστρώματα. Στο εσωτερικό του κυτταρικού τοιχώματος υπάρχει η κυττοπλασματική μεμβράνη, που περιβάλλει το κυττόπλασμα στο κέντρο του οποίου συνήθως βρίσκεται ένα χρωμόσωμα. Πολλά βακτήρια διαθέτουν εξωχρωμοσωμικά γενετικά στοιχεία με τη μορφή πλασμιδίων που είναι κυκλικά δίκλινα μόρια DNA.

Πολλαπλασιάζονται αγενώς με διαίρεση (fission). Η διαίρεση γίνεται με μεγάλη ταχύτητα και όταν έχουν στη διάθεσή τους κατάλληλα θρεπτικά υλικά, τα βακτηριακά κύτταρα μπορούν να διαιρούνται κάθε 20 λεπτά. Τα βακτήρια σχετίζονται με ένα μεγάλο αριθμό οικονομικά σημαντικών ασθενειών στα φυτά.

Στα κατά Gram αρνητικά βακτήρια των γενών *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Ralstonia*, *Xanthomonas* και *Xylella* υπάρχουν και στελέχη που είναι φυτοπαθογόνα (Tsiamis *et al.* 2000). Επίσης, στα κατά Gram θετικά βακτήρια υπάρχουν στελέχη των γενών *Clavibacter*, *Mycoplasma*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* και *Spiroplasma* που μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες στα φυτά. Οι μολύνσεις που μπορούν να δημιουργήσουν τα παραπάνω βακτήρια εμφανίζονται ως τοπικές νεκρωτικές κηλίδες, σε φύλλα, βλαστούς και φρούτα, ενώ σε ξυλώδη ιστό προκαλούν έλκη (μεγάλες νεκρωτικές κηλίδες). Μερικά στελέχη μπορούν να προκαλέσουν μαζική αποικοδόμηση του φυτικού ιστού, γνωστή ως μαλακή σήψη ή να προκαλέσουν μαρασμό των φυτών λόγω αποικισμού του αγγειακού



συστήματος του φυτού, καθυστερημένη ανάπτυξη ή διάφορες άλλες αναπτυξιακές ανωμαλίες. Άλλα βακτήρια όπως το *Agrobacterium*, μετασχηματίζουν γενετικά τον ξενιστή και με αυτόν τον τρόπο προκαλούν νεοπλαστικά καρκινώματα στα φυτά.

## 1.2. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΟΥ *PSEUDOMONAS SYRINGAE*

Το *Pseudomonas syringae* van Hall 1902 είναι ένα φωσφορίζον βακτήριο (μια ψευδομονάδα), το οποίο συγκαταλέγεται στην τρίτη υποομάδα των Πρωτοβακτηρίων (*Proteobacteria*, Olsen *et al.*, 1994). Η πρώτη απομόνωση του βακτηρίου πραγματοποιήθηκε από μολυσμένο ιστό πασχαλιάς (Pallaroni N.T, 1984). Τα παθογενή στελέχη των ψευδομονάδων είναι περιστασιακά παθογόνα των φυτών, και τα συμπτώματα που προκαλούν είναι κηλιδώσεις και έλκη στους ξενιστές. Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον ότι η ψευδομονάδα *P. syringae* προκαλεί ασθένεια σχεδόν σε όλα τα φυτά μεγάλης καλλιέργειας. Αν και βιοχημικά, τα διάφορα στελέχη από *P. syringae* δεν μπορούν να διακριθούν μεταξύ τους, παρόλα αυτά έχουν ένα περιορισμένο κύκλο ξενιστών που συνήθως δεν επικαλύπτεται. Ένα στέλεχος μπορεί να προκαλέσει ασθένεια σε ένα και μόνο είδος φυτού, και σε ορισμένες περιπτώσεις, μόνο ορισμένες ποικιλίες από αυτό το είδος είναι ευαίσθητες στο συγκεκριμένο στέλεχος. Για το λόγο αυτό ο ταξινομικός χαρακτηρισμός από τα περισσότερα παθογόνα στελέχη του *P. syringae* φέρουν τον χαρακτηρισμό *pathovar* (pv) για να προσδιορίσουν το φάσμα των ξενιστών (Dye *et al.*, 1980). Για παράδειγμα στελέχη του *P. syringae* που προκαλούν την χαρακτηριστική ασθένεια κηλίδωσης στο φασόλι (*Phaseolus vulgaris* L.) χαρακτηρίζεται ως *P. syringae* pv. *phaseolicola*. Αυτή τη στιγμή έχουν χαρακτηριστεί πάνω από 50 *pathovars* του *P. syringae* που προκαλούν χαρακτηριστικές ασθένειες σε ένα συγκεκριμένο φάσμα ξενιστών (Dye *et al.*, 1980).

Το αρχικό περιβάλλον διαβίωσης και ανάπτυξης των στελεχών του *P. syringae* εμφανίζεται να είναι επιφυτικό, στις εξωτερικές επιφάνειες των φυτικών οργάνων όπως φύλλα. Φυτά που είναι ξενιστές αλλά και φυτά μη-ξενιστές μπορούν να φέρουν επιφυτικούς πληθυσμούς από *P. syringae*, αλλά πρέπει να τονιστεί ότι ο αριθμός των βακτηρίων αυξάνεται σημαντικά μόνο σε φυτά ξενιστές που είναι ευαίσθητα σε αυτό το φυτοπαθογόνο. Όταν ένα παθογόνο στέλεχος του βακτηρίου *P. syringae* προσβάλλει φυτικό ιστό, υποβοηθούμενο από υγρασία ή τραυματισμό, βακτήρια προσροφούνται στα

γειτονικά κύτταρα του παρεγχυματικού ιστού. Δεν είναι γνωστό εάν ειδικές “προσφυτικές” πρωτεΐνες συμμετέχουν σε αυτή την διαδικασία ή είναι ένα αποτέλεσμα απορρόφησης νερού από τα φυτικά κύτταρα ή η εξάτμιση του νερού φέρνει τα βακτήρια κοντά στα φυτικά κύτταρα. Ο αποικισμός του φυτικού ιστού αρχίζει με ανάπτυξη των βακτηρίων στο μεσοκυττάριο διάστημα χωρίς να διαπερνά το φυτικό κύτταρο, αλλά παραμένει εξωτερικά του κυτταρικού τοιχώματος καθ' όλη τη διάρκεια της παθογένειας καθώς το κυτταρικό τοίχωμα αποτρέπει την επαφή του βακτηρίου με την κυτταρική μεμβράνη. Χαρακτηριστικό του βακτηρίου *P. syringae* είναι ότι σχεδόν κανένα στέλεχος του δεν έχει τη δυνατότητα να αποικοδομεί ενζυματικά το κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή, όπως πολύ χαρακτηριστικά γίνεται από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Erwinia carotovora*.

Οι αλλαγές στα κύτταρα ενός προσβεβλημένου φυτού είναι πολύ μικρές στα αρχικά στάδια της μόλυνσης. Συσπείρωση της κυτταρικής μεμβράνης και απόθεση νέων συστατικών στο κυτταρικό τοίχωμα έχουν παρατηρηθεί στα κύτταρα του ξενιστή που έχουν προσβληθεί με *P. syringae*, καθώς επίσης και ροή ιόντων καλίου και εκροή σακχαρόζης (Brown and Mansfield, 1988). Σε προχωρημένα στάδια παθογένειας μακροσκοπικά συμπτώματα, όπως συσσώρευση νερού στα μεσοκυττάρια διαστήματα του ιστού και νέκρωση του προσβεβλημένου ιστού, μπορούν εύκολα να παρατηρηθούν. Μεταφερόμενες πρωτεΐνες, πεπτιδικές τοξίνες και εξωκυττάριοι πολυσακχαρίτες παράγονται από το βακτήριο και συμβάλλουν στην εμφάνιση των συμπτωμάτων (Genin *et al.*, 1992; Bender, 1997; Leigh and Coplin, 1992). Οι τελευταίοι, δημιουργούν ένα υδροσκοπικό θύλακα, που το βακτήριο το χρησιμοποιεί για να επεκταθεί στο φυτικό ιστό, σαν μια πολλαπλασιαζόμενη αποικία στην εξωτερική επιφάνεια των κυττάρων, μέχρις ότου βρεθεί ένα φυσικό εμπόδιο ή μέχρι να ενεργοποιηθεί η επίκτητη άμυνα του ξενιστή (Rudolph and Sonnenberg, 1997).

Μια βακτηριακή ασθένεια μπορεί να προκληθεί στα φυτά, όταν ένα βακτήριο μπορεί να μολύνει νέα κύτταρα στον ιστό του φυτού πριν την ενεργοποίηση της επίκτητης άμυνας του ξενιστή. Η ενεργοποίηση της επίκτητης άμυνας του ξενιστή συνήθως εμφανίζεται ως την αντίδραση της υπερευαισθησίας. Η αποτυχία του φυτού να αναγνωρίσει την παρουσία ενός φυτοπαθογόνου ή η καταστολή του μηχανισμού άμυνας του φυτού από το φυτοπαθογόνο βακτήριο με τοξίνες ή άλλους παράγοντες μολυσματικότητας έχει σαν αποτέλεσμα την επιτυχή αποίκηση του φυτικού ιστού από το

βακτήριο και την εμφάνιση της ασθένειας.

### 1.3. ΘΕΩΡΗΜΑ FLOR, Η ΥΠΟΘΕΣΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΠΡΟΣ ΓΟΝΙΔΙΟ

Η ικανότητα μόλυνσης των περισσότερων φυτοπαθολογικών βακτηρίων σταματά πριν ακόμη ξεκινήσει, μιας και δεν μπορούν να εγκατασταθούν στα περισσότερα φυτά. Τα φυτά διαθέτουν τουλάχιστον δύο πεδία άμυνας τα οποία επικαλύπτονται, με κεντρικό στόχο τον περιορισμό της μολυσματικής δράσης των φυτοπαθολογικών οργανισμών. Το πρώτο πεδίο άμυνας είναι η βασική άμυνα που περιορίζει την ανάπτυξη των φυτοπαθολογικών (Glazebrook, *et al.*, 1997). Μεταλλάξεις στα γονίδια ενισχυμένης ανθεκτικότητας σε ασθένειες (enhance disease resistance, *edr*) της Αραβίδουπης (*Arabidopsis thaliana*) έχουν σαν αποτέλεσμα την μειωμένη ανάπτυξη φυτοπαθολογικών βακτηρίων όπως *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* στέλεχος DC3000 (Glazebrook *et al.*, 1997).

Το δεύτερο πεδίο άμυνας ενεργοποιείται από τα γονίδια ανθεκτικότητας του ξενιστή [*R* γονίδια (Hammond-Kosack and Jones, 1996)]. Οι πρωτεΐνες ανθεκτικότητας καθορίζουν την αναγνώριση ενός ειδικού μορίου που παράγεται από το παθογόνο. Αυτοί οι ενεργοποιητές της αντίδρασης της ανθεκτικότητας ονομάζονται γονίδια μη παθογένειας (*avr-avirulence*-γονίδια) (συναντάται και η ορολογία γονίδια απαθογένειας) μιας και η αναγνώριση τους από τα αντίστοιχα γονίδια ανθεκτικότητας του ξενιστή οδηγούν στην εκδήλωση μιας σειράς αντιδράσεων, που σαν αποτέλεσμα έχει την έκφραση της ανθεκτικότητας (Πίνακας 1).

Συνήθως οι αντιδράσεις ανθεκτικότητας εμφανίζονται με την μορφή της υπερευαισθησίας. Στην περίπτωση που το γονίδιο ανθεκτικότητας *R* ή το γονίδιο μη παθογένειας (*avr* γονίδιο) λείπει, τότε η αναγνώριση δεν επιτυγχάνεται και εμφανίζεται η ασθένεια (Flor, 1971). Αυτή η αναγνώριση γονιδίου προς γονίδιο (γνωστή και ως θεώρημα του Flor) καθορίζει την εμφάνιση της ανθεκτικότητας σε βακτήρια, μύκητες, ιούς, νηματώδεις και έντομα.

### Πίνακας 1

Σχηματική περιγραφή του θεωρήματος Flor, (γονιδίου προς γονίδιο). Για την εμφάνιση της ανθεκτικότητας απαιτείται η παρουσία των αντίστοιχων γονιδίων, ένα στον ξενιστή (RR ή Rr) και ένα στο φυτοπαθογόνο (avr).

Γενότυπος παθογόνου	Γενότυπος ξενιστή	
	RR ή Rr	rr
Υπαρξη avr γονιδίου	-	+
Μη-ύπαρξη avr γονιδίου	+	+

-: μη-συμβατή αντίδραση, εκδήλωση ανθεκτικότητας μέσω υπερευαισθησίας.

+: συμβατή αντίδραση, εκδήλωσης ασθένειας.

#### 1.4 ΓΟΝΙΔΙΑ ΜΗ-ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ (avr GENES)

Περισσότερα από 30 γονίδια μη-παθογένειας έχουν κλωνοποιηθεί κυρίως από στελέχη με μικρό εύρος ξενιστών των ειδών *Pseudomonas*, *Xanthomonas* και *Erwinia*. Τα avr γονίδια των βακτηρίων δεν δείχνουν καμία ομολογία με καμιά από τις γνωστές αλληλουχίες και γενικά κωδικοποιούν υδρόφιλες πρωτεΐνες που δεν φέρουν αλληλουχίες που να μπορούν να λειτουργούν ως σήμα αναγνώρισης. Παρόλο που όλα τα φυτοπαθογόνα βακτήρια αναπτύσσονται πολυκυτταρικά στις φυτικές επιφάνειες, στο χώρο του αποπλάστη στα φύλλα ή στα ξυλώδη αγγεία, καμία από τις πρωτεΐνες που κωδικοποιούν τα avr γονίδια δεν ενεργοποιεί την αντίδραση υπερευαισθησίας όταν τη τοποθετήσουμε στον αποπλάστη των κυττάρων των φύλλων, σε φυτά που φέρουν το κατάλληλο γονίδιο ανθεκτικότητας (R). Για την ακρίβεια η αντίδραση υπερευαισθησίας (AY) ενεργοποιείται μόνο όταν ζωντανά φυτοπαθογόνα βακτήρια, που φέρουν τα avr γονίδια, εισχωρήσουν στο μεσοκυττάριο χώρο των φύλλων (Leach and White, 1996).

