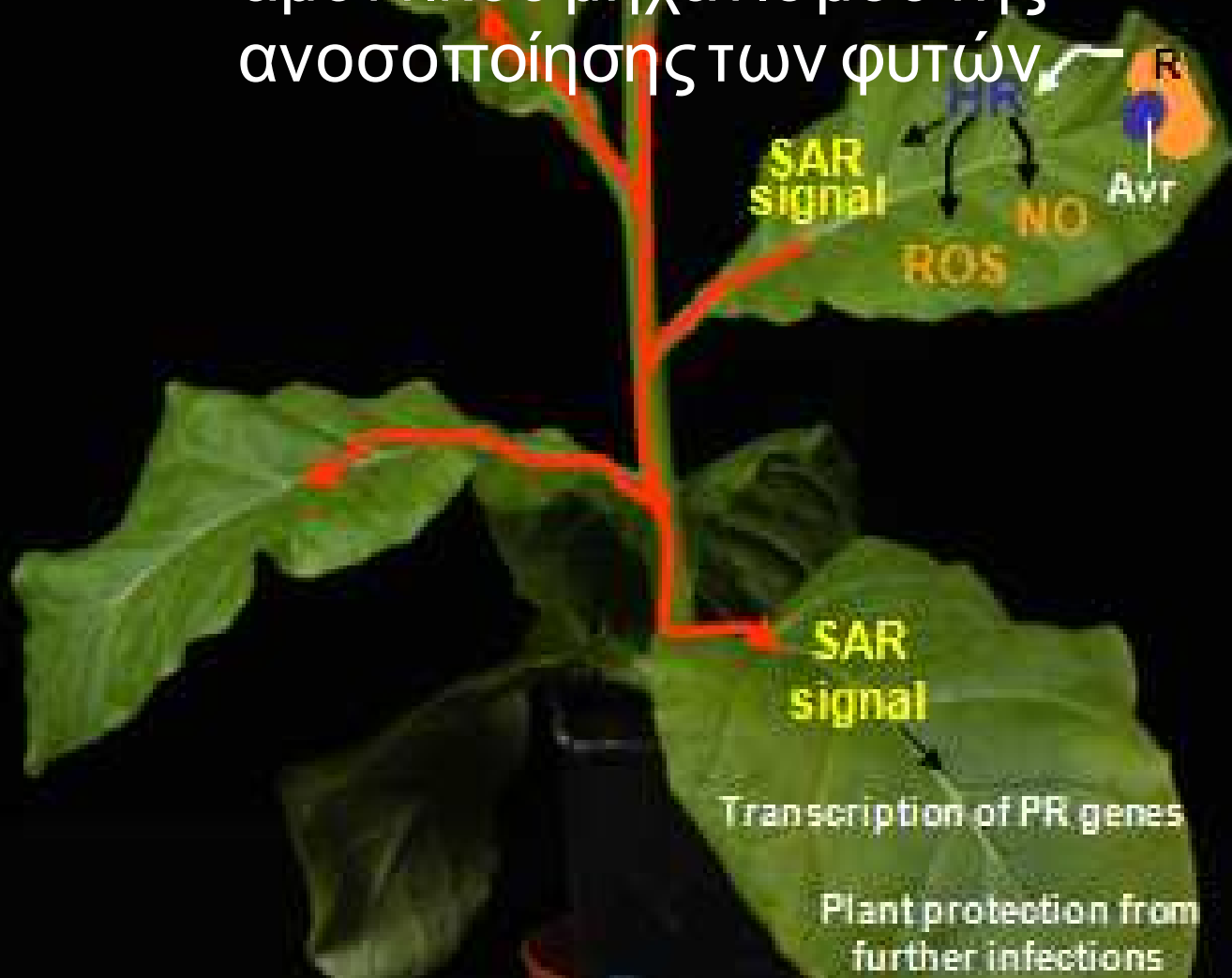


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Αξιολόγηση επιφανειοδραστικών
ουσιών στην ενεργοποίηση του
αμυντικού μηχανισμού της
ανοσοποίησης των φυτών



ΜΑΡΙΕΤΤΑ ΜΟΣΧΟΓΙΑΝΝΗ
ΑΘΗΝΑ 2010

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Αξιολόγηση επιφανειοδραστικών ουσιών στην ενεργοποίηση του αμυντικού μηχανισμού της ανοσοποίησης των φυτών

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Τζάμος Ε.

Καθηγητής

Μέλος

Αντωνίου Π.

Επίκουρη Καθηγήτρια

Επιβλέπουσα

Τσιτσιγιάνης Δ.

Λέκτορας

Μέλος

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η ολοκλήρωση αυτής της μεταπτυχιακής μελέτης θα ήταν αδύνατη χωρίς τη συμβολή και τη συνεχή καθοδήγηση πολλών ατόμων, τα οποία νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου.

Ευχαριστώ θερμά τον Διευθυντή του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας, Καθηγητή κ. Ελευθέριο Τζάμο που συνέβαλε στο να μου δοθεί η ευκαιρία να πραγματοποιήσω αυτή τη μεταπτυχιακή μελέτη και πίστεψε από την αρχή στις δυνατότητες μου. Τον ευχαριστώ για το συνεχές και ειλικρινό ενδιαφέρον του για την πορεία των πειραμάτων μου.

Θέλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Πολύμνια Αντωνίου, για την επίβλεψη της, καθώς επίσης και για τις πολύτιμες παρατηρήσεις της που με καθοδήγησαν καθ' όλη τη διάρκεια της έρευνας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Λέκτορα κ. Δημήτριο Τσιτσιγιάννη η συμβολή του οποίου υπήρξε καθοριστική. Το ειλικρινές ενδιαφέρον του και οι συστάσεις του για την επίλυση προβλημάτων, συνέβαλαν ουσιαστικά στην πορεία των πειραμάτων. Επίσης τον ευχαριστώ θερμά για τη διόρθωση της μελέτης που βελτίωσε ιδιαίτερα το τελικό κείμενο.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω το Δρ. Σωτήρη Τζάμο και το Δρ. Ιάκωβο Παντελίδη για τη βοήθεια που παρείχαν κατά την επεξεργασία και στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης, καθώς και για τη διαρκή βοήθεια κατά το πειραματικό μέρος της μελέτης.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές του εργαστηρίου της Φυτοπαθολογίας που ήταν πάντα πρόθυμοι να συμβάλλουν όπως μπορούσαν αλλά και για το υπέροχο κλίμα μέσα στο οποίο εργάστηκα για την εκπόνηση αυτής της μεταπτυχιακής μελέτης.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1. Ο ΑΜΥΝΤΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ	7
1.1.1. Γενικά	7
1.1.2. Εγγενές ανοσοποιητικό σύστημα του φυτού (Innate immune system).....	8
1.1.2.1. Βασικό Ανοσοποιητικό Σύστημα	10
1.1.2.2. Ανοσοποιητικό σύστημα των γονιδίων ή γόνων ανθεκτικότητας.....	14
1.1.2.3. Επαγόμενη και Επίκτητη διασυστηματική ανοχή των φυτών	19
1.1.3. Η εξέλιξη του μοριακού συμπλόκου αναγνώρισης φυτοπαθογόνων-ξενιστών	27
1.1.4.	X
ρήση επιφανειοδραστικών ουσιών για την επαγωγή επίκτητης διασυστηματικής ανοχής SAR.....	31
1.2. ΠΑΘΟΓΟΝΑ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ.....	37
1.2.1. Ο περονόσπορος του φυτού <i>Arabidopsis thaliana</i> από τον ωμομήκητα <i>Hyaloperonospora parasitica</i>	37
1.2.2. Η αδρομύκωση από το μύκητα <i>Verticillium dahliae</i>	41
1.2.3. Μωσαϊκό του καπνού (Tobacco Mosaic Virus, TMV)	45
1.3. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	49
2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ.....	51
2.1. Φυτικό υλικό	51
2.2. Προετοιμασία και εφαρμογή επιφανειοδραστικών παραγόντων	52
2.3. Στελέχη φυτοπαθογόνων ωμομηκίτων, μυκήτων και προετοιμασία μολυσματος.....	54
2.3.1. <i>Hyaloperonospora parasitica</i>	54
2.3.2. <i>Verticillium dahliae</i>	56
2.3.3. Tobacco mosaic virus (TMV)	57
2.4. Δοκιμές παθογένειας	58
2.4.1. <i>Hyaloperonospora parasitica</i>	58
2.4.2. <i>Verticillium dahliae</i>	60
2.4.3. Tobacco Mosaic Virus (TMV)	60
2.5. Τοποθέτηση επιφανειοδραστικών παραγόντων σε αμόλυντα φυτά <i>Arabidopsis thaliana</i> για ανίχνευση επαγωγής PR γονιδίων	61
2.6. Απομόνωση RNA από φυτά <i>Arabidopsis thaliana</i>	62
2.7. Μέτρηση συγκέντρωσης RNA	63
2.8. Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης	64

2.9. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR	65
2.10. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR	66
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	68
3.1. Αξιολόγηση της επίδρασης της εφαρμογής των επιφανειοδραστικών παραγόντων στα φυτά	68
3.2. Αξιολόγηση της δράσης των επιφανειοδραστικών παραγόντων κατά της ασθένειας του περονοσπόρου από το <i>Hyaloperonospora parasitica</i>	72
3.3. Αξιολόγηση της δράσης των επιφανειοδραστικών παραγόντων κατά των αδρομυκώσεων από το <i>Verticillium dahliae</i>	77
3.4. Αξιολόγηση της δράσης των επιφανειοδραστικών παραγόντων στον ιό του μωσαϊκού του καπνού TMV	83
3.5. Μοριακή διερεύνηση της επαγωγής PR γονιδίων από την εφαρμογή των επιφανειοδραστικών παραγόντων Α και Β σε φυτά <i>Arabidopsis thaliana</i>	90
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	92
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	97

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα φυτά κατά την μακρόχρονη εξελικτική τους πορεία διαμόρφωσαν πολύπλοκους μηχανισμούς που τους προσέδιδαν ανθεκτικότητα στην πληθώρα των παθογόνων (μύκητες, βακτήρια και ιοί) με τα οποία έρχονται σε καθημερινή επαφή. Το φαινόμενο της επίκτητης διασυστηματικής αντοχής SAR δηλαδή της βιοχημικής ή χημικής διέγερσης λανθανόντων μηχανισμών αντοχής, ώστε ένα φυτό ευπαθές σε ένα σύστημα ξενιστή-παθογόνου, να καθίσταται ανθεκτικό στο ίδιο αυτό σύστημα, αποτελεί σημείο έρευνας για πάρα πολλά χρόνια. Τα αποτελέσματα της SAR στην αντιμετώπιση ενός μεγάλου φάσματος παθογόνων, είναι συχνά τόσο ικανοποιητικά για την παρεμπόδιση και περιορισμό της ασθένειας, που έδωσαν το έναυσμα στους ερευνητές να προσπαθήσουν να αναπαράγουν το φαινόμενο ακόμα και με την απουσία των παθογόνων που αποτελούν τον παράγοντα έναρξης της επαγωγής ανθεκτικότητας. Η διάθεση στο εμπόριο σκευασμάτων με ουσίες που όταν εφαρμοσθούν στα φυτά μπορούν να επάγουν SAR, είναι πλέον γεγονός.

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, αξιολογήθηκαν δύο κατιονικοί επιφανειοδραστικοί παράγοντες του βρωμιούχου αμμωνίου (cationic surfactants of ammonium bromide) για την ικανότητα τους να επάγουν τον αμυντικό μηχανισμό των φυτών. Οι επιφανειοδραστικοί αυτοί παράγοντες, δεν έχουν μελετηθεί μέχρι τώρα για την ικανότητα τους να επάγουν την επίκτητη διασυστηματική αντοχή (Systemic Acquired Resistance, SAR) στα φυτά, ενώ σε άλλους οργανισμούς μελέτες έχουν δείξει ότι μπορούν να παίξουν σημαντικό ρόλο ως παράγοντες ανοσοποίησης.

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η εξέλιξη των συμπτωμάτων σε τρία συστήματα αλληλεπίδρασης ξενιστή-παθογόνου, σε κάθε ένα από τα οποία είχε γίνει εφαρμογή δύο τέτοιων παραγόντων, των Α και Β, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, προκειμένου να διαπιστωθεί αν κάποια συγκέντρωση ενός από τους δύο παράγοντες υπερτερεί έναντι των άλλων στον περιορισμό των συμπτωμάτων της ασθένειας. Τα πειράματα παθογένειας πραγματοποιήθηκαν σε φυτά *Arabidopsis thaliana* που μολύνθηκαν με τον ωομύκητα *Hyaloperonospora parasitica* και το μύκητα *Verticillium dahliae* και σε φυτά καπνού, *Nicotiana tabacum*, που μολύνθηκαν με τον ιό TMV. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα από τα πειράματα παθογένειας, με τον ωομύκητα

Hyaloperonospora parasitica, η επέμβαση με τον παράγοντα A σε συγκέντρωση 10 mM, έδωσε πολύ καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με το μάρτυρα και τις άλλες επεμβάσεις μειώνοντας τα επίπεδα της ασθένειας κατά 50%. Στα πειράματα παθογένειας με το παθογόνο *Verticillium dahliae*, για την αξιολόγηση της δυνατότητας των δύο παραγόντων A και B να περιορίσουν την ασθένεια, δεν υπήρξε κάποια συγκέντρωση ενός από τους δύο παράγοντες που να υπερτερεί σταθερά από τις υπόλοιπες και στα 3 πειράματα παθογένειας για την αποτελεσματικότητα της. Τέλος, στα πειράματα παθογένειας σε φυτά *Nicotiana tabacum* για την αξιολόγηση των δύο παραγόντων κατά του TMV, ο παράγοντας B στις συγκεντρώσεις 10 και 50 mM, παρουσιάζεται αποτελεσματικότερος στην αντιμετώπιση της ασθένειας.

Επιπλέον, από τα πειράματα παθογένειας προέκυψαν χρήσιμα στοιχεία σε σχέση με την επίδραση της εφαρμογής των δύο επιφανειοδραστικών αυτών παραγόντων στα φυτά σε συνθήκες θερμοκηπίου. Οι παράγοντες A και B φάνηκε να προκαλούν νέκρωση στην φυλλική επιφάνεια του φυτού στο οποίο εφαρμόζονταν. Η νέκρωση επιδεινώθηκε όταν οι παράγοντες εφαρμόστηκαν με ψεκασμό ακόμα και σε μικρότερες συγκεντρώσεις, σε ένα φύλλο ή και σε ολόκληρη τη φυλλική επιφάνεια τόσο των φυτών *Arabidopsis thaliana*, όσο και των φυτών *Nicotiana tabacum*, ενώ η παρουσία νεκρώσεων ακόμα και όταν δεν χρησιμοποιήθηκε προσκολλητικό Agral, δείχνει ότι οι νεκρώσεις είναι καθαρά επακόλουθο της εφαρμογής των παραγόντων αυτών. Με βάση τα αποτελέσματα συνίσταται η εφαρμογή των επιφανειοδραστικών παραγόντων με σταγόνες.

Τέλος οι δύο παράγοντες αξιολογήθηκαν σε μοριακό επίπεδο, με τη μέθοδο της RT-PCR, για να εξεταστεί η δυνατότητα επαγωγής γονιδίων που διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην άμυνα των φυτών όπως τα PR γονίδια (Pathogenesis-Related γονίδια) στα φυτά. Ανιχνεύθηκε η παρουσία δύο PR γονιδίων των PR-1 και PR-5 που έχει αναγνωρισθεί από πολλές μελέτες ότι εμπλέκονται στις αμυντικές λειτουργίες του φυτού, σε cDNA που προήλθε από RNA που εξήχθη από φυτά *Arabidopsis thaliana* σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα μετά από την εφαρμογή στα φυτά των παραγόντων A και B σε συγκέντρωση 10mM και Agral 0.02%. Η ηλεκτροφόρηση των αποτελεσμάτων της RT-PCR για τα PR1 και PR5 έδωσε ζώνες σε όλα τα χρονικά διαστήματα από την εφαρμογή των δύο παραγόντων και στην επέμβαση-μάρτυρα, με πολύ μικρές διαφορές ώστε να μην είναι ασφαλής η ανάλυση και η εξαγωγή πολύτιμων συμπερασμάτων.

Τα αποτελέσματα από αυτή την εργασία μπορούν να αποτελέσουν χρήσιμο εργαλείο σε κάθε νέα προσπάθεια αξιολόγησης των δύο παραγόντων, η οποία δεν είναι

ανάγκη να είναι τόσο γενικευμένη, αλλά θα έχει τη δυνατότητα να ερευνήσει περαιτέρω σε βάθος τη δράση τους.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ο ΑΜΥΝΤΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

1.1.1 Γενικά

Τα φυτά κατά την μακρόχρονη εξελικτική τους πορεία διαμόρφωσαν πολύπλοκους μηχανισμούς που τους προσέδιδαν ανθεκτικότητα στην πληθώρα των παθογόνων (μύκητες, βακτήρια και ιοί) με τα οποία έρχονται σε καθημερινή επαφή. Παρόλα αυτά η ασθένεια στη φύση, είναι η εξαίρεση αυτής της αλληλεπίδρασης και όχι ο κανόνας, καθώς η παράλληλη εξέλιξη φυτών και παθογόνων οδήγησε σε μια σταθερή και ταυτόχρονη εξέλιξη στο χρόνο, του αμυντικού συστήματος των φυτών και των μηχανισμών μόλυνσης των παθογόνων (Agrios, 2005).

Οι μηχανισμοί αντοχής των φυτών είναι ιδιαίτερα πολύπλοκοι, ενώ αποτελούν ένα συνδυασμό δομικών χαρακτηριστικών και επαγόμενων βιοχημικών αντιδράσεων. Τα δομικά χαρακτηριστικά, σχηματίζουν τον καλούμενο παθητικό ή προϋπάρχον αμυντικό μηχανισμό του φυτού και είναι είτε φυσικοί παράγοντες και κατασκευές του φυτού όπως οι κηροί, η εφυμενίδα, τα κυτταρικά τοιχώματα και τα στομάτια, που σχηματίζουν ένα φυσικό εμπόδιο στην εξάπλωση του παθογόνου σε ολόκληρο το φυτό, είτε χημικοί παράγοντες όπως τοξικοί μεταβολίτες και παρεμποδιστές ενζύμων που προϋπάρχουν στο φυτικό ιστό. Επιπλέον, τα φυτά έχουν τη δυνατότητα να αντιλαμβάνονται τα αρχικά στάδια της προσβολής άμεσα ή έμμεσα, και να αντιδρούν με την επαγωγή αμυντικών βιοχημικών αντιδράσεων. Οι συνδυασμοί των δομικών χαρακτηριστικών και των βιοχημικών αντιδράσεων που χρησιμοποιούν τα φυτά κατά την άμυνά τους είναι διαφορετικοί ανάλογα με το εξειδικευμένο σύστημα αλληλεπίδρασης ξενιστή – παθογόνου. Επιπροσθέτως, ακόμα και στο ίδιο σύστημα ξενιστή – παθογόνου, οι συνδυασμοί ποικίλουν με την ηλικία του φυτού, το είδος του φυτικού οργάνου ή ιστού που δέχεται τη προσβολή, τη θρεπτική κατάσταση του φυτού, και τις συνθήκες του περιβάλλοντος (Agrios, 2005).

1.1.2 Εγγενές ανοσοποιητικό σύστημα του φυτού (Innate immune system)

Τα φυτά εκτίθενται συνεχώς σε ένα μεγάλο αριθμό παθογόνων. Για να αποβούν μολυσματικά τα περισσότερα παθογόνα πρέπει να αποκτήσουν πρόσβαση στο εσωτερικό του φυτού, είτε διαπερνώντας απευθείας τη φυλλική ή ριζική επιφάνεια, είτε εισερχόμενα από πληγές ή φυσικά ανοίγματα στα φύλλα όπως είναι τα στομάτια. Τα φυτά σε αντίθεση με τα θηλαστικά, δεν διαθέτουν κινούμενα αμυντικά κύτταρα. Για να αποφύγουν την προσβολή, βασίζονται στον αμυντικό μηχανισμό κάθε μεμονωμένου κυττάρου καθώς και στην παραγωγή διασυστηματικών σημάτων προερχόμενα από το σημείο της αρχικής προσβολής. Έτσι ενεργοποιείται ο εγγενής ή ενεργητικός μηχανισμός άμυνας των φυτών, στον οποίο περιλαμβάνονται διάφοροι ιστολογικοί και βιοχημικοί μηχανισμοί, με τους οποίους τα φυτά αντιδρούν στην προσβολή από τα παθογόνα. Έχει δε διαφοροποιηθεί βιοχημικά στο :

1. Α) **βασικό ανοσοποιητικό σύστημα** (basal innate immune system), που ενεργοποιείται μέσα σε 10-30 min από την επαφή φυτού – παθογόνου.
2. β) στο **ανοσοποιητικό σύστημα των γονιδίων ή γόνων ανθεκτικότητας** (resistance (R) - gene-mediated mediated innate immune system) που ενεργοποιείται 2-3 h μετά την επαφή και την απελευθέρωση των διεγερτών από το παθογόνο στο φυτικό κύτταρο.
3. γ) στην **επαγόμενη και επίκτητη διασυστηματική αντοχή** (Systemic Acquired Resistance και Induced Systemic Resistance), στη βιολογική, βιοχημική ή χημική δηλαδή διέγερση λανθανόντων μηχανισμών αντοχής στα φυτά, ενάντια σε παθογόνα στα οποία εμφάνιζαν ευαισθησία πριν από τη δράση των παραγόντων διέγερσης.

Καθοριστική για την επαγωγή οποιουδήποτε αμυντικού μηχανισμού, είναι η έγκαιρη αναγνώριση του παθογόνου. Τα φυτά έχουν αποκτήσει την ικανότητα να αναγνωρίζουν μόρια που παράγονται από τα παθογόνα, όπως π.χ. τους διεγέρτες (elicitors), και να τα χρησιμοποιούν για την επαγωγή αντοχής. Ο όρος διεγέρτης, που αρχικά αποδιδόταν σε κάθε ουσία που είχε τη δυνατότητα να προκαλέσει στα φυτά συσσώρευση φυτοαλεξινών, δηλαδή μικρού μοριακού βάρους αντιμικροβιακών ενώσεων που παράγονται και συσσωρεύονται στα φυτά είτε σαν αποτέλεσμα μόλυνσεως από φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς είτε ως απόρροια επιδράσεως χημικών ή άλλης φύσεως μη παρασιτικών

αιτίων, πλέον χρησιμοποιείται για να περιγράψει κάθε παράγοντα που προκαλεί οποιαδήποτε μορφή άμυνας (Nürnberg, 1999). Αυτός ο διευρυμένος ορισμός των διεγερτών περιλαμβάνει τόσο παράγοντες που προέρχονται από το παθογόνο (εξωγενείς διεγέρτες) όσο και χημικές ενώσεις που απελευθερώνονται από τα φυτά λόγω της δράσης του παθογόνου (ενδογενείς διεγέρτες) (Boller, 1995; Ebel and Cosio, 1994).

Οι διεγέρτες διακρίνονται σε γενικούς ή χωρίς εξειδίκευση προς τη φυλή (general or race-nonspecific) και εξειδικευμένους (race-specific). Οι γενικοί διεγέρτες επάγουν αμυντικές λειτουργίες σε όλες τις ποικιλίες ενός τουλάχιστον είδους φυτού, ή ακόμα και σε επίπεδο οικογένειας φυτών, ανεξάρτητα δηλαδή από το αν το φυτό είναι ξενιστής ή όχι του παθογόνου. Εν αντιθέσει, σύμφωνα με τη θεωρία γόνου-προς-γόνο που θα αναλυθεί παρακάτω, οι ειδικοί διεγέρτες θεωρείται ότι είναι άμεσα ή έμμεσα προϊόντα των γονιδίων αμολυσματικότητας (avirulence ή avr genes). Έτσι ένας εξειδικευμένος διεγέρτης που ενεργοποιείται ή παράγεται από ένα Avr γονίδιο που εδράζει σε μια συγκεκριμένη φυλή παθογόνου, προσδίδει αντοχή μόνο σε ποικιλίες φυτών-ξενιστών που διαθέτουν το αντίστοιχο γονίδιο.

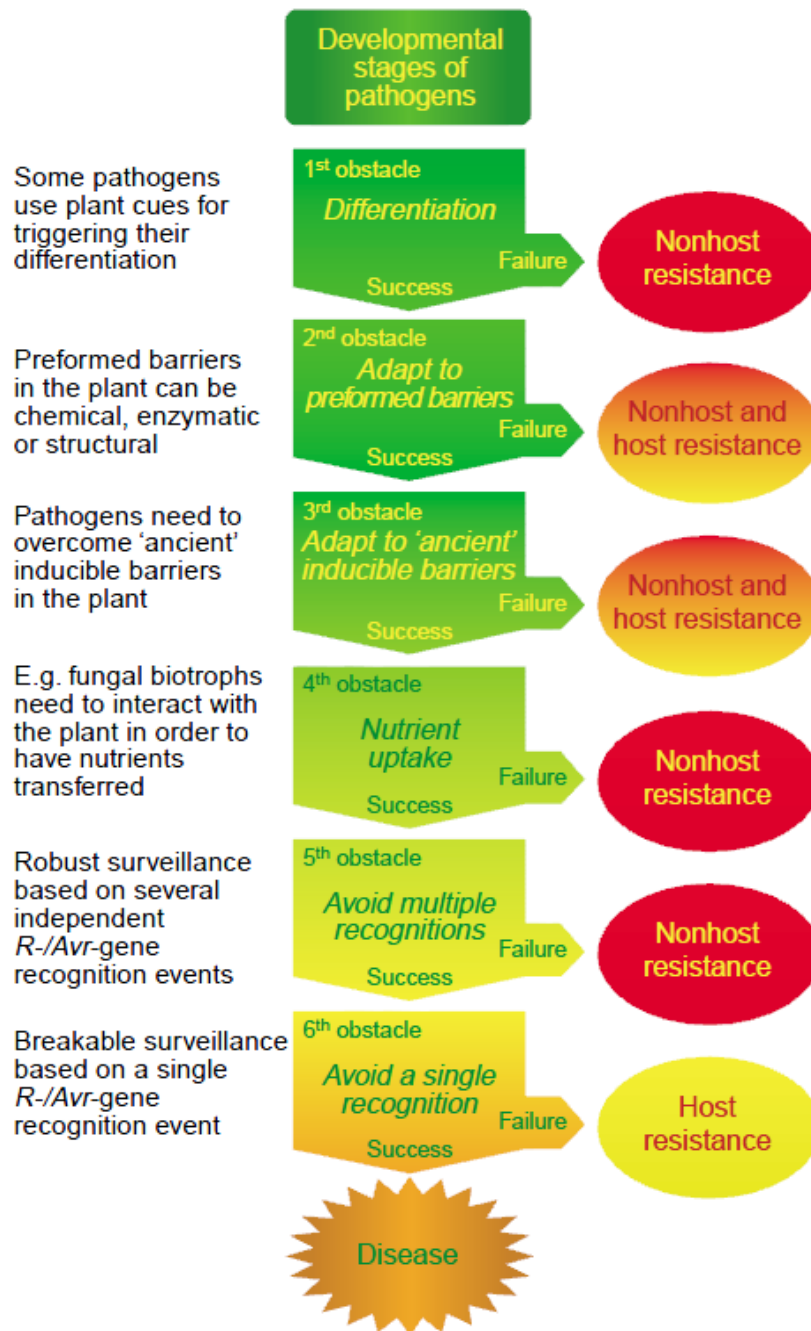
Η κατανόηση του τρόπου με τον οποίο τα φυτά αναγνωρίζουν τα “αντιγόνα” ή τους γενικούς διεγέρτες που παράγονται από τα διάφορα παθογόνα, βρίσκεται κυρίως στη δομή τους, καθώς αποτελούν συστατικά στοιχεία των κυτταρικών τοιχωμάτων των παθογόνων, όπως π.χ. τα λιποπολυσακχαρίδια (lipopolysaccharide LPS) των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, οι γλυκάνες, χιτίνες και πρωτεΐνες που προέρχονται από το κυτταρικό τοίχωμα των μυκήτων αλλά και η φλατζελίνη (flagellin) των βακτηρίων. Οι παράγοντες αυτοί περιγράφονται με τον όρο Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), που όπως έχει πρόσφατα διαπιστωθεί, προσδένονται σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης του φυτού, (pattern recognition receptors PRRs) και ακολούθως ενεργοποιούν την έκφραση αντιμικροβιακών γονιδίων άμυνας και αντιμικροβιακών ενώσεων.

1.1.2.1 Βασικό Ανοσοποιητικό Σύστημα

Παρόλο που τα φυτά έρχονται σε επαφή με πολλά παθογόνα σε όλους τους κύκλους της ζωής τους, καταφέρνουν να αποτρέπουν τις περισσότερες προσβολές, έτσι ώστε στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυτών και παθογόνων, η αντοχή να είναι συνηθέστερη και όχι η ασθένεια (Hammond-Kosack και Parker, 2003). Γενικά τα φυτά είναι ανθεκτικά σε ορισμένα παθογόνα επειδή α) ανήκουν σε ταξινομικές ομάδες που βρίσκονται έξω από το εύρος ξενιστών του παθογόνου (ανθεκτικότητα του μη-ξενιστή ή non-host resistance), έχουν στη διάθεσή τους γονίδια που προσδίδουν αντοχή (R genes) και δρουν ενάντια γονιδίων αμολυσματικότητας (avr genes) του παθογόνου (Agrios, 2005), β) παρουσιάζουν μια βασική ή γενικευμένη αντοχή (basal resistance).

Η κατανόηση της μοριακής φύσης της ανθεκτικότητας του μη-ξενιστή (non-host resistance), αποτελεί μία από τις πιο μεγάλες αναζητήσεις στην μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ ξενιστή- παθογόνου. Ο όρος "μη ξενιστής φυτό" (non-host plant), ή "μη ξενιστής παθογόνο" (non-host pathogen), αναφέρεται στο γεγονός ότι τα παθογόνα έχουν περιορισμένο εύρος φυτών στα οποία μπορούν να προκαλέσουν ασθένεια. Συχνά μόνο φυτά ενός γένους αποτελούν ξενιστές ενός συγκεκριμένου παθογόνου, όπως ισχύει για πολλά παθογόνα της ασθένειας του περνοσπόρου, της σκωρίασης και ορισμένων βακτηρίων. Η ανθεκτικότητα του μη-ξενιστή είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική και μεγάλης διάρκειας, οπότε συχνά θεωρείται ότι οι μηχανισμοί της μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη δημιουργία ανθεκτικών ποικιλιών (Thordal-Christensen, 2003). Ωστόσο σύγχρονα μοντέλα αποκαλύπτουν μια πολύπλοκη αλληλοεπικάλυψη εξειδικευμένων και μη-εξειδικευμένων μηχανισμών που εμπλέκονται στη άμυνα του φυτού (Huitema et al., 2003). Πλήθος στοιχείων υποδεικνύουν ότι η είσοδος των παθογόνων σε φυτά μη-ξενιστές, παρεμποδίζεται από αρκετά ταυτόχρονα, αλλά ανεξάρτητα γεγονότα αναγνώρισης. Παθογόνες φυλές των βακτηρίων *Xanthomonas campestris* και *Pseudomonas syringae*, παράγουν Avr γονίδια που επιτρέπουν την αναγνώριση των παθογόνων σε φυτά μη-ξενιστές, σύμφωνα με τη θεωρία της γόνου-προς-γόνου ανθεκτικότητας. Για παράδειγμα το γονίδιο αμολυσματικότητας του *P. syringae* pv. *pisi avrPpiA1*, (*Pseudomonas pisi* Avirulence 1), αναγνωρίζεται από ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στον αρακά, αλλά και στα φυτά *A. thaliana* και του φασολιού. Επίσης στο σιτάρι υπάρχουν 6 γονίδια ανθεκτικότητας που αντιστοιχούν σε γονίδια αμολυσματικότητας της απομόνωσης του περνοσπόρου από φυτό σίκαλης και οδηγούν στην εκδήλωση ανθεκτικότητας του μη-ξενιστή (Thordal-Christensen, 2003).

Η basal ή βασική ανθεκτικότητα, σύμφωνα με τα σύγχρονα ερευνητικά δεδομένα είναι η πρώτη ενεργή αντίδραση του φυτού ενάντια σε μικροβιακή προσβολή από τα παθογόνα. Γνωστή και ως PAMP-triggered immunity (PTI), ενεργοποιείται μετά από την αναγνώριση γενετικά συντηρημένων μικροβιακών στοιχείων-μοτίβων, από πρωτεΐνες-υποδοχείς προσαρμοσμένους στην επιφάνεια του φυτικού κυττάρου, ενώ η επαγωγή της σχετίζεται με την εναπόθεση καλόζης (για την ενίσχυση των κυτταρικών τοιχωμάτων στο σημείο της προσβολής) επαγωγή σήματος από MAP κινάσες (Mitogen-activated Protein kinases), διαμεμβρανική επαγωγή των Pathogen-Responsive (PR) γονιδίων, καθώς και παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS, reactive oxygen species). Όλα τα παραπάνω συμβάλλουν στη παρεμπόδιση της ανάπτυξης του παθογόνου (Nürnberg et al., 2004). Παρόλο που οι μοριακοί μηχανισμοί που κρύβονται πίσω από την PTI δεν είναι πλήρως διευκρινισμένοι, ο κατάλογος με τα μικροβιακά πρωτεϊνικά μοτίβα (συντηρημένες περιοχές αμινοξικών ακολουθιών) που έχουν βρεθεί να την ενεργοποιούν, συνεχώς αυξάνει. Τα PAMPs εκπληρώνουν μια ζωτικής σημασίας λειτουργία για τη διαβίωση του οργανισμού, είναι άκρως συντηρημένες δομικά περιοχές του γονιδιώματος σε ένα μεγάλο αριθμό παθογόνων, και δεν ανιχνεύονται στο ξενιστή υπό φυσιολογικές συνθήκες (Nürnberg et al., 2004). Για παράδειγμα PAMPs θεωρούνται πολλά συστατικά της κυτταρικής επιφάνειας των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένου του λιποπολυσακχαριδίου (lipopolysaccharide), ενός κύριου συστατικού της εξωτερικής μεμβράνης, καθώς και της φλατζελίνης, της πρωτεϊνικής υπομονάδας του μαστιγίου του βακτηρίου. Ομοίως τα φυτά αντιδρούν στη χιτίνη και την εργοστερόλη, κύρια συστατικά του εξωτερικού περιβλήματος των ανώτερων μυκήτων (Chisholm et al., 2006).



Current Opinion in Plant Biology

Εικόνα 1.1 : Απλοποιημένη παρουσίαση των εμποδίων που συναντά ένα παθογόνο καθώς προσπαθεί να πετύχει μόλυνση. Υποδεικνύονται τα στάδια κατά τα οποία μπορεί να διακριθεί η ανθεκτικότητα μη ξενιστή (non-host) και ξενιστή (host resistance) (Thordal-Christensen, 2003).

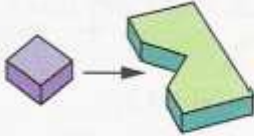
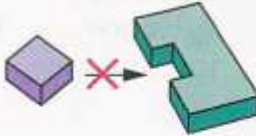
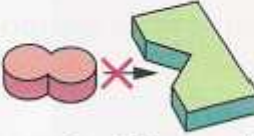
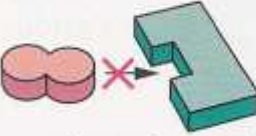
Ένας τυπικός PAMP, είναι η φλατζελίνη (flagellin), που συνιστά πρωτεϊνική υπομονάδα των μαστιγίων. Τα μαστίγια είναι απαραίτητα για την κίνηση των βακτηρίων, και, ενώ η κεντρική δομή του μαστιγίου ποικίλλει, το αμινοτελικό και καρβοξυλικό άκρο, είναι πολύ συντηρημένα σε όλα τα προκαρυωτικά βακτήρια, καθιστώντας το ένα άριστο PAMP (Gómez-Gómez and Boller, 2002). Η φλατζελίνη αναγνωρίζεται ως PAMP από πολλά φυτικά είδη, καθώς και από τους αμυντικούς υποδοχείς των θηλαστικών. Στα φυτά της *Arabidopsis*, ένα πεπτίδιο 22 αμινοξέων (flg22) που αντιστοιχεί στο υψηλά συντηρημένο αμινοτελικό άκρο, είναι επαρκές για την ενεργοποίηση του υποδοχέα FLS2 (receptor like kinase, RLK) που αποτελείται από εξωκυτταρικές επαναλήψεις πεπτιδίων πλούσιες σε λευκίνη (leucine-rich-repeats, LRRs) και μια ενδοκυτταρική κινάση πλούσια σε σερίνη και θιονίνη (serine/threonine kinase), και αποτελεί τον υποδοχέα της *Arabidopsis* για την φλατζελίνη. Τα φυτά που έχουν μεταλλαχθεί ώστε να μην έχουν τον υποδοχέα FLS2, δεν αντιδρούν στη φλατζελίνη, ενώ έχει πλέον αποδειχθεί η σχέση ανάμεσα στην αναγνώριση της φλατζελίνης από τους υποδοχείς των ξενιστών και την περαιτέρω παρεμπόδιση της ανάπτυξης του παθογόνου (Chisholm et al., 2006).

Μελέτες αποκάλυψαν ένα ανάλογο της φλατζελίνης, το Pep-13 (πεπτίδιο, Peptide-13), μιας επιφανειακής αλληλουχίας πεπτιδίων, η αναγνώριση του οποίου παίζει καθοριστικό ρόλο στην ενεργοποίηση της άμυνας του μαϊντανού και της πατάτας σε επικείμενη προσβολή από πολλά είδη *Phytophthora*. Οι αλληλουχίες του Pep-13, φάνηκε να είναι ιδιαίτερα συντηρημένες σε 10 είδη *Phytophthora*, αλλά απουσίαζαν από τις φυτικές αλληλουχίες (Nürnberg et al., 2004).

1.1.2.2 Ανοσοποιητικό σύστημα των γονιδίων ανθεκτικότητας

Η βαθμιαία εξέλιξη των ξενιστών-φυτών και των παθογόνων τους είναι παράλληλη όπως και η εξέλιξη της ασθένειας και της ανθεκτικότητας. Αυτό βρίσκει την εξήγησή του στο μοντέλο της γόνου-προς-γόνου ανθεκτικότητας, σύμφωνα με το οποίο για κάθε γονίδιο του παθογόνου που προκαλεί ασθένεια, υπάρχει ένα αντίστοιχο γονίδιο στο ξενιστή που προσδίδει ανθεκτικότητα, και ούτω καθεξής. Το μοντέλο αυτό προτάθηκε για πρώτη φορά από τον Harold H. Flor τη δεκαετία του 1940 μετά από γενετικές μελέτες στο φυτό λινάρι. Σύμφωνα με το προτεινόμενο μοντέλο η ανθεκτικότητα του φυτού επέρχεται μόνο όταν το φυτό διαθέτει ένα κυρίαρχο γονίδιο ανθεκτικότητας R (Resistance gene), και το παθογόνο εκφράζει το συμπληρωματικό κυρίαρχο γονίδιο αμολυσματικότητας (Avr, avirulence gene). Το μοντέλο έχει επαληθευτεί στις περισσότερες βιοτροφικές αλληλεπιδράσεις φυτού-παθογόνου και απεικονίζεται στην (Εικόνα 1.3) (Hammond-Kosack and Jones, 2000).

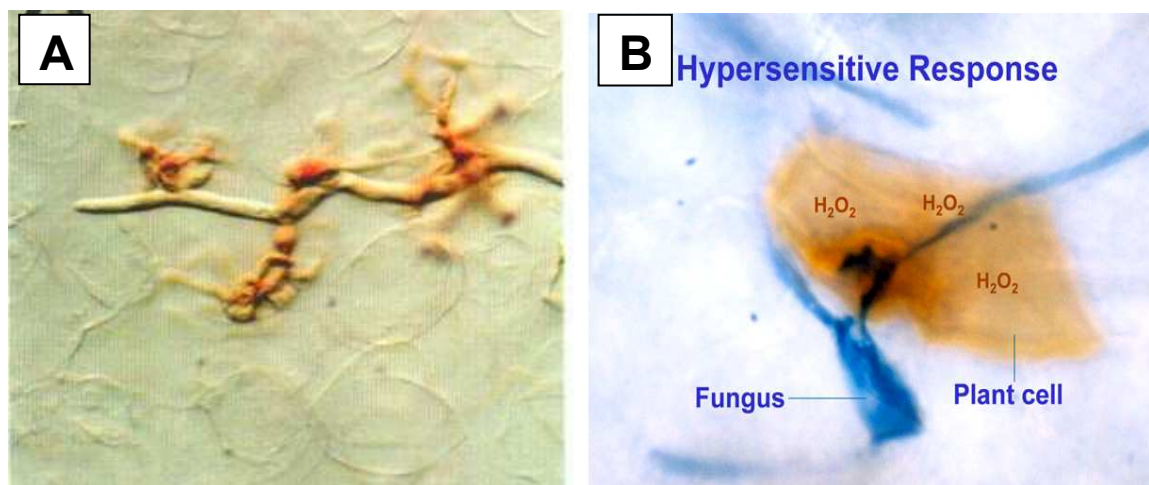
Όταν ένα εξειδικευμένο γονίδιο ανθεκτικότητας εμφανίζεται ή εισάγεται σε έναν ξενιστή, του επιτρέπει να αναγνωρίζει το προϊόν ενός συγκεκριμένου γονιδίου υπεύθυνου για τη μολυσματικότητα του παθογόνου. Αυτό το γονίδιο θεωρείται τότε ως το γονίδιο αμολυσματικότητας (Avr) του παθογόνου που αντιστοιχεί στο γονίδιο ανθεκτικότητας R του φυτού. Η παρεμπόδιση της μολυσματικής πορείας του παθογόνου οφείλεται στο ότι η αναγνώριση της λειτουργίας του γονιδίου Avr (δηλαδή του διεγέρτη, elicitor) από τον υποδοχέα που κωδικοποιείται από το γονίδιο R επάγει την αντίδραση υπερευαισθησίας (AY) (hypersensitive response) του φυτού που το διατηρεί άνοσο (Agrios, 2005).

Pathogen genotype	Host plant genotype	
	<i>R1</i>	<i>r1</i>
<i>Avr1</i>	 Avr1 R1 protein No disease (Plant and pathogen are incompatible .)	 Avr1 r1 protein Disease (Plant and pathogen are compatible .)
<i>avr1</i>	 avr1 R1 protein Disease (Plant and pathogen are compatible .)	 avr1 r1 protein Disease (Plant and pathogen are compatible .)

Εικόνα 1.2: Το μοντέλο του Flor για τη θεωρία ανθεκτικότητας γόνου-προς-γόνου. Για να επέλθει ανθεκτικότητα (ασύμβατη σχέση), απαιτείται η παρουσία συμπληρωματικών ζευγαριών από κυρίαρχα γονίδια, ένα από το ξενιστή και ένα από το παθογόνο. Μια αλλαγή ή απώλεια του γονιδίου ανθεκτικότητας του φυτού (το R αλλάζει σε r) ή του γονιδίου αμολυσματικότητας του παθογόνου (Avr αλλάζει σε avr) οδηγεί σε ασθένεια (συμβατή σχέση) (Hammond-Kosack and Jones, 2000).

Η ΑΥ, είναι μια επαγόμενη τοπική άμυνα των κυττάρων του ξενιστή στο σημείο της προσβολής από το παθογόνο. Το αποτέλεσμα είναι πολύ γρήγορος κυτταρικός θάνατος στο σημείο από το οποίο επιχειρεί το παθογόνο να εισέλθει, και μπορεί να ποικίλλει από το θάνατο ενός μόνο ή και δεκάδων κυττάρων. Εμφανίζεται σχεδόν σε όλες τις αμυντικές λειτουργίες. Αυτές που επάγονται από ένα ή περισσότερα γονίδια ανθεκτικότητας και σε πολλές περιπτώσεις πολυγονικής ανθεκτικότητας. Η αλληλεπίδραση μεταξύ διεγέρτη και υποδοχέα οδηγεί στην επαγωγή σήματος κατά τη διάρκεια μιας ταχείας ροής ιόντων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία αλκαλικού περιβάλλοντος στον αποπλάστη εκτός της κυτταρικής μεμβράνης, σχηματισμό οξειδίου του αζώτου (NO) που έχει τη δυνατότητα να επάγει κυτταρικό θάνατο μέσω των ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS Reactive Oxygen Species), την ενεργοποίηση ενός μεγάλου αριθμού αλυσιδωτών αντιδράσεων παραγωγής

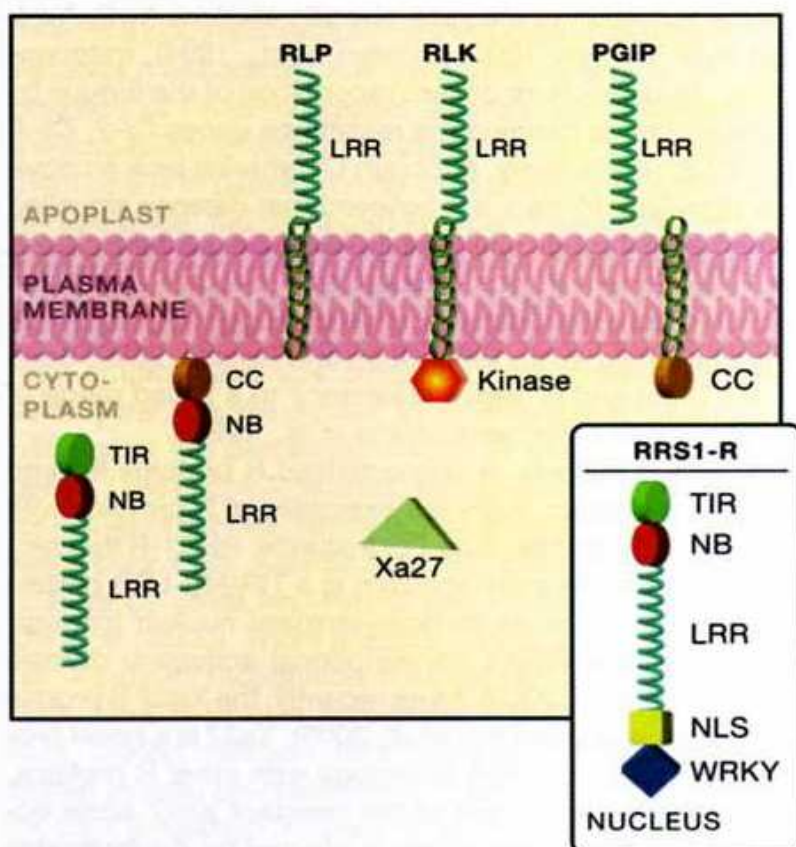
διαφόρων σημάτων συμπεριλαμβανομένων του βιοχημικού μονοπατιού των MAP (Mitogen-Activated Protein) κινασών και της μεταγραφικής ενεργοποίησης μιας πληθώρας γονιδίων ανθεκτικότητας. Αυτός ο μεταγραφικός επαναπρογραμματισμός προκαλεί την παραγωγή ή απελευθέρωση αντιμικροβιακών ενώσεων, ή στη δημιουργία συστατικών του σήματος που θα μεταφερθούν σε απομακρυσμένα σημεία του φυτού και θα επάγουν επίκτητη διασυστηματική αντοχή (Agrinos, 2005). Η ΑΥ ωστόσο δεν είναι υποχρεωτικό συστατικό για την ανθεκτικότητα, καθώς υπάρχει το παράδειγμα της επαγόμενης από το γονίδιο *Cf-9* (*Cladosporium fulvum-9*) ανθεκτικότητας στη τομάτα, κατά του παθογόνου *Cladosporium fulvum*, που δεν σχετίζεται πάντα με κυτταρικό θάνατο στο φυτό. Πιθανόν, υπάρχουν δύο μηχανισμοί που ενεργοποιούνται κατά την εκδήλωση της ΑΥ. Είτε το επιτιθέμενο κύτταρο εκκινεί ένα προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο με περιορισμένο εύρος, είτε τα κύτταρα που δέχονται το σήμα νεκρώνονται ταχύτατα από τοξικές ουσίες και ελεύθερες ρίζες που συνθέτουν και έτσι πεθαίνουν σαν αποτέλεσμα της νέκρωσης (Hammond-Kosack and Jones, 2000).



Εικόνα 1.3 : A. Αντίδραση Υπερευαισθησίας σε μεμονωμένα κύτταρα του μεσόφυλλου σε φυτό λάχανου στα οποία εισχώρησαν μυζητήρες μιας μη συμβατής απομόνωσης του μύκητα *Bremia lactucae* (Bennet et al., 1996). B. Διείσδυση του μύκητα *Erysiphe cichoracearum* (μπλε υφές) σε ένα κύτταρο και εκδήλωση της αντίδρασης υπερευαισθησίας ως αποτέλεσμα της παραγωγής H₂O₂ (ανιχνεύεται με diamino benzidine ως καφέ προϊόν αντίδρασης). Προσαρμογή από (Hofius et al., 2007).

Έως τώρα, ένας σημαντικός αριθμός R γονιδίων από φυτά και παθογόνων Avr γονιδίων από παθογόνα, έχουν χαρακτηρισθεί και κλωνοποιηθεί από ένα μεγάλο εύρος

ειδών. Παρά το ευρύ φάσμα ανθεκτικότητας που επάγεται από τις πρωτεΐνες που κωδικοποιούν τα R γονίδια, αυτά τα προϊόντα μπορούν να χωριστούν σε δύο κύριες κλάσεις ανάλογα με τον τρόπο που είναι οργανωμένη η δομή τους (Εικόνα 1.4) (Dangl and Jones, 2001). Οι δύο κύριες κλάσεις R πρωτεϊνών είναι οι πρωτεΐνες με περιοχή προσδέσεως νουκλεοτιδίων και επαναλήψεις πεπτιδίων πλούσιες σε λευκίνη (nucleotide binding leucine-rich repeat, NB-LRR) και οι εξωκυτταρικές LRR (eLRR) πρωτεΐνες ανθεκτικότητας. Η NB-LRR κλάση είναι η πιο πολυπληθής και οι πρωτεΐνες μπορεί να διαθέτουν εκτός από τη περιοχή της πρόσδεσης των νουκλεοτιδίων (NB) ένα αμινοτελικό άκρο που μοιάζει με περιελιγμένο σπείραμα (Coiled Coil –CC) ή μια TIR περιοχή ομόλογη του Toll-interleukin-1 υποδοχέα των θηλαστικών. Αυτές οι πρωτεΐνες συμμετέχουν σε μια πληθώρα διεργασιών από την ανάπτυξη μέχρι την ανθεκτικότητα σε διάφορες ασθένειες.



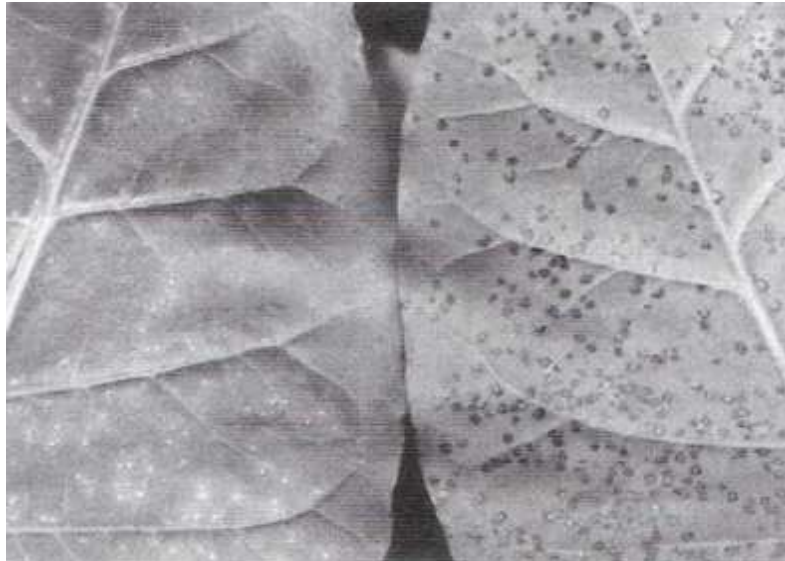
Εικόνα 1.4: Κλάσεις των πρωτεϊνών ανθεκτικότητας. Οι πρωτεΐνες ανθεκτικότητας R κατηγοριοποιούνται ανάλογα με το πώς είναι οργανωμένη η δομή τους.

Το αμινοτελικό άκρο (C-C ή TIR επηρεάζει την απαίτηση για συστατικά στοιχεία της άμυνας του φυτού που βρίσκονται σε προχωρημένα στάδια των αλυσιδωτών αντιδράσεων που τη διέπουν. Αυτή η κλάση περιλαμβάνει μεταξύ άλλων τις RSP2, RPM1 και RPS5, πρωτεΐνες ανθεκτικότητας της *Arabidopsis* (R) που παρέχουν αντοχή στο βακτήριο *Pseudomonas syringae*. Στο φυτό *Arabidopsis thaliana*, έχουν επίσης βρεθεί πολλές πρωτεΐνες ανθεκτικότητας στον περονόσπορο από τον ωομύκητα *Hyaloperonospora parasitica* (παλιότερα *Peronospora parasitica*), οι οποίες περιγράφονται ως RPP (for Resistance to P. parasitica, για ανθεκτικότητα στον *P. parasitica*), όπως η RPP1A TIR-NB-LRR πρωτεΐνη ανθεκτικότητας που παρέχει εξειδικευμένη αναγνώριση στον *H. parasitica* φυλή Cala2 στον οικότυπο Wassilewskija (Ws-0) και οι RPP5 και RPP14 στον οικότυπο Landsberg erecta (Lera) και στον οικότυπο (Ws-0) αντίστοιχα, που αναγνωρίζουν τον *H. parasitica* φυλή Noco2. Η δεύτερη κύρια κλάση R πρωτεϊνών που κωδικοποιεί εξωκυτταρικές LRR (eLRR) πρωτεΐνες έχει 3 υποκλάσεις. Τις RLP (receptor-like proteins, πρωτεΐνες τύπου-υποδοχέα, εξωκυτταρική LRR και διαμεμβρανική [TM] περιοχή), τις RLK (receptor-like kinases, κινάσες τύπου-υποδοχέα, εξωκυτταρική LRR, TM περιοχή, και κυτοπλασματική κινάση) και τις PGIP (polygalacturonase-inhibiting πρωτεΐνη με κυτταρικό τοίχωμα LRR). Οι πιο καλά χαρακτηρισμένες RLPs είναι τα Cf γονίδια της τομάτας που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε μολύνσεις από τον ημιβιοτροφικό μύκητα *Cladosporium fulvum*. Η Χα21, μια RLK παρούσα στο ρύζι, αντιδρά σε διεγέτες-τελεστές που κωδικοποιούνται από το αρνητικό κατά Gram βακτήριο *Xanthomonas oryzae*, προσδίδοντας ευρείας κλίμακας αντοχή σε είδη του γένους αυτού (Chisholm et al., 2006).

1.1.2.3 Επαγόμενη και Επίκτητη διασυστηματική αντοχή των φυτών

Ο Chester το 1933 στην ανασκόπηση του για το φαινόμενο που μελετούσε έκανε για πρώτη φορά χρήση του όρου «ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΠΑΓΩΜΕΝΗ ΑΝΟΣΙΑ » και έπειτα ο Ross το 1961, μετά από μια σειρά πειραμάτων σε φυτά καπνού με τον ιό του μωσαϊκού του καπνού TMV, κατέληξε στον ορισμό της ανθεκτικότητας που παρατήρησε, της SYSTEMIC ACQUIRED RESISTANCE και έθεσε τις βάσεις για την κατανόηση της. Έτσι γύρω στο 1970, ο καθηγητής Joe Kuc και η ομάδα του με μια σειρά δημοσιεύσεων αναφέρονταν στην διασυστηματική διέγερση μηχανισμών αντοχής των φυτών σε βακτηριολογικές, μυκητολογικές και ιολογικές ασθένειες των κολοκυνθοειδών. Η επίκτητη ή επαγόμενη διασυστηματική αντοχή, είναι η βιολογική, βιοχημική ή χημική διέγερση λανθανόντων μηχανισμών αντοχής, ώστε ένα φυτό ευπαθές σε ένα σύστημα ξενιστή-παθογόνου, να καθίσταται ανθεκτικό στο ίδιο αυτό σύστημα. Έχει επικρατήσει η «διασυστηματική αντοχή» να αποδίδεται χάριν συντομίας και με το γενικό όρο «Ανοσοποίηση» (Τζάμος, 2007). Η εκδήλωση της επίκτητης διασυστηματικής αντοχής έχει επαληθευτεί σε διάφορα δικοτυλήδωνα και μονοκοτυλήδωνα είδη και η ανθεκτικότητα που προσδίδει είναι αποτελεσματική ενάντια σε ένα ευρύ φάσμα ιών, βακτηρίων, ωομυκήτων, και μυκήτων. Εντούτοις, δεν είναι αποτελεσματική ενάντια σε όλα τα παθογόνα και το φάσμα της αντοχής ποικίλλει μεταξύ των διαφόρων ειδών των φυτών.

Η επίκτητη διασυστηματική αντοχή (systemic acquired resistance, SAR), είναι η άμυνα των φυτών σε «δεύτερο χρόνο», και επάγεται μετά το σχηματισμό αντίδρασης υπεραισθησίας στο παθογόνο. Αρχικά η επαγόμενη ανθεκτικότητα συγκεντρώνεται γύρω από το σημείο της νέκρωσης που προκαλείται από το παθογόνο ή το χημικό παράγοντα, οπότε καλείται τοπική επίκτητη αντοχή. Ακολούθως η ανθεκτικότητα μεταδίδεται διασυστηματικά και αναπτύσσεται σε απομακρυσμένα, μη προσβεβλημένα μέρη του φυτού οπότε καλείται επίκτητη διασυστηματική αντοχή (Agrios, 2005). Στο καπνό για παράδειγμα, η ανθεκτικότητα που επάγεται από το γονίδιο ανθεκτικότητας N ενάντια στον ιό του μωσαϊκού του καπνού (TMV), προστατεύει το φυτό από ακόλουθη μόλυνση από την φυλή TMV αλλά και από άλλα παθογόνα του καπνού που δοκιμάστηκαν (Εικόνα 1.5) (Hammond-Kosack and Jones, 2000).



Εικόνα 1.5: Επαγωγή SAR. Τα φύλλα καπνού που εκφράζουν το γονίδιο ανθεκτικότητας N είναι σε θέση να περιορίσουν την εξάπλωση του TMV σε μια μικρή ζώνη ιστού γύρω από το σημείο διείσδυσης, όπου και αργότερα εμφανίζεται νεκρωτική κηλίδα (δεξί φύλλο). Η ΑΥ που παρατηρείται ακολουθείται από την επαγωγή SAR σε όλο το φυτό, με αποτέλεσμα σε δευτερεύουσα προσβολή από τον ιό, αρκετές μέρες μετά την αρχική, να οδηγήσει σε νεκρωτικές κηλίδες (αριστερό φύλλο), πολύ μικρότερες από τις αρχικές. Και τα δύο φύλλα παρουσιάζονται 4 μέρες μετά τη μόλυνση.

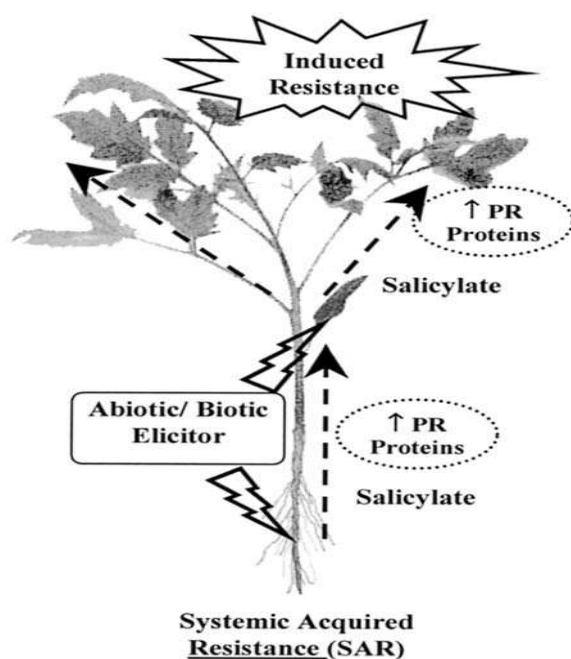
Μοριακά, η SAR χαρακτηρίζεται από την αυξανόμενη έκφραση ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων που εμπλέκονται στην παθογένεια όπως οι πρωτεΐνες PR (pathogen - related genes / PR genes), στους φυτικούς ιστούς. Οι PR πρωτεΐνες περιγράφηκαν για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1970 από τον Van Loon, που κατέγραψε συσσώρευση διαφόρων μέχρι τότε άγνωστων πρωτεϊνών μετά από την μόλυνση καπνού με τον ιό TMV. Παρόλο που πολλές PR πρωτεΐνες έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες *in vitro*, ο ρόλος της κάθε μιας στην αμυντική λειτουργία δεν έχει ακόμα πλήρως διευκρινιστεί. Είναι γενικά αποδεκτό ότι η έκφραση της SAR είναι αποτέλεσμα της κοινής δράσης πολλών PR πρωτεϊνών παρά μίας μεμονωμένης πρωτεΐνης. Παρά τον αδιευκρίνιστο ρόλο τους στην διέγερση της SAR, οι PR πρωτεΐνες είναι χρήσιμοι μοριακοί δείκτες αυτής της μορφής άμυνας (Durrant and Dong, 2004).

Σε βιοχημικό επίπεδο, καθοριστικής σημασίας για την επαγωγή «ανοσοποίησης» είναι το λεγόμενο σήμα. Η διέγερση λανθανόντων μηχανισμών αντοχής σε θέσεις πέραν της μόλυνσεως προϋποθέτει τη δραστηριοποίηση ή την παραγωγή των χημικών εκείνων παραγόντων που το απαρτίζουν, ώστε να υπάρξει άμυνα σε επακόλουθη μόλυνση. Οι περισσότεροι επιστήμονες υποθέτουν ότι το σήμα για τη SAR πρέπει να παράγεται 4-6 h

μετά από τη μόλυνση. Παρά την εμφανή σημασία του δεν έχει ακόμα καθοριστεί ο ακριβής ρόλος και η φύση του. Για τη SAR ανοσοποίηση, είναι αποδεκτό ότι η διέγερση των λανθανόντων μηχανισμών αντοχής πραγματοποιείται αφού συγκεκριμένοι υποδοχείς στα φυτά αναγνωρίσουν τα μόρια που έχουν το ρόλο του διεγέρτη. Αποτέλεσμα αυτής της αναγνώρισης, είναι η εκκίνηση της μεταβολικής οδού παραγωγής του σήματος, που με τη σειρά του ενεργοποιεί την παραγωγή παραγόντων με άμεση ή έμμεση αντιμικροβιακή δράση όπως η β -1,3-γλουκανάσες (glucanases), οι χιτινάσες (chitinases), πλούσιες σε κυστεΐνη (cysteine-rich) πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη θαυματίνη (thaumatin), και PR-1 πρωτεΐνες (Εικόνα 1.6). Το σύνολο των SAR γονιδίων που επάγονται σε ένα φυτό μπορεί να ποικίλει ανάλογα με το είδος του φυτού. Παρόλο που η SAR δεν επηρεάζει τη βλάστηση των σπορίων ή το σχηματισμό πλάκας συγκρατήσεως (appressorium) από το παθογόνο, η διείσδυση μειώνεται δραστικά στους ιστούς που έχει γίνει διασυστηματική επαγωγή ανθεκτικότητας, πιθανόν σαν αποτέλεσμα του σχηματισμού κάτω από τις πλάκες συγκρατήσεως, σχηματισμών με μορφή θηλής (papilla-like), που συσσωρεύουν σε σύντομο χρονικό διάστημα λιγνίνη. Σε κάποια συστήματα ξενιστή-παθογόνου, η SAR χαρακτηρίζεται από την δραστηριοποίηση του συστήματος των περοξειδασών (H_2O_2) και του συστήματος NADH /NADPH που επάγει την αναγωγή του O_2^- σε H_2O_2 και του O_2^- σε OH^- , όπως επίσης και του συστήματος των λιποξυγενασών, που προκαλούν την οξειδωση των λιπιδίων των μεμβρανών. Αυτές οι λειτουργίες προκαλούν το σχηματισμό παραγώγων των λιπαρών οξέων (fatty acids), που προσφέρουν ισχυρή αντιμικροβιακή προστασία.