Ένα επιπρόσθετο σύμπλεγμα γονιδίων που λέγεται *hrp* (προφέρεται χαρπ) απαιτείται ώστε να ενεργοποιηθεί η AY. Η εισαγωγή αυτού του συμπλέγματος γονιδίων μέσα στο μη-παθογόνο βακτήριο *Escherichia coli* μαζί με ένα avr γονίδιο καθιστά το βακτήριο ικανό να ενεργοποιεί την AY στο κατάλληλο φυτό ξενιστή (Stevens, et al., 1998). Έτσι οι Avr πρωτεΐνες εξαρτώνται άμεσα από την έκφραση των γονιδίων *hrp*. Ο καθένας μπορεί να φανταστεί ότι πολλές πρωτεΐνες βακτηρίων που εναποτίθενται στα κύτταρα του

ξενιστή, είναι παράγοντες παθογένειας και ότι κάποιες από αυτές γίνονται παράγοντες μη-παθογένειας όταν αναγνωρισθούν από το σύστημα επιτήρησης του φυτού.

Όταν το φυτό εκδηλώνει συγκεκριμένη ανθεκτικότητα, το παθογόνο βακτήριο αποκτά κυρίαρχα γονίδια μη-παθογένειας τα οποία είναι γενετικά συμπληρωματικά στα γονίδια ανθεκτικότητας ασθενειών του φυτού ξενιστή. Αν το παθογόνο περιέχει ένα κυρίαρχο γονίδιο μη-παθογένειας και το φυτό ξενιστής ένα γονίδιο ανθεκτικότητας, το προσβεβλημένο φυτό εκφράζει την ΑΥ με αποτέλεσμα το παθογόνο να μην μπορεί να εκδηλώσει την ασθένεια στον ξενιστή. Τα *avr* γονίδια στην ουσία μειώνουν το εύρος των ξενιστών που ένα παθογόνο μπορεί να προσβάλλει και να εκδηλώσει την ασθένεια.

Οι πρωτεΐνες που παράγονται από τα *avr* γονίδια (πρωτεΐνες τελεστές) μεταφέρονται μέσω του Εκκριτικού Συστήματος Τύπου III (το οποίο είναι αποτέλεσμα του συμπλέγματος *hrp*, για περισσότερες λεπτομέρειες Κεφάλαιο 1.5) στο κυττόπλασμα του ευκαρυωτικού κυττάρου (Mudgett and Staskawicz, 1998). Αυτοί οι τελεστές πιστεύεται ότι αναγνωρίζονται από υποδοχείς του φυτού που περιέχουν τις πρωτεΐνες-προϊόντα των κυρίαρχων αλληλόμορφων ανθεκτικότητας του φυτού. Τότε η ένωση προσδέτη-υποδοχέα ενεργοποιεί την ΑΥ. Όμως, αφού τα παθογόνα μπορεί να επιβιώσουν, τουλάχιστον στο αρχικό τους στάδιο, χωρίς συγκεκριμένο κυρίαρχο αλληλόμορφο μη παθογένειας, γιατί όλα αυτά τα γονίδια δεν έχουν χαθεί. Είναι πλέον γνωστό ότι τα *avr* γονίδια συνεισφέρουν στην παθογένεια ή στη μολυσματικότητα (ένταση της ασθένειας) του παθογόνου (Lorang *et al.*, 1994, Ritter and Dangl, 1995, Jackson *et al.*, 1999, Tsiamis *et al.*, 2000).

Αρκετά *avr* γονίδια έχει αποδειχθεί ότι έχουν σημαντικές λειτουργίες στην παθογένεια. Ένα τέτοιο γονίδιο είναι το *avrBs2* του *Xanthomonas campestris pv. versicatoria*, η διαγραφή του οποίου προκαλεί μείωση της παθογένειας (Kearny and Staskawicz, 1990). Αυτό το γονίδιο δείχνει ομολογία στα γονίδια που συνθέτουν αγροπιννοσίνη του *Agrobacterium tumefaciens* και πιθανώς παρέχει στο βακτήριο μια πηγή άνθρακα και αζώτου στη διάρκεια του αποικισμού του στο φυτό-ξενιστή. Αρκετά πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι τα προϊόντα (πρωτεΐνες) των *avr* γονιδίων χρειάζεται να αναγνωριστούν στο εσωτερικό των φυτικών κυττάρων, που φέρουν το ανάλογο γονίδιο ανθεκτικότητας (γονίδια *R*), ώστε να προκαλέσουν την ΑΥ. Ενδεικτικά αναφέρονται οι παρακάτω ξενιστές και ζευγάρια *avr* + *R* γονιδίων: αραβίδοψη *RPS2+avrRpt*,

*RPM1+aroRPM1+aroB* (Leister *et al.*, 1996, Gopalan *et al.*, 1996), τομάτα *Pto+aroPto* (Tang *et al.*, 1996 Scofield *et al.*, 1996). Τα αντίστοιχα γονίδια ανθεκτικότητας *R* για πολλά από τα *avr* γονίδια βακτηρίων που προαναφέραμε έχουν κλωνοποιηθεί και πιθανότατα κωδικοποιούν κυτοπλασματικές πρωτεΐνες (Martin *et al.*, 1993, Bent *et al.*, 1994, Grant *et al.*, 1995), κάτι το οποίο είναι σύμφωνο με την αρχική θεωρία σχετικά με την δράση των *Avr* πρωτεϊνών. Μια εξαίρεση είναι το γονίδιο *Xa21* του ρυζιού που παρέχει ανθεκτικότητα στο φυτοπαθογόνο βακτήριο *X.oryzae* pv. *oryzae*. (Song *et al.*, 1995). Βασιζόμενοι σε δομική ανάλυση το *Xa21* προβλέπεται ότι κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη υποδοχέα με ένα πλούσιο σε λευκίνη επαναλαμβανόμενο τομέα και ένα κυτοπλασματικό τομέα κινάσης.

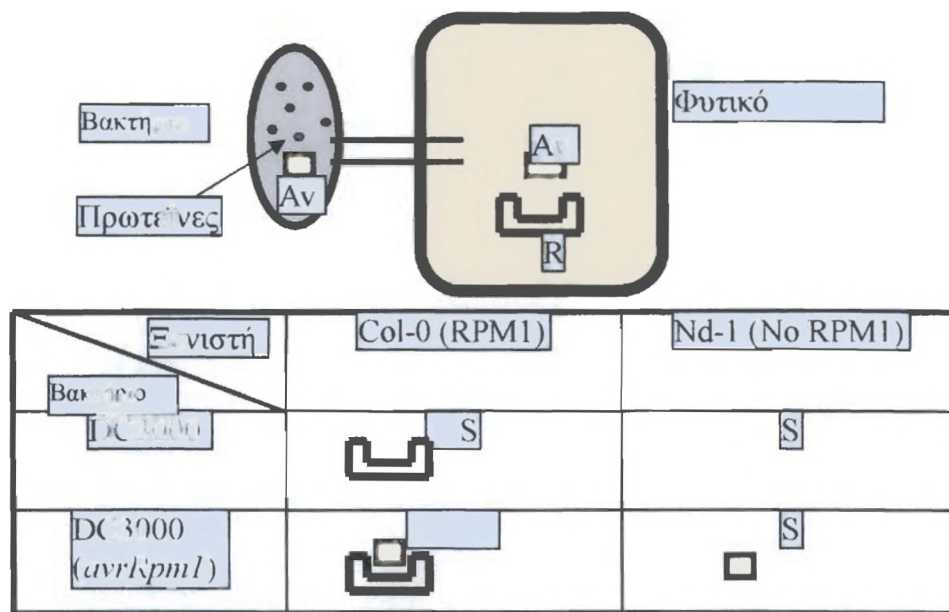
Το πιο απλό γενετικό μοντέλο που θα μπορούσε να εξηγήσει την αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών μη-παθογένειας από το φυτοπαθογόνο και ανθεκτικότητας από τον ξενιστή είναι η θεώρηση των πρωτεϊνών ανθεκτικότητας ως υποδοχέα και των πρωτεϊνών μη-παθογένειας ως προσδέτη. Πειράματα που σχεδιάστηκαν από αρκετά εργαστήρια, για να αποδείξουν μια άμεση, φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών ανθεκτικότητας και μη-παθογένειας ήταν μη επιτυχής. Εξαίρεση αποτελεί η απόδειξη της *in vitro* αλληλεπίδρασης μεταξύ της πρωτεΐνης ανθεκτικότητας Pita του ρυζιού και της αντίστοιχης πρωτεΐνης μη παθογένειας από τον μύκητα *Magnaporthe grisea* (Bryan *et al.*, 2000).

Μια εναλλακτική γενετική μετάφραση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών ανθεκτικότητας και μη-παθογένειας είναι το μοντέλο «φρουρός» (Kim *et al.*, 2002; Kruger *et al.*, 2002; Mackey *et al.*, 2002; Shao *et al.*, 2002), το οποίο και δέχεται ότι υπάρχει μια έμμεση αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών.

Το μοντέλο αυτό προτείνει ότι οι πρωτεΐνες τελεστές (effector proteins) του φυτοπαθογόνου αλληλεπιδρούν με καθορισμένες πρωτεΐνες του ξενιστή, που ονομάζονται στόχοι παθογένειας (pathogenicity targets), με σκοπό την μόλυνση και εγκατάσταση της ασθένειας στο ξενιστή. Τα γονίδια ανθεκτικότητας φρουρούν τους στόχους παθογένειας και μόλις αναγνωρίσουν το σύμπλεγμα τελεστή-στόχου παθογένειας ενεργοποιούν την επίκτητη άμυνα του ξενιστή.

Το βακτηριακό Εκκριτικό Σύστημα Τύπου III μεταφέρει τις πρωτεΐνες μη-παθογένειας μέσα στο φυτικό κύτταρο. Η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης της μη-παθογένειας με την αντίστοιχη πρωτεΐνη του ξενιστή (αυτή που αποκαλούμε στόχο

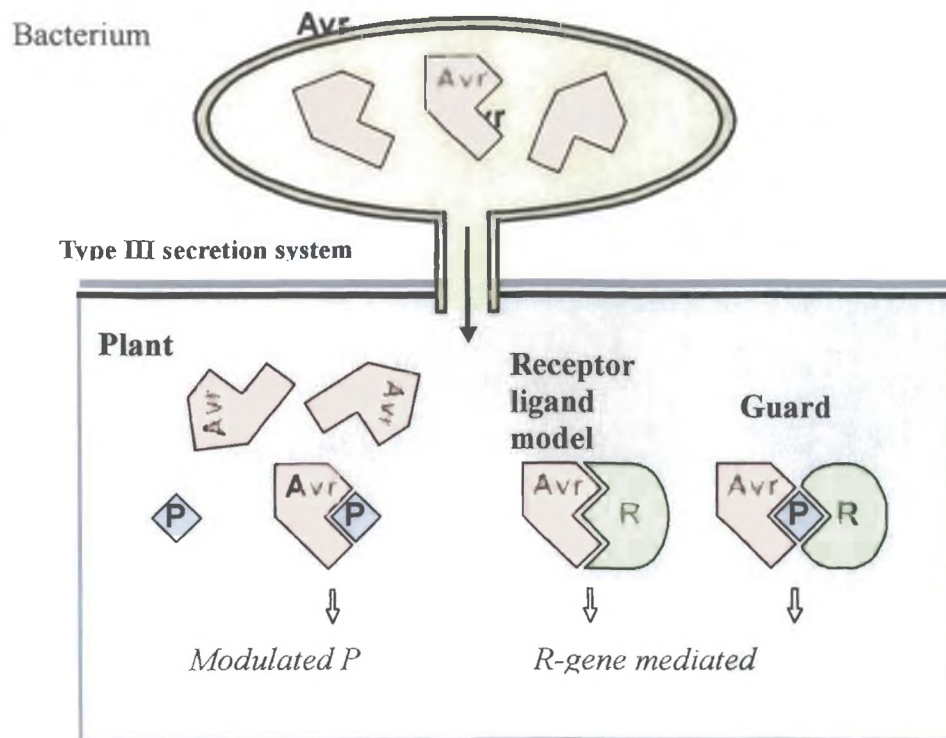
παθογένειας [P]) οδηγεί στην ανάπτυξη της συμβατής αντίδρασης. Το μοντέλο προσδέκτη-υποδοχέα προβλέπει ότι υπάρχει μια άμεση αντίδραση μεταξύ της πρωτεΐνης της μη-παθογένειας και της πρωτεΐνης της ανθεκτικότητας, η οποία ενεργοποιεί την εκδήλωση της μη-συμβατής αντίδρασης. Στο μοντέλο φρουρός, η πρωτεΐνη της ανθεκτικότητας στην ουσία περιφρουρεί την πρωτεΐνη παθογένειας που βρίσκεται στον ξενιστή. Στα ανθεκτικά φυτά το σύμπλεγμα που δημιουργείται μεταξύ της πρωτεΐνης της μη-παθογένειας και του στόχου παθογένειας αναγνωρίζεται από το γονίδιο ανθεκτικότητας του ξενιστή και με αυτόν τον τρόπο ενεργοποιείται η επίκτητη άμυνα του ξενιστή.



Εικόνα 1

Σχηματική αναπαράσταση του μοντέλου προσδέκτη-υποδοχέα.

Με αυτό τον τρόπο το μοντέλο φρουρός μπορεί να εξηγήσει τη διπλή αναγνωριστική ικανότητα ορισμένων γονιδίων ανθεκτικότητας όπως το γονίδιο *RPM1* (Mackey *et al.*, 2002) καθώς τα γονίδια ανθεκτικότητας θα μπορούσαν να φρουρούν το στόχο παθογένειας του ξενιστή που αλληλεπιδρά με δυο διαφορετικούς τελεστές (γονίδια μη-παθογένειας). Επίσης το μοντέλο φρουρός είναι σύμφωνο με το γεγονός ότι δεν έχει παρατηρηθεί φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ των γονιδίων ανθεκτικότητας και των γονιδίων μη-παθογένειας.



Εικόνα 2

Σχηματική αναπαράσταση του μοντέλου “φρουρός”.