Μηχανισμοί άμυνας του φυτού διεγείρονται τοπικά κατά την εκδήλωση της SAR, στο σημείο της προσβολής και έχουν σαν αποτέλεσμα τον περιορισμό της νεκρωτικής κηλίδας και την ταύτιση της θέσης της μόλυνσης και της αντίδρασης του φυτού, αλλά και διασυστηματικά, με αμυντικές αντιδράσεις σε επακόλουθες προσβολές παθογόνων. Μεταξύ των μηχανισμών που ενεργοποιούνται, πρωτεύοντα ρόλο διαδραματίζουν οι ακόλουθες: α) η εκδήλωση αντίδρασης υπεραισθησίας, β) παραγωγή ενώσεων μέσω οξειδωτικής μεταβολικής εκρήξεως, που έχουν σαν αποτέλεσμα την παραγωγή ενεργού οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS). Η οξειδωτική έκρηξη είναι μια γρήγορη αντίδραση των φυτών στη μόλυνση ή τους διεγέρτες, κατά τη διάρκεια της αντίδρασης υπερευαισθησίας. Οι ROS (O_2^- , H_2O_2 και OH^-) είναι τοξικά παράγωγα που καταστέλλουν άμεσα το παθογόνο και οδηγούν στη νέκρωση των κυττάρων κατά την ΑΥ, γ) παραγωγή αναστολέων πρωτεϊνών. δ) λιγνιτοποίηση και άλλοι δομικοί φραγμοί, δηλαδή εναπόθεση λιγνίνης στο κυτταρικό τοίχωμα κατά την εισβολή του παθογόνου, δημιουργώντας μηχανική παρεμπόδιση, αφού η

λιγνίνη είναι αδιάβροχη, σχεδόν αδιαπέραστη και ανθεκτική στη χημική αποδόμηση από τα παθογόνα, ε) σύνθεση και συσσώρευση φυτοαλεξινών, στ) διέγερση των γονιδίων που συμβάλλουν στην άμυνα του φυτού μέσω της δράσης των πρωτεϊνών ανθεκτικότητας, ζ) μηχανισμοί της διασυστηματικής επαγόμενης ανοχής των φυτών εναντίον ιολογικών ασθενειών, που στηρίζονται στην παρεμπόδιση πολλαπλασιασμού των ιών και στο σχηματισμό πρωτεϊνών ανθεκτικότητας (Τζάμος, 2007).



Εικόνα 1.6: Η SAR επάγεται με την έκθεση ριζικών ή φυλλικών ιστών σε αβιοτικούς ή βιοτικούς παράγοντες, εξαρτάται από το SA και σχετίζεται με την συγκέντρωση PR πρωτεϊνών (Vallad & Goodman, 2004).

Οι ουσίες που τους έχει αποδοθεί ο «ρόλος» του σήματος στα φυτά (Τζάμος, 2007):

- Σαλικυλικό οξύ, (Salicylic Acid, SA) : που παράγεται στους χλωροπλάστες του φυτού, ενώ η δομή του μορίου του, του επιτρέπει να μετακινείται ταχύτατα από το σημείο αρχικής εφαρμογής ή σύνθεσης του σε απομακρυσμένους φυτικούς ιστούς. Με εξωγενή εφαρμογή SA επάγεται η έκφραση PR πρωτεϊνών και προκύπτει διασυστηματική προστασία κατά των παθογόνων. Επιπλέον, αυξήσεις ενδογενούς SA συσχετίζονται συχνά με την έκφραση των γονιδίων άμυνας και ανάπτυξης της ανθεκτικότητας.

- Ιασμονικό οξύ, (Jasmonic Acid, JA) : παράγεται κατά το μεταβολισμό των λιπαρών οξέων από το λινολενικό οξύ και ανήκει στην ομάδα των κυκλοπεντανονών. Μικρές ποσότητες JA επάγουν πρωτεϊνικούς παρεμποδιστές, όπως η θειονίνη, η ωσμοτίνη, η προλίνη των κυτταρικών τοιχωμάτων, ένα σουλφιδριλικό παρεμποδιστή πρωτεΐνας και διάφορα ένζυμα που εμπλέκονται στους μηχανισμούς άμυνας του φυτού. Σύμφωνα με τα παραπάνω θεωρείται ως ένας δευτερογενής επαγωγέας της ανοσοποίησης.

- Συστεμίνη (Systemin) : είναι ένα πεπτίδιο 18 αμινοξέων που έχει απομονωθεί από την τομάτα. Συμβάλλει στην σύνθεση παρεμποδιστών πρωτεΐνας και με το SA πιστεύεται ότι είναι τα σήματα της SAR- ανοσοποίησης με ικανότητα μετακίνησης μέσα στο φυτό.

- Αιθυλένιο (Ethylene, ET) : είναι μια πτητική φυτική ορμόνη που επηρεάζει τον ρυθμό αναπτύξεως των φυτών και τη γήρανση. Επάγει την σύνθεση PR πρωτεϊνών και η παρουσία του δημιουργεί δομικές αλλαγές που αυξάνουν την αντοχή του κυτταρικού τοιχώματος όπως εναπόθεση λιγνίνης και συσσώρευση υδροξυπρολινοπρωτεϊνών. Φαίνεται λοιπόν ότι το ET, είναι σήμα της ανοσοποίησης αλλά δεν αποτελεί την ουσία διέγερσης των μηχανισμών άμυνας στα φυτά.

- Επίσης το αραχιδονικό οξύ (arachidonic acid), και το 2,6-διχλωροϊσονικοτινικό οξύ (2,6-dichloroisonicotinic acid), επάγουν σε ορισμένες περιπτώσεις τοπική και διασυστηματική αντοχή στα φυτά σε επίπεδα που δεν προκαλείται νέκρωση των ιστών.

Το Σαλικυλικό οξύ ή SA, έχει σχεδόν συνδέσει το όνομά του με το φαινόμενο της SAR ανοσοποίησης. Το SA έχει ανιχνευθεί στα φυτά γύρω στις 8 ώρες μετά τη μόλυνση, ενώ αύξηση στη συγκέντρωση του στο φλοιό του ανώτερου φύλλου παρατηρήθηκε μέσα σε 12 ώρες από τη μόλυνση του κατώτερου φύλλου, ενώ η έκφραση της SAR επήλθε μέσα σε 24 ώρες από τη μόλυνση. Έως τότε, ολόκληρο το φυτό είχε συσσωρεύσει πολύ υψηλές συγκεντρώσεις SA, ακόμα και όταν το φύλλο που είχε μολυνθεί είχε απομακρυνθεί πριν παρατηρηθεί κάποια εμφανής αύξηση της συγκέντρωσης του σαλικυλικού οξέος (Agrios, 2005). Η απαραίτητη παρουσία του SA ως ενδογενές σήμα της SAR έχει αποδειχθεί από τους Gaaffney et al. (1993) με τη χρήση ενός βακτηριακού γονιδίου, του *nahG*, που κωδικοποιεί την salicylate hydroxylase (σαλικυλική υδροξυλάση), η οποία διασπά το SA μετατρέποντας το σε κατεχόλη. Διαγονιδιακά φυτά καπνού και *Arabidopsis* που εκφράζουν το *nahG*, συσσωρεύουν πολύ λίγο SA μετά από προσβολή παθογόνου και δεν έχουν την δυνατότητα επαγωγής των PR γονιδίων ως αποτέλεσμα της εκδήλωσης της SAR. Επίσης,

εξωγενής εφαρμογή SA ή των αναλόγων του , 2,6-dichloroisonicotinic acid (INA), benzothiadiazole S-methyl ester (BTH), έχει σαν αποτέλεσμα την επαγωγή SAR. Ωστόσο υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός πειραμάτων που διαφωνούν ως προς το γεγονός ότι το SA είναι το διασυστηματικό σήμα της αντοχής. Για παράδειγμα υπάρχουν αναφορές ότι αφαίρεση μολυσμένων από *Pseudomonas syringae* φύλλων αγγουριού, αμέσως μετά την πρόκληση της SAR και πριν αυξηθούν σημαντικά τα επίπεδα του SA δεν κατάφερε να σταματήσει την επαγωγή SAR (Durrant and Dong, 2004).

Παράλληλα με το SA, το ιασμονικό οξύ JA και το αιθυλένιο ET εμπλέκονται σε διάφορες αμυντικές αντιδράσεις. Τα φυτά που έχουν δεχθεί μεταλλαγές ώστε να μην αντιδρούν στο JA και το ET έχουν καταστεί ανίκανα να επάγουν επαγόμενη διασυστηματική αντοχή (Induced Systemic Resistance ISR), μια άλλης μορφή διασυστηματικής αντοχής η οποία ενεργοποιείται από βακτήρια της ριζόσφαιρας, δεν εμφανίζει ορατά συμπτώματα στα φυτά όπως νεκρωτικές κηλίδες και πολλές φορές έχει βρεθεί να προάγει την ανάπτυξη των φυτών. Η ταυτόχρονη επαγωγή SAR και ISR απέδωσε πρόσθετα επίπεδα ανθεκτικότητας ενάντια στο παθογόνο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato DC3000*, υποδεικνύοντας ότι το βιοχημικό μονοπάτι της ISR, στην εκδήλωση του οποίου εμπλέκονται τα JA ή ET, δρα παράλληλα με το βιοχημικό μονοπάτι της SAR που ρυθμίζεται από το SA. Επιπροσθέτως, το SA έχει βρεθεί να ανακόπτει την αντίδραση του φυτού σε τραυματισμούς που ρυθμίζεται από το JA.

Ενώ η καθοριστική δράση του SA στη γόνου-προς-γόνου ανθεκτικότητα ήταν από καιρό γνωστή, η επίδραση του ET και JA στην εκδήλωση ανθεκτικότητας σε παθογόνα που φέρουν Avr γονίδια παρατηρήθηκε πρόσφατα γεγονός που καθιστά την διασαφήνιση του ρόλου τους στην άμυνα του φυτού ελλιπή (Dong,2001).

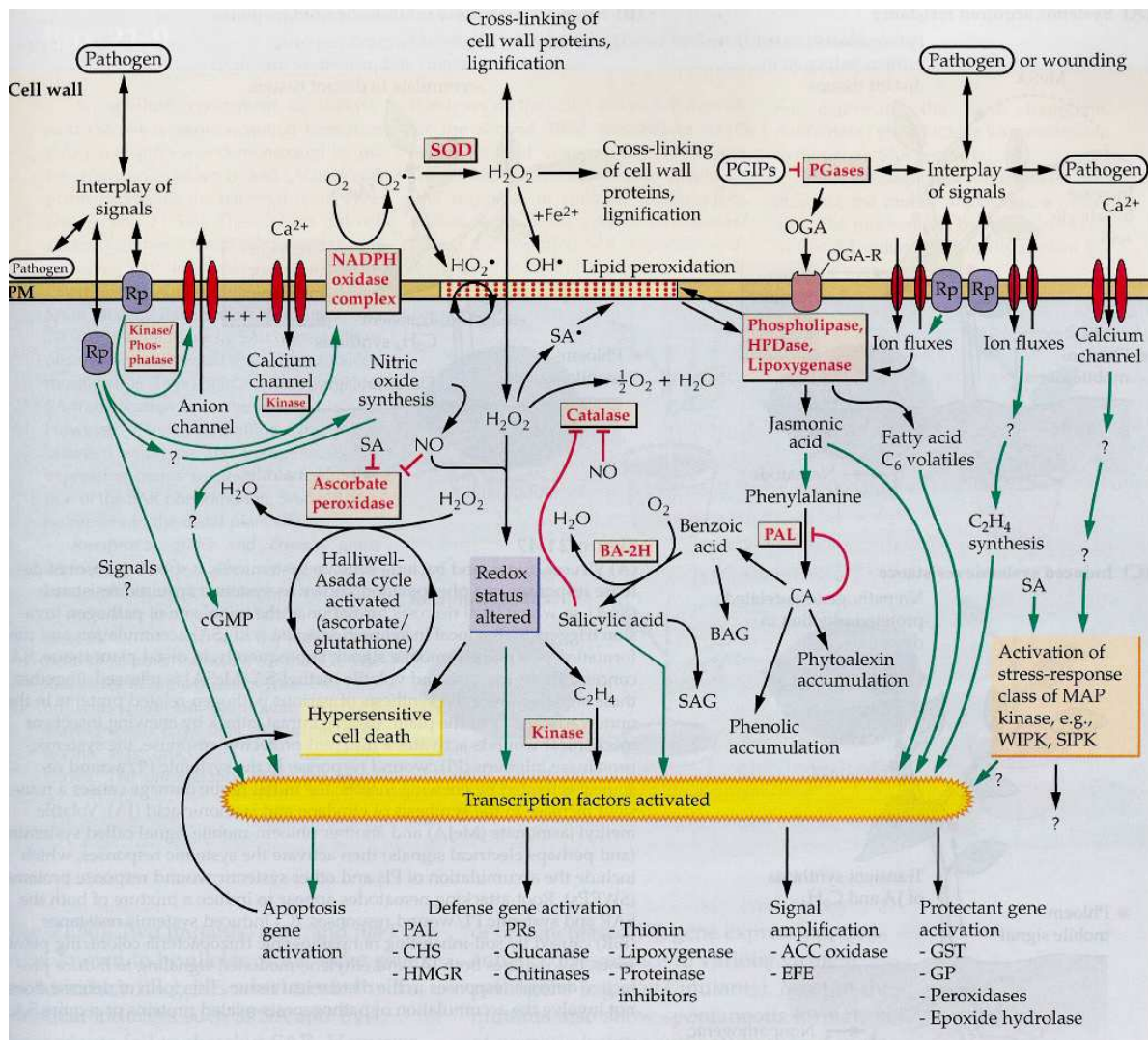
Ανάμεσα στις ανακαλύψεις οι οποίες εξηγούν τη διαδικασία της επαγωγής της SAR, ήταν και η πρόταση από τους Maldonado et al. (2002) ότι το *dir1* (defective in induced resistance 1), ένα μόριο με λιπιδιακή βάση, ίσως είναι το διασυστηματικό σήμα για τη SAR. Το *dir1*, είναι ένα φυτό μεταλλαγμένο ώστε να μην κωδικοποιείται η DIR1 πρωτεΐνη, που έδειξε φυσιολογική τοπική ανθεκτικότητα στα παθογόνα αλλά δεν μπόρεσε να επάγει SAR ή PR γονίδια στα απομακρυσμένα φύλλα. Οπότε η πρωτεΐνη DIR1, που έχει ομοιότητες στην αλληλουχία με τις LTPs (Lipid Transfer Proteins), ίσως λειτουργεί για τη παραγωγή ή μετάδοση του σήματος (Durrant and Dong, 2004). Μια απλοποιημένη απεικόνιση των

βιοχημικών μονοπατιών σήμανσης που απαιτούνται για να ενεργοποιηθεί και να συντονιστεί η επαγωγή των αμυντικών λειτουργιών του φυτού, παρουσιάζεται στην (Εικόνα 1.7).

Στενά συνδεδεμένο με το φαινόμενο της SAR είναι και το γονίδιο *NPR1*. Ένα πολύ κοινό «εργαλείο» στην προσπάθεια ανακάλυψης γονιδίων που εμπλέκονται στον μηχανισμό της SAR είναι η πρόκληση τυχαίων μεταλλαγών σε φυτά *A. thaliana* και έπειτα ο έλεγχος του κατά πόσο αναπτύσσουν τον μηχανισμό της SAR ανοσοποίησης. Κατά την διάρκεια μιας τέτοιας διαδικασίας, ανιχνεύθηκαν κάποια φυτά που δεν αντιδρούσαν στο SA και φάνηκε ότι είχαν όλα μεταλλαγές στο ίδιο γονίδιο, *NPRI/NIMI* (NON-EXPRESSER OF PR GENES I / NON INDUCIBLE IMMUNITY I)¹.

Τα φυτά *npr1* είναι επίσης γνωστά ως *nim1* και *sai1*, και παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία σε διάφορα παθογόνα ενώ έχουν πρόβλημα στην έκφραση αντοχής που συνδέεται με συγκεκριμένα PR γονίδια, υποδεικνύοντας ότι το *NPR1* έχει σημαντικό ρόλο στη SAR και στη παρεμπόδιση της ανάπτυξης των παθογόνων στο σημείο της μόλυνσης. Επίσης, το *NPR1* είναι απαραίτητο για την επαγωγή της ISR, καθώς και στη συνεργασία μεταξύ των βιοχημικών μονοπατιών σήμανσης του SA, JA και του ET (C₂H₄). Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει και το γεγονός ότι τα *npr1* φυτά παρουσιάζουν μειωμένη αντοχή στη τοξικότητα του SA και συσσωρεύουν ενδογενώς SA σε ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις, οπότε το *NPR1* ίσως έχει κάποιο ρόλο τόσο στην αποτροπή της συσσώρευσης στους ιστούς SA σε συγκεντρώσεις ικανές να προκαλέσουν τοξικότητα, όσο και στο ρυθμιστικό έλεγχο της βιοσύνθεσης του SA. Όλα αυτά, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η υπερέκφραση του *NPR1* επάγει μεγάλης κλίμακας αντοχή στο φυτό, υποδεικνύουν ότι το *NPR1* είναι θετικός ρυθμιστής της SAR ανοσοποίησης (Durrant and Dong, 2004) .

1: Τα μεταλλαγμένα φυτά *npr1* σε σχέση με τα φυτά *NPR1*, έχουν απενεργοποιημένο το λόγω γονίδιο και για αυτό το λόγο οι χαρακτήρες είναι γραμμένοι με μικρά και όχι κεφαλαία γράμματα.



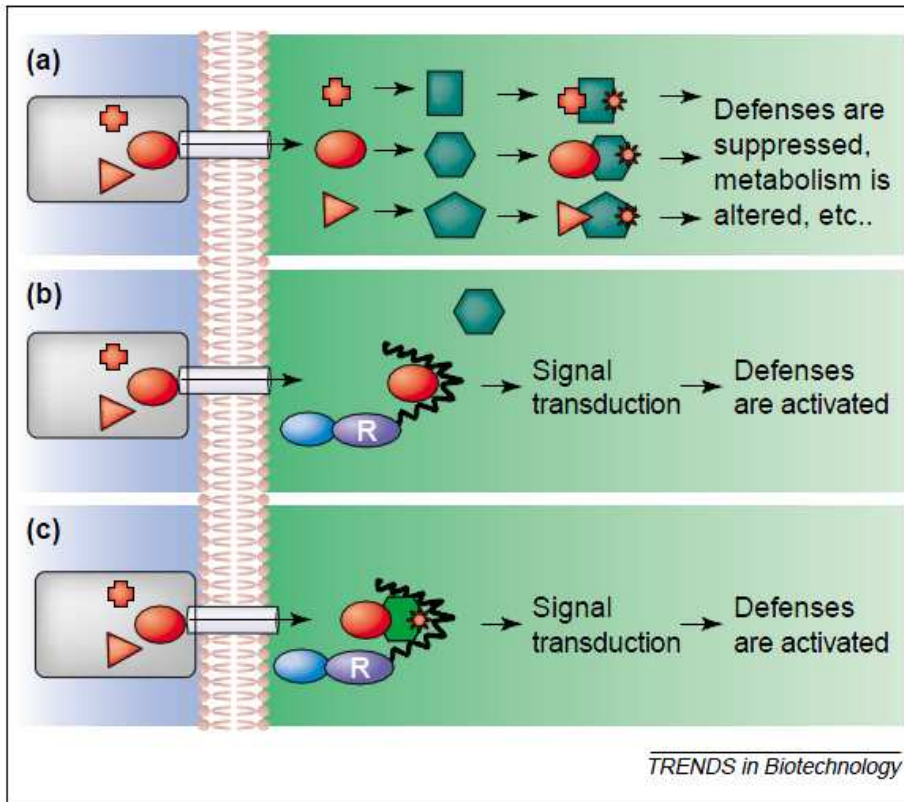
Εικόνα 1.7: Μονοπάτια μεταγωγής του σήματος που οδηγούν στην ενεργοποίηση και συγχρονισμό των αμυντικών μηχανισμών των φυτών.

Οι πρωτεΐνες υποδοχείς των φυτών (RP) αναγνωρίζουν τα σήματα που προέρχονται από το παθογόνο ή σχετίζονται με αλληλεπιδράσεις. Αυτά τα σήματα περιλαμβάνουν τα άμεσα ή έμμεσα προϊόντα των *Anr* genes, της φυσικής επαφής και των γενικών συστατικών στοιχείων κάθε οργανισμού, όπως η χιτίνη, τα ένζυμα και τα στοιχεία του φυτικού κυττάρου. Οι πρωτεΐνες υποδοχείς των φυτών μπορεί να είναι ή να μην είναι προϊόντα των R γονιδίων. Η άμεση παραγωγή σήματος σε μεταγενέστερα στάδια της μόλυνσης δεν είναι γνωστή σαν διαδικασία αλλά περιλαμβάνει κινάσες, φωσφατάσες, G πρωτεΐνες και ροή ιόντων. Διάφορα ξεχωριστά και άμεσα ενεργοποιούμενα γεγονότα αναγνωρίζονται, όπως η παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) και μονοξειδίου του αζώτου, και η άμεση επαγωγή μεταγραφής αμυντικών γονιδίων (ή πιθανόν και γονιδίων απόπτωσης). Ενίσχυση της αρχικής αμυντικής λειτουργίας συμβαίνει μέσω της παραγωγής πρόσθετων συστατικών σήματος, όπως άλλες ROS, υπεροξειδομένα λιπίδια, βενζοϊκό οξύ (BA), SA, JA και ET. Αυτό με τη σειρά του επάγει άλλα σχετιζόμενα με την άμυνα γονίδια και τροποποιεί αμυντικές πρωτεΐνες και ένζυμα. Ταυτόχρονες αλλαγές στο οξειδαναγωγικό καθεστώς του κυττάρου ή κυτταρική καταστροφή θα ενεργοποιήσουν προσηματισμένους μηχανισμούς για τη κυτταρική προστασία (Halliwell-Asada κύκλος, plastid-localized superoxide dismutase SOD και ένζυμα καταλάσης) και επάγουν γονίδια που κωδικοποιούν διάφορα συστατικά που προστατεύουν το κύτταρο. Η πίεση που προκαλείται από την άμυνα μπορεί επίσης να επάγει κυτταρικό θάνατο. Επικοινωνία μεταξύ των μονοπατιών σήμανσης φαίνεται να συντονίζει τις λειτουργίες. Ένα πράσινο βέλος υποδεικνύει τις θετικές αντιδράσεις και η κόκκινη γραμμή τις αρνητικές. (Προσαρμογή από Hammond-Kosack and Jones, 2000).

1.1.3 Η εξέλιξη του μοριακού συμπλόκου αναγνώρισης φυτοπαθογόνων-ξενιστών

Πρόσφατα επιστημονικά δεδομένα αποδεικνύουν ότι οι R πρωτεΐνες λειτουργούν είτε με απευθείας αναγνώριση και πρόσδεσή τους στον τελεστή (**θεωρία γόνου προς γόνου**) ή αναγνωρίζοντας μια άλλη πρωτεΐνη του φυτού η οποία είναι ο στόχος του παθογόνου τελεστικού μορίου (**υπόθεση του φρουρού - guard hypothesis**).

Η πιο απλή εκδοχή του κλασσικού μοντέλου για την επαφή του υποδοχέα του ξενιστή και του διεγέρτη υποθέτει μια άμεση επαφή ανάμεσα στη R πρωτεΐνη και την αντίστοιχη Avr πρωτεΐνη. Ωστόσο, εντατική έρευνα με πολλούς συνδυασμούς R και Avr πρωτεϊνών αποκάλυψαν δύο μόνο περιπτώσεις άμεσης επαφής. Η έλλειψη αποδεικτικών στοιχείων της άμεσης επαφής R-Avr πρωτεϊνών οδήγησε τους Van der Biezen και Jones (1998) στη διατύπωση της υπόθεσης του φρουρού (Εικόνα 1.8). Αυτό το μοντέλο υποθέτει ότι οι R πρωτεΐνες ενεργοποιούν την άμυνα όταν έρθουν σε επαφή με μια άλλη πρωτεΐνη του φυτού (“φρουρούμενη”) που γίνεται στόχος και τροποποιείται από το παθογόνο στην προσπάθεια του να δημιουργήσει μέσα στο φυτό ευνοϊκό για την ανάπτυξή του περιβάλλον. Η άμυνα του φυτού ενεργοποιείται όταν η R πρωτεΐνη εντοπίσει οποιαδήποτε προσπάθεια επίθεσης στη «φρουρούμενη» πρωτεΐνη της, γεγονός που δεν καθιστά απαραίτητη την άμεση αλληλεπίδραση ανάμεσα στις R και Avr πρωτεΐνες (McDowell and Woffenden, 2003). Με την υπόθεση του φρουρού ερμηνεύτηκε το γεγονός ότι η R πρωτεϊνική κινάση Pto αναγνωρίζει και προσδένεται στον τελεστή AvrPto έμμεσα μέσω της NB-LRR πρωτεΐνης Pfr με σκοπό να δραστηριοποιήσει το εγγενές ανοσοποιητικό σύστημα. Σε ένα άλλο παράδειγμα, ο τελεστής Avr2 του μύκητα *Fulvia fulva* εκκρίνεται από το μύκητα στον αποπλαστικό χώρο φυτών τομάτας και αλληλεπιδρά με την εξωκυτταρική πρωτεάση της κυστεΐνης (cysteine protease) Rcr3 της τομάτας. Στη συνέχεια το σύμπλοκο Rcr3-Avr2 σε συνδυασμό με την πρωτεΐνη ανθεκτικότητας Cf-2 ενεργοποιεί το εγγενές ανοσοποιητικό σύστημα και την αντίδραση υπερευαισθησίας (Τζάμος, 2007).



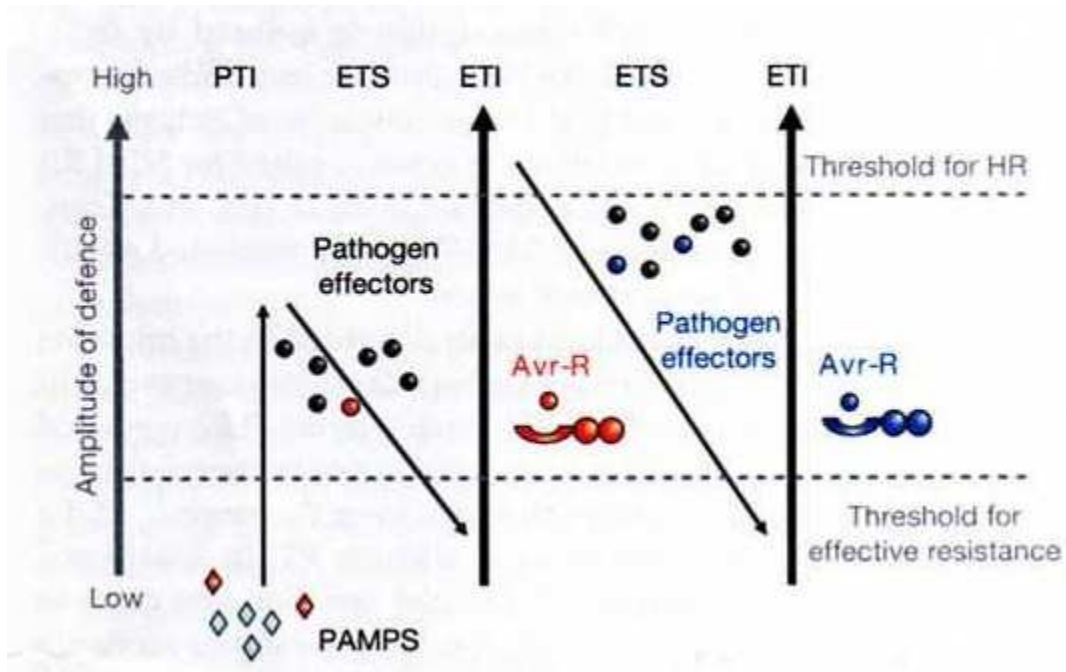
Εικόνα 1.8 : Αλληλεπιδράσεις μεταξύ Ανγ πρωτεϊνών του παθογόνου και R πρωτεϊνών του φυτού. Ένα υποθετικό παθογόνο (γκρι) επιτίθεται σε ένα φυτικό κύτταρο και εκφράζει μια σειρά πρωτεϊνών μολυσματικότητας (κόκκινες). Αυτές οι πρωτεΐνες εισέρχονται μέσα στα φυτικά κύτταρα μέσω του Εκκριτικού Συστήματος Τύπου III (βακτήρια) ή με άλλους άγνωστους μηχανισμούς (μύκητες και ωομύκητες). Μετά τη είσοδό τους, στοχεύουν πρωτεΐνες του ξενιστή (πράσινες) που ελέγχουν τις αμυντικές αντιδράσεις, το μεταβολισμό ή άλλες διεργασίες του φυτού που επιδρούν στη μολυσματικότητα του παθογόνου. a) σε αυτό το πλαίσιο, το φυτικό κύτταρο δεν εκφράζει κάποια R πρωτεΐνη ικανή να αναγνωρίσει κάποια από τις πρωτεΐνες αμολυσματικότητας. Έτσι, το φυτό δεν εντοπίζει εγκαίρως το παθογόνο και η όποια αμυντική αντίδραση επάγεται είναι αναποτελεσματική (Ασθενεί). b) αυτό το πλαίσιο απεικονίζει το κλασσικό μοντέλο υποδοχέα-διεγέρτη, στο οποίο μια R πρωτεΐνη προσδένεται άμεσα με μια πρωτεΐνη αμολυσματικότητας. Αυτό το γεγονός της αναγνώρισης ενεργοποιεί ένα πολύπλοκο μονοπάτι μετάδοσης του σήματος, το οποίο με τη σειρά του ενεργοποιεί τις αμυντικές λειτουργίες. c) αυτό το πλαίσιο απεικονίζει την υπόθεση του φρουρού, στην οποία μια R πρωτεΐνη (φρουρός) εντοπίζει μια τροποποιημένη πρωτεΐνη του ξενιστή (“φρουρούμενη”, κόκκινος αστερίσκος), ίσως σε ένα σύμπλοκο με την πρωτεΐνη αμολυσματικότητας. Προσαρμογή από (McDowell and Woffenden, 2003).

Η υπόθεση της γόνου-προς-γόνου ανθεκτικότητας, αποτελεί κλασσικό μοντέλο στη φυτοπαθολογία και παρέχει τη γενετική βάση για την κατανόηση των εξειδικευμένων γεγονότων αναγνώρισης που περιλαμβάνονται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ ξενιστή-παθογόνου. Ο Flor το 1956, απέδειξε ότι για κάθε κυρίαρχο γονίδιο του ξενιστή που

καθορίζει την ανθεκτικότητα (R), υπάρχει ένα αντίστοιχο κυρίαρχο γονίδιο αμολυσματικότητας (Anr) που καθορίζει την παθογένεια. Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία, όταν ένα από τα γονίδια αμολυσματικότητας ή το αντίστοιχο της ανθεκτικότητας δεν εκφράζεται, τότε δεν παρατηρείται αλληλοαναγνώριση με αποτέλεσμα η σχέση ξενιστή-παθογόνου να είναι συμβατή και να εκδηλώνεται η ασθένεια. Στην περίπτωση όμως που και τα δύο αντιδρώντα μέλη Anr και αντίστοιχες συμπληρωματικές πρωτεΐνες ανθεκτικότητας είναι παρόντα παρατηρείται αναγνώριση, που οδηγεί σε μια μη συμβατή σχέση που εκδηλώνεται ως αντοχή του φυτού στο παθογόνο (Τζάμος, 2007). Το μοντέλο αυτό επαληθεύεται σε πολλά συστήματα ξενιστή-παθογόνου, υποδεικνύοντας ότι οι γόνου-προς-γόνο αλληλεπιδράσεις είναι αρκετά κοινές στη φύση. Η εξειδίκευση που χαρακτηρίζει τις αλληλεπιδράσεις γόνου-προς-γόνο, υποδεικνύει ότι το πρώτο βήμα στην εκδήλωση ανθεκτικότητας σε μια ασθένεια, είναι ένα γεγονός αναγνώρισης που περιλαμβάνει άμεσα ή έμμεσα προϊόντα των αντίστοιχων γονιδίων ανθεκτικότητας του ξενιστή και των γονιδίων αμολυσματικότητας του παθογόνου. Αρκετά γονίδια ανθεκτικότητας της κλάσης αυτής έχουν κλωνοποιηθεί πρόσφατα.

Συνοψίζοντας, η αντίληψη που έχουμε για το αμυντικό σύστημα των φυτών κάνει λόγο για δύο κλάδους. Στον ένα γίνεται χρήση των αποδεκτών αναγνώρισης προτύπων (pattern recognition receptors) PRRs που αντιδρούν ενάντια σε αργά αναπτυσσόμενα μικροβιακά- PAMPs όπως η φλατζελίνη. Ο δεύτερος δρ σε μεγαλύτερο εύρος μέσα στο κύτταρο, χρησιμοποιώντας τα πολυμορφικά NB-LRR (Nucleotide Binding-Leucine Rich Repeat) πρωτεϊνικά προϊόντα που κωδικοποιούνται από τα περισσότερα γονίδια αντοχής (Resistance R genes). Μπορεί δε να αναπαρασταθεί με ένα μοντέλο ζιγκ-ζαγκ 4 φάσεων (Εικόνα 1.1). Στη φάση 1, PAMPs αναγνωρίζονται από τους PRRs, έχοντας σαν αποτέλεσμα την επαγωγή άμυνας, την PAMP-triggered immunity (PTI) που είναι σε θέση να αποτρέψει περαιτέρω εγκατάσταση του παθογόνου στο εσωτερικό του φυτού. Στη φάση 2, ορισμένα παθογόνα μπορεί να χρησιμοποιήσουν διεγέρτες που συνεισφέρουν στη μολυσματικότητα του παθογόνου. Αυτοί οι διεγέρτες μπορεί να καταστείλουν την PTI. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την ευαισθησία του ξενιστή που επάγεται από τους διεγέρτες-τελεστές (effectors) ή effector-triggered susceptibility (ETS). Στη φάση 3 ένας δεδομένος τελεστής, αναγνωρίζεται από μια από τις NB-LRR πρωτεΐνες οδηγώντας στην effector-triggered immunity (ETI). Η ETI, είναι μια αμυντική λειτουργία που μπορεί να οδηγήσει σε ανθεκτικότητα και συχνά στην εκδήλωση της αντίδρασης υπερευαισθησίας (Hypersensitive Response, HR) στο σημείο της προσβολής. Στη φάση 4, η φυσική επιλογή οδηγεί τα

παθογόνα να αποφύγουν την ETI είτε με απόπτωση είτε με διαφοροποίηση του τελεστή, είτε αποκτώντας νέους τελεστές που καταστέλλουν την ETI και παράλληλα ευνοεί αντίστοιχα R γονίδια ώστε να διεγερθεί και πάλι η ETI (Jones et al., 2006).



Εικόνα 1.9: Ένα ζιγκ-ζαγκ μοντέλο απεικονίζει το αποτέλεσμα της άμυνας του φυτού με ποσοτικό τρόπο. Στο σχήμα το συνολικό εύρος της ανθεκτικότητας ή της ευαισθησίας είναι ανάλογο του (PTI – ETS + ETI) (Jones et al., 2006).

1.2 ΧΡΗΣΗ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΑΓΩΓΗ ΕΠΙΚΤΗΤΗΣ ΔΙΑΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ SAR

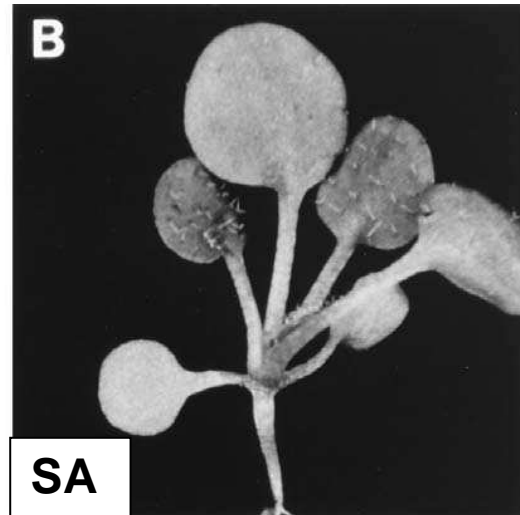
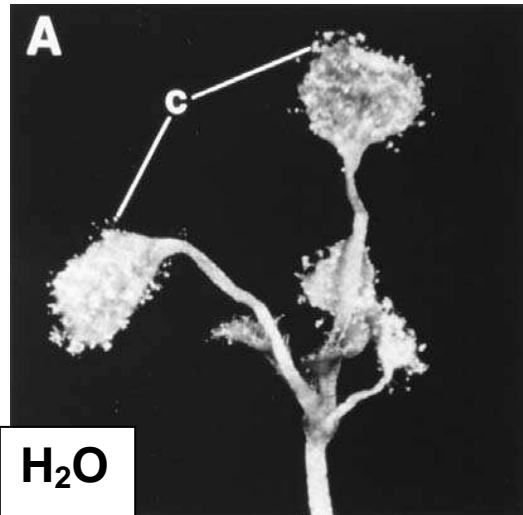
Η επίκτητη διασυστηματική αντοχή SAR, μπορεί να ενεργοποιηθεί από διάφορες χημικές ουσίες, που αποτελούν ένα επιπλέον εργαλείο στην αντιμετώπιση των ασθενειών. Πολλές φυσικές ή συνθετικές ουσίες έχουν περιγραφεί ως επαγωγείς της SAR, και οι πιο αποτελεσματικές είναι το SA, BABA, BTH, INA (Εικόνα 1.10), που επάγουν τη SAR χωρίς την απαραίτητη παρουσία του παθογόνου και την επακόλουθη αλληλεπίδραση του με το φυτό, αλλά απλά με την εξωγενή εφαρμογή τους στη φυλλική επιφάνεια (επιφανειοδραστικές ουσίες).

Συγκεκριμένα για τις χημικές ουσίες, μια ουσία μπορεί να θεωρηθεί ως διεγέρτης ανοσοποίησης αν μπορεί:

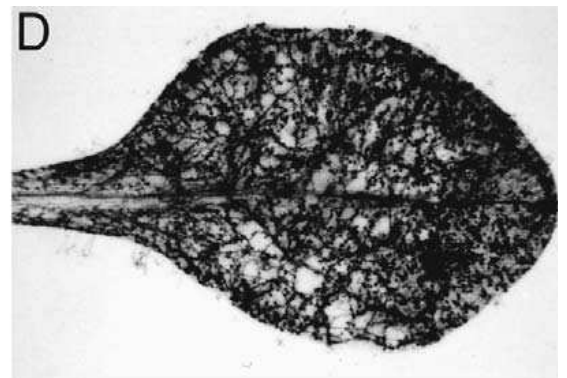
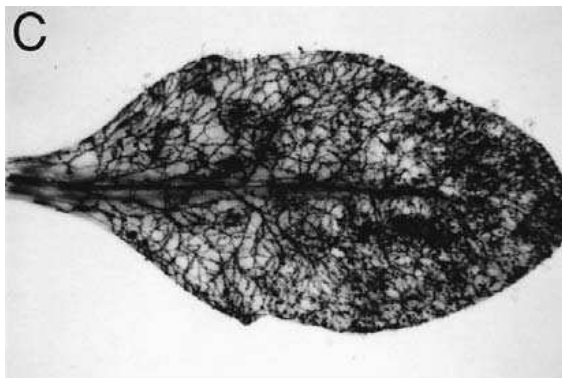
- ✓ Να διεγείρει μηχανισμούς αντοχής εναντίον ενός αριθμού παθογόνων αιτίων
- ✓ Να προκαλεί την έκφραση των ίδιων βιοχημικών δεικτών που εμφανίζει και το βιολογικό πρότυπο «ανοσοποίησης»
- ✓ Να μην έχει άμεση αντιμικροβιακή δράση *in vitro* ή *in vivo*
- ✓ Να τροποποιεί την αλληλεπίδραση παθογόνου-φυτού, ώστε φαινοτυπικά να μην έχουμε μόλυνση και να επάγει τους μηχανισμούς αμύνης του φυτού πριν ή μετά από τη μόλυνση (Τζάμος, 2007).

Ανόργανες ενώσεις

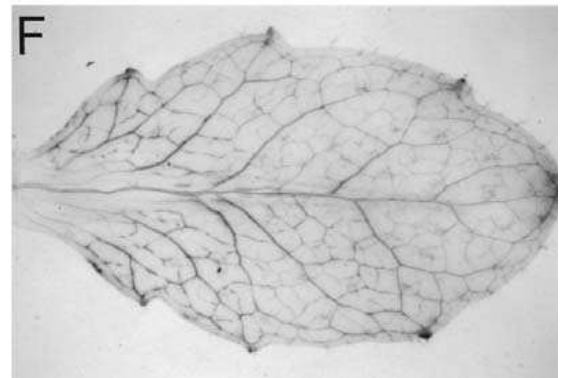
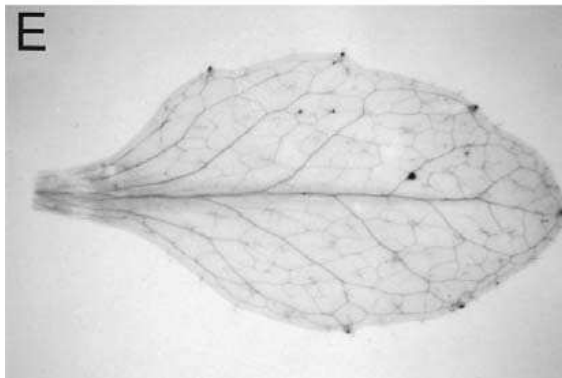
Τα φωσφορικά άλατα επάγουν SAR σε φυτά κολοκυθιάς, φασολιάς και αραβόσιτου. Διαλύματα K_3PO_4 , K_2HPO_4 , Na_3PO_4 και Na_2PO_4 σε δόσεις 50-100 mM, όταν ψεκασθούν στο 1^ο και 2^ο φύλλο αγγουριάς επάγουν SAR στα ανώτερα φύλλα του φυτού. Στην αγγουριά και το καπνό επέμβαση με σκόνη SiO_2 επάγει SAR ενισχύοντας τη δράση των χιτινασών, της β-1,3- γλουκανάσης και των περοξειδασών (Τζάμος, 2007, Sticher et al., 1997).



H₂O



INA



Εικόνα 1.10: Επαγόμενη αντοχή σε φυτά *Arabidopsis* που έχουν ψεκάσθει με νερό (A, C, D), SA (B), ή INA και έπειτα μολύνθηκαν με κονίδια του *Hyaloperonospora parasitica* 5 (A, B) ή 4 (C-F) μέρες μετά την εφαρμογή των παραγόντων. Στις 6 (A, B) ή στις 10 (C-F) μέρες μετά από τη μόλυνση, μεμονωμένα φύλλα εμφάνισαν πλήθος καρποφοριών του ωομύκητα στα φύλλα που ψεκάσθηκαν με νερό ενώ σχεδόν κανένα σε αυτά που ψεκάσθηκαν με INA. Τα φυτά στα A-C και το E είναι φυσιολογικά ενώ τα D και F μετασχηματίστηκαν με ένα γονίδιο που παρεμποδίζει τη συσσώρευση SA, δείχνοντας ότι το INA δρα απουσία συσσώρευσης SA (Προσαρμογή από Agrios, 2005).

Φυσικές οργανικές ενώσεις

1. **Σαλικυλικό οξύ, SA.** Η εξωγενής εφαρμογή SA σε φυτά έχει βρεθεί να επάγει τα ίδια PR-γονίδια που κινητοποιούνται και όταν αυξάνονται τα επίπεδα του SA ενδογενώς. Τα τελευταία χρόνια έχει βρεθεί ότι η επίδραση του SA στην SAR βασίζεται στην ενεργοποίηση αρκετών αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως η γλουταθειόνη-S-τρανσφεράση (glutathione-S-transferase) αλλά και στα επίπεδα αρκετών μη οξειδωτικών ενζύμων όπως η γλουταθιόνη (glutathione) (Fodor et al., 1997), ενώ ορισμένοι τύποι PR γονιδίων, όπως οι PR-1 πρωτεΐνες και οι εξωκυτταρικές β-1,3-γλουκανάσες και χιτινάσες επάγονται από το βιοχημικό μονοπάτι του SA, τουλάχιστον στα φυτά *Arabidopsis* και στον καπνό (Uknes et al., 1992). Αν και το SA έχει άμεση φυτοτοξική δράση, όταν εφαρμοσθεί σε κατάλληλες ποσότητες επάγει SAR χωρίς το σχηματισμό στην επιφάνεια των φύλλων νεκρωτικών κηλίδων. Για παράδειγμα εξωγενής εφαρμογή SA σε φυτά *Nicotiana benthamiana* σε ποσότητες από 0-5 mM, έδειξε να παρεμποδίζει την ανάπτυξη, παθογένεια και προσκόλληση στα φυτικά κύτταρα φυλών του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens* (Sticher et al., 1997, Anand et al., 2008).
2. **Ιασμονικό οξύ, JA.** Εξωγενής εφαρμογή JA ή του μεθυλιωμένου εστέρα του, MeJA, σε χαμηλές συγκεντρώσεις, προκαλούν διέγερση διάφορων πρωτεϊνών που συμβάλλουν στην άμυνα του φυτού όπως οι θειονίνες στο κριθάρι και το φυτό *Arabidopsis thaliana*, παρεμποδιστές πρωτεϊνών στη τομάτα και ενζύμων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των φυτοαλεξινών (Τζάμος, 2007, Sticher et al., 1997).
3. **Αιθυλένιο, ET.** Εξωγενής εφαρμογή ET στον καπνό που έχει το N γονίδιο ανθεκτικότητας στον TMV έχει σαν αποτέλεσμα την παρεμπόδιση του ιού και χαρακτηρίζεται από μείωση του μεγέθους των νεκρώσεων, ενώ έχει βρεθεί ότι επάγει αμυντικούς μηχανισμούς και σε κωνοφόρα (Hudgins and Franceschi, 2004, Sticher et al., 1997). Κλάσεις PR-γονιδίων που έχουν βρεθεί να σχετίζονται με το αιθυλένιο συμπεριλαμβάνουν τις ενδοκυττάρειες β-1,3-γλουκανάσες (PR-2), τις ενδοκυττάρειες βασικές χιτινάσες (PR-3), τις όξινες hevein-like πρωτεΐνες (PR-4) και τις φυτικές αμυντίνες (plant defensins, PDFs, PR12) (Lorenzo et al., 2003). Η επαγωγή αυτών των γονιδίων γίνεται από ένα βιοχημικό μονοπάτι που το αιθυλένιο και το ιασμονικό οξύ λειτουργούν συνεργιστικά (Penninckx et al., 2000).

4. **Αζελαϊκό οξύ, AZA.** Το αζελαϊκό οξύ είναι ένα φυσικό κορεσμένο δικαρβοξυλικό οξύ (C₉H₁₆O₄) των φυτών. Διαφυλλικός ψεκασμός φυτών *Arabidopsis thaliana*, με AZA, σε συγκεντρώσεις περίπου 1 mM, επάγουν ανθεκτικότητα στη φυλή PmaDG3 του *Pseudomonas syringae*. Σύμφωνα με τη θεωρία που έχει διατυπωθεί, το AZA, ενεργοποιεί έναν ταχύτερο ή και ισχυρότερο μηχανισμό αντίδρασης στα φυτά, που περιλαμβάνει την παραγωγή SA και τη συσσώρευση του σε υψηλά επίπεδα μέσα στους φυτικούς ιστούς, αλλά ταυτόχρονα επάγει και τη μεταγραφική διαδικασία για την παραγωγή του δείκτη της SAR, του γονιδίου ανθεκτικότητας PR-1 (Jung et al., 2009).
5. Εκτός από τα ανωτέρω ουσίες, διάφορα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα όπως το αραχιδονικό, το λινολεϊκό και το εικοσιπενταενοϊκό οξύ, έχουν δείξει να επάγουν SAR ενάντια στο παθογόνο *Phytophthora infestans*.

ΣΥΝΘΕΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Η εισαγωγή στην αγορά των εμπορικών χημικών σκευασμάτων που επάγουν SAR αντοχή στα φυτά ήταν το επιστέγασμα της έρευνας στο χώρο αυτό έως τότε. Οι σημαντικότερες χημικές ουσίες είναι το DL- β-αμινοβουτιρικό οξύ (BABA), το 2,6 διχλωροϊσονικοτινικό οξύ INA και το βενζο (1,2,3) θειανταζολ -7- καρβοθειικό οξύ – S – μεθυλεστέρας (BTH) αλλά και η ένωση fosetyl-AI.

Το BABA, έχει αναφερθεί ως επαγωγέας της SAR σε πολλά φυτικά είδη. Τοπικές εφαρμογές BABA, προστατεύουν τη τομάτα από τον ωμοκύκητα *Phytophthora infestans* και τον *Peronospora tabacina*, μέσω της σύνθεσης χιτυνασών και β-1,3- γλουκανασών, χωρίς να μεταβολίζεται μέσα στους φυτικούς ιστούς, ενώ στον καπνό επάγει την έκφραση του γονιδίου PR1α που συνεπάγεται τη συσσώρευση της PR1 πρωτεΐνης (Sticher et al., 1997).

Το INA, και ο μεθυλιωμένος εστέρας του, είναι αποτελεσματικοί παράγοντες για τη προστασία δικοτυλήδων και μονοκοτυλήδων φυτών από ένα ευρύ φάσμα παθογόνων. Το INA, έχει ήπια αντιμικροβιακή δράση *in vitro* και επάγει την έκφραση SAR γονιδίων πριν από τη μόλυνση. Ένα σημαντικό πρόβλημα στην χρήση των εμπορικών σκευασμάτων INA, είναι το γεγονός ότι σε πολλές καλλιέργειες προκαλούν τοξικότητα.

Το BTH, είναι ανάλογο του σαλικιλικού οξέος και αποτελεί εμπειρικό σκεύασμα με το όνομα BION στην Ευρώπη και παράγεται από την εταιρία Novartis.

Το fosetyl-AI, είναι ένα διασυστηματικό μυκητοκτόνο της ομάδας των οργανοφωσφορικών (αλκυλοφωσφορικά) που εμφανίστηκε στη γεωργική πράξη το 1977 με το εμπορικό όνομα Aliette. Είναι αποτελεσματικό για την αντιμετώπιση Οομυκήτων της τάξεως Peronosporales, όπως ο *Plasmopara viticola*, *Bremia spp.* και είδη των γενών *Pythium* και *Phytophthora*, αλλά και για μετασυστηματικές επεμβάσεις όπως στην περίπτωση της ασθένειας του ανανά, που οφείλεται στον *Phytophthora parasitica var. parasitica*. Υπάρχουν ενδείξεις ότι έχει εκτός της αποπ्लाστικής και πολύ καλή συμπλαστική κίνηση, που ίσως οφείλεται στο μεταβολίτη του, το φωσφορικό οξύ (H_3PO_3). Ο μηχανισμός δράσης του fosetyl-AI φαίνεται να είναι διπλός. Αφενός παρουσιάζει άμεση φυτοτοξική δράση και αφετέρου επάγει τους μηχανισμούς άμυνας του φυτού, όπως την παραγωγή πολυφαινολών (χημικές ενώσεις που θεωρείται ότι δρουν σαν χημικοί παρεμποδιστές παθογόνων σε νεαρούς ιστούς αλλά και ως παρεμποδιστές της δράσης πυκτινολυτικών και άλλων ενζύμων των παθογόνων) και φυτοαλεξινών (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007). Πιο συγκεκριμένα, η ένωση fosetyl-AI, έχει αποδειχθεί ότι επάγει παροδική παραγωγή του γονιδίου ανθεκτικότητας PR-1, ενός δείκτη της SAR, όταν εφαρμοσθεί στη μέγιστη επιτρεπτή συγκέντρωση της (5 g/l), σε φυτά *Arabidopsis thaliana* αγρίου τύπου αλλά όχι σε φυτά *nim1* ή φυτά NahG, τα οποία όπως έχει περιγραφεί παραπάνω, έχουν προβλήματα στην έκφραση της SAR. Αυτή η επαγωγή είναι κατά πάσα πιθανότητα επακόλουθο του σχηματισμού νεκρωτικών κηλίδων στα φυτά μετά από την εφαρμογή του μυκητοκτόνου, ενώ μοιάζει να εξαρτάται από το βιοχημικό μονοπάτι της SAR, αφού η επαγωγή του PR-1 σε *nim1* και NahG υπό τις ίδιες συνθήκες, παρεμποδίζεται.

Μια άλλη κατηγορία συνθετικών ενώσεων που σε αντίθεση με τις παραπάνω δεν έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι τώρα για την επαγωγή αμυντικών μηχανισμών στα φυτά που να σχετίζονται με τη SAR, είναι οι κατιονικοί επιφανειοδραστικοί παράγοντες του βρωμιούχου αμμωνίου (cationic surfactants of ammonium bromide). Οι τετρακυλαμμωνικές αυτές ουσίες, φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην επαγωγή ανοσοποίησης σε άλλους οργανισμούς. Έχουν μεγάλου μήκους αλυσίδες αποτελούμενες από ομάδες αλκυλίου, γεγονός που τους προσδίδει λιποφιλικές ιδιότητες. Αυτό επιτρέπει τη χρήση τους για την προετοιμασία λιποσωμάτων που χρησιμοποιούνται ως συστήματα φορέων DNA που εισάγεται στα κύτταρα

αλλάζοντας τις ιδιότητες τους (transfection π.χ. από ιό) και ως φορείς για τη μετάδοση φαρκευτικών ουσιών. Οι παράγοντες αυτοί, που οι μεμβράνες τους αποτελούνται από δύο μοριακά στρώματα, χρησιμοποιούνται ευρέως στην ιατρική και ιδιαίτερα στη μελέτη της ανοσολογίας (immunology), ως ανοσοενισχυτικά έκδοχα (adjuvants), δηλαδή παράγοντες ανοσοποίησης που έχουν την ικανότητα να αυξήσουν την άμυνα των οργανισμών στα αντιγόνα. Επίσης *in vivo*, κατά τη μελέτη του ιού της ψευδολύσσας των γουρουινών (pseudorabies virus), αποδείχθηκε ότι η εφαρμογή εμβολίου DNA σε συνδυασμό με DDAB (Dimethyl Dioctadecyl Ammonium Bromide) απέδωσε ισχυρότερες αμυντικές αντιδράσεις από ότι η εφαρμογή μόνο του εμβολίου, και γενικότερα οδήγησε σε ενισχυμένη αντιϊκή αμυντική λειτουργία. Παρόμοια, η χορήγηση σε αρουραίους, DDAB μαζί με trehalose 6,6-dibehenate (TDB) δημιουργεί μια αποτελεσματική ανοσοενισχυτική υπομονάδα στο *Mycobacterium tuberculosis*, τον παράγοντα πρόκλησης φυματίωσης στον άνθρωπο. (Holten-Andersen et al., 2004).

1.3 ΠΑΘΟΓΟΝΑ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

1.3.1 Ο περονόσπορος του φυτού *Arabidopsis thaliana* από τον ωομύκητα *Hyaloperonospora parasitica*

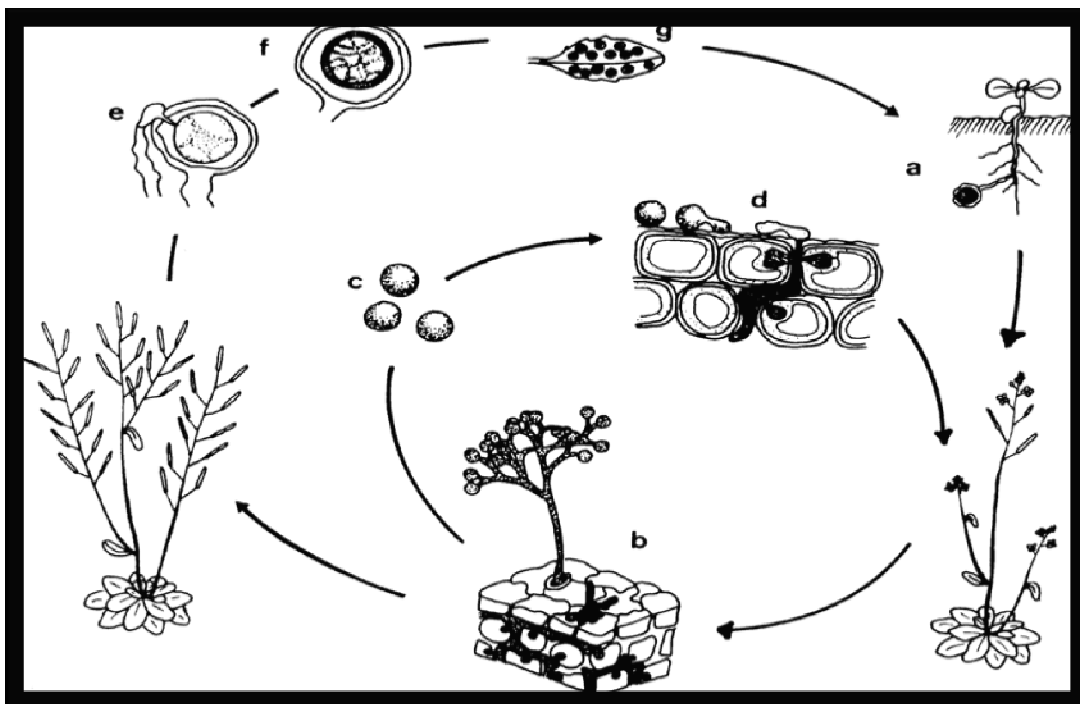
Ο *Hyaloperonospora Constant. parasitica* (Pers.:Fr), (προηγούμενη ονομασία *Peronospora parasitica*), ανήκει στο βασίλειο των Χρωμίστων, κλάση Ωομύκητες, τάξη Peronosporales, οικογένεια *Peronosporaceae*. Οι απομονώσεις από το φυτό *Arabidopsis thaliana* μέχρι τώρα δεν έχουν βρεθεί παθογόνες για άλλα σταυρανόχλωμα αλλά διατηρούν σύμφωνα με τα μέχρι τώρα δεδομένα, μια καθαρά γόνου-προς-γόνου αλληλεπίδραση με άλλους οικότυπους του ξενιστή.

Τα είδη της οικογένειας *Peronosporaceae*, προκαλούν τους περονόσπορους των φυτών, όπως ο *Plasmopara viticola* (περονόσπορος της αμπέλου) και ο *Bremia lactuceae* (περονόσπορος του μαρουλιού). Οι μύκητες αυτοί είναι υποχρεωτικά παράσιτα στα ανώτερα φυτά, και προσβάλλουν μόνο τρυφερούς, πράσινους ιστούς. Η ανάπτυξη τους σε επιδημική μορφή εξαρτάται κυρίως από τις περιβαλλοντικές συνθήκες και ιδίως τη βροχόπτωση και τη σχετική υγρασία του αέρα. Στην τάξη των Peronosporales ανήκει και η οικογένεια *Pythiaceae* με τα δύο πολύ μεγάλης οικονομικής σημασίας για τη γεωργία γένη, *Pythium* και *Phytophthora*, που είναι κύρια αίτια για διάφορες ασθένειες όπως τήξεις φυταρίων, κομμίωση λαιμού εσπεριδοειδών, περονόσπορος της πατάτας κ.α.

Ο περονόσπορος (downy mildew) του φυτού *Arabidopsis* δεν είναι μια ιδιαίτερα καταστροφική ασθένεια κάποιου ευρέως καλλιεργούμενου φυτού, ούτε προκαλεί ζημιές ιδιαίτερης οικονομικής σημασίας. Παρόλα αυτά, αυτό το σύστημα αλληλεπίδρασης ξενιστή-παθογόνου, έχει αποτελέσει εργαστηριακό μοντέλο από το 1990 και έχει διεξαχθεί μεγάλη ερευνητική προσπάθεια βασισμένη σε αυτό. Αποτέλεσμα αυτής της έρευνας είναι να έχουν κλωνοποιηθεί και χαρακτηριστεί πολλά γονίδια ανθεκτικότητας που σχετίζονται με αυτό, όπως και να έχουν αποσαφηνιστεί πολλά από τα στοιχεία μετάδοσης του σήματος σε επακόλουθα στάδια της μόλυνσης από το συγκεκριμένο παθογόνο.

Ο κύκλος ασθένειας και του παθογόνου περιγράφεται στην ακόλουθη Εικόνα 1.11. Την άνοιξη, νέες μολύνσεις φυτών *Arabidopsis* πραγματοποιούνται από

ωοσπόρια που έχουν διαχειμάσει σε φυτικά υπολείμματα στο έδαφος. Επιτυχής μολύνσεις επιτυγχάνονται στα φύλλα και τις κοτυληδόνες από τα κονίδια. Σε αντίθεση με άλλες φυλές *H. parasitica* που μολύνουν άλλα σταυρανθή, αυτή που μολύνει την *Arabidopsis* είναι ομόθαλλη. Τα ωοσπόρια σχηματίζονται στα φύλλα της *Arabidopsis* μία εβδομάδα περίπου από τη μόλυνση των πραγματικών φύλλων ή των κοτυληδόνων (Slusarenko and Schlaich, 2003). Το πρώτο ορατό, με γυμνό μάτι, σημείο της προσβολής είναι η εξάνθηση από σποροιαγγειοφόρους-κονιδιοφόρους που καλύπτουν τις άνω και κάτω επιφάνειες των φύλλων και των μίσχων. Οι κονιδιοφόροι εξέρχονται από τα στομάτια των ιστών.



Εικόνα 1.11 : Κύκλος ασθένειας από τον ωομύκητα *Hyaloperonospora parasitica* στο φυτό *Arabidopsis thaliana*. (a) Οι μολύνσεις ξεκινάνε από τη βλάστηση ωοσπορίων στο έδαφος. (b) Τα φυτά αποικίζονται από ένα κοινούκταρο μυκήλιο που αναπτύσσεται ενδοφυτικά, και εγκαθίσταται στους μεσοκυττάριους χώρους γεγονός που του δίνει περίεργη μορφή. Οι υφές σχηματίζουν κατασκευές (μυζητήρες) στα κύτταρα του ξενιστή που έχουν σχήμα αχλαδιού και χρησιμεύουν στη θρέψη του παθογόνου. Μετά από μια περίοδο ανάπτυξης που ποικίλλει (1-2 εβδομάδες) σποροιαγγειοφόροι, που φέρουν αγενή, σφαιρικά, υαλοειδή κονίδια (c) εξέρχονται από τα στομάτια. (d) Με τη βλάστηση των κονιδίων, ξεκινάνε νέοι κύκλοι μολύνσεων. (e-g) Τα ωοσπόρια σχηματίζονται ταυτόχρονα με τα αγενή σπόρια. (e) Τα θηλυκά αναπαραγωγικά όργανα, τα ωογόνια, γονιμοποιούνται μέσω της σύζευξης από το αρσενικό ανθηρίδιο. (f) Το γονιμοποιημένο ωογόνο αναπτύσσεται σε ένα ώριμο ωοσπόριο. (g) Τα ωοσπόρια στα φύλλα είναι άφθονα. Προσαρμογή από Mauch-Mani and Slusarenko (1993).