### 1.5. ΤΟ ΕΚΚΡΙΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΥΠΟΥ III ΚΑΙ ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ *hrp*

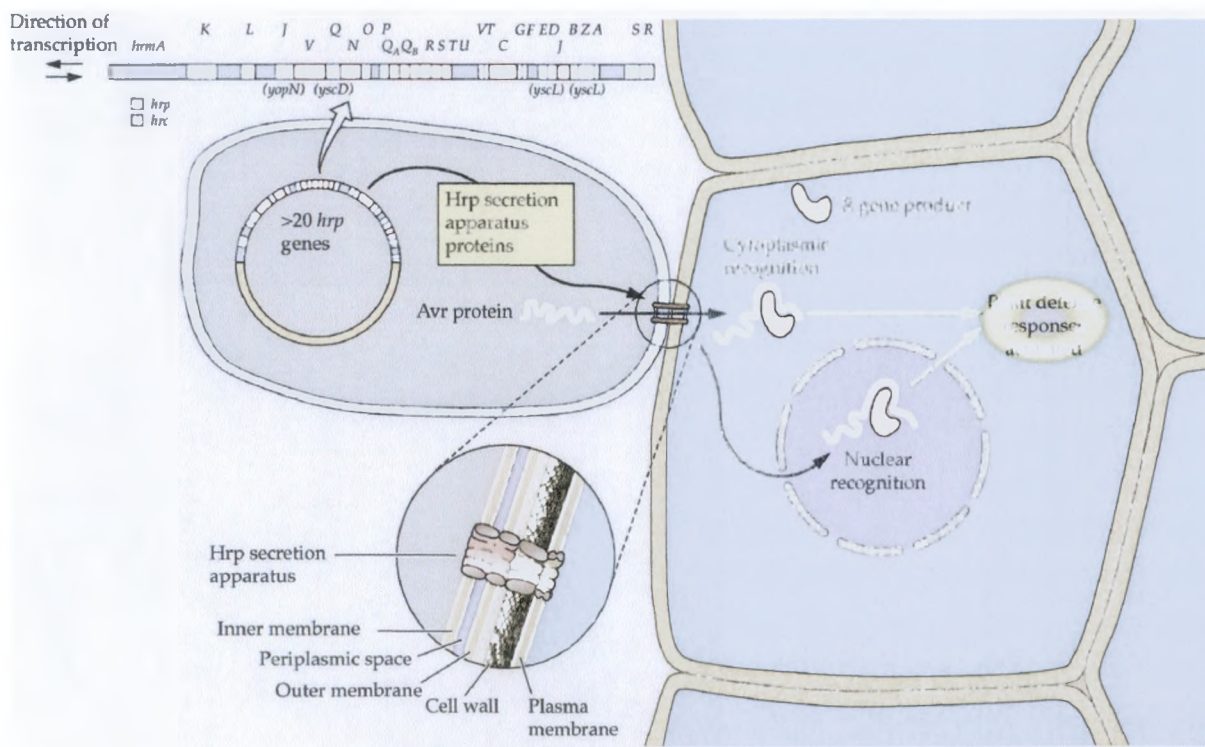
Ο αρχικός γενετικός χαρακτηρισμός των παραγόντων της παθογένειας του *P. syringae* συνέβαλε στη διαπίστωση ενός συμπλέγματος χρωμοσωμικών μεταλλάξεων που επιδρούν αρνητικά στην έκφραση της παθογένειας, σε είδη φυτών που είναι ευπαθή κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Οι μεταλλάξεις αυτές έχουν σαν αποτέλεσμα την μη ενεργοποίηση της αντίδρασης της υπερευαισθησίας σε μολύνσεις με ανθεκτικά φυτά ή τη μη-εκδήλωση της ασθένειας σε ευπαθή φυτά. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι η αντίδραση της υπερευαισθησίας παρουσιάζεται με διαφορετικούς φαινοτύπους, υποδηλώνοντας ότι πληθώρα διαφορετικών στοιχείων συμμετέχουν στην διεργασία εμφάνισης της υπερευαισθησίας (Tsiamis *et al.*, 2000).

Αυτή η συστάδα γονιδίων που παίζει καθοριστικό ρόλο στην εκδήλωση της ασθένειας αλλά και της υπερευαισθησίας, έχει καθοριστεί ως σύμπλεγμα *hrp* και είναι τα αρχικά των *Hypersensitive Response and Pathogenicity* (Lindgren *et al.*, 1986). Γονίδια *hrp* έχουν βρεθεί σε είδη και των τεσσάρων βακτηριακών φυτοπαθογόνων γενών: *Erwinia*,



*Pseudomonas*, *Ralstonia* και *Xanthomonas* (Boucher *et al.*, 1987, Lindgren *et al.*, 1988, Arlat *et al.*, 1991).

Ανάλυση της γονιδιακής ακολουθίας αποκάλυψε την ύπαρξη 35 ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης σε ένα σύμπλεγμα που καταλαμβάνει 35kb στο γονιδίωμα του *P. syringae*. Η πρώτη ένδειξη για την βιοχημική δράση του συμπλέγματος *hrp* προήλθε από την ομολογία 12 *hrp* γονιδίων του *P. syringae*, με γονίδια παθογένειας από το παθογόνο *Yersinia pestis* που προσβάλλει ζώα και ανθρώπους (Huang *et al.*, 1995). Αυτά τα συντηρημένα γονίδια αποτελούν απαραίτητα στοιχεία για την δημιουργία του Εκκριτικού Συστήματος Τύπου III (για συντομία ΕΣΤΤ) στα ζωικά παθογόνα όπως *Y. Pestis*, *Shigella flexneri* και *Salmonella enterica* (Hueck, 1998).



Εικόνα 3

Σχηματική αναπαράσταση του συμπλέγματος *hrp* καθώς και του εκκριτικού συστήματος Τύπου III.

Η εκτεταμένη ομολογία των προϊόντων του *hrp* συμπλέγματος και του ΕΣΤΤ από τα ζωικά παθογόνα οδήγησε στην πρόβλεψη ότι οι πρωτεΐνες παθογένειας και μολυσματικότητας θα πρέπει να χρησιμοποιούν αυτό το σύστημα έκκρισης για να

μεταφερθούν μέσα στο κύτταρο του ξενιστή. Πραγματικά, χρησιμοποιώντας βιοχημικές και γενετικές μεθόδους αρκετά εργαστήρια απέδειξαν τη μεταφορά πρωτεϊνών τελεστών (effector proteins) μέσα στο κύτταρο του ξενιστή, όπως AvrBs3, AvrB (Yuan and He, 1996, Van den Ackerveken, *et al.*, 1996).

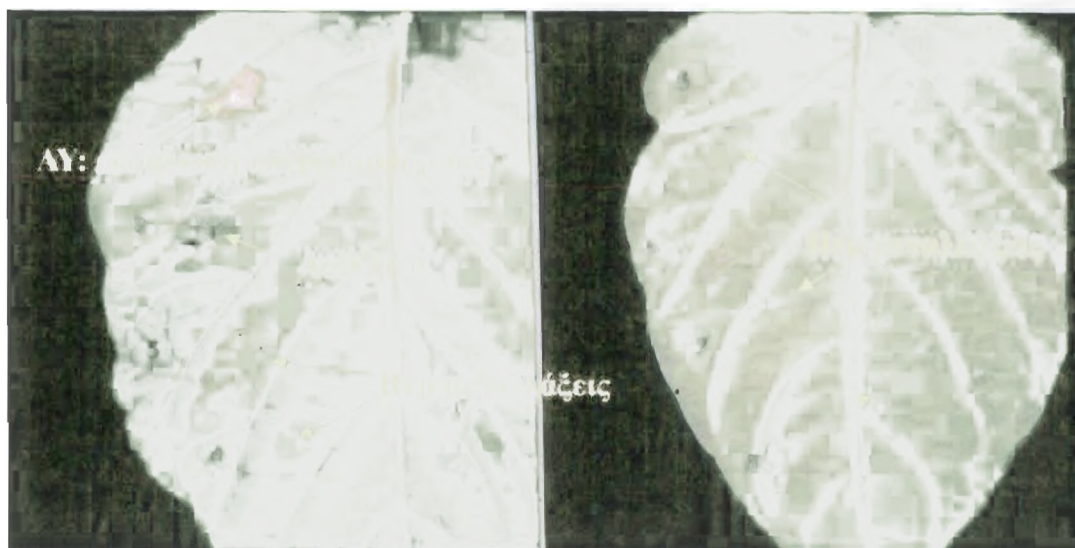
Η ύπαρξη και λειτουργία του εκκριτικού μονοπατιού τύπου III παρουσιάζει ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον για τους εξής λόγους:

1. Συνιστά ένα σπάνιο βιολογικό δρώμενο, με τη μεταφορά πρωτεϊνών μεταξύ οργανισμών που μπορεί να ανήκουν σε διαφορετικά βασίλεια (interkingdom protein transfer) με παραπλήσια φαινόμενα τη βακτηριακή σύζευξη και τη βακτηριακή ογκογέννηση των φυτών, όπου όμως, η διοργανισμική μεταφορά αφορά DNA και προσδεμένες σ' αυτό πρωτεΐνες.
2. Αποτέλεσμα αυτής της μεταφοράς είναι η προσαρμογή του κυτταρικού μεταβολισμού του ξενιστή στις ανάγκες του παθογόνου.
3. Η δόμηση των αγωγών πρωτεϊνομεταφοράς είναι εξόχως περίπλοκη και η λειτουργία τους αυστηρά ελεγχόμενη.
4. Τα δομικά και λειτουργικά μακρομόρια του συστήματος είναι ευρέως συντηρημένα μεταξύ φυλογενετικά απόμακρων παθογόνων βακτηρίων που προσβάλλουν τόσο ανώτερα φυτά όσο και ανώτερα θηλαστικά.

Τα ΕΣΤΤ που έχουν παρατηρηθεί σε παθογόνα ζώων φέρουν κάποιες μορφολογικές ομοιότητες στα βασικά δομικά τους στοιχεία, όπως ένα σύμπλοκο που περιβάλλεται από μία μεμβράνη σε συνδυασμό με μία πολυκύτταρη στενή δομή, που μοιάζει με βελόνα (Kubori *et al.*, 1998; Tamano *et al.*, 2000; Blocker *et al.*, 2001; Sekiya *et al.*, 2001).

Τα επιφανειακά, εξαρτώμενα από το τύπου III σύστημα, υλικά προσκόλλησης έχουν επίσης αναγνωριστεί σε φυτικά παθογόνα βακτήρια (*P. syringae*, *Erwinia amylovora*, *Raistonia solanacearum* και *X. campestris*). Αυτά αποκαλούνται ινίδια Hrp (*hrp pili*) και έχουν παρόμοια διάμετρο (6-8 nm), όμως είναι αρκετά μεγαλύτερα σε μήκος από τις βελόνες που χρησιμοποιούν τα ζωικά παθογόνα (Roine *et al.*, 1997; Van Gijsegem *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2001; Jin and He, 2001). Το ινίδιο που παράγεται από το σύμπλεγμα χαρπ μπορεί να επιμηκυνθεί σε μήκος αρκετών μικρομέτρων και έχει τη δυνατότητα να διαπεράσει το κυτταρικό τοίχωμα (Romantschuk *et al.*, 2001). Στα *E.*

*amylovara* και *P. syringae* pv. *tomato* έχει βρεθεί ότι το σύμπλεγμα *Hrp* λειτουργεί ως αγωγός για πρωτεΐνες που εκκρίνονται (Brown *et al.*, 2001; Jin and He, 2001; Jin *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002). Μέχρι τώρα δεν υπάρχουν ενδείξεις ότι το σύμπλεγμα *Hrp* λειτουργεί και ως μέσω επικοινωνίας στο βακτήριο και το κύτταρο του ξενιστή. Σε μονάδα του *R. solanacearum* όπου έχει μεταλλαχθεί το γονίδιο *hrpY*, το οποίο ευθύνεται για τη μεγάλη υπομονάδα του σωρού, δεν φαίνεται να επηρεάζεται η επαφή-προσκόλληση του βακτηρίου σε καλλιεργούμενα φυτικά κύτταρα (Van Gijsegem *et. al.*, 2000).



Εικόνα 4

Αντιδράσεις φυτών καρπού στο *Pseudomonas syringae*

#### 1.6. ΓΟΝΙΔΙΑ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ (R GENES)

Τα φυτά εκφράζουν ένα μοριακό σύστημα μεγάλης ακρίβειας που όχι μόνο αναγνωρίζει αλλά και απαντά σε πολλά πιθανά παθογόνα. Στην περίπτωση των φυτοπαθογόνων βακτηρίων, η ανθεκτικότητα ενεργοποιείται όταν το φυτό εντοπίσει μια πρωτεΐνη τελεστή τύπου III του παθογόνου που έχει την ικανότητα να προκαλέσει την ασθένεια. Η ανθεκτικότητα των φυτών πολλές φορές καθορίζεται από ένα συγκεκριμένο αλληλόμορφο ενός συγκεκριμένου γονιδίου ανθεκτικότητας (R). Οι πρωτεΐνες R της κυρίαρχης κλάσης περιέχουν μία περιοχή δέσμευσης νουκλεοτιδίου (NB) και επαναλαμβανόμενες περιοχές πλούσιες σε λευκίνη (LRR) για αυτό ονομάζονται NB-LRR πρωτεΐνες. Φυτά που εκφράζουν τη σωστή R πρωτεΐνη ανθεκτικότητας, πετυχαίνουν, με

την παρουσία ενός συγκεκριμένου τελεστή τύπου III, να δημιουργούν ένα σύμπλοκο κατάλληλο για διάφορα κυτταρικά και μοριακά γεγονότα που ενεργοποιούν τις αμυντικές λειτουργίες του φυτού (Dangl and Jones, 2001). Το σύνολο αυτών των λειτουργιών προκαλούν τοπικό κυτταρικό θάνατο γύρω από την περιοχή της μόλυνσης που προσδιορίζεται ως αντίδραση υπερευαισθησίας η οποία εμποδίζει την ανάπτυξη του παθογόνου.

Οι τελεστές τύπου III παραδίδονται μέσω του ΕΣΤΤ στο εσωτερικό του κυττάρου του ξενιστή (Collmer *et al.*, 2000; Galan and Collmer, 1999; Hueck, 1998). Μία ενδιαφέρουσα ερώτηση είναι: γιατί τα βακτήρια παραθέτουν στο εσωτερικό του κυττάρου του ξενιστή πρωτεΐνες που προωθούν την ανθεκτικότητα; Για την ακρίβεια στην διάρκεια της μόλυνσης των ευπαθών ξενιστών, πολλές από τις τύπου III πρωτεΐνες τελεστές έχουν σημαντική συμβολή στην πραγματοποίηση της πλήρους παθογένειας του βακτηρίου (Chang *et al.*, 2000; Tsiamis *et al.*, 2000; Lorang *et al.*, 1994; Ritter and Dangl, 1995; Shan *et al.*, 2000). Σε αυτές τις περιπτώσεις ο τελεστής πραγματοποιεί την παθογενή λειτουργία του με το να αναστέλλει τις αμυντικές λειτουργίες του ξενιστή και/ή με το να διευκολύνει την απόκτηση θρεπτικών στοιχείων μέσω της πολυκυτταρικής αποικίας που αναπτύσσεται στον αποπλάστη του φυτού. Για τους παραπάνω λόγους, υπάρχει γενικότερο ενδιαφέρον στο να κατανοήσουμε τις μοριακές λειτουργίες των πρωτεϊνών τελεστών του τύπου III παθογόνων βακτηρίων όπως του *Pseudomonas syringae* (Collmer *et al.*, 2002; Nimchuk *et al.*, 2001).

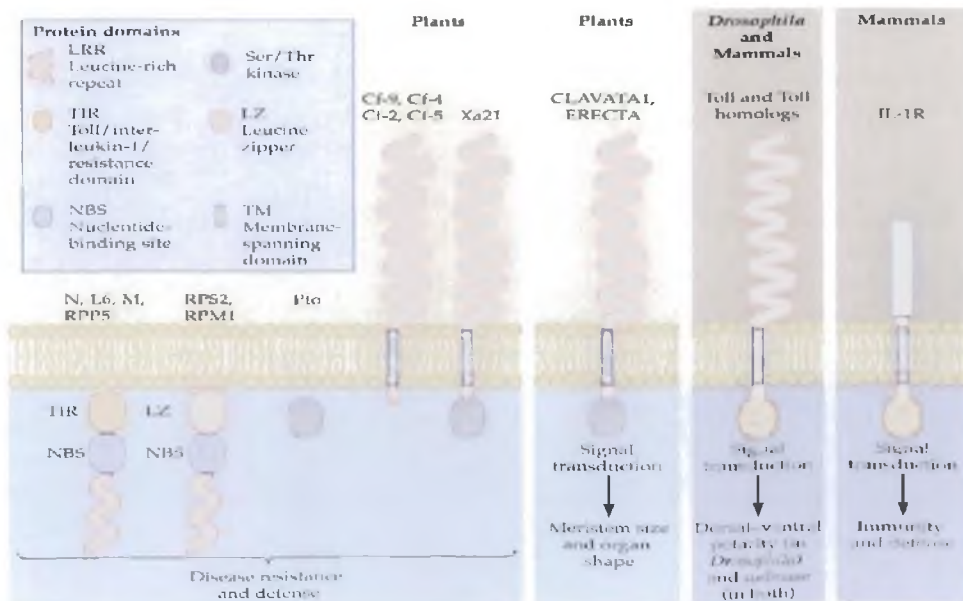
Παρόλο που τα γονίδια *R* αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένους τελεστές των παθογόνων, ήταν πολύ δύσκολο να εντοπιστούν μοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των *R* πρωτεϊνών και των τύπου III τελεστών που ενεργοποιούν τη δράση τους. Επιπρόσθετα, φαινόταν παράδοξο ότι οι 175 NB-LRR πρωτεΐνες και τμήματα των πρωτεϊνών που αποκρυπτογραφήθηκαν στο γονιδίωμα της Αραβίδουψης να είναι ένα ακριβές πρόγραμμα αναγνώρισης που λειτουργεί ως μέσο άμεσης αναγνώρισης για τους παράγοντες της παθογένειας όλων των πιθανών παθογόνων, από ιούς και μύκητες έως νηματώδεις και αφίδες, όπου το κάθε ένα από αυτά εντοπίζεται από NB-LRR πρωτεΐνες.

Προκειμένου να δοθεί μία εξήγηση για το πρόβλημα του περιορισμένου προγράμματος, έγινε η υπόθεση ότι οι *R* πρωτεΐνες μπορεί να “φρουρούν” έναν περιορισμένο αριθμό από κάποιους κυτταρικούς στόχους κλειδιά των παραγόντων

παθογένειας του παθογόνου (Bonas and Lahaye, 2002; Dangl and Jones, 2001; van der Biezen and Jones, 1998). Σύμφωνα με την υπόθεση του “φρουρού” (Kim *et al.*, 2002; Kruger *et al.*, 2002; Mackey *et. al.*, 2002; Shao *et. al.*, 2002), μία πρωτεΐνη τελεστής του τύπου III τροποποιεί έναν στόχο του ξενιστή έτσι ώστε να προχωρήσει στη δημιουργία παθογένειας από το παθογόνο.

Η πρωτεΐνη R που ανταποκρίνεται προβάλλει την ακεραιότητα εκείνου του συγκεκριμένου στόχου του ξενιστή έτσι ώστε να εντοπίσει την τροποποίηση αυτού από τον τελεστή τύπου III. Η τροποποίηση οδηγεί στην ενεργοποίηση του γονιδίου ανθεκτικότητας R και την ενεργοποίηση των αμυντικών λειτουργιών του φυτού. Έτσι η πρωτεΐνη R φρουρεί το φυτό από το παθογόνο αναστέλλοντας αυτόν τον συγκεκριμένο τελεστή και κατ' επέκταση οποιοδήποτε παράγοντα παθογένειας που με παρόμοιο τρόπο τροποποιεί τον ίδιο στόχο,

Έτσι παρόλο που η ιστορία της ζωής των μυκήτων, των βακτηρίων και των ζωικών παθογόνων των φυτών πιθανότατα διαφέρει, ίσως όλα τους να έχουν εξελιχθεί προκειμένου να τροποποιούν περιορισμένο αριθμό κρίσιμων συμπλοκών πρωτεϊνών του ξενιστή. Επομένως, ο αριθμός των 175 NB-LRR γονιδιακού προγράμματος της αραβίδωσης αντανάκλα το ανώτατο όριο του αριθμού των κρίσιμων κυτταρικών στόχων του ξενιστή που φρουρούνται.



Εικόνα 5

Σχηματική αναπαράσταση των γονιδίων ανθεκτικότητας στα φυτά.



**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>**  
**ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

## 2.1. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΑΠΟΘΕΜΑΤΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.

Τα στελέχη *Pseudomonas* καλλιεργήθηκαν συστηματικά στους 25-28°C σε Luria Bertani (LB) με άγαρ, υγρό LB ή σε King's B (KB) με άγαρ. Οι υγρές καλλιέργειες αναδεύτηκαν μέσα σε περιστρεφόμενο επωαστικό μηχάνημα στις 150-200 στροφές ανά λεπτό. Για αποθήκευση μακράς χρονικής διάρκειας, παίρνουμε 750μl από την υγρή καλλιέργεια και τοποθετούμε σε σωληνάρια των 1,5ml μαζί με 750μl 40% γλυκερόλης. Στη συνέχεια τα βάζουμε στους -70°C αφού πρώτα τα παγώσουμε με υγρό άζωτο.

Για να επανακτήσουμε τα αποθέματα από την αποθήκευση, παίρνουμε ένα μικρό δείγμα από ένα σωληνάριο αφού πρώτα το ξεπαγώσουμε και το απλώνουμε στην επιφάνεια του ανάλογου υγρού θρεπτικού ή σε τρυβλίο με ανάλογο θρεπτικό. Οι καλλιέργειες για συχνή χρήση διατηρήθηκαν σε τρυβλία Petri αποθηκευμένα στους 4°C.

## 2.2. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ, ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ.

Όλα τα μέσα αποστειρώθηκαν σε θερμοκρασία 121°C και πίεση 1,5 bar για 20 λεπτά. Για την παρασκευή τους χρησιμοποιήθηκε αποιονισμένο νερό, ή υψηλής καθαρότητας (MilliQ) νερό. Παρακάτω δίνονται τα συστατικά ανά λίτρο:

King's B (KB) θρεπτικό υπόστρωμα σε στερεά μορφή (King *et al.*, 1954)

Πεπτόνη 20gr,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  2,5gr,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  6gr,

Γλυκερόλη 30ml, Άγαρ 15gr.

Luria Bertani (LB) θρεπτικό υπόστρωμα σε υγρή μορφή. (Miller, 1972)

Τρυπτόνη 10gr, Εκχύλισμα ζύμης 5gr, Χλωριούχο Νάτριο 5gr, Γλυκόζη 1gr, Άγαρ 15gr.

### Διαλύματα

Συγκεκριμένα διαλύματα που απαιτούνται περιγράφονται στην κάθε μέθοδο. Τα παρακάτω χρησιμοποιήθηκαν γενικότερα.

EDTA: 0,5M αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ, pH ρυθμισμένο στο 8.0

ΤΑΕ: 40mM Trizma base; 20mM Οξικό Νάτριο; 2mM NaEDTA; pH ρυθμισμένο στο 8,1 με οξικό οξύ.

**Πίνακας 2**

Αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν και οι συγκεντρώσεις τους.

ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ( $\mu\text{g/ml}$ )	Αρχική συγκέντρωση (10 $\text{mg/ml}$ )
Καναμικίνη	40	Νερό
Ριφαμπικίνη	70	Μεθανόλη 100%

**2.3. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΦΥΤΩΝ ΑΡΑΒΙΔΟΨΗΣ.**

Οι σπόροι των φυτών φυτεύτηκαν ξεχωριστά σε κιβώτια σποράς και τοποθετήθηκαν ώστε να αναπτυχθούν σε θάλαμο με θερμοκρασία 18-24°C. Ο φωτισμός εξασφαλιζόταν από λάμπες που βρίσκονταν στους πάγκους όπου είχαμε τοποθετήσει τα κιβώτια με τα φυτά, έτσι ώστε να έχουν φως για 10 ώρες την ημέρα. Κάτω από αυτές τις συνθήκες ήταν πιθανό να παραχθούν νεαρά φυτά από όλους τους οικότυπους.

**2.4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΕΓΑΛΟΜΟΡΙΑΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΦΥΤΙΚΟ ΙΣΤΟ ΑΡΑΒΙΔΟΨΗΣ**

Το γενετικό υλικό των περισσότερων οργανισμών είναι το DNA (εξαιρέση αποτελούν οι RNA ιοί). Η γενετική πληροφορία είναι οργανωμένη σε γονίδια. Η απομόνωση του DNA αποτελεί το πρώτο βήμα για την κλωνοποίηση και το μοριακό χαρακτηρισμό των γονιδίων. Είναι γνωστό ότι το DNA των ευκαρυωτικών οργανισμών οργανώνεται μέσα στον πυρήνα, μαζί με διάφορες πρωτεΐνες, σε χρωμοσώματα. Η απομόνωση καθαρού DNA απαιτεί συνεχώς την απομάκρυνση του από πρωτεϊνικές ή και άλλες προσμίξεις. Το βιολογικό υλικό που θα χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση DNA είναι φύλλα του φυτού Αραβίδοψη, *Arabidopsis thaliana*. Η μέθοδος που θα ακολουθηθεί αποτελεί παραλλαγή της μεθόδου του Dellaporta *et. al.*, 1983, που χρησιμοποιείται για την απομόνωση γενωμικού DNA από φυτά Αραβίδοψης.

Η διαδικασία απομόνωσης φυτικού DNA θα πρέπει να ακολουθήσει τα παρακάτω βήματα:

1. Τα κυτταρικά τοιχώματα θα πρέπει να διασπαστούν για να απελευθερώσουν τα εσωτερικά συστατικά του κυττάρου. Αυτό συνήθως πραγματοποιείται με την



ομογενοποίηση του ιστού με υγρό άζωτο χρησιμοποιώντας ένα ιγδίο και έμβολο.

2. Η κυτταρική μεμβράνη θα πρέπει να διασπαστεί έτσι ώστε το DNA να απελευθερωθεί. Αυτό συνήθως επιτυγχάνεται με τη χρησιμοποίηση ενός απορρυπαντικού, συνήθως SDS (sodium dodesyl sulphate) ή CTAB (cetyltrimethylammonium bromide). Σ' αυτό το στάδιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί και το ένζυμο της πρωτεΐνάσης K για την απομάκρυνση πρωτεϊνών.

3. Το DNA θα πρέπει να προστατευθεί από ενδονουκλεάσες. Γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται απορρυπαντικά και EDTA (ethylenediaminetetra-acetic acid). Επίσης στο εκχύλισμα του ιστού προστίθεται και φαινόλη ή/και χλωροφόρμιο για την αποδιάταξη και απομάκρυνση των πρωτεϊνών από το DNA .

4. Οι πολυσακχαρίτες μπορούν να απομακρυνθούν με τη χρησιμοποίηση διαβαθμισμένης συγκέντρωσης χλωριούχου κεσίου, αν και καλής ποιότητας DNA (κατάλληλο για περιοριστικές πέψεις και κλωνοποιήσεις) μπορεί να αποκτηθεί και χωρίς την χρησιμοποίηση χλωριούχου κεσίου.

5.- Με λίγη προσοχή DNA υψηλού μοριακού βάρους (50-100Kb) μπορεί να αποκτηθεί.

## Πειραματική Διαδικασία

### Απομόνωση μεγαλομοριακού DNA

- ✦ Συλλέγουμε το βιολογικό μας υλικό (1 φύλλο *Arabidopsis thaliana*). Στην περίπτωση που δεν χρησιμοποιηθούν αμέσως, αποθηκεύονται στους  $-80^{\circ}\text{C}$ , αφού πρώτα τα παγώσουμε σε υγρό άζωτο ( $-196^{\circ}\text{C}$ ).
- ✦ Με τη βοήθεια ενός λύχνου Bunsen πυρακτώνουμε την άκρη ενός ακροφύσιου και το τοποθετούμε αμέσως σε ένα σωληνάριο erpendorf 1.5 ml έτσι ώστε το ακροφύσιο να αποκτήσει το σχήμα του πυθμένα του σωλήνα.
- ✦ Μετά τη συλλογή του βιολογικού υλικού το τοποθετούμε σε σωλήνα erpendorf 1.5 ml και ομογενοποιούμε, χρησιμοποιώντας το ειδικά διαμορφωμένο ακροφύσιο από το προηγούμενο στάδιο, με μερικές δυνατές περιστροφές.
- ✦ Προσθέτουμε στο ομογενοποίημα 200ml 2xCTAB buffer και αναδεύουμε δυνατά με το ειδικό όργανο αναταράξεως (vortex).