Η φυλή Noco2 (Εικόνα 1.12), του *H. parasitica*, έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμη κατά τη διεξαγωγή πειραμάτων, καθώς τα φυτά αγρίου τύπου του οικότυπου Col-0, δεν έχουν κανένα αποτελεσματικό γονίδιο ανθεκτικότητας στη μόλυνση. Αυτό τη διαχωρίζει από τις άλλες φυλές, όπως την Emwa1, μεταξύ της οποίας και του Col-0, υπάρχει ασυμβατότητα που οδηγεί σε race-specific (ως προς τη φυλή) ανθεκτικότητα.

Οι περονόσποροι παρατηρούνται συνήθως σε δροσερά, υγρά κλίματα, κυρίως την άνοιξη ή το φθινόπωρο. Οι Felton και Walker (1946) έδειξαν ότι η παραγωγή των σπορίων είναι ταχύτερη στους 8-12 °C, ενώ η διείσδυση στους 16 °C και η δημιουργία μυζητήρων γίνεται σε θερμοκρασίες 20-24 °C. Σε εργαστηριακές συνθήκες ανάπτυξης του παθογόνου, οι συνήθεις θερμοκρασίες που πραγματοποιείται η ανάπτυξη και η παραγωγή κονιδιοφόρων του *H. parasitica* είναι οι 16-18 °C και σχετική υγρασία που πλησιάζει το 100%. Η παραγωγή κονιδίων πραγματοποιείται κυρίως κατά τη διάρκεια της νύχτας και τα σπόρια απελευθερώνονται την ημέρα, καθώς οι σποριαγγειοφόροι πριν καταστραφούν συστρέφονται βίαια και εκτοξεύουν τα κονίδια στον αέρα. Επομένως, η συλλογή κονιδίων για τη δημιουργία μολύσματος, ευνοείται κατά τις πρωινές ώρες. Η μόλυνση ξεκινά με τη βλάστηση του κονιδίου είτε με άμεση παραγωγή πλάκας συγκρατήσεως, είτε με παραγωγή περιορισμένου μήκους βλαστικής υψής, μέσα σε 6 ώρες από την επαφή με το φύλλο. Η διαφοροποιημένη υφή διείσδυσης, αναπτύσσεται στο κάτω μέρος της πλάκας συγκρατήσεως, που χρησιμεύει σαν όργανο συγκρατήσεως, και εισχωρεί στο φύλλο συνήθως ανάμεσα στη συνένωση δύο επιδερμικών κυττάρων. Σε σπάνιες περιπτώσεις η πλάκα συγκρατήσεως σχηματίζεται πάνω από το στομάτιο του φύλλου, και η υφή διείσδυσεως εισχωρεί και αναπτύσσεται απευθείας από το στομάτιο. Οι μυζητήρες συχνά δημιουργούνται στα επιδερμικά κύτταρα καθώς η υφή διείσδυσης περνά ανάμεσά τους, και νέοι μυζητήρες παράγονται στα κύτταρα του μεσόφυλλου, καθώς η υφή αναπτύσσεται στο μεσοκυττάριο χώρο. Οι κονιδιοφόροι αναπτύσσονται στα επιφανειακά στρώματα των κυττάρων του ξενιστή και εξέρχονται από τα στομάτια. Η μεγαλύτερη πυκνότητα κονιδιοφόρων παρατηρείται συνήθως στη κάτω επιφάνεια των φύλλων, όπου υπάρχουν και τα περισσότερα στομάτια (Slusarenko and Schlaich, 2003).



Εικόνα 1.12 : Εξάνθηση από σποριαγγειοφόρους-κονιδιοφόρους σε φύλλα φυτών *Arabidopsis* 7 ημέρες μετά από μόλυνση με τον *Hyaloperonospora parasitica* φυλή Noco2.

Ο καλύτερος ίσως τρόπος αντιμετώπισης των περονοσπόρων των φυτών, είναι η αποφυγή των περιβαλλοντικών συνθηκών που ευνοούν την ασθένεια. Θα πρέπει να εφαρμόζονται εκείνες οι καλλιεργητικές φροντίδες που επιτρέπουν την ανακύκλωση του αέρα στον αγρό ή στο θερμοκήπιο, την απομάκρυνση των φυτικών υπολειμμάτων όπου μπορούν να διαχειμάσουν τα σπόρια κ.α. Συνήθως η ασθένεια είναι εύκολο να αντιμετωπισθεί στα περισσότερα φυτά στα αρχικά στάδια όταν το φύλλωμα και οι καρποί προστατεύονται με χαλκούχα ή οργανικά μυκητοκτόνα.

1.3.2 Η αδρομύκωση από το μύκητα *Verticillium dahliae*

Οι αδρομυκώσεις των φυτών οφείλονται κυρίως σε δύο γένη φυτοπαθογόνων μυκήτων, το *Verticillium* sp. και τις ειδικές μορφές του *Fusarium oxysporum*. Οι εδαφογενείς αυτοί μύκητες έχουν την ικανότητα να εισέρχονται από το ριζικό σύστημα του φυτού και να εγκαθίστανται στα αγγεία του ξύλου προκαλώντας μάρανση, χλώρωση και νέκρωση των φύλλων και τελική νέκρωση όλου του φυτού. Οι ασθένειες αυτές είναι καταστρεπτικές διότι προκαλούν πολύ σοβαρές ζημιές σε ένα πλήθος καλλιεργούμενων φυτών χωρίς να υπάρχουν μέχρι σήμερα αποτελεσματικά χημικά μέσα για την αντιμετώπιση τους.

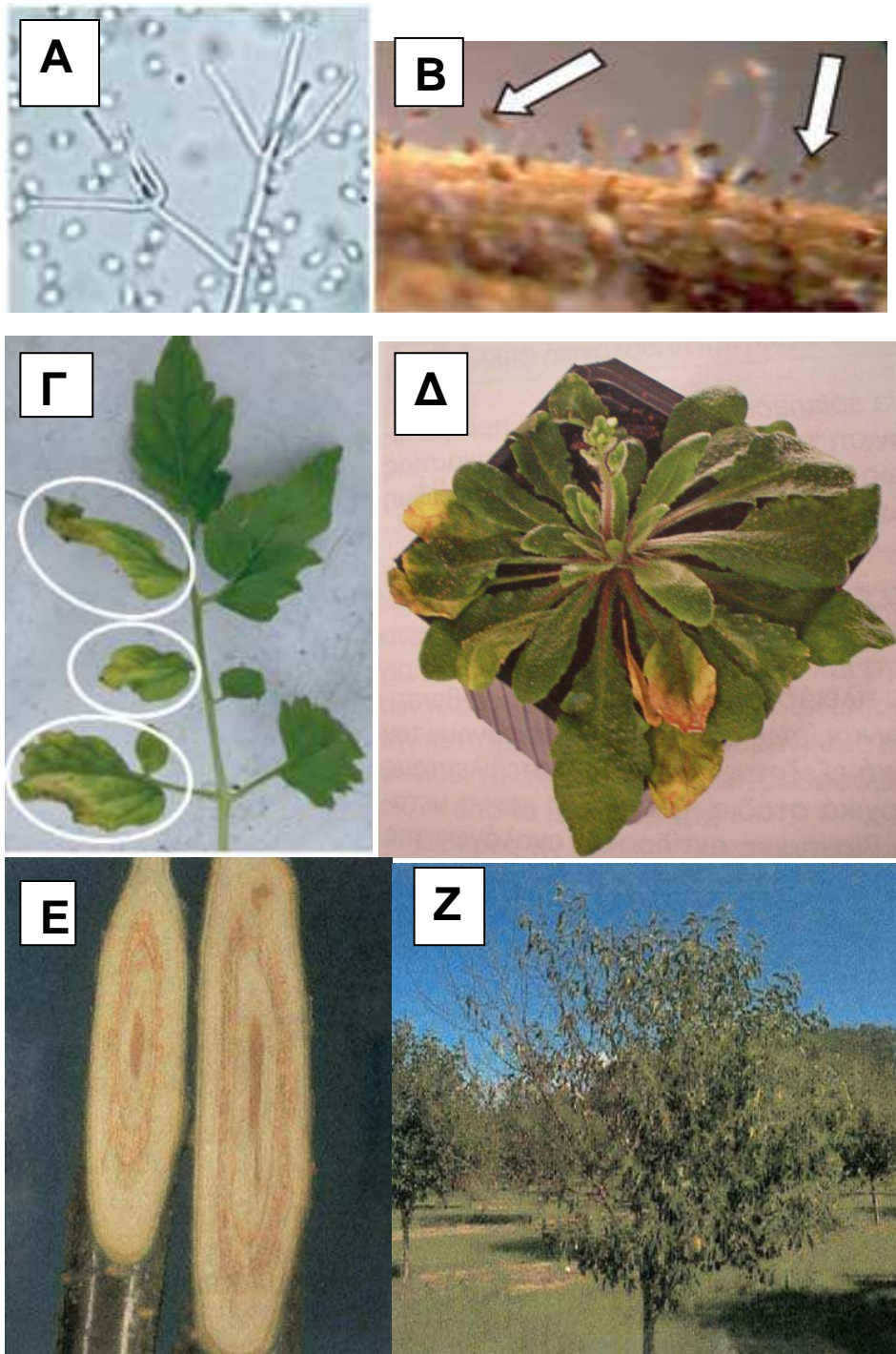
Το γένος *Verticillium*, ανήκει στο βασίλειο των μυκήτων, στο φύλλο των Ασκομυκήτων. Προσβάλλει φυτά σε εύκρατα και τροπικά κλίματα με ένα εύρος ξενιστών γύρω στους 200 (κυρίως δικοτυλήδονα φυτά). Ο μύκητας *Verticillium albo-atrum* και ο *V. dahliae* είναι τα είδη που ευθύνονται για το μεγαλύτερο αριθμό προσβολών. Ο *V. dahliae*, προκαλεί αδρομύκωση σε λαχανικά (πατάτα, πιπεριά, τομάτα, μελιτζάνα κ.α.), δένδρωδεις καλλιέργειες (ελιά, βερυκοκιά, φυσικιά κ.α.), ανθοκομικά, ποώδη μονοετή, πολυετή και δασικά είδη. Έχει αναφερθεί ότι παράγει ένζυμα αποδιοργάνωσης των κυτταρικών τοιχωμάτων και φυτοτοξίνες που σχετίζονται με την ανάπτυξη των συμπτωμάτων. Τα μικροσκληρώτια που σχηματίζει και το μελανό μυκήλιο παίζουν σημαντικό ρόλο στο βιολογικό κύκλο ζωής του παθογόνου, καθώς αποτελούν κύρια πηγή παραγωγής μολυσμάτων και πρωταρχικής σημασίας όργανα για τη μακρόχρονη επιβίωση του μύκητα.

Τα συμπτώματα του *Verticillium dahliae* μπορεί να ποικίλλουν ανάλογα με το ξενιστή, και γενικά όλες οι αδρομυκώσεις έχουν παρόμοια συμπτώματα. Αρχικά ένα μόνο μέρος του φύλλου χάνει τη σπαργή του, γίνεται μαλακό και χλωρωτικό και τελικά νεκρώνεται. Συνηθέστερα τα συμπτώματα ξεκινούν πρώτα στους παλαιότερους βλαστούς, καθώς η μόλυνση κινείται από τη βάση προς τα άκρα. Τα φύλλα μπορεί να είναι επίπεδα ή να συστρέφονται, ενώ συχνά παρατηρείται επιναστία (Εικόνα 1.13 Γ και 1.13 Δ). Οι νεαροί και τρυφεροί βλαστοί επίσης μαραίνονται και νεκρώνονται. Στους προσβεβλημένους βλαστούς και στο στέλεχος παρατηρείται καστανός μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου σε μορφή ολόκληρου ή διακεκομμένου δακτυλίου.

Ο *V. dahliae*, εισχωρεί στα φυτά από το ριζικό σύστημα. Προκαλεί μονοκυκλική ασθένεια, δηλαδή μόνο ένας κύκλος ασθένειας και παραγωγής μολυσμάτων πραγματοποιείται κάθε καλλιεργητική περίοδο. Ο κύκλος ζωής του παθογόνου μπορεί να διακριθεί σε τρεις φάσεις: τη ληθαργική ή λανθάνουσα, την παρασιτική και τη σαπροφυτική. Κατά τη ληθαργική φάση, οι κατασκευές διαχείμανσης του μύκητα, τα μικροσκληρώτια, παραμένουν όπως υπονοεί και η ονομασία της φάσης αυτής, σε λήθαργο. Η βλάστηση των μικροσκληρωτίων αποτρέπεται μέσω της λειτουργίας που ονομάζεται μυκόσταση (mycostasis), και ενεργοποιείται μόνο μετά την επικράτηση περιβαλλοντικών συνθηκών που να ευνοούν την βλάστηση και ανάπτυξη του μύκητα. Η περίσσεια άνθρακα και αζώτου π.χ., υποδηλώνουν την παρουσία ξενιστών φυτών που απελευθερώνουν αυτές τις ουσίες στη ριζόσφαιρα. Καθώς κάθε μεμονωμένο κύτταρο ενός μικροσκληρωτίου μπορεί να βλαστήσει έστω και μία φορά, το μικροσκληρώτιο βλαστάνει πολλές φορές, αυξάνοντας την πιθανότητα επιτυχούς μόλυνσης. Οι υφές που εξέρχονται από το βλαστάρι μικροσκληρωτίου, μπορούν να διανύσουν περιορισμένη απόσταση μέχρι να φτάσουν τον υποψήφιο ξενιστή. Τυπικά ο μύκητας *V. dahliae*, εισέρχεται στη φάση του παρασιτισμού μολύνοντας τα ευαίσθητα φυτά είτε από το ακρορίζιο είτε από τα σημεία σχηματισμού των πλευρικών ριζών. Για να περάσει στους ιστούς του ξύλου, ο μύκητας πρέπει πρώτα να ξεπεράσει την ενδοδερμίδα, που λειτουργεί σαν φυσική προστασία στην προσβολή. Η είσοδος επομένως του μύκητα μπορεί να επιτευχθεί είτε στην περίπτωση που η ενδοδερμίδα δεν έχει σχηματισθεί ακόμα, δηλαδή από το ακρορίζιο είτε όταν είναι τραυματισμένη (π.χ. από τη δράση νηματωδών σκωλήκων). Αν ξεπεραστεί το εμπόδιο της ενδοδερμίδας, εισέρχεται στα αγγεία του ξύλου όπου σχηματίζει κονίδια. Σε πρόσφατα μολυσμένους νεαρούς βλαστούς, ο αριθμός των αγγείων του ξύλου που σχηματίζονται είναι μειωμένος και όσον αφορά τη δομή τους, έχουν λεπτότερα τοιχώματα. Στα αγγεία του ξύλου μολυσμένων βλαστών και ριζών αναπτύσσονται οι υφές του μυκηλίου και κονίδια τα οποία συχνά φράζουν τα αγγεία. Σε πολλές περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί τα κύτταρα του παρεγχύματος που περιβάλλουν τα αγγεία να κινητοποιούνται από το εκκριτικό σύστημα του μύκητα σε υπερβολικό πολλαπλασιασμό, οδηγώντας έτσι τα αγγεία σε κατάρρευση. Η απόφραξη των αγγείων επιδεινώνεται και με τη συσσώρευση των προϊόντων της αποδόμησης των φυτικών ιστών που προκαλείται από τα ένζυμα του μύκητα, σχηματίζοντας μάζες με υψηλό ιξώδες. Η οξειδωση και μεταφορά αυτών των προϊόντων έχει θεωρηθεί υπαίτια και για τον καστανό μεταχρωματισμό των προσβεβλημένων αγγείων (Εικόνα 1.13 Ε).

Προβλήματα στη μετακίνηση των στοιχείων μέσω των αγγείων δημιουργούν και οι τυλώσεις, από τη συνένωση δύο αντικριστών αγγείων, στη προσπάθεια του ξενιστή να ανακόψει τη πορεία του μύκητα. Έχει υποστηριχθεί από διάφορους επιστήμονες ότι μέσω των αγγείων, οι τοξίνες που παράγονται από το μύκητα μεταφέρονται στα φύλλα, στα οποία προκαλούν μείωση στη σύνθεση της χλωροφύλλης κατά μήκος των νευρώσεων και μείωση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας, κατάρρευση των κυτταρικών μεμβρανών του φύλλου και συνεπώς της ικανότητας του να ρυθμίζει την υδατική του κατάσταση με αποτέλεσμα την επινασσία, τη μάρανση, και τη νέκρωση (Agris, 2005). Τα υαλώδη κονίδια σχηματίζονται πάνω στα άκρα ενός πλήθους ανορθωμένων, κονιδιοφόρων που διακλαδίζονται σε 3-4 φιαλίδια (Εικόνα 1.13 Α). Αυτά τα κονίδια που έχουν μικρή διάρκεια ζωής, μεταφέρονται σταδιακά σε νέες θέσεις με το ανοδικό ρεύμα μέσω των αγγείων όπου βλαστάνουν εκ νέου και η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Η διαδικασία “αποικισμού” του φυτού από το μύκητα έχει παρατηρηθεί ότι σημειώνεται σε κύκλους πολλαπλασιασμού και μείωσης του πληθυσμού του μύκητα που οφείλεται στους αμυντικούς μηχανισμούς του φυτού. Κατά τη διάρκεια της νέκρωσης των ιστών ή της γήρανσης του φυτού, ο μύκητας περνά στη σαπροφυτική φάση. Σε αυτό το στάδιο παράγει μεγάλες ποσότητες μικροσκληρωτίων στα υπολείμματα των καλλιεργειών που απελευθερώνονται στο έδαφος με την αποσύνθεση των φυτικών ιστών (Εικόνα 1.13 Β). Τα μικροσκληρώτια του μύκητα έχουν την ικανότητα να επιζούν για 10-15 χρόνια. Πρόσθετα, η διαχείμανση μπορεί να γίνει είτε με μορφή μυκηλίου στους πολυετής ξενιστές είτε σε πολλαπλασιαστικά όργανα του φυτού όπως κόνδυλοι, βολβοί και σπόροι (Fradin and Thomma, 2006).

Η αντιμετώπιση της ασθένειας βασίζεται στη χρήση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού, εδάφους που δεν έχει μολύσματα του παθογόνου, ανθεκτικών ποικιλιών και αποφυγή φύτευσης ευαίσθητων ξενιστών σε αγρούς που έχουν καλλιεργηθεί επί σειρά ετών με σολανώδη. Ο υποκαπνισμός του εδάφους, είναι μια λύση στην οποία δύσκολα μπορεί πλέον να καταφύγει κάποιος με την απαγόρευση χρήσης του βρωμιούχου μεθυλίου, που έως τώρα είχε επικρατήσει, ενώ ταυτόχρονα δεν έχει αντικατασταθεί από άλλο σκεύασμα με την ίδια επιτυχία και αναγνώριση. Η θερμική απενεργοποίηση του μύκητα μέσω της ηλιαπολύμανσης αποτελεί μια ιδιαίτερα επιτυχημένη τεχνική η οποία κερδίζει ολοένα και περισσότερο έδαφος στην αντιμετώπιση της ασθένειας σε περιοχές με υψηλά ποσοστά ηλιοφάνειας και χαμηλή βροχόπτωση (Agris, 2005, Τζάμος, 2007).

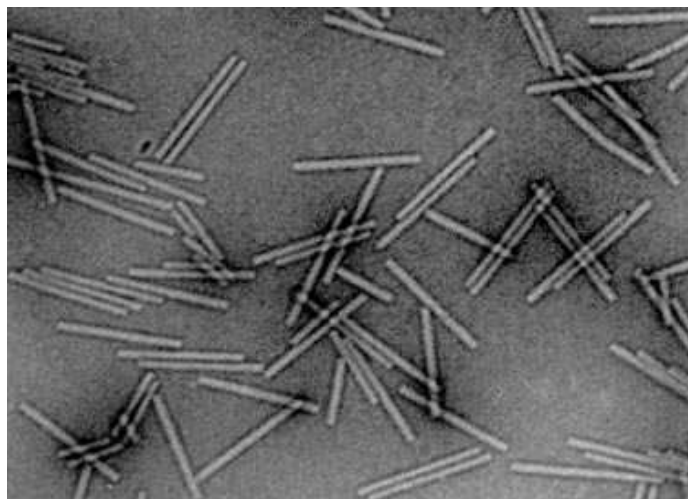


Εικόνα 1.13 : Μορφολογικά χαρακτηριστικά του *V. dahlia* και συμπτώματα σε διάφορους ξενιστές. Α) Μικροσκοπική παρατήρηση του μύκητα με τους χαρακτηριστικούς κονιδιοφόρους και ελεύθερα σπόρια (Fradin and Thomma, 2006). Β) Μικροσκληρώτια του μύκητα (βέλη) σε νεκρό ιστό βλαστού τομάτας. Γ) προσβεβλημένο φύλλο τομάτας με χαρακτηριστική χλώρωση, μάρανση και νέκρωση σε ένα μόνο τμήμα του φύλλου. Δ) συμπτώματα χαρακτηριστικά της μόλυνσης *V. dahliae* σε φυτό *Arabidopsis thaliana* (Τζάμος, 2007). Ε) καστανός μεταχρωματισμός σε αγγεία του ξύλου προσβεβλημένου βλαστού ροδακινιάς. Ζ) Μάρανση και νέκρωση μέρους προσβεβλημένου δένδρου ροδακινιάς (Agrios, 2005).

1.3.3 Μωσαϊκού του καπνού (Tobacco Mosaic Virus, TMV)

Ο ιός του μωσαϊκού του καπνού (*Tobacco mosaic virus*, TMV), έχει μια εντυπωσιακή ιστορία και η μελέτη του έχει αποτελέσει τροχοπέδη πολλών και σημαντικών ανακαλύψεων. Δεν έχει παρά να αναλογιστεί κανείς ότι εξαιτίας αυτού του παθογόνου ανακαλύφθηκε από τους Watson και Crick το 1953 το μοντέλο της διπλής έλικας του DNA. Ο TMV είναι μία ασθένεια ενδημική σε όλες τις περιοχές της γης και περιγράφηκε πρώτη φορά από τον Mayer το 1886. Ωστόσο η φύση του παράγοντα που προκαλεί αυτή την ασθένεια παρέμενε άγνωστη μέχρι να έρθουν στο φως το 1898, τα αποτελέσματα των πειραμάτων του Beijerinck, κάνοντας τον TMV τον πρώτο ιό που ταυτοποιήθηκε και έπαιξε ουσιώδη ρόλο στη γένεση της ιολογίας.

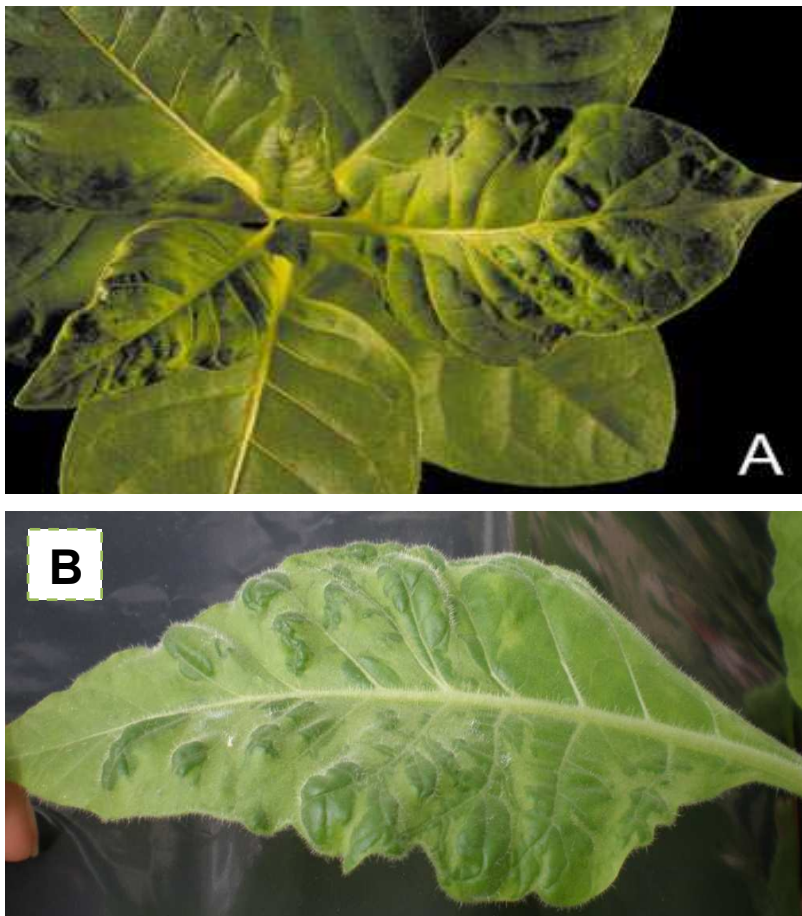
Ο TMV, είναι ένας RNA ιός, ραβδοειδής, απλής αλυσίδας και ανήκει στο γένος *Tobamovirus*. Σχηματίζει ραβδόμορφα ισωμάτια (virions) (Εικόνα 1.14) (300×18 nm) και περιέχει 6395 νουκλεοτίδια. Σχηματίζει μια έλικα που είναι ο σκελετός του ισωματίου πάνω στον οποίο διατάσσονται τα καψομερή με επίσης ελικοειδή τρόπο. Τα καψομερή είναι πρωτεϊνικά μόρια απολύτως όμοια μεταξύ τους, με 158 αμινοξέα το καθένα, και ο συνολικός αριθμός τους σε ένα ισωμάτιο είναι 2130.



Εικόνα 1.14: Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο των TMV ισωματίων μετά από χρώση με οξικό ουρανύλιο (uranyl acetate). Προσαρμογή από Dr J.N. Culver, University of Maryland Biotechnology Institute (Knapp, and Lewandowski, 2001).

Το εύρος ξενιστών του TMV είναι περιορισμένο. Παρόλα αυτά μια μεγάλη ποικιλία ζιζανίων και καλλιεργούμενων φυτών, κυρίως από την οικογένεια Solanaceae όπως π.χ. ο καπνός, η πιπεριά και η τομάτα, μπορούν να μολυνθούν πειραματικά από τον ιό (Knapp, and Lewandowski, 2001).

Στα πολύ νεαρά φύλλα του καπνού το πρώτο σύμπτωμα που παρατηρείται είναι ένας αποχρωματισμός των νεύρων. Στη συνέχεια εμφανίζεται έντονο μωσαϊκό, στο οποίο εναλλάσσονται περιοχές ανοιχτοπράσινες έως και κίτρινες, με περιοχές σκούρου πράσινου (Εικόνα 1.15).



Εικόνα 1.15: Συμπτώματα TMV σε ανώτερα φύλλα καπνού. A) από άγριο στέλεχος TMV (Knapp, and Lewandowski, 2001). B) από τη φυλή U1 του TMV, σε ποικιλία καπνού Petite Havana.

Στις περιοχές που το φύλλο έχει σκούρο πράσινο χρωματισμό το έλασμα είναι πιο παχύ, δίνοντας την εντύπωση ότι υπάρχουν φλύκταινες, που το κάνουν να εξέχει πάνω από το ύψος των ανοιχτοπράσινων περιοχών. Στις ανοιχτόχρωμες περιοχές, η χλωρωτική εμφάνιση είναι αποτέλεσμα της μειωμένης λειτουργίας και παρουσίας των

χλωροπλαστών. Τα νέα φύλλα παρατηρούνται συρρικνωμένα, αλλά με την ανάπτυξη τους η επιφάνεια τους ομαλοποιείται και παρουσιάζει κατσάρωμα μόνο κατά θέσεις. Όταν η προσβολή είναι σοβαρή έχει σημειωθεί και παραμόρφωση των ανθέων. Τα προσβεβλημένα με τον TMV καπνόφυτα έχουν μικρότερο ύψος από το κανονικό, με φύλλα μικρότερα, στενότερα αλλά και πιο εύθραυστα, λόγω της αύξησης της περιεκτικότητας τους σε άμυλο. Τα συμπτώματα της ασθένειας είναι τυπικά στους 20-28 °C. Αν η μόλυνση του φυτού καθυστερήσει, η ασθένεια δεν επηρεάζει ολόκληρο το φυτό αλλά περιορίζεται στα φύλλα της κορυφής (Γεωργόπουλος, 1984).

Ο ιός του μωσαϊκού του καπνού είναι ίσως ο πιο σταθερός από όλους τους ιούς. Το σημείο θερμικής αδρανοποίησης του μέσα σε μη αραιωμένο φυτικό χυμό είναι οι 93°C. Μπορεί να διαχειμάσει σε μολυσμένους μίσχους και φύλλα στο έδαφος, στην επιφάνεια μολυσμένων σπόρων, για διάστημα έως και 50 χρόνων. Ο ιός μεταδίδεται εύκολα αν αγγίξουμε υγιή ευαίσθητα φυτά, έχοντας πρώτα έρθει σε επαφή με μολυσμένα καπνόφυτα, ή προϊόντα καπνού. Ο ιός εισέρχεται από πληγές στην επιφάνεια του φύλλου, οι οποίες μπορούν να προκληθούν με ένα απλό άγγιγμα ή τρίψιμο της επιφάνειας του φύλλου. Ο ιός έχει την ικανότητα να κινείται και να μολύνει διασυστηματικά. Η μετακίνηση του ιού από κύτταρο σε κύτταρο μέσα στο ξενιστή γίνεται με τη βοήθεια των πλασμοδεσμάτων, που συνδέουν τα κύτταρα μεταξύ τους, από τη θέση της αρχικής εισόδου του ιού και είναι βραδεία. Η διασυστηματική μετακίνηση του ιού είναι ταχύτερη και λαμβάνει χώρα μέσω των αγγείων του ηθμού. Θεωρείται ότι ο TMV αλλά και μερικοί άλλοι ιοί, μετακινούνται σε μεγάλες αποστάσεις εντός του φυτού σε μορφές συμπλόκων που αποκαλούνται ριβονουκλεοπρωτεΐνες (vRNP). Οι ριβονουκλεοπρωτεΐνες που περιέχουν ιικό RNA, καψιδιακή πρωτεΐνη και νουκλεϊκά οξέα θεωρείται ότι είναι η μετακινούμενη μορφή του ιού σε μικρές ή μεγάλες αποστάσεις εντός του φυτού (Τζάμος, 2007). Στον αγρό η μετάδοση γίνεται κυρίως κατά τις διάφορες καλλιεργητικές εργασίες με τα χέρια ή και τα εργαλεία. Μπορεί ακόμα να γίνει και με την απλή επαφή μολυσμένων και αμόλυντων φύλλων διαφορετικών φυτών. Παρότι η μηχανική μετάδοση του ιού είναι τόσο εύκολη, μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί κανένας φορέας του TMV. Στα νεαρά φυτά ο χρόνος επώασης (από τη μόλυνση ως την εμφάνιση των συμπτωμάτων) είναι μόνο 2-3 μέρες, ενώ στα πιο ηλικιωμένα 6-10 ημέρες ανάλογα και με τη θερμοκρασία. Η ένταση των συμπτωμάτων αυξάνει με την αύξηση του επιπέδου του αζώτου στα φυτά και την αύξηση της θερμοκρασίας (Γεωργόπουλος, 1984).

Στα πλαίσια αντιμετώπισης της ασθένειας του TMV, έχει εξετασθεί και η δημιουργία κλωνοποιημένων φυτών, που θα φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας στον ιό. Το γονίδιο N, του φυτού του καπνού, είναι ένα τέτοιο γονίδιο, καθώς εξασφαλίζει γόνου-προς-γόνου ανθεκτικότητα στον ιό του μωσαϊκού του καπνού και στα περισσότερα είδη της οικογένειας των *Tobamovirus*. Η υποθετική πρωτεΐνη ανθεκτικότητας που κωδικοποιεί το N γονίδιο, ανήκει στην κλάση των NB-LRR πρωτεϊνών. Η ανθεκτικότητα που εξασφαλίζεται από το N γονίδιο στον TMV, χαρακτηρίζεται από τη δημιουργία εντοπισμένων νεκρωτικών κηλίδων, στο σημείο της προσβολής από τον ιό, σαν αποτέλεσμα της εκδήλωσης αντίδρασης υπερευαισθησίας (AY). Με τον σχηματισμό των νεκρωτικών κηλίδων, ο ιός εγκλωβίζεται στα κύτταρα αυτά και δεν μπορεί να κινηθεί μέσα στο φυτό. Η μοριακή φύση του διεγέρτη του ιού για την εκδήλωση των νεκρωτικών κηλίδων της AY δεν έχει βρεθεί ακόμα. Παρόμοια δράση με το N γονίδιο έχουν και τα γονίδια Tm-1, Tm-2, Tm-2a (από το Tomato, τομάτα) και τα L1-L4 γονίδια που παρέχουν ανθεκτικότητα στις περισσότερες φυλές TMV σε φυτά της τομάτας και πιπεριάς αντίστοιχα.