- ✦ Επωάζουμε το ομογενοποίημα για τουλάχιστον 5 λεπτά στους 65°C.
- ✦ Προσθέτουμε ίσο όγκο 200ml διάλυμα χλωροφορμίου και το αναδεύουμε δυνατά με το ειδικό όργανο αναταράξεως.
- ✦ Φυγοκεντρούμε στις 16.000 στροφές/λεπτό (rpm) για 5 λεπτά.
- ✦ Συλλέγουμε το υπερκείμενο σε ένα καθαρό σωλήνα erpendorf 1,5ml, στο οποίο προσθέτουμε 5μg t-RNA και 600ml παγωμένης αιθανόλης (περίπου τριπλάσιο όγκο). Αν η μεσόφαση (η περιοχή μεταξύ οργανικής και υδάτινης φάσης) έχει απομακρυνθεί πλήρως, τότε προχωρούμε στο στάδιο 8. Αν όχι, τότε επαναλαμβάνουμε τα στάδια 6-7.
- ✦ Επωάζουμε για 20 λεπτά στους -20°C.
- ✦ Φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά στις 16.000 στροφές/λεπτό στους 4°C.
- ✦ Το DNA θα πρέπει να εμφανιστεί με τη μορφή λευκού ιζήματος στον πυθμένα του σωλήνα.
- ✦ Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και “ξεπλένουμε” το DNA σε 200ml 70% αιθανόλη.
- ✦ Φυγοκεντρούμε στις 16.000 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά και απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
- ✦ Ξηραίνουμε το ήζημα στο ειδικό δοχείο κενού για 2-3 λεπτά και το διαλύουμε ανάλογα με την ποσότητα του σε:
  - ✦ TE διάλυμα (περίπου 50-100ml), αν πρόκειται να αποθηκευτεί στους -30°C για μεγάλο χρονικό διάστημα.
  - ✦ Αποστειρωμένο νερό (περίπου 50-100ml) αν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί σύντομα για περαιτέρω ανάλυση.

## 2.5. ΜΕΘΟΔΟΣ PCR

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) είναι μια πολύ χρήσιμη μέθοδος η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση, πολλαπλή αντιγραφή και κλωνοποίηση τμημάτων DNA από διαφορετικές πηγές. Η μέθοδος PCR βασίζεται αφενός στην ιδιότητα των δικλώνων μορίων DNA να αποδιατάσσονται σε υψηλές θερμοκρασίες και αφετέρου στο γεγονός ότι ειδικά σχεδιασμένα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, συμπληρωματικά σε καθεμία από τις δύο αλυσίδες και ευρισκόμενα στα αντίθετα άκρα μιας συγκεκριμένης νουκλεοτιδικής περιοχής, μπορούν να

χρησιμοποιηθούν ως εναρκτήρια μόρια για την *in vitro* σύνθεση δίκλωνου DNA με τη χρήση μιας DNA πολυμεράσης. Επαναλαμβανόμενοι κύκλοι αποδιάταξης, υβριδοποίησης των συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων (primer annealing) και πολυμερασικής δράσης (επιμήκυνση) έχουν ως αποτέλεσμα την εκθετική αύξηση της ποσότητας του DNA τμήματος που περιλαμβάνεται μεταξύ των δύο συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων. Συγκεκριμένα, η μέθοδος PCR επιτρέπει την παραγωγή περισσότερων από 10 μορίων του συγκεκριμένου τμήματος DNA ξεκινώντας από λίγα μόνο μόρια. Η ευαισθησία αυτής της μεθόδου σημαίνει ότι το δείγμα μας (template DNA) δεν θα πρέπει να είναι μολυσμένο με κανένα άλλο “ξένο” μόριο DNA. Η ανακάλυψη και η απομόνωση μιας θερμοσταθερής DNA πολυμεράσης από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* (Taq polymerase) συνέβαλε σημαντικά στην ενζυμική κατάλυση του πολλαπλασιασμού του DNA καθώς το ένζυμο είναι σταθερό στις υψηλές θερμοκρασίες που είναι απαραίτητες για την αποδιάταξη του DNA. Το μοναδικό μειονέκτημα της Taq πολυμεράσης είναι ότι δεν διαθέτει “διορθωτικές” λειτουργίες και για αυτό το λόγο τοποθετεί  $2 \times 10^4$  νουκλεοτίδια λάθος ανά κύκλο. Μια πολυμεράση που απομονώθηκε από το βακτήριο *Thermococcus litoradis* βρέθηκε να διαθέτει “διορθωτικές” λειτουργίες (πραγματοποιεί 6 φορές λιγότερα λάθη από ότι η κοινή πολυμεράση).

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μια πληθώρα πειραμάτων και μερικά από αυτά θα περιγραφούν παρακάτω:

**1. Ενίσχυση πλασμιδιακού DNA.** Συγκεκριμένα τμήματα DNA μπορούν να ενισχυθούν από πλασμιδιακό DNA και αυτά με την σειρά τους να χρησιμοποιηθούν για την δημιουργία ανιχνευτών ή την σύντηξη γονιδίων. Η μέθοδος αυτή μπορεί να τροποποιηθεί και να χρησιμοποιηθεί με βακτηριακές αποικίες προσφέροντας μια γρήγορη μέθοδο ανίχνευσης για την ταυτοποίηση αποικιών που φέρουν τον ζητούμενο κλώνο σε ένα πείραμα κλωνοποίησης. Ένα μικρό μέρος της βακτηριακής αποικίας χρησιμοποιείται για λύση των βακτηριακών κυττάρων τα οποία και θα προσφέρουν την μήτρα (template DNA) για την ενίσχυση του τμήματος του DNA που μας ενδιαφέρει. Ολιγονουκλεοτίδια που βρίσκονται δεξιά και αριστερά του τμήματος του DNA που κλωνοποιήθηκε, χρησιμοποιούνται για την έναρξη της αντίδρασης και το σωστό μέγεθος του προϊόντος ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση.

**2. Ενίσχυση φυτικού DNA.** Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται για την ανίχνευση μετασηματισμένου DNA σε διαγονιδιακά φυτά. Ένα μικρό μέρος φυτικού ιστού χρησιμοποιείται για την απομόνωση DNA το οποίο και θα χρησιμοποιηθεί ως μήτρα (template DNA) στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης. Τα ολιγονουκλεοτίδια που θα χρησιμοποιηθούν θα πρέπει να είναι ομόλογα στις δύο πλευρές του μετασηματισμένου DNA. Η ανάλυση των προϊόντων πραγματοποιείται με ηλεκτροφόρηση και η παρουσία μίας ζώνης στο σωστό μέγεθος δηλώνει την παρουσία του συγκεκριμένου γονιδίου στο DNA του φυτού.

**3. RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA).** Η τεχνική χρησιμοποιείται εκτεταμένα σήμερα, κυρίως ως συμπληρωματική της ανάλυσης από την τεχνική RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Τυχαία ολιγονουκλεοτίδια (10mer) χρησιμοποιούνται ως εκκινητές για την δημιουργία τυχαίων προϊόντων από γενωμικό DNA. Διαφορετικές ποικιλίες φυτών θα μας δώσουν και διαφορετικό προφίλ ενισχυμένων ζωνών (πολυμορφισμό) με συγκεκριμένα ολιγονουκλεοτίδια. Με αυτό τον τρόπο οι διαφορετικές ποικιλίες μπορούν να διαχωριστούν και ο πολυμορφισμός μπορεί να χαρτογραφηθεί στο γονιδίωμα του φυτού. Η τεχνική αυτή μπορεί να παράγει γονιδιακούς δείκτες πολύ γρήγορα καθώς είναι πολύ εύκολο να χρησιμοποιήσουμε πολλούς διαφορετικούς εκκινητές.

**4. CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences).** Αυτή η τεχνική προσφέρει την ταχύτητα της τεχνικής RAPDs με την πιστότητα των RFLP. Οι ζώνες του DNA θα ενισχυθούν πρώτα με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης και κατόπιν ένζυμα περιορισμού θα χρησιμοποιηθούν για την πέψη των ενισχυμένων τμημάτων DNA. Συγκεκριμένα ολιγονουκλεοτίδια θα σχεδιαστούν (19-24mer) από γνωστές αλληλουχίες τα οποία θα ενισχύσουν τις ζώνες μεταξύ 800-1800bp. Αυτά τα ενισχυμένα τμήματα DNA από τις διαφορετικές ποικιλίες ή καθαρές σειρές θα χρησιμοποιηθούν για πέψη με διάφορα ένζυμα περιορισμού και το προφίλ των προϊόντων θα χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση πολυμορφισμού.

Η πιστότητα και αποτελεσματικότητα της μεθόδου PCR εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως η συγκέντρωση της Taq DNA πολυμεράσης, των τριφωσφορικών δεσοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs), των ιόντων  $Mg^{2+}$ , του DNA και των ολιγονουκλεοτιδίων. Επίσης η θερμοκρασία και η διάρκεια κάθε σταδίου ενός κύκλου

καθώς και ο συνολικός αριθμός των κύκλων επηρεάζουν την ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος και την ειδικότητα της αντίδρασης.

Ο όρος αυστηρότητα (*stringency*) αναφέρεται στη σπουδαιότητα της θερμοκρασίας και της αλατότητας στην υβριδοποίηση των νουκλεϊκών οξέων και ως εκ τούτου παίζουν σπουδαίο ρόλο για την επιλογή των κατάλληλων συνθηκών για την αντίδραση PCR.

Συνθήκες «υψηλής αυστηρότητας» σημαίνει υψηλή θερμοκρασία και χαμηλή συγκέντρωση άλατος που οδηγεί σε μείωση της σταθερότητας των προϊόντων της DNA υβριδοποίησης ενώ συνθήκες «χαμηλής αυστηρότητας» σημαίνει χαμηλή θερμοκρασία και υψηλή συγκέντρωση άλατος που οδηγεί σε αύξηση της σταθερότητας των προϊόντων της DNA υβριδοποίησης. Μεταβάλλοντας λοιπόν τη συγκέντρωση των ιόντων  $Mg^{2+}$  και την θερμοκρασία υβριδοποίησης (*annealing temperature*) μπορούμε να αλλάξουμε την «αυστηρότητα» της αντίδρασης PCR μέχρι να βρούμε τις βέλτιστες συνθήκες για ένα συγκεκριμένο ζευγάρι ολιγονουκλεοτιδίων και ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα DNA.

Η επιλογή των εναρκτήριων ολιγονουκλεοτιδίων είναι επίσης ένας σημαντικός παράγοντας της μεθόδου PCR. Ο γενικός κανόνας είναι να σχεδιάζονται PCR primers μήκους 20 ολιγονουκλεοτιδίων και το περιεχόμενο τους σε GC να είναι μεταξύ 40 - 60%. Τα νουκλεοτίδια G και C πρέπει, κατά το δυνατόν, να είναι ομοιόμορφα κατανεμημένα κατά μήκος του ολιγονουκλεοτιδίου. Θα πρέπει επίσης να αποφεύγεται η παρουσία περισσοτέρων των 3 G ή C νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο του ολιγονουκλεοτιδίου γιατί μπορούν να δημιουργηθούν μη ειδικές εναρκτήριες υβριδοποιήσεις (*non-specific priming*).

Όλες σχεδόν οι μέθοδοι απομόνωσης DNA είναι κατάλληλες για την παραγωγή *template DNA* για αντίδραση PCR. Ίχνη από ουσίες όπως φαινόλη, EDTA, *proteinase K*, είναι ισχυροί αναστολείς της ενζυμικής δραστηριότητας της *Taq DNA* πολυμεράσης, όπως κατακρήμνιση του DNA με αιθανόλη και επαναλαμβανόμενα ξεπλύματα με 70% αιθανόλη είναι αποτελεσματικοί τρόποι για την απομάκρυνση τέτοιων προσμίξεων.

Η συγκέντρωση του κάθε τριφωσφορικού δεσοξυριβονουκλεοτιδίου σε μια PCR αντίδραση είναι συνήθως 200μM. Είναι σημαντικό και τα τέσσερα τριφωσφορικά δεσοξυριβονουκλεοτίδια (*dATP*, *dCTP*, *dGTP*, *dTTP*) να βρίσκονται στην ίδια ακριβώς συγκέντρωση, διαφορετικά θα έχουμε αύξηση των λαθών στη σύνθεση των PCR

προϊόντων. Επίσης υψηλές συγκεντρώσεις της Taq DNA πολυμεράσης έχουν σαν αποτέλεσμα την αύξηση της σύνθεσης μη ειδικών προϊόντων.

Γενικά, η μέθοδος PCR είναι μια εμπειρική τεχνική και συνήθως απαιτεί τον καθορισμό των βέλτιστων συνθηκών της αντίδρασης για κάθε νέο ζεύγος εναρκτήριων ολιγονουκλεοτιδίων και DNA υποστρώματος.

## 2.6. ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ

Κάνουμε ηλεκτροφόρηση 1 με 2μl από το καθαρισμένο δείγμα μας μαζί με μία γνωστή ποσότητα DNA (pUC18). Στην συνέχεια με το πρόγραμμα Gene Tools της SynGene υπολογίζουμε τη διαφορά στην ένταση της φωτεινότητας μεταξύ του καθαρισμένου δείγματος και του δείγματος γνωστής ποσότητας. Με αυτό τον τρόπο καθορίζουμε την ποσότητα του άγνωστου δείγματος.

## 2.7. ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ

Μετά τον καθορισμό της συγκέντρωσης του άγνωστου δείγματος μεταφέραμε σε ένα σωληνάριο των 1.5ml τον όγκο εκείνο που αντιστοιχούσε στην ποσότητα του DNA που θέλαμε να κατακρημνίσουμε. Προσθέσαμε την ανάλογη ποσότητα Milli Q νερού, μέχρι τελικό όγκο 100μl, 10μl οξικό νάτριο και 250μl 100% αιθανόλη. Το μείγμα ανακατεύτηκε καλά με συσκευή ανάδευσης και τοποθετήθηκε για 1 ώρα στους 4°C. Κατόπιν κάναμε φυγοκέντρωση στη μέγιστη ταχύτητα στους 4°C. Απομάκρυνση των αλάτων πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη 125μl 70% αιθανόλη. Φυγοκεντρίσαμε για 5 λεπτά, πετάξαμε το υπερκείμενο και αφήσαμε το ίζημα DNA σε κενό αέρος για 3 με 5 λεπτά.