Η αντιμετώπιση του ιού του μωσαϊκού του καπνού βασίζεται κυρίως στη χρήση ανθεκτικών ποικιλιών που αναπτύσσουν αντίδραση υπερευαισθησίας, αλλά και στην υγιεινή του αγρού, δηλαδή την αποφυγή μετάδοσης του ιού, με την απομάκρυνση των μολυσμένων φυτών ακολουθούμενη από πλύσιμο των χεριών. Επίσης συνίσταται η αποφυγή της καλλιέργειας για τουλάχιστον δύο χρόνια ευαίσθητων ποικιλιών σε αγρούς ή θερμοκήπια που είχαν καλλιεργηθεί φυτά μολυσμένα με TMV. Σε φυτά τομάτας, που αποτελούν ξενιστή της ασθένειας, έχει χρησιμοποιηθεί σαν μέτρο αντιμετώπισης η μόλυνση τους με μια ήπια φυλή του ιού όταν βρίσκονται σε νεαρό στάδιο. Ωστόσο τα τελευταία χρόνια, έχει επιτευχθεί έλεγχος του ιού σε πειραματικό επίπεδο με τη βοήθεια της γενετικής μηχανικής, εισάγοντας σε φυτά καπνού και τομάτας, το γονίδιο που κωδικοποιεί την καψιδιακή πρωτεΐνη (coat protein) του ιού TMV. Επίσης έχει αναφερθεί ότι ψεκασμός φυτών με γάλα, αποτρέπει την προσβολή από τον ιό (Agrios, 2005).

1.4 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Το φαινόμενο της επίκτητης διασυστηματικής αντοχής SAR, αποτελεί σημείο έρευνας για πάρα πολλά χρόνια. Από τη μελέτη των πρωτεϊνών και γονιδίων που εμπλέκονται στη SAR, την ικανότητα μετάδοσής της σε απομακρυσμένα μέρη του φυτού, τη μελέτη διαφορετικών βιοχημικών μονοπατιών που την επάγουν μέχρι την ανακάλυψη όλο και περισσότερων συστημάτων αλληλεπίδρασης ξενιστή-παθογόνου στα οποία εμπλέκεται, έχει σημειωθεί τεράστια πρόοδος στη γνώση μας για τη πολύπλοκη αυτή αμυντική λειτουργία των φυτών. Βέβαια η έρευνα συνεχίζεται καθώς απομένει να διαλευκανθούν πολλά ακόμα στοιχεία της SAR και κυρίως το σήμα ενεργοποίησης της άμυνας των φυτών.

Τα αποτελέσματα της SAR στην αντιμετώπιση ενός μεγάλου φάσματος παθογόνων, είναι συχνά τόσο ικανοποιητικά για την παρεμπόδιση και περιορισμό της ασθένειας, που έδωσαν το έναυσμα στους ερευνητές να προσπαθήσουν να αναπαράγουν το φαινόμενο ακόμα και με την απουσία των παθογόνων που αποτελούν τον παράγοντα έναρξης της επαγωγής ανθεκτικότητας. Η διάθεση στο εμπόριο σκευασμάτων με ουσίες που όταν εφαρμοσθούν στα φυτά μπορούν να επάγουν SAR, και να τα προστατέψουν από ακόλουθες μολύνσεις, αν και ιδιαίτερα φιλόδοξο, κάθε άλλο παρά ακατόρθωτο είναι αφού τέτοιου είδους σκευάσματα είναι πλέον γεγονός (π.χ. Aliette).

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης είναι η αξιολόγηση δύο κατιονικών επιφανειοδραστικών ουσιών του βρωμιούχου αμμωνίου, σχετικά με την ικανότητα τους να επάγουν τον αμυντικό μηχανισμό των φυτών. Για το σκοπό αυτό θα μελετηθεί η εξέλιξη των συμπτωμάτων έπειτα από τη χρήση δύο τέτοιων παραγόντων, σε σύγκριση πάντα με φυτά που δεν έχουν δεχθεί το σχετική επέμβαση, για τρία συστήματα αλληλεπίδρασης ξενιστή-παθογόνου : μόλυνση με τον ωμόκητα *Hyaloperonospora parasitica* και το μύκητα *Verticillium dahliae* σε φυτά *Arabidopsis thaliana* και μόλυνση με τον ιό TMV σε φυτά καπνού, *Nicotiana tabacum*.

Επίσης, οι δύο παράγοντες θα αξιολογηθούν σε μοριακό επίπεδο, για το αν έχουν τη δυνατότητα επαγωγής γονιδίων άμυνας του φυτού και σε ποιο διάστημα μετά την εφαρμογή τους. Αυτό θα γίνει με τη βοήθεια των μοριακών τεχνικών της PCR, και θα ανιχνευθεί η έκφραση δύο συγκεκριμένων PR (Pathogen Related) γονιδίων, του PR1 και PR5, που η παρουσία τους στο RNA του φυτού, μπορεί να θεωρηθεί δείκτης επαγωγής SAR.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Φυτικό υλικό

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν φυτά που ανήκουν στο πρότυπο-φυτό *Arabidopsis thaliana*, οικότυπος Columbia (Col-0), της οικογένειας των σταυρανθών.

Πιο συγκεκριμένα, οι μολύνσεις έγιναν σε φυτά Col-0, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν και μεταλλαγμένα *eds-1* φυτά *Arabidopsis*. Στα φυτά *eds1*, καταστέλλεται η δράση των TIR-NBS-LRR πρωτεϊνών ανθεκτικότητας (McDowell et al., 2000).

Οι σπόροι τόσο του Col-0 όσο και της μεταλλαγμένης σειράς *eds1*, παρέμεναν αποθηκευμένοι στους 4°C. Για τη διακοπή του λήθαργου των σπόρων, τοποθετήθηκαν σε γλαστράκια διαμέτρου 6 cm με 200 cm³ περίπου τύρφης, καλύφθηκαν με ζελατίνη για τη δημιουργία συνθηκών υψηλής σχετικής υγρασίας, και παρέμειναν σε θερμοκρασία 4°C για 3-4 μέρες. Έν συνεχεία, μεταφέρθηκαν σε θερμοκήπιο, με ελεγχόμενες συνθήκες φωτός και θερμοκρασίας, δηλαδή στους 25 °C, και με φωτοπερίοδο 10 ωρών φωτός και 14 ωρών σκοτάδι. Τα πλαστικά καλύμματα τους αφαιρέθηκαν 5 ημέρες μετά από τη βλάστηση των σπόρων. Μία εβδομάδα μετά από την αφαίρεση του πλαστικού καλύμματος, τα φυτά μεταφυτεύθηκαν σε νέα γλαστράκια των ίδιων διαστάσεων, που 1-2 ημέρες πριν τη μεταφύτευση είχαν δεχθεί ριζοπότισμα με το σκεύασμα Diazinon, (500 μl /lt νερού), ένα διασυστηματικό εντομοκτόνο για την καταπολέμηση προνυμφών των δίπτερων και συγκεκριμένα της οικογένειας *Sciaridae*. Το χώμα, αποτελούταν από ένα μείγμα τύρφης με ποταμίσις άμμο σε μια αναλογία 4:1, ώστε να εξασφαλίζει καλύτερη στράγγιση και αερισμό στο περιβάλλον των ριζών. Τα φυτά μεταφυτεύονταν ένα ανά γλαστράκι, όταν επρόκειτο να χρησιμοποιηθούν στα πειράματα παθογένειας του *V.dahliae*, ή πέντε ανά γλαστράκι για τα πειράματα παθογένειας του *H.parasitica*. Η υδατική κατάσταση των φυτών διατηρούνταν σταθερή.

Επίσης χρησιμοποιήθηκαν φυτά καπνού, *Nicotiana tabacum*, ποικιλίες Petite Havana (PH) και Petite Gerard (PG). Από αυτές τις δύο ποικιλίες, η Petite Havana

είναι ευαίσθητη στην προσβολή από τον ιό TMV, λόγω του ότι δε φέρει το γονίδιο N, που σχετίζεται με την άμυνα του φυτού στον TMV, εκδηλώνοντας τα τυπικά συμπτώματα της ασθένειας. Η ποικιλία Petite Gerard είναι ομοζυγωτική με την Petite Havana αλλά φέρει το N γονίδιο και οδηγεί στην εκδήλωση της αντίδρασης υπερευαισθησίας. Οι σπόροι και των δύο ποικιλιών, παρέμεναν αποθηκευμένοι στους 4°C. Για τη διακοπή του λήθαργου των σπόρων, τοποθετήθηκαν σε γλαστράκια διαμέτρου 6 cm με 200 cm³ περίπου τύρφης, καλύφθηκαν με ζελατίνη για τη δημιουργία συνθηκών υψηλής σχετικής υγρασίας, και παρέμειναν σε θερμοκρασία 4°C για 3-4 μέρες. Εν συνεχεία, μεταφέρθηκαν σε θερμοκήπιο σε ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας 25°C, σχετική υγρασία περίπου 70% και φωτοπερίοδο 14 ώρες. Τα πλαστικά καλύμματα τους αφαιρέθηκαν 5 ημέρες μετά από τη βλάστηση των σπόρων. Δύο περίπου εβδομάδες μετά από την αφαίρεση του πλαστικού καλύμματος, τα φυτά μεταφυτεύθηκαν σε νέα γλαστράκια, διαμέτρου 15cm 300 cm³ τύρφης περίπου, ένα ανά γλαστράκι. Τα φυτά δέχονταν πότισμα, υποστύλωση και λίπανση με το σκεύασμα XL60[®] όποτε αυτό κρινόταν απαραίτητο.

2.2 Προετοιμασία και εφαρμογή επιφανειοδραστικών παραγόντων

Δύο διαφορετικές επιφανειοδραστικές ουσίες που ανήκουν στη γενικότερη χημική ομάδα των κατιονικών ενώσεων του βρωμιούχου αμμωνίου, αξιολογήθηκαν στα πειράματα για την ικανότητα επαγωγής του αμυντικού μηχανισμού των φυτών. Οι παράγοντες, στους οποίους θα αναφερόμαστε χάριν ευκολίας ως παράγοντες A και B, δοκιμάστηκαν σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις των 50, 10 και 1 mM. Παρασκευάστηκαν δύο διαλύματα αναφοράς (stock solutions), για τον κάθε παράγοντα, συγκέντρωσης 50 mM. Η ποσότητα του παράγοντα A για την παρασκευή 10 ml διαλυμάτων αναφοράς, ήταν 1,1612 gr, ενώ για τον B 1,1541 gr. Οι ουσίες και για τους δύο παράγοντες μετρήθηκαν σε ζυγό ακριβείας, και διαλύθηκαν σε 10 ml διπλά αποσταγμένου και αποστειρωμένου νερού, στο οποίο είχε γίνει προσθήκη 2 ml προσκολλητικού Agral (περιεκτικότητα 0,02% του τελικού όγκου), ώστε να αποφευχθεί η απρροή, κατά την εφαρμογή των παραγόντων στη φυλλική επιφάνεια.

Τα δύο stock solutions διατηρούνταν στους -20°C σε σωληνάκια Falcon των 25 ml, και κάθε φορά που έπρεπε να εφαρμοσθούν οι παράγοντες στα φυτά, παρασκευάζονταν οι συγκεντρώσεις 10 και 1 mM των παραγόντων, με την προσθήκη 200 μl σε 800 ml αποστειρωμένο νερό, για τη συγκέντρωση 10 mM, και προσθήκη 20 μl σε 980 ml αποστειρωμένο νερό για τη συγκέντρωση 1 mM, και προσκολλητικού Agral (σε συγκέντρωση 0,02%). Τα σωληνάκια Falcon των 25 ml, με τις επιθυμητές συγκεντρώσεις των παραγόντων μεταφέρονταν στο θερμοκήπιο μέσα σε δοχείο με πάγο. Σε όλες τις περιπτώσεις των πειραμάτων, ως μάρτυρας για την εφαρμογή των παραγόντων, χρησιμοποιήθηκε διπλά απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό και προσκολλητικό Agral (σε συγκέντρωση 0,02%). Στα φυτά της *Arabidopsis thaliana*, τοποθετούταν 1 σταγόνα των 10 μl (Εικόνα 2.1), σε ένα από τα κατώτερα φύλλα του φυτού, ενώ στα φυτά καπνού, επιλεγόταν ένα από τα κατώτερα φύλλα και τοποθετούνταν 3-4 σταγόνες των 20 μl. Η τοποθέτηση των παραγόντων γινόταν πάντα 7 ημέρες πριν από τη μόλυνση με το εκάστοτε παθογόνο. Στη μόλυνση των φυτών *Arabidopsis thaliana*, με τον *H. parasitica*, οι παράγοντες τοποθετούνταν μία εβδομάδα μετά από τη μεταφύτευση των φυτών, ενώ όταν επρόκειτο να μολυνθούν με το *V. dahliae*, οι παράγοντες τοποθετούνταν 2-3 εβδομάδες μετά τη μεταφύτευση. Στα φυτά του καπνού οι παράγοντες τοποθετούνταν περίπου 4 εβδομάδες μετά τη μεταφύτευσή τους.



Εικόνα 2.1: Παράδειγμα εφαρμογής σταγόνας 10 μl του παράγοντα Α ή Β σε φύλλο φυτού *Arabidopsis thaliana*, 3 εβδομάδων.

2.3 Στελέχη φυτοπαθογόνων ωομυκήτων, μυκήτων και προετοιμασία μολύσματος

2.3.1 *Hyaloperonospora parasitica*

Η φυλή Noco2, του *Hyaloperonospora parasitica*, που έχει μελετηθεί ιδιαίτερα σε σχέση με την παθογένεια της στο φυτό *A. thaliana*, χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα της συγκεκριμένης μελέτης. Το παθογόνο διατηρείται σε θάλαμο βαθιάς κατάψυξης (-80°C), με τη μορφή μολυσμένων με το παθογόνο φυτών *A. thaliana*, που τοποθετήθηκαν σε μικρά πλαστικά δοχεία και μεταφέρθηκαν στο θάλαμο 7 ημέρες μετά τη μόλυνση, όταν δηλαδή σχηματίστηκαν οι κονιδιοφόροι. Για την δημιουργία του μολύσματος των πειραμάτων παθογένειας του *H. parasitica*, συλλέχθηκε μέρος των φυτών από τους -80°C, και τοποθετήθηκε σε σωλήνακι τύπου

Falcon 15 ml, με 2-3 ml διπλά απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό. Έγινε έντονη ανάδευση του αιωρήματος και στη συνέχεια με τη βοήθεια διηθητικού πανιού Miracloth, διαχωρίστηκαν τα φυτικά στελέχη και τα υπολείμματα χύματος, από το υπόλοιπο αιώρημα, που βρίσκονταν επαναιωρηματοποιημένα τα κονίδια. Το μόλυσμα ψεκάστηκε με ειδικό ψεκαστικό χρωμάτων σε 2-3 γλαστράκια με φυτά *A. thaliana* ηλικίας 2 εβδομάδων μετά τη σπορά, μεταλλαγμένα στο *eds1* γονίδιο ώστε να παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία και διευκολύνοντας έτσι τη συλλογή μεγαλύτερης ποσότητας μολύσματος αργότερα. Το ψεκαστικό σχηματίζει μικρού μεγέθους σταγονίδια, επιτρέποντας τη καλύτερη διασπορά του μολύσματος πάνω στη φυλλική επιφάνεια. Τα ψεκασμένα γλαστράκια τοποθετούνται σε πλαστικό κουτί η κάτω επιφάνεια του οποίου είναι στρωμένη με δύο φύλλα διηθητικού χαρτιού, κορεσμένα με νερό, ώστε να δημιουργούνται συνθήκες υψηλής σχετικής υγρασίας (περίπου 100%) συνθήκη που ευνοεί την ανάπτυξη του παθογόνου και το σχηματισμό κονιδίων. Το πλαστικό κουτί τοποθετήθηκε σε θάλαμο επώασης υπό ελεγχόμενες συνθήκες, 16-18°C και φωτοπερίοδο 10 ώρες. Την 7^η μέρα μετά τη μόλυνση, οι εναέριοι κονιδιοφόροι είχαν σχηματισθεί πάνω στα φύλλα. Η διαδικασία επαναλήφθηκε όπως αναφέρθηκε παραπάνω για άλλες 2-3 φορές σε φυτά *eds1*, ώστε να αυξηθεί το μόλυσμα και να ανακτήσει ο ωομύκτης την πλήρη μολυσματική του ικανότητα. Για το πείραμα παθογένειας συλλέχθηκαν όσο το δυνατόν περισσότερα φυτά, σε σωληνάκι Falcon των 50 ml (Εικόνα 2.2). Η μόλυνση πραγματοποιούνταν με αιώρημα κονιδίων συγκέντρωσης 4×10^4 κονίδια/ml σε φυτά *A. thaliana* (Col-0). Η συγκέντρωση ρυθμίστηκε με τη βοήθεια αιματοκυτταρόμετρου.

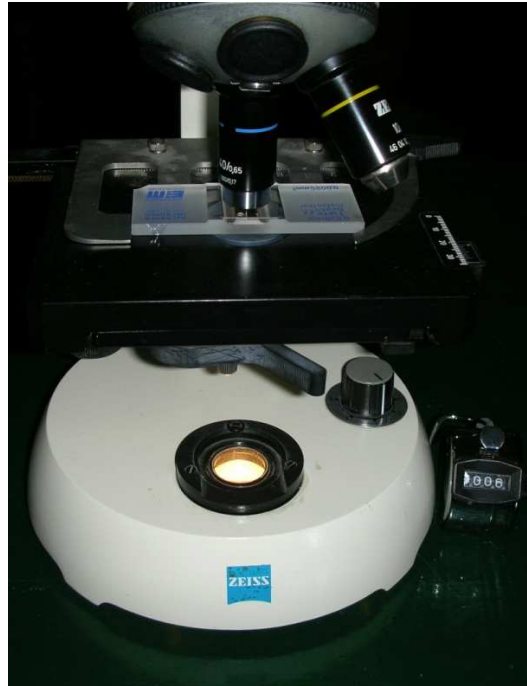


Εικόνα 2.2: Συλλογή μολυσμένων φυταρίων *A. thaliana* σε σωληνάκια τύπου Falcon χωρητικότητας 50 ml, 7 ημέρες μετά τη μόλυνση από το *H. parasitica* (αριστερά). Χρήση διηθητικού πανιού Mira cloth, για τη μετάγγιση του αιωρήματος των κονιδίων και την απομάκρυνση των φυτών και πιθανόν υπολειμμάτων χώματος (δεξιά).

2.3.2 *Verticillium dahliae*

Η φυλή του *Verticillium dahliae* που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα παθογένειας, προέρχεται από μολυσμένα φυτά ραπανιού. Τα στελέχη του μύκητα διατηρούνταν στους -80°C , ως αιώρημα κονιδίων σε 25% υδατική γλυκερόλη (Maniatis et al., 1982). Για την ενεργοποίηση του μύκητα, μια μικρή ποσότητα από το παγωμένο αιώρημα των -80°C , εφαρμόσθηκε με γραμμική διασπορά σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό (PDA, potato dextrose agar), τα οποία μεταφέρθηκαν στη συνέχεια σε επωαστικό θάλαμο στους 25°C για 4-5 ημέρες περίπου. Για την παρασκευή μολύσματος του μύκητα *V. dahliae*, τμήματα της αναπτυσσόμενης καλλιέργειας του μύκητα σε τρυβλία στους 25°C , κόπηκαν με φελοτρυπητήρα μικρής διαμέτρου (3-4 κομμάτια) και τοποθετήθηκαν σε κωνική φιάλη, με υγρό θρεπτικό διάλυμα SSN (100 ml). Οι κωνικές φιάλες παρέμειναν σε περιστρεφόμενο επωαστικό θάλαμο στους 22°C και στις 160-180 rpm, για διάστημα 4 ημερών. Την 4^η μέρα, με τη βοήθεια

διθητικού πανιού, διηθήθηκαν οι καλλιέργειες ώστε να απομακρυνθεί το μυκήλιο του μύκητα. Με τη βοήθεια αιματοκυτταρόμετρου (Εικόνα 2.3), δημιουργήθηκε αιώρημα συγκέντρωσης 10^7 κονίδια/ml, που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα παθογένειας.



Εικόνα 2.3: Οπτικό μικροσκόπιο, στη τράπεζα του οποίου είναι τοποθετημένο το αιματοκυτταρόμετρο, με το οποίο καταμετρούνται τα κονίδια.

2.3.3 Tobacco Mosaic Virus (TMV)

Στα πειράματα παθογένειας, χρησιμοποιήθηκε η φυλή U1 του TMV. Ο ιός φυλάσσεται στους -20°C σε δοκιμαστικό σωλήνα τύπου Falcon χωρητικότητας 50ml, ως εκχύλισμα από τη σύνθλιψη (λειοτρίβιση) μολυσμένων από τον ιό φύλλων σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα. Για τη προετοιμασία του μολύσματος αναμείχθηκε ποσότητα 2ml από το εκχύλισμα του ιού, με 48 ml φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (Phosphate buffer, pH 7) (Harrold et al., 2008).

2.4 Δοκιμές παθογένειας

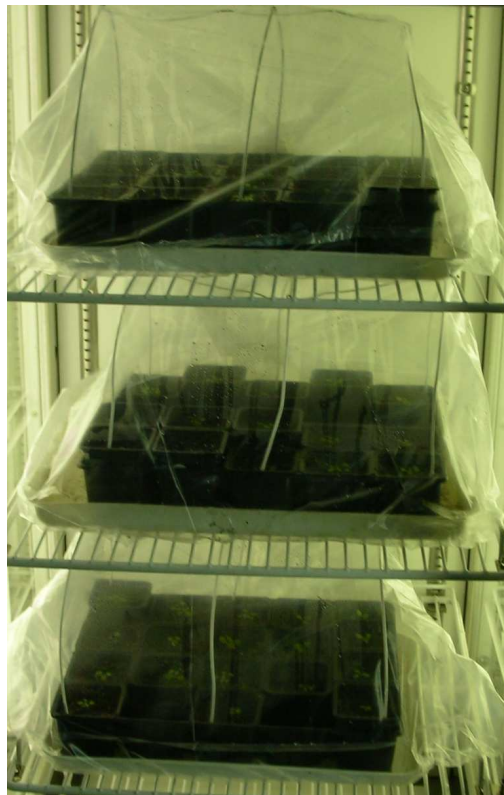
2.4.1 *Hyaloperonospora parasitica*

Για τις δοκιμές παθογένειας με τον *H. Psarasitica*, έγιναν 3 ανεξάρτητες επαναλήψεις. Στη πρώτη επανάληψη, υπήρχε ένα φυτό/γλαστράκι, ενώ στις άλλες δύο πέντε (Εικόνα 2.3), όπως προαναφέρθηκε, με σκοπό να μειωθεί το στατιστικό λάθος. Στην πρώτη επανάληψη του πειράματος, έγιναν 6 επαναλήψεις σε κάθε διαφορετική επέμβαση των φυτών. Αντίθετα, στα δύο επόμενα πειράματα παθογένειας, σε κάθε επέμβαση με διαφορετική συγκέντρωση του παράγοντα υπήρχαν 5 επαναλήψεις, ενώ στην επέμβαση που τα φυτά που είχαν ψεκάσθηκαν μόνο με νερό και Agra1, υπήρχαν 10 επαναλήψεις. Και στις τρεις επαναλήψεις του πειράματος παθογένειας, τα φυτά είχαν ομαδοποιηθεί σε 3 παλέτες, ώστε οι μηδενικοί μάρτυρες (φυτά που δεν δέχθηκαν καμία επέμβαση) να μην συνυπάρχουν στην ίδια παλέτα που θα ψεκαζόταν με το αιώρημα κονιδίων. Ψεκάσθηκαν 10 ml μολύσματος συγκέντρωσης 4×10^4 κονίδια/ml ανά παλέτα.



Εικόνα 2.4: Παλέτα φυτών *A. thaliana* (δεξιά), γλαστράκι που διακρίνεται η διάταξη των πέντε φυτών (αριστερά).

Στη συνέχεια όλοι οι δίσκοι τοποθετήθηκαν σε διάφανη πλαστική σακούλα, η μέσα επιφάνεια της οποίας ψεκάστηκε με νερό, προκειμένου να εξασφαλισθούν συνθήκες υψηλής σχετικής υγρασίας. Εν συνεχεία οι δίσκοι μεταφέρθηκαν σε θάλαμο με ελεγχόμενες συνθήκες, 16-18°C και φωτοπερίοδο 8 ώρες (Εικόνα 2.5). Παρέμειναν εκεί για 7 ημέρες, και στη συνέχεια, έγινε καταμέτρηση των κονιδίων με τη βοήθεια αιματοκυτομέτρου. Τα φυτά από κάθε γλαστράκι συλλέχθηκαν και τοποθετήθηκαν σε σωληνάκι τύπου Falcon, των 25ml στο οποίο προστέθηκε 1 ml αποστειρωμένου νερού και ακολουθούσε έντονη ανάδευση του σωλήνα, προκειμένου να επιτευχθεί η επαναιώρηση των κονιδίων. Σε ένα μικρό δείγμα που λήφθηκε από το σωλήνα μετά από την ανάδευση, έγινε καταμέτρηση των κονιδίων. Ακολούθησε γραφική παράσταση του μέσου όρου συγκέντρωσης των κονιδίων ανά επέμβαση (συγκέντρωση του παράγοντα A1, 10 και 50mM και του B1, 10 και 50mM και στο μάρτυρα, δηλαδή φυτά που ψεκάστηκαν μόνο με νερό και Agral. Οι τιμές αυτές εισήχθησαν στο πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης ANOVA για να διαπιστωθεί αν κάποια επέμβαση έχει στατιστικά σημαντική διαφορά από τους υπόλοιπους.



Εικόνα 2.5: Δίσκοι καλυμμένοι με πλαστική σακούλα στο θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών.

2.4.2 *Verticillium dahliae*

Οι δοκιμές παθογένειας του *V. dahliae*, έγιναν σε φυτά *A. thaliana*, περίπου 3-4 εβδομάδων. Ποσότητα 10ml αιωρήματος κονιδίων συγκέντρωσης 10^7 κονίδια/ml του παθογόνου, εφαρμόστηκε με ριζοπότισμα στα φυτά, που δεν είχαν ποτισθεί για 2-3 μέρες, προκειμένου να συγκρατηθεί το μόλυσμα στη ριζόσφαιρα. Τα φυτά παρέμειναν σε θερμοκήπιο με 23-25°C και φωτοπερίοδο 10 h για μία εβδομάδα και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε θερμοκήπιο με θερμοκρασία 28°C, σχετική υγρασία περίπου 75% και περίοδο φωτός 14 ώρες, μέχρι την εμφάνιση συμπτωμάτων. Το ποσοστό της ασθένειας σε κάθε μέτρηση, υπολογίστηκε ως ο αριθμός των μολυσμένων φύλλων στο σύνολο των φύλλων του φυτού. Η πρόοδος της ασθένειας καταγράφηκε σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα και ακολούθησε γραφική παράσταση των συμπτωμάτων ασθένειας σε σχέση με το χρόνο. Έχοντας ως βάση το διάγραμμα με τη πρόοδο της ασθένειας στο δεδομένο διάστημα, υπολογίστηκε ο δείκτης AUDPC (area under the curve, εμβαδόν κάτω από την καμπύλη προόδου της ασθένειας) και στη συνέχεια εκφράστηκε ως ποσοστό της μέγιστης τιμής AUDPC για όλη τη διάρκεια του πειράματος (που αντιστοιχεί σε 100% προσβολή) και ονομάστηκε σχετική AUDPC (REL AUDPC) (Korovel et al., 2001). Τιμές με βάση αυτό το ποσοστό για κάθε διαφορετική επέμβαση των φυτών, επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης STATGRAPHICS Plus με τη μέθοδο ANOVA, και οι μέσοι όροι διαχωρίστηκαν με τη μέθοδο πολλαπλής δοκιμής του Fisher, Least Significant Difference (LSD). Τα πειράματα παθογένειας επαναλήφθηκαν 3 φορές με 5 επαναλήψεις ανά επέμβαση.

2.4.3 Tobacco Mosaic Virus (TMV)

Οι δοκιμές παθογένειας του TMV, έγιναν σε φυτά καπνού ηλικίας 5 εβδομάδων περίπου, σε θερμοκήπιο με θερμοκρασία 28°C, σχετική υγρασία περίπου 75% και περίοδο φωτός 14 ώρες. Η μόλυνση έγινε με μηχανικό τρόπο, (με τριβή με το χέρι) όλης της επιφάνειας ενός φύλλου, στο οποίο είχαν τοποθετηθεί 450 μl από το

διάλυμα του ιού σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα. Το ποσοστό της ασθένειας στα φυτά από την ποικιλία PH, σε κάθε μέτρηση, υπολογίστηκε ως ο αριθμός των μολυσμένων φύλλων στο σύνολο των φύλλων του φυτού. Η πρόοδος της ασθένειας καταγράφηκε σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Ακολούθησε γραφική παράσταση των συμπτωμάτων ασθένειας σε σχέση με το χρόνο. Έχοντας ως βάση το διάγραμμα με τη πρόοδο της ασθένειας στο δεδομένο διάστημα, υπολογίστηκε ο δείκτης AUDPC (area under the curve, εμβαδόν κάτω από την καμπύλη προόδου της ασθένειας) και στη συνέχεια εκφράστηκε ως ποσοστό της μέγιστης τιμής AUDPC για όλη τη διάρκεια του πειράματος (που αντιστοιχεί σε 100% προσβολή) και ονομάστηκε σχετική AUDPC (REL AUDPC). Τιμές με βάση αυτό το ποσοστό για κάθε διαφορετική επέμβαση των φυτών, επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης STATGRAPHICS Plus με τη μέθοδο ANOVA, και οι μέσοι όροι διαχωρίστηκαν με τη μέθοδο πολλαπλής δοκιμής του Fisher, Least Significant Difference (LSD). Τα πειράματα παθογένειας επαναλήφθηκαν 2 φορές με 6 επαναλήψεις ανά επέμβαση.

2.5 Τοποθέτηση επιφανειοδραστικών παραγόντων σε αμόλυντα φυτά *Arabidopsis thaliana* για ανίχνευση επαγωγής PR γονιδίων

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, έγινε προσπάθεια να ανιχνευθεί σε μοριακό επίπεδο το κατά πόσο η εφαρμογή των δύο παραγόντων A και B στα φυτά *A. thaliana* μπορεί να επάγει την παραγωγή γονιδίων που σχετίζονται με τους μηχανισμούς άμυνας του φυτού.

Για το σκοπό αυτό, τοποθετήθηκε η συγκέντρωση 10 mM των δύο παραγόντων A και B, σε φυτά *A. thaliana* 3 εβδομάδων. Σαν μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκαν φυτά της ίδιας ηλικίας που είχαν δεχθεί εφαρμογή με νερό και Agral (0,02% του όγκου του νερού). Σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα συλλέχθηκαν ολόκληρα φυτά, και από τους 3 χειρισμούς, από τα οποία αφαιρέθηκε το ριζικό σύστημα, τοποθετούνταν σε 3 διαφορετικούς πλαστικούς σωλήνες (Eppendorf tubes) του 1,5 ml και τοποθετούνταν σε ειδικό δοχείο που περιείχε υγρό

άζωτο, για να ψυχθούν άμεσα οι ιστοί, πριν αρχίσει η δράση ενζύμων που θα μπορούσαν να υποβαθμίσουν την ποιότητα των δειγμάτων. Στη συνέχεια συλλέγονταν με πολύ προσοχή από το υγρό άζωτο, και τοποθετούνταν σε θάλαμο διατήρησης, στους -80 °C. Μετά την ολοκλήρωση αυτής της διαδικασίας, από τα δείγματα που συλλέχθηκαν έγινε εξαγωγή RNA, για την ανίχνευση της παρουσίας γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα του φυτού.

2.6 Απομόνωση RNA από φυτά *Arabidopsis thaliana*

Η απομόνωση ολικού RNA από τα φυτά *A. thaliana*, που συλλέχθηκαν, έγινε με το RNeasy® mini Kit, της Qiagen, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ο ιστός από κάθε δείγμα που είχε συλλεχθεί, κονιορτοποιήθηκε μέσα στα Eppendorf tubes των 1,5 ml, παρουσία υγρού αζώτου. Περίπου 100 mg κονιορτοποιημένου ιστού τοποθετήθηκαν σε νέο σωληνάκι τύπου Eppendorf και προστέθηκαν 600 µl Buffer RLT, και έγινε έντονη ανάδευση. Όλες οι διαδικασίες πριν τη προσθήκη του Buffer, γίνονται γρήγορα και παρουσία υγρού αζώτου για να μην λιώσει ο ιστός και καταστραφεί το RNA. Μετά από παραμονή 2 min σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 56°C για να διαλυθούν οι ιστοί, το περιεχόμενο από κάθε σωληνάκι, μεταγγίστηκε με πιπέτα κατευθείαν σε μία QIAshredder spin column τοποθετημένη σε σωλήνα συλλογής 2 ml, που παρέχεται από το Kit, και έγινε φυγοκέντρηση για 2 min στις 13.000 rpm. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης μεταφέρθηκε με προσοχή σε νέο σωληνάκι χωρίς να μετακινηθεί το ίζημα που σχηματιζόταν στο πάτο του σωλήνα. Στο σωλήνα με το υπερκείμενο προστέθηκαν 300 µl απόλυτης αιθυλικής αλκοόλης και ακολούθησε άμεση ανάδευση με τη χρήση πιπέτας. Το δείγμα συνήθως 650 µl, μεταφέρθηκε σε μία RNeasy mini column τοποθετημένη σε σωλήνα συλλογής 2 ml, που παρέχεται από το Kit, και έγινε φυγοκέντρηση για 3 min στις 11.000 rpm. Το διάλυμα που διήλθε από τη μεμβράνη και συγκεντρώθηκε στο σωλήνα συλλογής μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, δεν χρησιμοποιήθηκε περαιτέρω. Στη RNeasy στήλη προστέθηκαν 700 µl Buffer RW1 και αφού επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min, ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 sec στις 11.000 rpm. Το διάλυμα που διήλθε από τη μεμβράνη και συγκεντρώθηκε στο σωλήνα συλλογής μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, δεν χρησιμοποιήθηκε περαιτέρω. Η RNeasy στήλη μεταφέρθηκε σε

νέο σωλήνα συλλογής 2 ml, και προστέθηκαν στη στήλη 500 μl Buffer RPE. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 30 sec στις 11.000 rpm, για να πλυθεί η στήλη και το διάλυμα που διήλθε από τη μεμβράνη και συγκεντρώθηκε στο σωλήνα συλλογής μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, δεν χρησιμοποιήθηκε περαιτέρω. Προστέθηκαν στη στήλη ακόμα 500 μl Buffer RPE και έγινε φυγοκέντρηση για 2 min στις 11.000 rpm για να πλυθεί η μεμβράνη που υπάρχει στη RNeasy column, από ανεπιθύμητες ουσίες και να συγκρατήσει μόνο το RNA. Για την συλλογή του RNA, μεταφέρθηκε η RNeasy column σε σωλήνα 1,5 ml, και προστέθηκαν 40 μl απαλλαγμένου από ριβονουκλεάσες νερό (RNase-free water) που παρέχεται από το Kit, στο μέσο περίπου της μεμβράνης της RNeasy column, και παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για 3 min. Όση ποσότητα νερού πέρασε μέσα από τη μεμβράνη τοποθετήθηκε και πάλι με προσοχή στη RNeasy column, και παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 min, αυτή τη φορά, για να επαναδιαλυματοποιηθεί όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ποσότητα RNA. Η στήλη με το σωλήνα συλλογής, τοποθετήθηκαν για φυγοκέντρηση 1 min στις 11.000 rpm. Το RNA που συλλέχθηκε αποθηκεύθηκε σε βαθιά κατάψυξη (-80 °C).

2.7 Μέτρηση συγκέντρωσης RNA

Η συγκέντρωση της ποσότητας RNA των δειγμάτων έγινε σε όργανο Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer. Ο μηδενισμός του οργάνου γινόταν με μια σταγόνα 1μl απαλλαγμένου από ριβονουκλεάσες νερό από το Kit της Qiagen, και στη συνέχεια γινόταν η μέτρηση όλων των δειγμάτων με τοποθέτηση μιας σταγόνας 1μl στο όργανο. Η συγκέντρωση υπολογίζεται ουσιαστικά από τον τύπο :

$$[C] = O.D_{260} \text{ του δείγματος} \times 40\mu\text{g/ml (RNA)} \times \text{συντελεστής αραίωσης.}$$

Όπου $O.D_{260}$ η απορρόφηση του δείγματος στα 260 nm.

2.8 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης

Η αλυσιδωτή αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης-πολυμεράσης (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction RT-PCR) χρησιμοποιήθηκε για την *in vitro* μεγάλης κλίμακας παραγωγή μορίων DNA συμπληρωματικών προς τμήματα μορίων RNA. Σε μια αντίδραση RT-PCR προστίθεται Buffer και DDT (Dithiothreitol) που δημιουργούν το κατάλληλο περιβάλλον για την πραγματοποίηση της αντίδρασης. Το oligo dT, δρα σαν εκκινητής και προσκολλάται στο poly-A άκρο του RNA (λόγω της συμπληρωματικότητας των βάσεων A-T). Η αντίστροφη μεταγραφάση (ένζυμο Superscript II της Invitrogen), επιμηκύνει τους εκκινητές με προσθήκη δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs), με αποτέλεσμα μια *in vitro* διαδικασία αντίστροφης μεταγραφής για τη παραγωγή cDNA (complementary DNA). Τα μόρια cDNA που παράγονται πολλαπλασιάζονται με εκθετικό ρυθμό κατά τους κύκλους που ακολουθούν στην PCR, με τελικό αποτέλεσμα την αποκλειστική τους παρουσία στο διάλυμα. Για την αποφυγή της καταστροφής του RNA, χρησιμοποιείται στην αντίδραση και αναστολέας της δράσης της RNase (RNase inhibitor).

Στο πείραμα, 2 mg RNA σε 16,5 μl τελικό όγκο με προσθήκη διπλά απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού επωάστηκε σε μηχανήμα PCR στους 70°C για 5 min, και στη συνέχεια προστέθηκαν τα ακόλουθα:

RNA + H ₂ O	16,5 μl
2 mM dNTP	2 μl
30 mM olido DT	2μl
RNAase inhibitor (40 U/ μl)	0,5 μl
Superscript II (50 U/ μl)	1 μl
5x Buffer	6 μl
100 mM DTT	2 μl

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 30 μl και επωάστηκε στο μηχανήμα της PCR για 90 min στους 42°C, και ακολούθησε απενεργοποίηση του ενζύμου στους 70°C για 10 min.

2.9 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό των PR γονιδίων. Η PCR πραγματοποιείται με τη χρήση δύο ολιγονουκλεοτιδίων, τους εκκινητές (primers), που σχεδιάζονται έτσι, ώστε να είναι συμπληρωματικοί προς τα δύο άκρα της προς πολλαπλασιασμό αλληλουχίας, καθένας δε συμπληρωματικός προς το 3' άκρο της αλυσίδας που θα αντιγράψει. Η PCR καθίσταται εφικτή χάρη στη χρήση DNA πολυμεράσης ανθεκτικής στις υψηλές θερμοκρασίες αποδιάταξης του DNA. Η πολυμεράση που χρησιμοποιείται συνήθως είναι η Taq πολυμεράση από το θερμόφιλο ευβακτήριο *Thermus aquaticus*, που διατηρεί σημαντικό μέρος της δραστικότητάς της σε θερμοκρασίες μέχρι και 97,5 °C.

Τα αντιδραστήρια προστέθηκαν ως εξής για την πραγματοποίηση της αντίδρασης:

c DNA	3 μl
10 x Buffer	2,5 μl
dNTPs	2 μl
Primer F1	1 μl
Primer R1	1 μl
H ₂ O	15 μl
Taq (Qiagen)	0,5 μl

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 25 μl και οι σωλήνες τοποθετήθηκαν στο μηχάνημα της PCR. Πρώτα τα δείγματα επωάστηκαν στους 95°C για 3 min. Έπειτα η αντίδραση πραγματοποιείται σαν μια κυκλική επανάληψη τριών σταδίων:

α) Αποδιάταξη του DNA με θέρμανση στους 95°C για 30 sec. Με αυτό τον τρόπο οι δύο αλυσίδες του DNA γίνονται προσβάσιμες στους εκκινητές.

β) Πρόσδεση (annealing) του ζεύγους των εκκινητών στις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες. Το βήμα αυτό πραγματοποιείται σε θερμοκρασία, 54 °C για 30 sec.

γ) Επιμήκυνση των ολιγονουκλεοτιδικών εκκινήτων από τη DNA πολυμεράση στους 72 °C για 1,2 min.

Τα τρία αυτά στάδια επαναλήφθηκαν 30 φορές. Σε κάθε κύκλο χρησιμοποιούνται σαν υπόστρωμα τα αρχικά μόρια DNA αλλά και τα προϊόντα όλων των προηγούμενων κύκλων. Ο πολλαπλασιασμός με εκθετικό ρυθμό των τμημάτων DNA που προκύπτουν έχει ως πρακτικό αποτέλεσμα την παρουσία στο τελικό διάλυμα μόνο του προς πολλαπλασιασμό τμήματος DNA. Μετά από ένα ορισμένο αριθμό κύκλων, εξαντλείται η ενζυμική δραστηριότητα της πολυμεράσης και η αντίδραση περνά από την εκθετική φάση σε φάση «κορεσμού» (plateau), κατά την οποία επιπλέον κύκλοι δεν έχουν σαν αποτέλεσμα αύξηση της ποσότητας του προϊόντος. Αυτό οφείλεται κυρίως στην προοδευτική απώλεια της δραστηριότητας του ενζύμου, όταν επωάζεται σε υψηλές θερμοκρασίες για σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα.

Μετά τη λήξη όλων των κύκλων προστέθηκε ένα επιπλέον στάδιο επιμήκυνσης στους 72 °C για 10 min , προκειμένου να συμπληρώσει η πολυμεράση τυχόν ατέλειες στα μόρια που είχε συνθέσει.

2.10 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR

Η ηλεκτροφόρηση επιτρέπει το διαχωρισμό μορίων νουκλεϊκών οξέων ανάλογα με το μέγεθός τους. Βασίζεται στη διαφορετική ευκολία με την οποία περνούν μόρια διαφορετικού μεγέθους μέσα από ένα πήγμα, η δικτυωτή-μικροπορώδης υφή του οποίου επιτρέπει στα μικρότερα μόρια να τη διατρέχουν πιο εύκολα. Η κίνηση των αρνητικά φορτισμένων μορίων νουκλεϊκών οξέων διατηρείται χάρη στην εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου που διατρέχει το πήγμα. Το πήγμα βρίσκεται μέσα σε κατάλληλο ιοντικό ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων TAE (1x). Κατά την ηλεκτροφόρηση, μόρια DNA (ομοίως ισχύει και για τα μόρια RNA) ίδιου μεγέθους μετακινούνται υπό τις ίδιες συνθήκες (σύνθεση και πυκνότητα πήγματος, ένταση ρεύματος, διαφορά δυναμικού) και ύστερα από το ίδιο χρονικό διάστημα κατά ίση απόσταση. Έτσι, με τη χρήση δεικτών μεγέθους, του ladder, δηλαδή μορίων γνωστού μεγέθους δίπλα στα υπό

μελέτη μόρια είναι εφικτός ο αδρός προσδιορισμός του μεγέθους των υπό μελέτη μορίων.

Τα δείγματα μετά από την αντίδραση της PCR, αναμείχθηκαν με ποσότητα 2,5μl διαλύματος φόρτωσης (6x loading blue buffer), και μαζί με δείκτη μοριακών βαρών (ladder) 1kb που είχε αναμειχθεί με την ανάλογη ποσότητα loading buffer, φορτωνόταν ποσότητα 10 μl σε πήγμα που περιείχε 0,8% αγαρόζη σε 1x ρυθμιστικό διάλυμα TAE. Η ηλεκτροφόρηση του πηγματος έγινε στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα με εφαρμογή τάσης περίπου 100 Volt στα άκρα της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Μετά την ηλεκτροφόρηση ακολούθησε χειρισμός του πηγματος με υδατικό διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου συγκέντρωσης περίπου 1 μg/ml για 20-30 min και έπειτα παρατήρηση του σε τράπεζα UV ακτινοβολίας (365nm).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Αξιολόγηση της επίδρασης της εφαρμογής των επιφανειοδραστικών παραγόντων στα φυτά

Στα πλαίσια της αξιολόγησης των παραγόντων A και B, ακολουθήθηκαν δύο διαφορετικές προσεγγίσεις, ως προς τον τρόπο εφαρμογής τους στα φυτά. Στην πρώτη προσέγγιση, η εφαρμογή των παραγόντων στα φυτά έγινε με σταγόνες στην επιφάνεια του φύλλου, ενώ κατά την δεύτερη, οι παράγοντες εφαρμόστηκαν με ψεκασμό της φυλλικής επιφάνειας.

Όταν οι παράγοντες εφαρμόστηκαν στα φυτά με τη δημιουργία μίας σταγόνας 10 μl σε ένα από τα κατώτερα φύλλα κάθε φυτού, παρατηρήθηκε ότι η εφαρμογή τους στα φυτά προκαλούσε εκτεταμένη νέκρωση του φύλλου στο οποίο τοποθετούταν η σταγόνα, τόσο στα φυτά *Arabidopsis thaliana* (Εικόνα 3.1) όσο και στα φυτά καπνού. Η νέκρωση αυτή, ορισμένες φορές οδηγούσε και σε πτώση του φύλλου, ενώ παρατηρήθηκε σε όλες τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα, δηλαδή αυτές των 1,10, και 50 mM. Στα φυτά που δέχθηκαν επέμβαση με το μάρτυρα, όπου το προσκολλητικό Agral που χρησιμοποιήθηκε σε ποσοστό 0,02% του συνολικού όγκου, η νέκρωση που προκαλούσε η εφαρμογή της σταγόνας ήταν πολύ περιορισμένη στα φυτά *A. thaliana* σε σχέση με αυτή που προκαλούσαν οι συγκεντρώσεις των παραγόντων A και B, ενώ στα φυτά καπνού, η νέκρωση που προκάλεσε η επέμβαση με το μάρτυρα, ήταν αρκετά εκτεταμένη συγκρινόμενη με αυτή που προκάλεσαν οι συγκεντρώσεις των παραγόντων A και B.



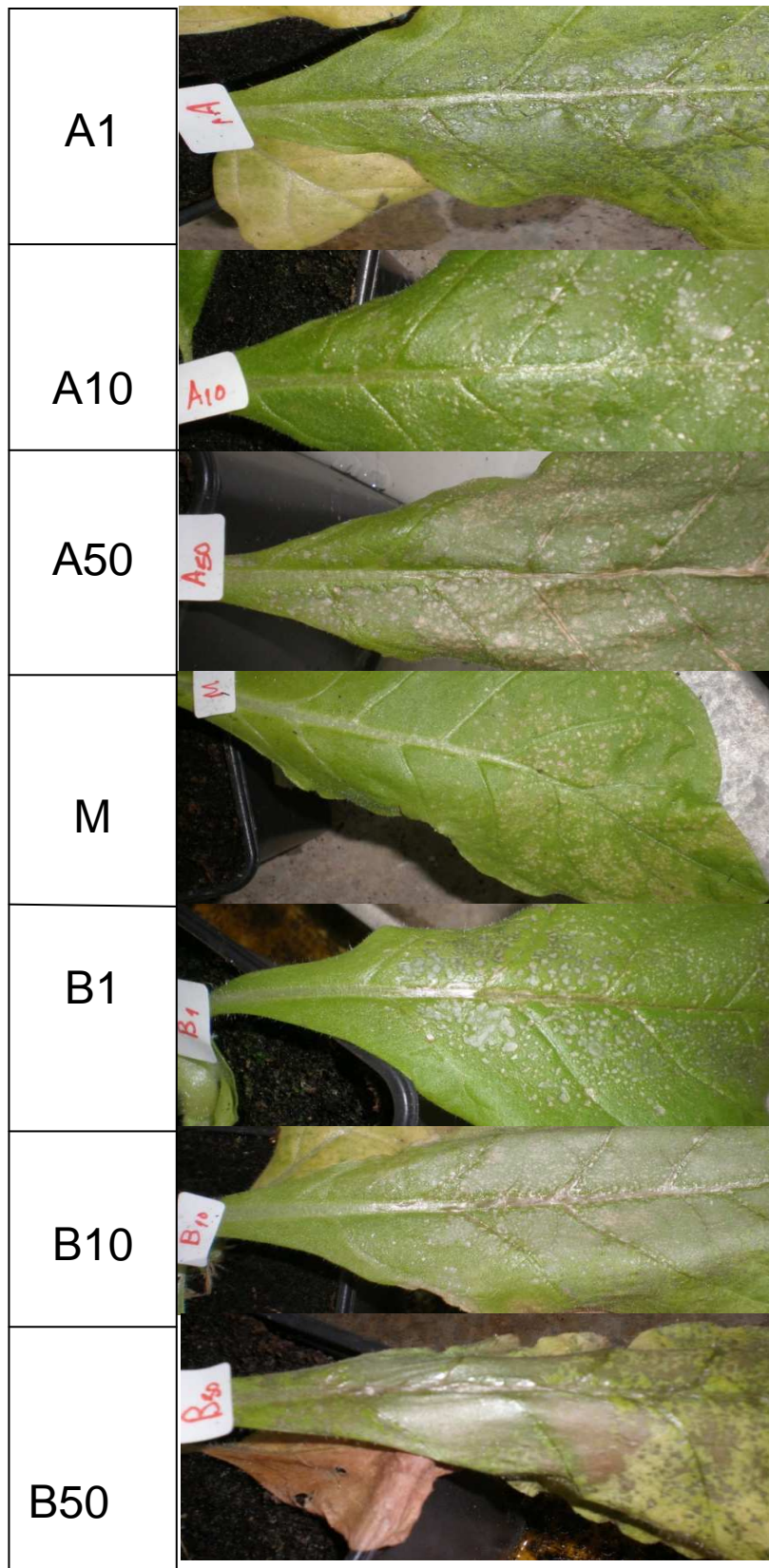
Εικόνα 3.1: Επίδραση του παράγοντα Β Νέκρωση (10μl/ 50 mM Β), σε φύλλο φυτού *Arabidopsis thaliana* περίπου 1 εβδομάδα μετά από τη μεταφύτευση του. Η νέκρωση που δημιούργησαν οι άλλες συγκεντρώσεις του παράγοντα Β καθώς και του Α ήταν παρόμοιες.

Πραγματοποιήθηκαν επίσης και δοκιμές όπου οι παράγοντες εφαρμόστηκαν στα φυτά με τη μέθοδο του ψεκασμού. Ο ψεκασμός έγινε με ειδικό σπρέι για τον ψεκασμό χρωμάτων, μέχρι να παρατηρηθεί απορροή από τη φυλλική επιφάνεια. Στην περίπτωση των φυτών *Arabidopsis thaliana* δοκιμάστηκαν οι δύο παράγοντες σε συγκεντρώσεις των 1, 5 και 10 mM (Εικόνα 3.2) ενώ στα φυτά καπνού οι συγκεντρώσεις των 1, 10 και 50 mM (Εικόνα 3.3). Σε όλες τις δοκιμές ανεξαιρέτως παρατηρήθηκε ιδιαίτερα εκτεταμένη νέκρωση σε ολόκληρη την φυλλική επιφάνεια, που οδηγούσε σύντομα σε νέκρωση του φυτού.

Εφόσον η εφαρμογή των παραγόντων στα φυτά με ψεκασμό, οδηγούσε σε νέκρωση ολόκληρου του φυτού, απορρίφθηκε. Σε όλα τα πειράματα παθογένειας που περιλαμβάνονται σε αυτή τη μελέτη, η εφαρμογή των παραγόντων έγινε με την δημιουργία σταγόνων στα φύλλα των φυτών. Ο ακριβής λόγος της αντίδρασης των φυτών με νέκρωση μετά την εφαρμογή των δύο παραγόντων, ίσως έχει σχέση με την χημική τους δομή και χρειάζεται να διερευνηθεί περισσότερο στο μέλλον.



Εικόνα 3.2: Επίδραση των παραγόντων A και B σε φυτά *Arabidopsis thaliana* ηλικίας 4 εβδομάδων που ψεκάστηκαν με ειδικό ψεκαστικό. Α) Από αριστερά ο Μάρτυρας με Agral 0,02% του όγκου του νερού, και φυτά με τον παράγοντα A 1, 5 και 10 mM. Β) Από αριστερά ο Μάρτυρας με Agral 0,02% του όγκου του νερού, και φυτά με τον παράγοντα B 1, 5 και 10 mM.



Εικόνα 3.3: Επίδραση των παραγόντων A και B (συγκεντρώσεις 1, 10 και 50 mM και Agral 0,02%) σε φυτά καπνού 6 εβδομάδων που ψεκάστηκαν μέχρι πλήρους διαβροχής και εμφάνισαν νεκρωτικές κηλίδες. Ο Μάρτυρας (M) ήταν νερό με Agral σε ποσοστό 0,02% του τελικού όγκου.

3.2 Αξιολόγηση της δράσης των επιφανειοδραστικών παραγόντων κατά του περονοσπόρου από τον *Hyaloperonospora parasitica*

Για την αξιολόγηση της ικανότητας των δύο παραγόντων A και B να επάγουν ανθεκτικότητα, έγιναν πειράματα παθογένειας με το παθογόνο *Hyaloperonospora parasitica*, σε φυτά *Arabidopsis thaliana* στα οποία μία εβδομάδα πριν τη μόλυνση, είχε γίνει εφαρμογή παραγόντων όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 2.2. Τα συμπτώματα αξιολογήθηκαν με τη μέτρηση των κονιδίων στα φυτά μετά από 7 ημέρες επώασης σε ειδικό θάλαμο (Εικόνα 3.4 και 3.5).

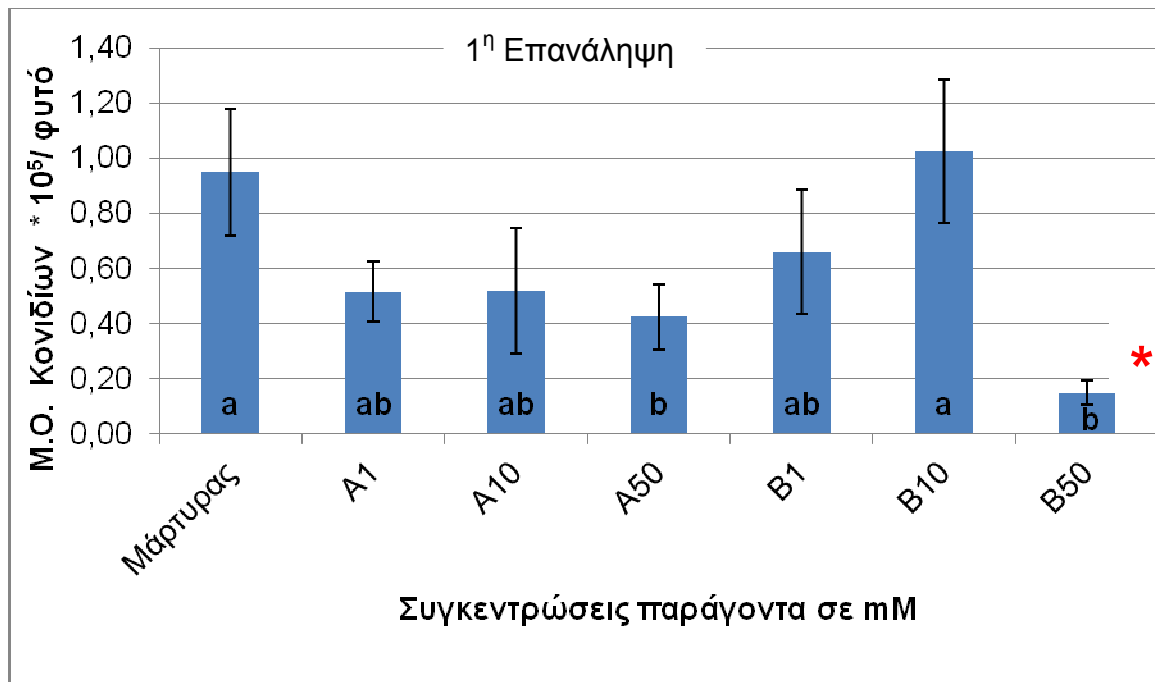


Εικόνα 3.4: Επίδραση των παραγόντων A και B στην εμφάνιση της ασθένειας του *H. parasitica* σε φυτά *A. thaliana* στα οποία έγινε εφαρμογή του παράγοντα A. Στις επάνω φωτογραφίες παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά φυτά από τις επεμβάσεις με το μάρτυρα (M) (νερό και Agral 0,02% του τελικού όγκου) και τον παράγοντα A σε συγκεντρώσεις 1, 10 και 50 mM, και οι εξανθήσεις από κονιδιοφόρους του παθογόνου 7 ημέρες μετά τη μόλυνση.



Εικόνα 3.5: Επίδραση των παραγόντων A και B στην εμφάνιση της ασθένειας του *H. parasitica* σε φυτά *A. thaliana* στα οποία έγινε εφαρμογή του παράγοντα B. Στις επάνω φωτογραφίες παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά φυτά από τις επεμβάσεις με το μάρτυρα (M) (νερό και Agral 0,02% του τελικού όγκου) και τον παράγοντα B σε συγκεντρώσεις 1, 10 και 50 mM, και οι εξανθήσεις από κονιδιοφόρους του παθογόνου 7 ημέρες μετά τη μόλυνση.

Τα πειράματα παθογένειας έγιναν σε 3 ανεξάρτητες επαναλήψεις. Τα αποτελέσματα από το πρώτο πείραμα, απεικονίζονται στο Διάγραμμα 3.1, όπου για κάθε διαφορετική επέμβαση, έχει υπολογισθεί ο μέσος όρος των κονιδίων και το στατιστικό σφάλμα. Οι τιμές αυτές εισήχθησαν στο πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης STATGRAPHICS Plus και επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο ANOVA, και οι μέσοι όροι διαχωρίστηκαν με τη μέθοδο πολλαπλής δοκιμής του Fisher, Least Significant Difference (LSD) .



Διάγραμμα 3.1: Αξιολόγηση της δράσης των παραγόντων A και B στο μέσο όρο των κονιδίων ανά επέμβαση για το πρώτο πείραμα παθογένειας, 7 ημέρες μετά τη μόλυνση με τον *H. parasitica*. Οι διαφορετικές επεμβάσεις είναι για τον παράγοντα A και B, 1, 10 και 50 mM αντίστοιχα και ο μάρτυρας έχει δεχθεί πριν τη μόλυνση επέμβαση με νερό και Argal (0,02% του όγκου του νερού). Οι κάθετες στήλες αντιπροσωπεύουν την απόκλιση από το μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα. Στη βάση κάθε στήλης αναγράφεται ένα γράμμα ανάλογα με το διαχωρισμό που έγινε από το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης, και διαφέρουν στατιστικά σε επίπεδο σημαντικότητας ($P \leq 0.05$). Οι στήλες με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά σύμφωνα με τη μέθοδο LSD. (*) (στην επέμβαση αυτή αυτό ο φυτικός ιστός καταστράφηκε αρκετά από την εφαρμογή του παράγοντα).

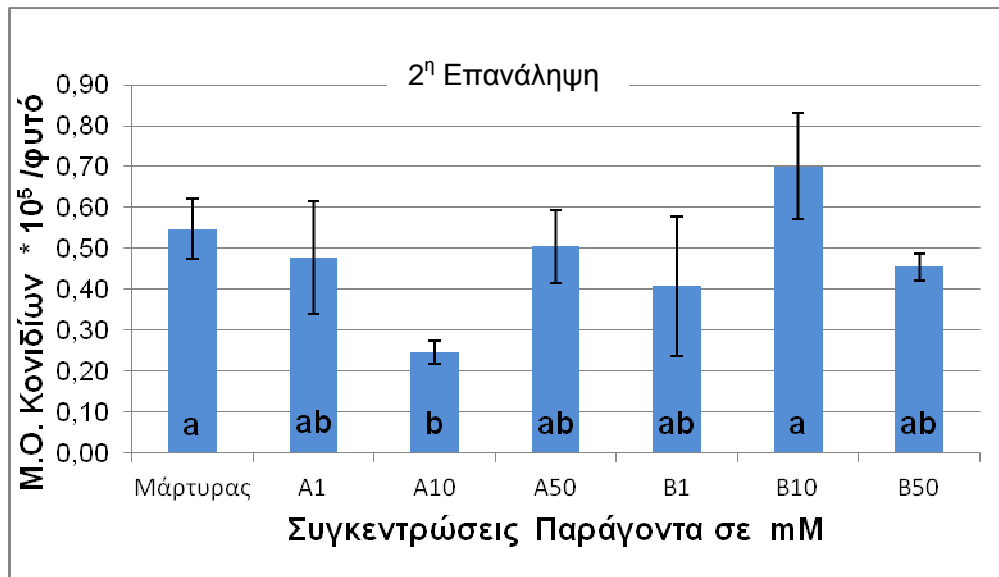
Τα αποτελέσματα από το πρώτο πείραμα παθογένειας, μετά τη στατιστική ανάλυση, υποδεικνύουν ότι στατιστικά σημαντική διαφορά υπάρχει μόνο μεταξύ της επέμβασης του μάρτυρα με την επέμβαση με τον παράγοντα A σε συγκέντρωση 50mM, που φαίνεται να έχει καλύτερα αποτελέσματα στον περιορισμό της παραγωγής κονιδίων από το μύκητα και άρα της ασθένειας. Επίσης στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρείται και μεταξύ των επεμβάσεων με τον παράγοντα A σε συγκέντρωση 50mM και τον παράγοντα B σε συγκέντρωση 10 mM. Το αποτέλεσμα για την επέμβαση B50, δεν λήφθηκε υπόψιν, καθώς ο αριθμός των κονιδίων/ml που μετρήθηκαν, ήταν πολύ μικρός εξαιτίας της καταστροφής του φυτικού ιστού των δειγμάτων αυτών από τη νεκρωτική δράση του παράγοντα στη συγκέντρωση αυτή. Η επέμβαση με το παράγοντα A50 mM, αποδείχθηκε ότι μειώνει την παραγωγή κονιδίων από το μύκητα στο μισό (56%) σε σχέση με το μάρτυρα και την επέμβαση B10. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι επεμβάσεις A1 και A10 (ο παράγοντας A σε

συγκεντρώσεις 1 και 10mM), ήταν επίσης πάρα πολύ κοντά σε αριθμό κονιδίων/ml στην επέμβαση A50, η τάση δηλαδή είναι ο παράγοντας A να μειώνει το επίπεδο του μολύσματος.