## 2.8. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ PCR

### Πειραματική Διαδικασία

Αφού προετοιμάσουμε τις αντιδράσεις τις τοποθετούμε στη συσκευή PCR (MJ Research) και την προγραμματίζουμε να πραγματοποιήσει αρχικά ένα στάδιο αποδιάταξης του DNA στους 94°C για μερικά λεπτά και στη συνέχεια πραγματοποιούμε 30 κύκλους με τις εξής παραμέτρους:

α) αποδιάταξη (denaturation): 94°C για 30 δευτερόλεπτα.

β) υβριδοποίηση (annealing): 48-62°C για 30 δευτερόλεπτα.

γ) επιμήκυνση (extension): 72°C για 30 δευτερόλεπτα έως μερικά λεπτά (ανάλογα το μέγεθος που θέλουμε να ενισχύσουμε).

Μετά την ολοκλήρωση των 30 κύκλων, ακολουθεί ένα τελικό στάδιο επιμήκυνσης στους 72°C για 10 λεπτά με το οποίο πραγματοποιείται ο πλήρης πολυμερισμός όλων των μορίων. Στη συνέχεια οι αντιδράσεις αναλύονται με ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης (0.6-2%) ή αποθηκεύονται στους -20 °C.

## 2.9 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Η αγαρόζη διαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA pH.8) σε κατάλληλη συγκέντρωση, ανάλογα με το εύρος των μεγεθών του DNA που θέλουμε να διαχωριστούν (0.6-2% w/v), με την προσθήκη 3 μl διαλύματος βρωμιούχου εθιδίου (10mg/ml). Το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτοφόρησης στις δεξαμενές ηλεκτοφόρησης ήταν όμοιο με αυτό που χρησιμοποιήθηκε για τα πήκτώματα. Τα δείγματα φορτώθηκαν στα πηγάδια αφού το πήκτωμα τοποθετήθηκε στο ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης.

Το διάλυμα φόρτωσης (40% v/v γλυκερόλη, 0.25% w/v xylene cyanol FF, 0.25% w/v bromophenol blue σε TE) προστέθηκε στα δείγματα ώστε να βοηθήσει στην φόρτωση και στην κρίση της προόδου της ηλεκτροφόρησης. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε για 45 με 60 λεπτά στα 120 V. Τα πήκτώματα κατόπιν εξετάστηκαν σε συσκευή παραγωγής UV ακτινοβολίας. Τα αποτελέσματα καταγράφηκαν μέσω ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής.

## 2.10. ΜΟΛΥΝΣΗ ΑΡΑΒΙΔΟΨΗΣ ΜΕ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

Σε υγρά θρεπτικά υποστρώματα (LB), έχουμε προσθέσει τα απαραίτητα αντιβιοτικά, και επίσης προσθέσαμε μία αποικία από το στέλεχος που θέλουμε να αναπτύξουμε. Την υγρή αυτή καλλιέργεια την τοποθετήσαμε σε επωαστικό θάλαμο με ανάδευση (300rpm) για 24 ώρες με θερμοκρασία ανάδευσης 28°C. Τα φυτά Αραβίδουνης επιμολύνθηκαν με τα παθογόνα στελέχη χρησιμοποιώντας ως μόλυσμα 10<sup>8</sup> cfu/ml.

Παρατηρήσεις καταγράφηκαν σύμφωνα με το ποσοστό κατακρήμνισης που παρουσιάζουν τα μολυσμένα φυτά. Πιο συγκεκριμένα το παρακάτω κλειδί χρησιμοποιήθηκε.

0: καμία αλλαγή δεν έχει παρατηρηθεί

1: μερική χλώρωση

2: το 25% του ιστού έχει κατακρήμνιστεί

3: το 50% του ιστού έχει κατακρήμνιστεί

4: το 75% του ιστού έχει κατακρήμνιστεί

5: το 100% του ιστού έχει κατακρήμνιστεί



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>**

### **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

### 3.1 ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ ΑΡΑΒΙΔΟΥΣΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

Αφού αναπτύξαμε φυτά Αραβίδουσης που είχαν γενετικά τροποποιηθεί με το γονίδιο *hrpA* με τη τεχνική της εμφάνισης του άνθους (Τσιάμης Γ., προσωπική επικοινωνία), χρησιμοποιήσαμε την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης προκειμένου να ενισχύσουμε το γονίδιο *hrpA*. Προχωρήσαμε δηλαδή σε πολλαπλή αντιγραφή του τμήματος που εισήχθηκε στην Αραβίδουση. Για να το επιτύχουμε αυτό απομονώσαμε γενωμικό DNA από 8 φυτά Αραβίδουσης και σε αυτά τα φυτά πραγματοποιήσαμε αντιδράσεις PCR.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού (PCR) για την ενίσχυση του γονιδίου *hrpA* πραγματοποιήθηκε ως εξής:

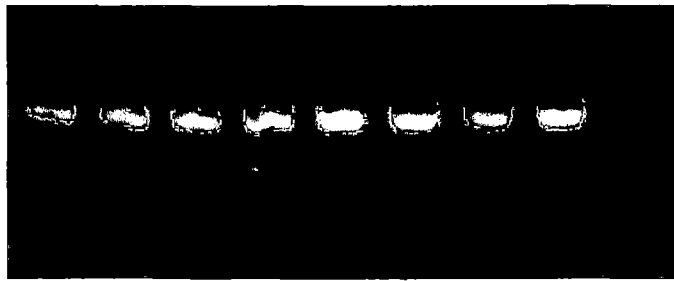
1. Τα αντιδραστήρια καθώς και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση της αντίδρασης PCR είναι:
  - α) 15  $\mu$ l αποστειρωμένο απιονισμένο  $H_2O$
  - β) 2  $\mu$ l 10X  $(NH_4^+)$  PCR ρυθμιστικό διάλυμα
  - γ) 0.8  $\mu$ l 50 mM  $MgCl_2$
  - δ) 0.1  $\mu$ l 25 mM dNTPs mix
  - ε) 0.5  $\mu$ l εναρκτήριο ολιγονουκλεοτίδιο (Primer) *hrpAF* (2 $\mu$ M)
  - ζ) 0.5  $\mu$ l εναρκτήριο ολιγονουκλεοτίδιο (Primer) *hrpAR* (2 $\mu$ M)
  - η) 0.1  $\mu$ l *Taq* DNA πολυμεράση (1 unit)

#### Πίνακας 3

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν και η αλληλουχία τους.

Primer	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ
<i>hrpAF</i>	5'- CTCGGATCCGAGGAGTCCACCATGGTCGCATTTGCA -3'
<i>hrpAR</i>	5'- CCCGAGATCTTAGTAACTGATACCTTTAGC-3'

2. Τοποθετήσαμε τα 19 μl του παραπάνω μίγματος σε κάθε έναν από τους δέκα σωλήνες των 0.2 ml, και προσθέσαμε σε κάθε σωληνάριο 1 μl γενωμικού DNA.
3. Προγραμματίσαμε τη συσκευή PCR να πραγματοποιήσει αρχικά ένα στάδιο αποδιάταξης του DNA στους 94°C για 15 λεπτά και στη συνέχεια 35 κύκλους με τις εξής παραμέτρους:
  - α) αποδιάταξη (denaturation): 94°C για 30 δευτερόλεπτα.
  - β) υβριδοποίηση (annealing): 60°C για 30 δευτερόλεπτα.
  - γ) επιμήκυνση (extension): 72°C για 30 δευτερόλεπτα.
4. Μετά την ολοκλήρωση των 35 κύκλων, ακολούθησε ένα τελικό στάδιο επιμήκυνσης στους 72°C για 10 λεπτά με το οποίο πραγματοποιήθηκε ο πλήρης πολυμερισμός όλων των μορίων του DNA.
5. Στη συνέχεια οι αντιδράσεις αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5% όπως αναφέρεται στην παράγραφο 2.9



**Εικόνα 6**

*Προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμερισμού μετά από ηλεκτροφόρηση.*

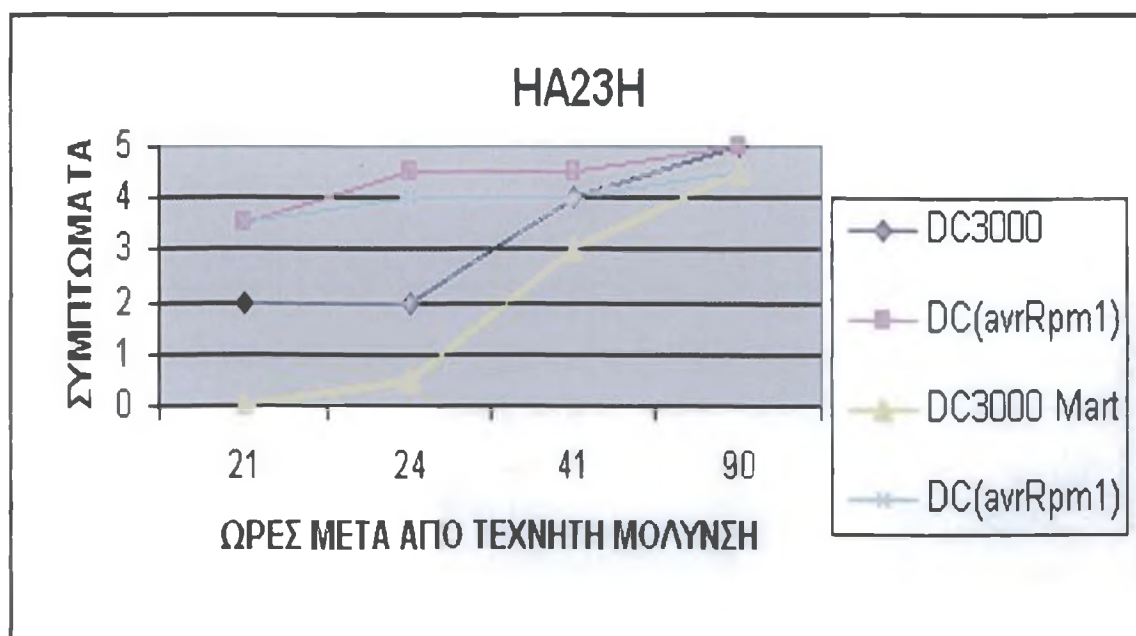
Από την παραπάνω φωτογραφία είναι εμφανές ότι και τα 8 φυτά που εξετάσαμε ήταν γενετικά τροποποιημένα με το γονίδιο *hrpA* από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae*.

### **3.2. ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΔΙΑΓΟΝΙΑΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ ΑΡΑΒΙΔΟΨΗΣ**

Τα στελέχη DC 3000 και DC 3000(*avrRpm1*) χρησιμοποιήθηκαν για να μολυνθούν γενετικά τροποποιημένα φυτά Αραβίδουψης που εκφράζουν την πρωτεΐνη HrpA. Τα φυτά πριν πραγματοποιηθεί το τεστ παθογένειας μεταφέρονται στο εργαστήριο όπου και ψεκάζονται με β-οιστραδιόλη έτσι ώστε να αρχίσει η έκφραση του γονιδίου και παραγωγή της πρωτεΐνης HrpA. Οι μολύνσεις των φυτών πραγματοποιήθηκαν τρεις ώρες

μετά την επαγωγή με οιστραδιόλη. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν φυτά Αραβίδουφης που έχουν τροποποιηθεί γενετικά με το γονίδιο *hrrA* αλλά η επαγωγή πραγματοποιήθηκε με νερό. Το μόλυσμα που χρησιμοποιήθηκε για όλα τα τεστ παθογένειας ήταν  $10^8$  βακτήρια ανά ml. Οι μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφονται στο κεφάλαιο 2.10.

Στο πρώτο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν φυτά της διαγονιακής σειράς HA23H στα οποία έχει πραγματοποιηθεί επαγωγή με οιστραδιόλη καθώς και φυτά στα οποία δεν έχει πραγματοποιηθεί επαγωγή. Όπως φαίνεται και από το σχήμα 1 είναι φανερό ότι στα φυτά μάρτυρες το στέλεχος DC3000 προκαλεί την ασθένεια στα φυτά της Αραβίδουφης. Η ασθένεια στο σχήμα 1 εμφανίζεται ως μια καθυστερημένη εμφάνιση των συμπτωμάτων σε αντίθεση με την αντίδραση της υπερευαισθησίας (HR) όπου τα συμπτώματα είναι πολύ πιο γρήγορα χρονικά. Την αντίδραση της υπερευαισθησίας την παρατηρούμε με το στέλεχος DC(*avrRpm1*). Στα φυτά της διαγονιακής σειράς HA23H που έχει γίνει επαγωγή με οιστραδιόλη και παράγεται πλέον η πρωτεΐνη βλέπουμε μια σημαντική διαφορά με τα φυτά μάρτυρες. Το στέλεχος DC3000 στα φυτά της σειράς HA23H που έχει γίνει η επαγωγή εμφανίζει τα συμπτώματα την ίδια χρονική στιγμή με το στέλεχος DC3000(*avrRpm1*) που γνωρίζουμε ότι προκαλεί την υπερευαισθησία (Σχήμα 1).

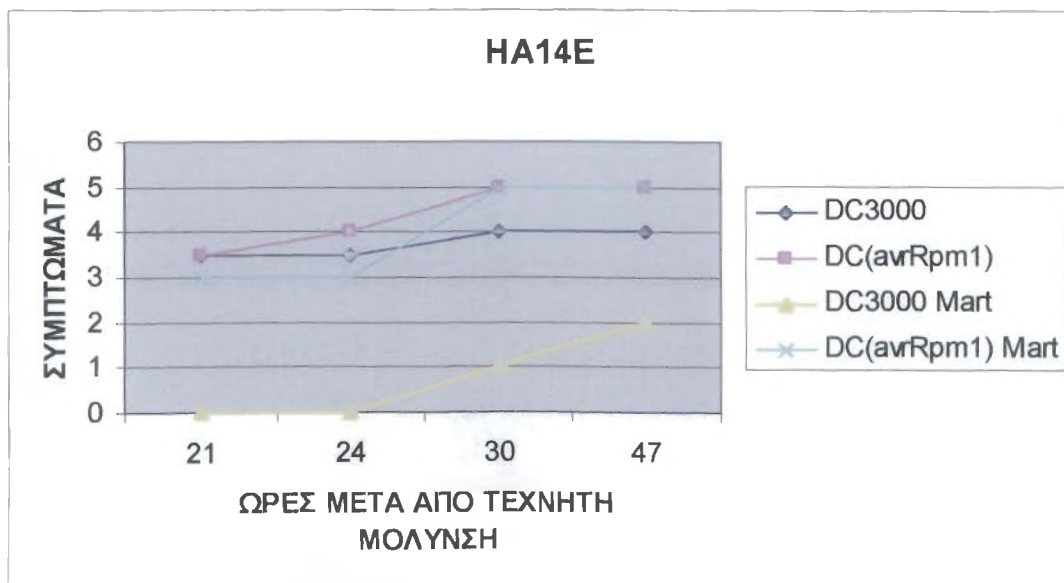


Σχήμα 1

Φαινοτυπικές αντιδράσεις σε φυτά Αραβίδουψης, οικότυπος HA23H, μετά από μόλυνση με τα φυτοπαθογόνα στελέχη DC3000 και DC3000(*avrRpm1*).

- DC3000 Mart:(αρνητικός μάρτυρας): Φυτά Αραβίδουψης HA23H στα οποία δεν πραγματοποιήθηκε επαγωγή με Β-οιστραδιόλη.
- DC(*avrRpm1*):(αρνητικός μάρτυρας): Φυτά Αραβίδουψης HA23H στα οποία δεν πραγματοποιήθηκε επαγωγή με Β-οιστραδιόλη.

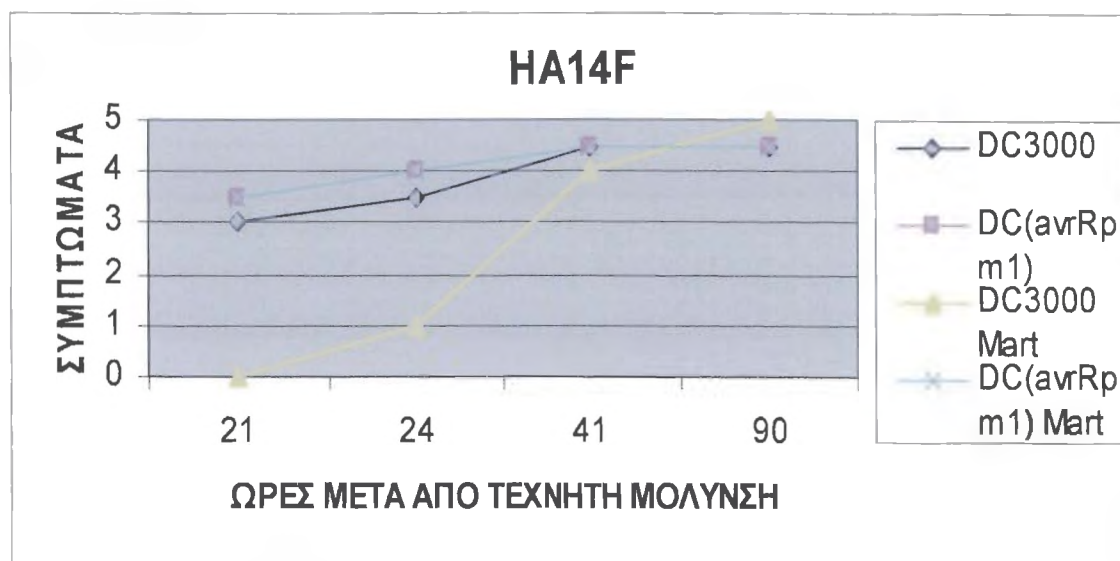
Στο δεύτερο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν φυτά της διαγονιακής σειράς HA14E στα οποία έχει πραγματοποιηθεί επαγωγή με οιστραδιόλη καθώς και φυτά στα οποία δεν έχει πραγματοποιηθεί επαγωγή (το ίδιο εφαρμόσαμε και στα πειράματα που ακολουθούν). Παρατηρούμε πως το στέλεχος DC3000 προκαλεί την ασθένεια στα φυτά μάρτυρες της Αραβίδουψης (σχήμα 2). Την αντίδραση της υπερευαισθησίας την παρατηρούμε με το στέλεχος DC3000(*avrRpm1*). Η διαφορά ανάμεσα στα φυτά της διαγονιακής σειράς HA14E που έχει γίνει επαγωγή με οιστραδιόλη και παράγεται πλέον η πρωτεΐνη με τα φυτά μάρτυρες είναι απολύτως εμφανείς. Το στέλεχος DC3000 στα φυτά της σειράς HA14E που έχει γίνει η επαγωγή εμφανίζει τα συμπτώματα την ίδια χρονική στιγμή με το στέλεχος DC3000(*avrRpm1*) που γνωρίζουμε ότι προκαλεί την υπερευαισθησία (Σχήμα 2).



Σχήμα 2

Στο τρίτο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν φυτά της διαγονιακής σειράς HA14F. Τα αποτελέσματα είναι παραπλήσια και εδώ. Στα φυτά που έχει πραγματοποιηθεί επαγωγή με οιστραδιόλη το στέλεχος DC3000 προκαλεί την αντίδραση της υπερευαισθησίας, ενώ στα φυτά που δεν έχει γίνει επαγωγή παρατηρείται η εκδήλωση της ασθένειας (Σχήμα 3).

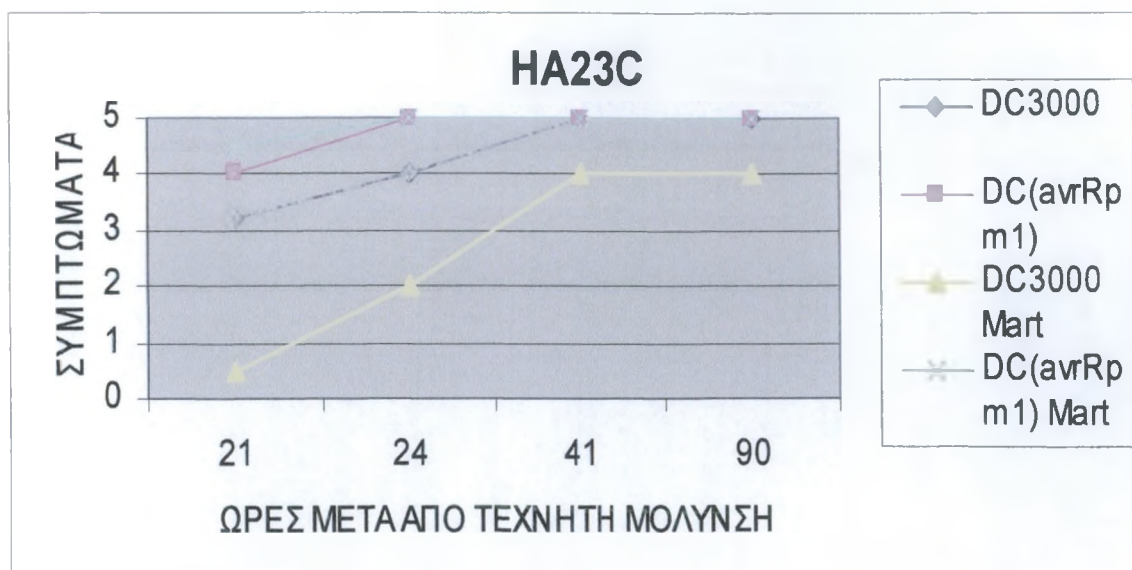
- DC3000 Mart:(αρνητικός μάρτυρας): Φυτά Αραβίδουψης HA14E στα οποία δεν πραγματοποιήθηκε επαγωγή με Β-οιστραδιόλη.
- DC(avrRpm1) Mart:(αρνητικός μάρτυρας): Φυτά Αραβίδουψης HA14E στα οποία δεν πραγματοποιήθηκε επαγωγή με Β-οιστραδιόλη.



Σχήμα 3

- DC3000 Mart:(αρνητικός μάρτυρας): Φυτά Αραβίδουψης HA14F στα οποία δεν πραγματοποιήθηκε επαγωγή με Β-οιστραδιόλη.
- DC(avrRpm1) Mart:(αρνητικός μάρτυρας): Φυτά Αραβίδουψης HA14F στα οποία δεν πραγματοποιήθηκε επαγωγή με Β-οιστραδιόλη.

Στο τέταρτο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν φυτά της διαγονιακής σειράς HA23C. Τα αποτελέσματα είναι παρόμοια και εδώ. Στα φυτά που έχει πραγματοποιηθεί επαγωγή με οιστραδιόλη το στέλεχος DC3000 προκαλεί την αντίδραση της υπερευαισθησίας, ενώ στα φυτά που δεν έχει γίνει επαγωγή παρατηρείται η εκδήλωση της ασθένειας (Σχήμα 4).

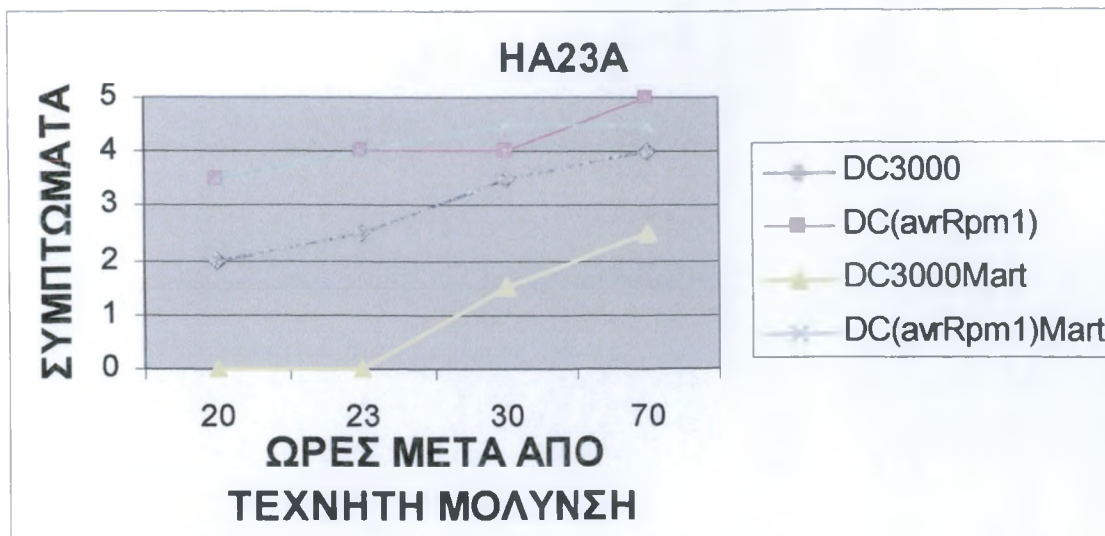


Σχήμα 4

- DC3000 Mart:(αρνητικός μάρτυρας): Φυτά Αραβίδουνης HA23C στα οποία δεν πραγματοποιήθηκε επαγωγή με Β-οιστραδιόλη.
- DC(avrRpm1) Mart:(αρνητικός μάρτυρας): Φυτά Αραβίδουνης HA23C στα οποία δεν πραγματοποιήθηκε επαγωγή με Β-οιστραδιόλη.

Στο πέμπτο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν φυτά της διαγονιακής σειράς HA23A στα οποία (όπως και στα προηγούμενα πειράματα) έχει πραγματοποιηθεί επαγωγή με οιστραδιόλη καθώς και φυτά στα οποία δεν έχει πραγματοποιηθεί επαγωγή. Τα αποτελέσματα είναι παραπλήσια και εδώ. Στα φυτά που έχει πραγματοποιηθεί επαγωγή με οιστραδιόλη το στέλεχος DC3000 προκαλεί την αντίδραση της υπερευαισθησίας, ενώ στα φυτά που δεν έχει γίνει επαγωγή παρατηρείται η εκδήλωση της ασθένειας (Σχήμα 5). Την αντίδραση της υπερευαισθησίας προκαλεί το στέλεχος DC3000(avrRpm1) όπως γνωρίζουμε και στα φυτά όπου έχει πραγματοποιηθεί επαγωγή αλλά και στα φυτά μάρτυρες.





Σχήμα 5

- DC3000 Mart:(αρνητικός μάρτυρας): Φυτά Αραβίδωσης HA23A στα οποία δεν πραγματοποιήθηκε επαγωγή με Β-οιστραδιόλη.
- DC(avrRpm1) Mart:(αρνητικός μάρτυρας): Φυτά Αραβίδωσης HA23A στα οποία δεν πραγματοποιήθηκε επαγωγή με Β-οιστραδιόλη.

Φυτά Αραβίδωσης που εκφράζουν την πρωτεΐνη HrpA, υπό τον έλεγχο ενός επαγόμενου προαγωγέα, εκφράζουν ανθεκτικότητα ως προς τη βακτηριακή σιγμάτωση, με την έκφραση της υπερευαισθησίας. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει ότι έκφραση της HrpA πρωτεΐνης *in planta* μετατρέπει την εμφάνιση της ασθένειας σε υπερευαισθησία. Η αναγνώριση και ο μοριακός χαρακτηρισμός των πρωτεϊνών της Αραβίδωσης που αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη HrpA θα μας προσφέρει νέες θεωρήσεις για το δίκτυο των αλληλεπιδράσεων που πραγματοποιούνται στις αλληλεπιδράσεις ξενιστών-βακτηρίων αλλά και θα αναδείξει μια νέα ομάδα γονιδίων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την δημιουργία ανθεκτικών ποικιλιών.

Επίσης σε μελλοντικά πειράματα θα μπορούσαμε να αναπτύξουμε γενετικά αναβαθμισμένα φυτά ντομάτας που να παρουσιάζουν ανθεκτικότητα ως προς το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, που προκαλεί τη βακτηριακή σιγμάτωση στη ντομάτα. Για τη δημιουργία των γενετικά αναβαθμισμένων φυτών ντομάτας θα μπορούσαμε να χρησιμοποιήσουμε το γονίδιο *hrpA* που κωδικοποιεί την



υπομονάδα που είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία των ινιδίων στο εκκριτικό σύστημα τύπου III. Με την ολοκλήρωση της δημιουργίας των γενετικά αναβαθμισμένων φυτών ντομάτας θα μπορούσαμε να εξετάσουμε και την ανθεκτικότητα που εκφράζουν σε ένα ευρύ φάσμα ασθενειών.

Τέλος, χρησιμοποιώντας λειτουργική γονιδιωματική θα μπορούσε να εξεταστεί η χρησιμοποίηση των γονιδίων που κωδικοποιούν την υπομονάδα που είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία των ινιδίων στο εκκριτικό σύστημα τύπου III και από άλλα σημαντικά φυτοπαθογόνα βακτήρια όπως *Ralstonia solanearum*, *Xanthomonas campestris*, και *Erwinia chrysanthemi*.

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>**  
**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Arlat M, Gough CL, Barber CE, Boucher C, Daniels MJ. (1994) *Xanthomonas campestris* contains a cluster of *hrp* genes related to the larger *hrp* cluster of *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Plant Microbe Interact.* ;4(6):593-601.
2. Bender C.L. (1997) Phytoxin production in *Pseudomonas syringae*. In Stacey G., and Keen N.T (eds) "*Plant Microbe Interactions vol.3*", Chapman and Hall, New York, pp. 124-144.
3. Bent, A. F., Kunkel, B. N., Dahlbeck, D., Brown, K. L., Schmidt, R., Giraudat, J., Leung, J., and Staskawicz, B. J. (1994) RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science* 265, 1856-1860.
4. Blocker, A., Jouihri, N., Larquet, E., Gounon, P., Ebel, F., Parsot, C., Sansonetti, P. and Allaoui, A. (2001) Structure and composition of the *Shigella flexneri* "needle complex", a part of its type III secreton. *Mol. Microbiol.*, 39, 652-663.
5. Bonas, U., and Lahaye, T. (2002) Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 44-50.
6. Boucher CA, Van Gijsegem F, Barberis PA, Arlat M, Zischek C. (1987) *Pseudomonas solanacearum* genes controlling both pathogenicity on tomato and hypersensitivity on tobacco are clustered. *J Bacteriol.*;169(12):5626-32
7. Brown I. And Mansfield J.W. (1988) An ultrastructural study, including cytochemistry and quantitative analyses, of the interactions between *Pseudomonads* and leaves of *Phaseolus vulgaris* L. *Physiological Molecular Plant Pathology*, 33: 351-361.
8. Brown, I.R., Mansfield, J.W., Taira, S., Roine, E. and Romantschuk, M. (2001) Immunocytochemical localization of HrpA and HrpZ supports a role for the Hrp pilus in the transfer of effector proteins from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* across the host plant cell wall. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 14, 394-404.
9. Bryan, G.T., Wu, K.S., Farrall, L., Jia, Y., Hershey, H.P., Mc Adams, S.A., Faulk, K.N., Donaldson, G.K., Tarchini, R., Valent., B., (2000) A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice resistance gene *Pi-ta*. *Plant Cell*, 12: 2033-2045.

10. Chang, J.H., Rathjen, J.P., Bernal, A.J., Staskawicz, B.J., and Michelmore, R.W. (2000) *avrPto* enhances growth and necrosis caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in tomato lines lacking either *Pto* or *Prf*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13, 568–571.
11. Collmer, A., Badel, J.L., Charkowski, A.O., Deng, W.L., Fouts, D.E., Ramos, A.R., Rehm, A.H., Anderson, D.M., Schneewind, O., van Dijk, K., and Alfano, J.R. (2000) *Pseudomonas syringae* Hrp type III secretion system and effector proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 8770–8777.
12. Collmer, A., Lindeberg, M., Petnicki-Ocwieja, T., Schnieder, D.J., and Alfano, J.R. (2002) Genomic mining type III secretion system effectors in *Pseudomonas syringae* yields new picks for all TTSS prospectors. *Trends Microbiol.* 10, 462–469.
13. Dangl, J.L., and Jones, J.D.G., (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411, 826–833.
14. Dye d., Bradbury J.F., Goto M., Hayward A.C., Lelliott R.A., Schroth M.N. (1980) International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. *Review of Plant Pathology*, 59: 153-168.
15. Flor H.H. (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, 9: 275-296.
16. Gálan, J.E., and Collmer, A. (1999) Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* 284, 1322–1328.
17. Genin S., Gough C.L., Zischek C., and Boucher C.A. (1992) Evidence that the *hrpB* gene encodes a positive regulator for pathogenicity genes of *Pseudomonas solanacearum*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 6: 3065-3076.
18. Glazebrook J., Rogers E.E. and Ausubel F.M. (1997) Use of Arabidopsis for genetic dissection of plant defense responses. *Annual Review of Genetics*, 31:547:569.
19. Gopalan, S., Bauer, D.W., Alfano, J.R., Loniello, A.O., He, S.Y., Collmer, A., (1996) Expression of the *Pseudomonas syringae* avirulence protein AvrB in plant cells alleviates its dependence on the hypersensitive response and pathogenicity (Hrp) secretion system in eliciting genotype-specific hypersensitive cell death. *Plant Cell.* 8 (7): 1095-105.

20. Grant M.R., Godiard L., Straube E., Ashfield T., Leward J., Sattler A., Innes R.W., Dangl J.L. (1995) Structure of the Arabidopsis *RPM1* gene enabling dual specificity disease resistance. *Science* 269: 843-846.
21. Hammond-Kosack K.E. and Jones J.D.G. (1996) Plant disease resistance genes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 575-607.
22. Hu, W., Yuan, J., Jin, Q.L., Hart, P. and He, S.Y., (2001) Immunogold labeling of Hrp pili of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* assembled in minimal medium and *in planta*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 14, 234-241.
23. Huang, H.C., Lin, R.H., Chang, C.J., Collmer, A., Deng, W.L. (1995) The complete *hrp* gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 includes two blocks of genes required for *harpin<sub>Pss</sub>* secretion that are arranged collinearly with *Yersinia ysc* homologs. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 8: 733-746.
24. Hueck C.J (1998) Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of Animals and Plants. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62: 379-433.
25. Jackson R.W., Athanassopoulos E., Tsiamis G., Sesma A., Arnold D.L., Gibbon M.J., Murillo J., Taylor J.D., Vivian A. (1999) Identification of a pathogenicity island, which contains genes for virulence and avirulence, on a large native plasmid in the bean pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, 96:10875-10880.
26. Jin, Q. and He, S.Y. (2001) Role of the Hrp pilus in type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*. *Science*, 294, 2556-2558.
27. Jin, Q., Hu, W., Brown, I., McGhee, G., Hart, P., Jones, A.L. and He, S.Y., (2001) Visualization of secreted Hrp and Avr proteins along the Hrp pilus during type III secretion in *Erwinia amylovora* and *Pseudomonas syringae*. *Mol. Microbiol.*, 40, 1129-1139.
28. Kearney B, Staskawicz B.J. (1990) Widespread distribution and fitness contribution of *Xanthomonas campestris* avirulence gene *avrBs2*. *Nature*, 26; 346(6282):385-6.
29. Kim, Y.J., Lin, N.C., and Martin, G., (2002) Two distinct *Pseudomonas* effector proteins interact with the Pto kinase and activate plant immunity. *Cell* 109, 589-596.
30. King, E.O., Ward, M.K. and Raney, D.E. (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44, 301-307.

31. Kruger, J., Thomas, C.M., Golstein, C., Dixon, M.S., Smoker, M., Tang, S., Mulder, L., and Jones, J.D.G., (2002) A tomato cysteine protease required for Cf-2-dependent disease resistance and suppression of autonecrosis. *Science* 296, 744-747.
32. Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galan, J.E. and Aizawa, S.I. (1998) Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science*, 280: 602-605.
33. Leach, J.E. and White, F.F. (1996) Bacterial avirulence genes, *Annu. Rev. Phytopathol.* 34, 153-179.
34. Leigh J.A. and Coplin D.L. (1992) Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. *Annual Review of Microbiology*, 46: 307-346.
35. Leister, R.T., Ausubel, F.M. and Katagiri, F. (1996) Molecular recognition of pathogen attack occurs inside of plant cells in plant disease resistance specified by the *Arabidopsis* genes *RPS2* and *RPM1*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 15497-15502.
36. Li, C.M., Brown, I., Mansfield, J., Stevens, C., Boureau, T., Romantschuk, M. and Taira, S. (2002) The Hrp pilus of *Pseudomonas syringae* elongates from its tip and acts as a conduit for translocation of the effector protein HrpZ. *EMBO J.*, 21, 1909-1915.
37. Lindgren P.B., Peet R.C. and Panopoulos N.J. (1986) Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* controls pathogenicity on bean plants and hypersensitivity on nonhost plants. *Journal of Bacteriology*, 168:512-522.
38. Lorang J.M., Shen H., Kobayashi D., Cooksey D., Keen N.T. (1994) *avrA* and *avrE* in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* PT23 play a role in virulence on tomato plants. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 7: 208-215.
39. Mackey, D., Holt, B.F., III, Wiig, A., and Dangl, J.L. (2002) RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* Type III effector molecules and is required for RPM1-mediated disease resistance in *Arabidopsis*. *Cell* 108, 743-754.
40. Martin G.B., Brommonschenkel S.H., Chunwongse J., Frary A., Ganai M.W., Spivey R., Wu T., Earle E.D., Tanksley S.D. (1993) Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato, *Science* 262, 1432-1436
41. Miller J.H. (1972) Experiments in Molecular genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.*

42. Mudgett M. and Staskawicz B. (1998) Protein signaling via Type III secretion pathways in phytopathogenic bacteria. *Current opinion in Microbiology*, 1: 109-114.
43. Nimchuk, Z., Rohmer, L., Chang, J.H., and Dangl, J.L. (2001) Knowing the dancer from the dance: R gene products and their interactions with other proteins from host and pathogen. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 288-294.
44. Olsen G.J., Woese C.R. and Overbeek R. (1994) The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *Journal of Bacteriology*, 176: 1-6.
45. Pallaroni N.I. (1984) *Pseudomonaceae*. In Krieg N.R. and Holt J.G. (eds.) "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", vol.1. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 141-210.
46. Ritter C. and Dangl J.L (1995) The *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* *avrRpm1* gene is required for virulence in *Arabidopsis*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 8: 444-453.
47. Roine, E., Wei, W.S., Yuan, J., Nurmiaho-Lassila, E.L., Kalkkinen, N., Romantschuk, M. and He, S.Y. (1997) Hrp pilus: a hrp-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 94, 3459-3464.
48. Romantschuk, M., Roine, E. and Taira, S. (2001) Hrp pilus-reaching through the plant cell wall. *Eur. J. Plant Pathol.*, 107, 153-160.
49. Rudolph K. and Sonnenberg B. (1997) Role of polysaccharides from *Pseudomonas syringae* pathovars in pathogenesis. In Rudolph K., Burr T.J., Mansfield J.W., Stead D., Vivian A. and Von Kietzell (eds) "*Pseudomonas syringae* pathovars and Related Pathogens", *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands*, pp. 265-270.
50. Scofield, S. R., Tobias, C. M., Rathjen, J. P., Chang, J. H., Lavelle, D. T., Michelmore, R. W., and Staskawicz, B. J. (1996) Molecular basis of gene-for-gene specificity in bacteria speck disease of tomato, *Science* 274, 2063-2065.
51. Sekiya, K., Ohishi, M., Ogino, T., Tamano, K., Sasakawa, C. and Abe, A. (2001) Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA sheath-like structure. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 98, 11638-11643.

52. Shan, L., Thara, V.K., Martin, G.B., Zhou, J.M., and Tang, X. (2000) The *Pseudomonas* AvrPto protein is differentially recognized by tomato and tobacco and is localized to the plant plasma membrane. *Plant Cell* 12, 2323–2337.
53. Shao, F., Merritt, P.M., Bao, Z., Innes, R.W., and Dixon, J.E. (2002) A *Yersinia* effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Cell* 109, 575–588.
54. Song W.Y., Wang G.L., Chen L.L., Kim H.S., Pi L.Y., Holsten T., Gardner J., Wang B., Zhai W.X., Zhu L.H., Fauquet C., Ronald P. (1995) A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene *Xa21*, *Science*. 15; 270 (5243): 1804-6.
55. Stevens, C., Bennet, M.A., Athanasopoulos, E., Tsiamis, G., Taylor, J.D., Mansfield, J.W., (1998) Sequence variations in alleles of the avirulence gene *avrPphE.R2* from *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola* lead to less recognition of the AvrPphE→ P.T.O. protein within bean cells and again in cultivar-specific virulence. *Molecular Microbiology*, 29 (1): 165-177
56. Tamano, K., Aizawa, S., Katayama, E., Nonaka, T., Imajoh-Ohmi, S., Kuwae, A., Nagai, S. and Sasakawa, C. (2000) Supramolecular structure of the Shigella type III secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors. *EMBO J.*, 19, 3876-3887.
57. Tang, X., Frederick, R.D., Zhou, J., Halterman, D.A., Jia, Y., Martin, G.B. (1996) Initiation of plant disease resistance by physical interaction of *avrPto* and *Pto* kinase, *Science* 274 (5295): 2060-3.
58. Tsiamis G., Mansfield, J.W., Hockenhull R., Jackson R.W., Sesma A., Athanassopoulos E., Bennett M.A., Stevens C., Vivian A., Taylor J.D., Murillo J. (2000) Cultivar-specific avirulence and virulence functions assigned to *avrPphF* in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, the cause of bean halo-blight. *The EMBO Journal* 19:3204-3214.
59. Van den Ackerveken G., Marois G. and Bonas U. (1996) Recognition of the bacterial AvrBs3 protein occurs inside the plant cell. *Cell*, 87: 1307-1316.
60. Van der Biezen, E.A., and Jones, J.D.G. (1998) Plant disease resistance proteins and the “gene-for-gene” concept. *Trends Biochem. Sci.* 23, 454–456.



61. Van Gijsegem, F., Vasse, J., Camus, J.C., Marena, M. and Boucher, C. (2000) *Ralstonia solanacearum* produces Hrp-dependent pili that are required for PopA secretion but not for attachment of bacteria to plant cells. *Mol. Microbiol.*, 36, 249-260.
62. Yuan J. and He S.Y. (1996) The *Pseudomonas syringae* Hrp regulation and secretion system controls the production and secretion of multiple extracellular proteins. *Journal of Bacteriology*, 178: 6399-6402.