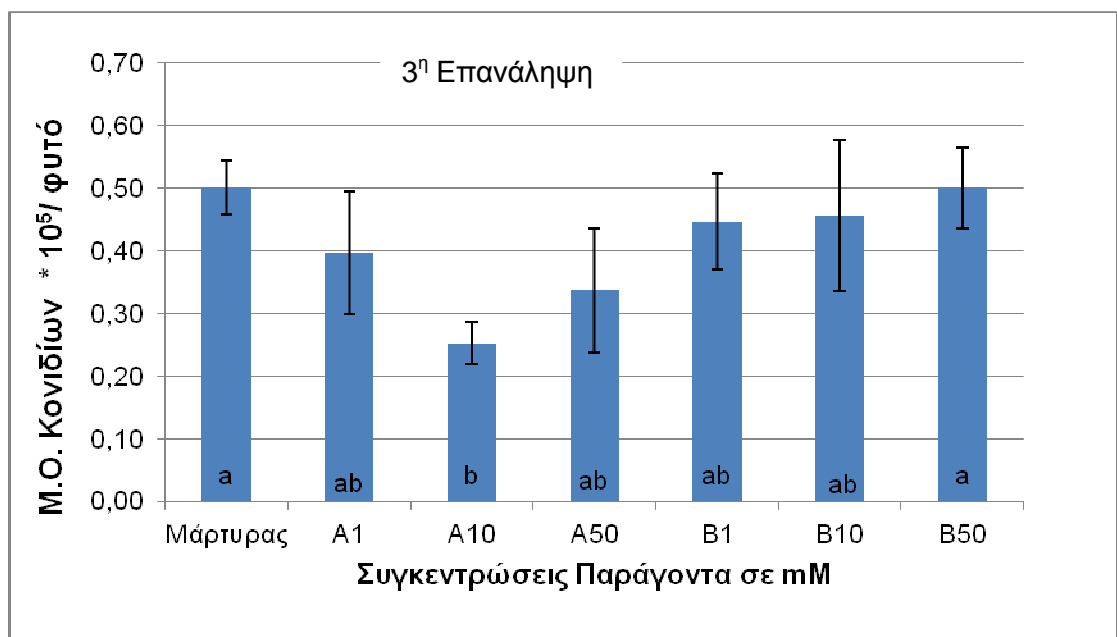
Στα επόμενα δύο πειράματα παθογένειας ακολουθήθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία και τα αποτελέσματα απεικονίζονται στο Διάγραμμα 3.2 για το δεύτερο και στο Διάγραμμα 3.3 για το τρίτο πείραμα παθογένειας.

Η στατιστική ανάλυση στο δεύτερο και τρίτο πείραμα παθογένειας, κατέδειξε παρόμοια διαφοροποίηση των επεμβάσεων με το μάρτυρα και τους δύο παράγοντες. Και στα δύο πειράματα, στην επέμβαση με τον παράγοντα A10 το ποσοστό μείωσης της ασθένειας ήταν σχεδόν 50% σε σχέση με την επέμβαση με το μάρτυρα, υποδεικνύοντας πως είχε στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα στον περιορισμό της ασθένειας. Στο δεύτερο και τρίτο πείραμα ο παράγοντας B σε συγκέντρωση 10mM, βρέθηκε στατιστικά μη σημαντικό συγκριτικά με το μάρτυρα.

Συμπερασματικά, ο παράγοντας A10, αποδεικνύεται αποτελεσματικότερος στην περιορισμό της ασθένειας, με στατιστικά σημαντική διαφορά και από το μάρτυρα και από τις άλλες επεμβάσεις. Ο λόγος της απόκλισης στο πρώτο πείραμα παθογένειας είναι πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι είχε τοποθετηθεί μόνο ένα φυτό/ γλαστράκι (σε αντίθεση με τα 5 φυτά/ γλαστράκι των άλλων δύο επαναλήψεων), με αποτέλεσμα να υπάρχει μεγαλύτερο σφάλμα κατά την μέτρηση των κονιδίων, αλλά και η νεκρωτική δράση που εμφανίζουν οι παράγοντες να έχει μεγαλύτερη επιρροή στην εξέλιξη του βιολογικού κύκλου του παθογόνου.



Διάγραμμα 3.2: Αξιολόγηση της δράσης των παραγόντων A και B στο μέσο όρο των κονιδίων ανά επέμβαση για το δεύτερο πείραμα παθογένειας, 7 ημέρες μετά τη μόλυνση με τον *H. parasitica*. Οι διαφορετικές επεμβάσεις είναι για τον παράγοντα A και B, 1, 10 και 50 mM αντίστοιχα και ο μάρτυρας έχει δεχθεί πριν τη μόλυνση επέμβαση με νερό και Argal (0,02% του όγκου του νερού). Οι κάθετες στήλες αντιπροσωπεύουν την απόκλιση από το μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα. Στη βάση κάθε στήλης αναγράφεται ένα γράμμα ανάλογα με το διαχωρισμό που έγινε από το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης, και διαφέρουν στατιστικά σε επίπεδο σημαντικότητας ($P \leq 0.05$). Οι στήλες με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά σύμφωνα με τη μέθοδο LSD.



Διάγραμμα 3.3: Αξιολόγηση της δράσης των παραγόντων A και B στο μέσο όρο των κονιδίων ανά επέμβαση για το τρίτο πείραμα παθογένειας, 7 ημέρες μετά τη μόλυνση με τον *H. parasitica*. Οι διαφορετικές επεμβάσεις είναι για τον παράγοντα A και B, 1, 10 και 50 mM αντίστοιχα και ο μάρτυρας έχει δεχθεί πριν τη μόλυνση επέμβαση με νερό και Argal (0,02% του όγκου του νερού). Οι κάθετες στήλες αντιπροσωπεύουν την απόκλιση από το μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα. Στη βάση κάθε στήλης αναγράφεται ένα γράμμα ανάλογα με το διαχωρισμό που έγινε από το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης, και διαφέρουν στατιστικά σε επίπεδο σημαντικότητας ($P \leq 0.05$). Οι στήλες με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά σύμφωνα με τη μέθοδο LSD.

3.3 Αξιολόγηση της δράσης των επιφανειοδραστικών παραγόντων κατά των αδρομυκώσεων από το *Verticillium dahliae*

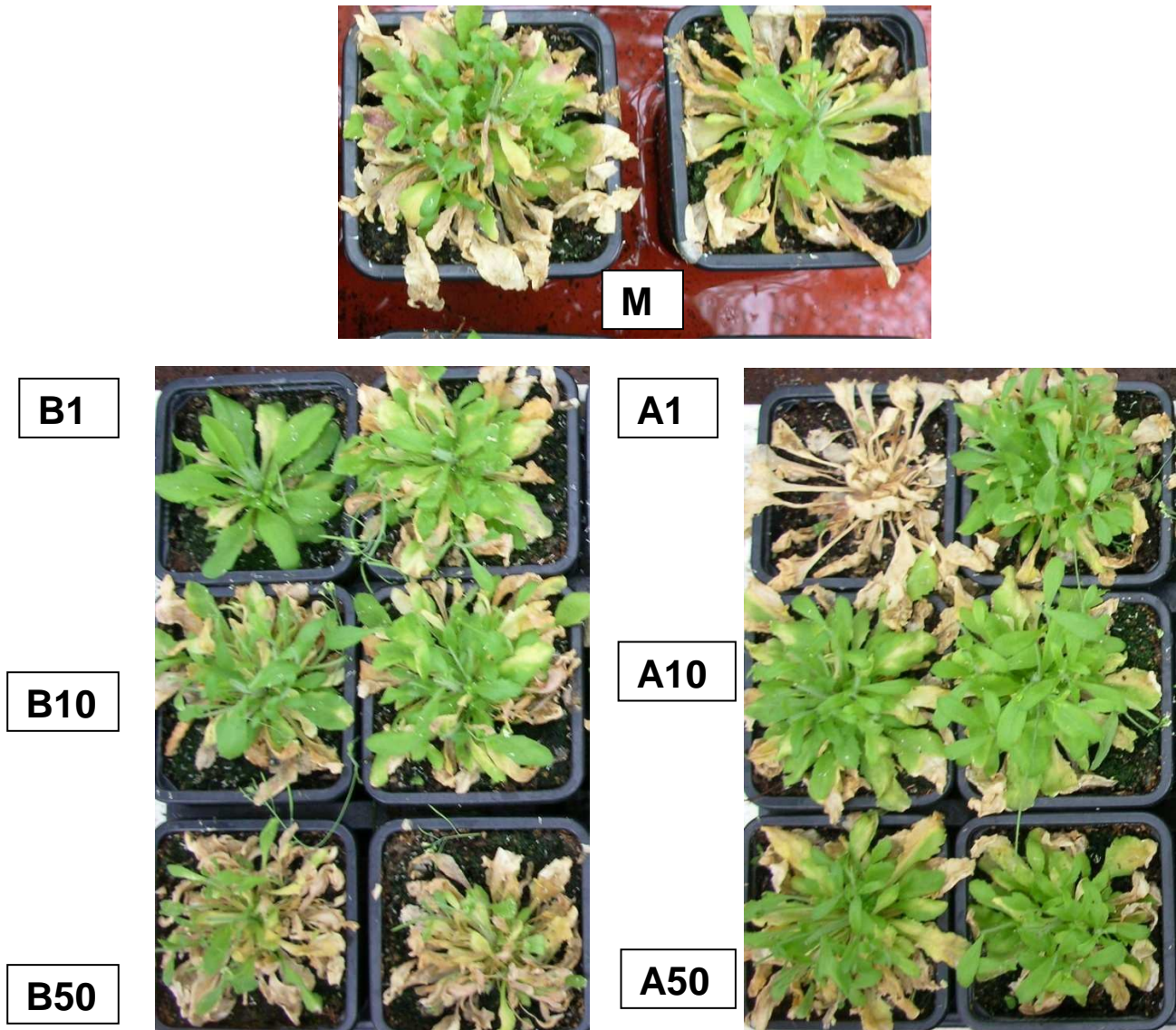
Για την αξιολόγηση της ικανότητας των δύο παραγόντων A και B να επάγουν ανθεκτικότητα κατά των αδρομυκώσεων, έγιναν πειράματα παθογένειας με το παθογόνο *Verticillium dahliae*, σε φυτά *Arabidopsis thaliana* στα οποία μία εβδομάδα πριν τη μόλυνση, είχε γίνει εφαρμογή παραγόντων όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 2.2. Τα πρώτα συμπτώματα εμφανίζονταν περίπου 2 εβδομάδες μετά τη μόλυνση και είχαν τη μορφή της χλώρωσης και απώλειας σπαργής των φύλλων. Η καταγραφή των συμπτωμάτων έγινε μέχρι και περίπου 30 μέρες μετά την μόλυνση και για τα τρία πειράματα παθογένειας που διεξήχθησαν ανεξάρτητα, χωρίς να παρατηρείται εκ πρώτης όψεως κάποια επέμβαση που να εμφάνιζε ηπιότερα συμπτώματα και αργή εξέλιξη της ασθένειας, συγκρινόμενος με τους υπόλοιπους (Εικόνα 3.6).

Έγινε γραφική αναπαράσταση του ποσοστού της ασθένειας, σε σχέση με τον χρόνο και υπολογίσθηκε ο δείκτης AUDPC και η σχετική AUDPC. Οι τιμές αυτές εισήχθησαν στο πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης STATGRAPHICS Plus και επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο ANOVA, και οι μέσοι όροι διαχωρίστηκαν με τη μέθοδο πολλαπλής δοκιμής του Fisher, Least Significant Difference (LSD).

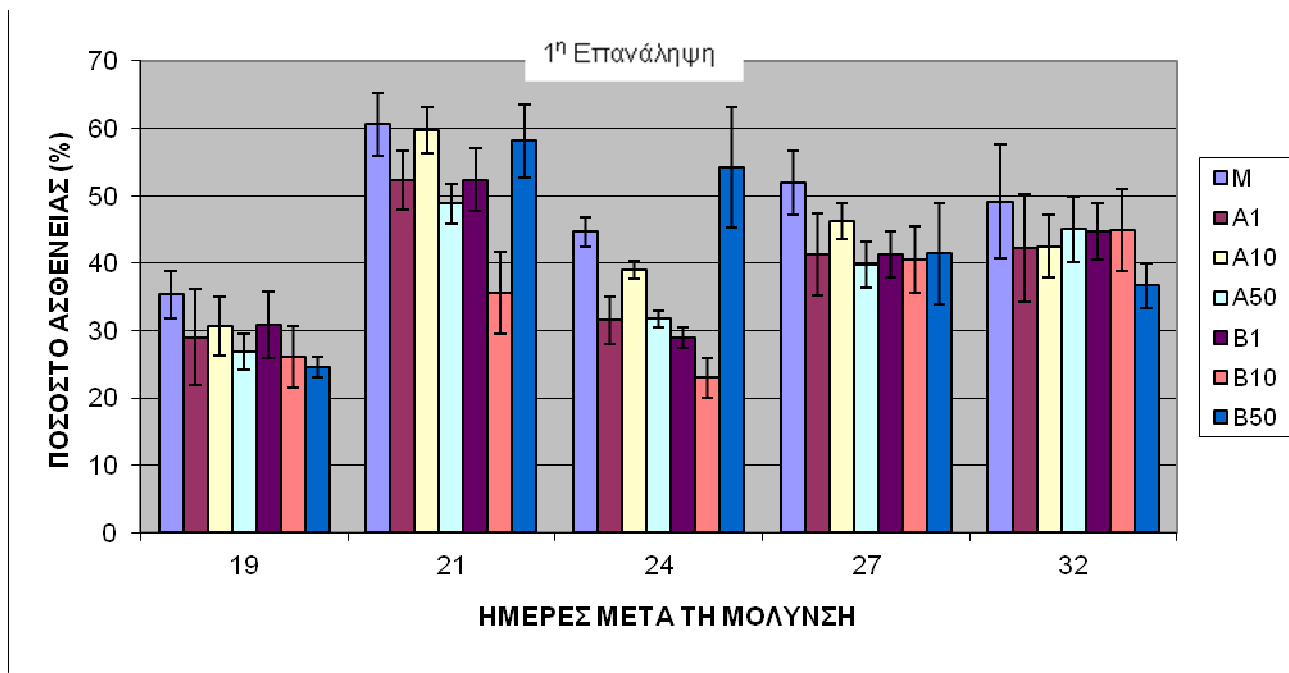
Για κάθε πείραμα παθογένειας παρουσιάζονται δύο γραφικές παραστάσεις, μια που αφορά το ποσοστό ασθένειας με την πάροδο του χρόνου για κάθε επέμβαση (Διαγράμματα 3.4(A), 3.5(A) και 3.6(A)) , και μία όπου παρουσιάζεται η σχετική AUDPC όπως υπολογίστηκε για κάθε επέμβαση στα Διαγράμματα 3.4(B), 3.5(B) και 3.6(B).

Στο πρώτο πείραμα παθογένειας Διάγραμμα 3.4(A) και Διάγραμμα 3.4(B), στις επεμβάσεις με τους A50 και B10, το ποσοστό της ασθένειας παραμένει καθόλη τη διάρκεια των μετρήσεων σε ποσοστά κάτω του 50%. Ειδικότερα, την 21^η ημέρα μετά τη μόλυνση, το ποσοστό ασθένειας για την επέμβαση B10 είναι σχεδόν στο μισό σε σχέση με το μάρτυρα και την 24^η μέρα μετά τη μόλυνση, όλες οι επεμβάσεις A50, B1 και B10 διατηρούν ιδιαίτερα χαμηλό ποσοστό ασθένειας (15% λιγότερο από το μάρτυρα). Η στατιστική ανάλυση υποδεικνύει αυτές τις δύο επεμβάσεις (A50 και B10)

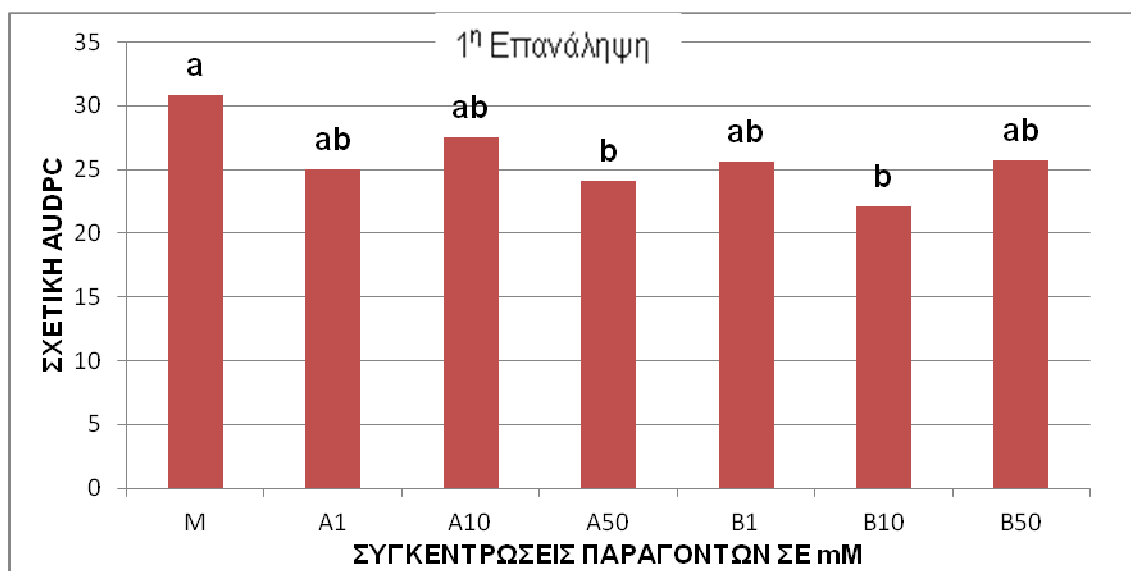
ως τις μόνες με στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το μάρτυρα. Όλες οι υπόλοιπες επεμβάσεις εμφανίζουν απλά μια μικρή τάση διαφοροποίησης.



Εικόνα 3.6: Επίδραση των παραγόντων A και B στην εμφάνιση της ασθένειας του *V. dahliae* σε φυτά *A. thaliana* στα οποία έγινε εφαρμογή των παραγόντων A και B. Πάνω φαίνονται αντιπροσωπευτικά φυτά από τις επεμβάσεις με το μάρτυρα (M), (νερό και Agral 0,02% του τελικού όγκου) και τον παράγοντα A και B σε συγκεντρώσεις 1, 10 και 50 mM, και οι χαρακτηριστικές νεκρώσεις στα φύλλα που προκαλεί το παθογόνο, από το πρώτο πείραμα παθογένειας 27 ημέρες μετά τη μόλυνση.

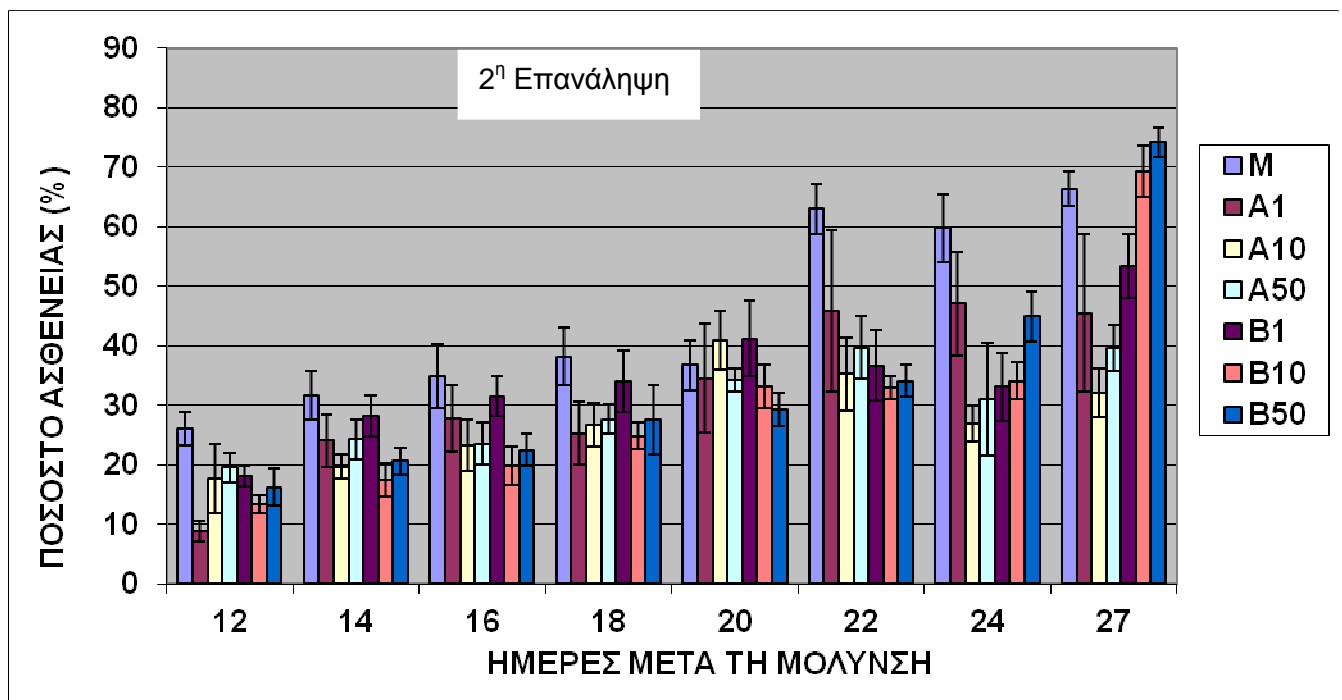


Διάγραμμα 3.4(A): Αξιολόγηση της επίδρασης των παραγόντων A και B στο ποσοστό ασθενών φύλλων μετά τη μόλυνση με τον *V. dahliae* σε φυτά *A. thaliana* στο πρώτο πείραμα παθογένειας. Η ένταση της ασθένειας υπολογίστηκε για κάθε μέρα καταγραφής των συμπτωμάτων ως το ποσοστό (%) του αριθμού των ασθενών φύλλων ως προς το συνολικό αριθμό των φύλλων για κάθε φυτό. Οι κάθετες μπάρες αντιπροσωπεύουν την απόκλιση από το μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα. Ο άξονας X αναπαριστά τις ημέρες μετά τη μόλυνση με το παθογόνο. Ως M αναφέρεται ο μάρτυρας, και οι παράγοντες A και B συνοδεύονται από ένα αριθμό, τη συγκέντρωση σε mM.

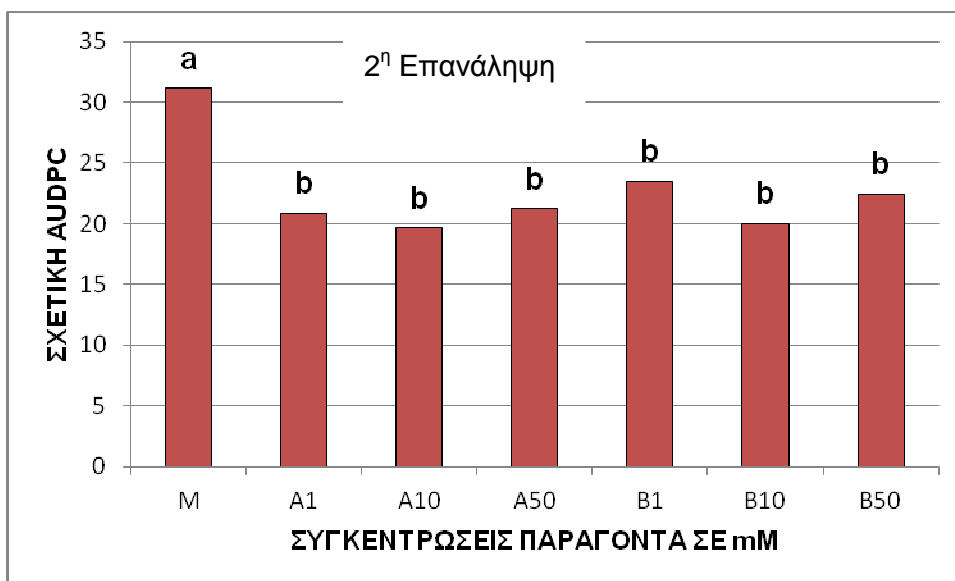


Διάγραμμα 3.4(B): Καμπύλη εξέλιξης της ασθένειας (AUDPC) με υπολογισμό του εμβαδού με τη μέθοδο της τραπεζοειδούς ολοκλήρωσης (Campbell και Madden, 1990). Υπολογίστηκε το εμβαδόν στη γραφική παράσταση 3.4 (A) με το χρόνο και η ασθένεια εκφράστηκε ως το ποσοστό του μέγιστου εμβαδού για όλη τη διάρκεια του πειράματος, (Σχετική AUDPC)(Koronel et al., 2001). Πάνω από κάθε στήλη αναγράφεται ένα γράμμα ανάλογα με το διαχωρισμό που έγινε από το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης, και διαφέρουν στατιστικά σε επίπεδο σημαντικότητας ($P \leq 0.05$).

Στο δεύτερο πείραμα παθογένειας υπάρχει μια τελείως διαφορετική εικόνα, καθώς όλες οι επεμβάσεις εξελίσσονται με την ίδια περίπου ένταση Διάγραμμα 3.5(A), γεγονός που παρουσιάζεται και από το Διάγραμμα 3.5(B), όπου όλες οι επεμβάσεις έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά με το μάρτυρα αλλά όχι και μεταξύ τους. Οι επεμβάσεις με τους A10 και B10, εμφάνισαν σχετική AUDPC, ίση ή και λιγότερη από 20%.



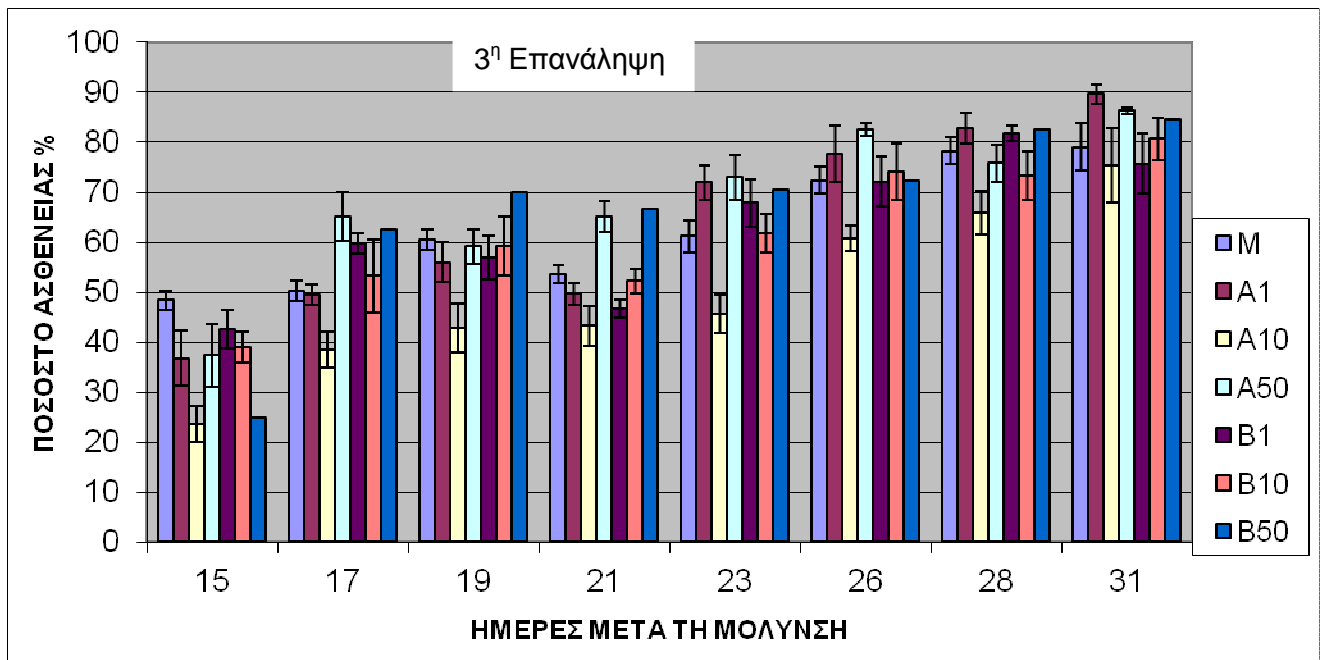
Διάγραμμα 3.5(A): Αξιολόγηση της επίδρασης των παραγόντων A και B στο ποσοστό ασθενών φύλλων μετά τη μόλυνση με τον *V. dahliae* σε φυτά *A. thaliana* στο δεύτερο πείραμα παθογένειας. Η ένταση της ασθένειας υπολογίστηκε για κάθε μέρα καταγραφής των συμπτωμάτων ως το ποσοστό (%) του αριθμού των ασθενών φύλλων ως προς το συνολικό αριθμό των φύλλων για κάθε φυτό. Οι κάθετες μπάρες αντιπροσωπεύουν την απόκλιση από το μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα. Ο άξονας X αναπαριστά τις ημέρες μετά τη μόλυνση με το παθογόνο. Ως M αναφέρεται ο μάρτυρας, και οι παράγοντες A και B συνοδεύονται από ένα αριθμό, τη συγκέντρωση σε mM.



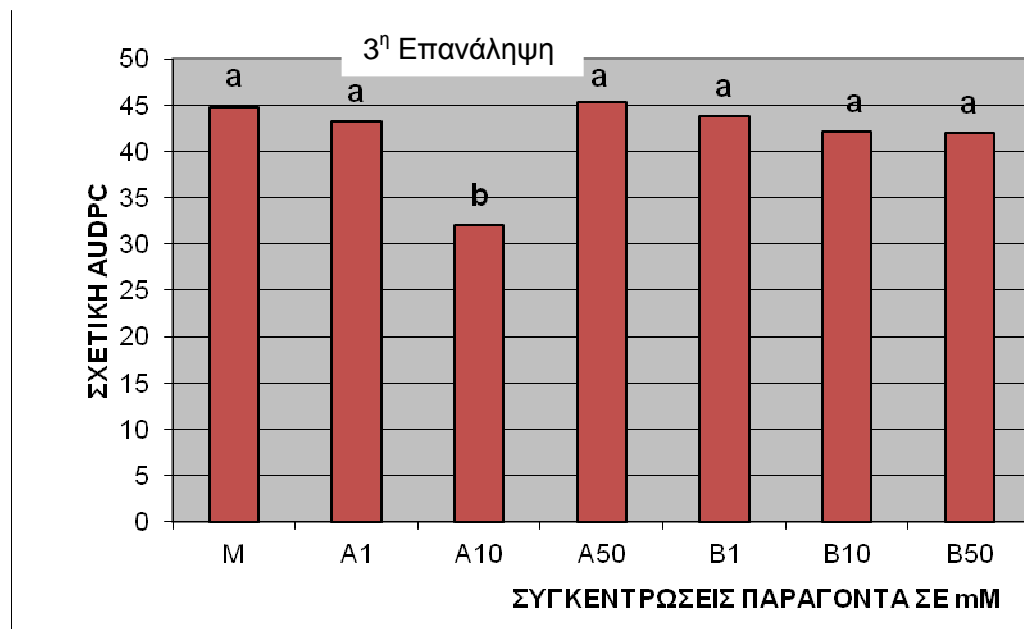
Διάγραμμα 3.5(B): Καμπύλη εξέλιξης της ασθένειας (AUDPC) με υπολογισμό του εμβαδού με τη μέθοδο της τραπεζοειδούς ολοκλήρωσης (Campbell και Madden, 1990). Υπολογίστηκε το εμβαδόν στη γραφική παράσταση 3.5 (A) με το χρόνο και η ασθένεια εκφράστηκε ως το ποσοστό του μέγιστου εμβαδού για όλη τη διάρκεια του πειράματος, (Σχετική AUDPC)(Kogonvel et al., 2001) . Πάνω από κάθε στήλη αναγράφεται ένα γράμμα ανάλογα με το διαχωρισμό που έγινε από το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης, και διαφέρουν στατιστικά σε επίπεδο σημαντικότητας ($P \leq 0.05$).

Στο τρίτο πείραμα παθογένειας, η επέμβαση με τον παράγοντα A10, έχει στατιστικά σημαντικά καλύτερα αποτελέσματα σε όλη τη διάρκεια εξέλιξης της ασθένειας. Μόνο στις 15 ημέρες μετά τη μόλυνση με το παθογόνο, η επέμβαση με το παράγοντα B50 και στις 21 ημέρες η επέμβαση με το παράγοντα A1, έχουν σχεδόν τα ίδια ποσοστά με τον A10 Διάγραμμα 3.6(A). Παρόλα αυτά στο Διάγραμμα 3.6(B), φαίνεται από την στατιστική ανάλυση των τιμών της σχετικής AUDPC, ότι η επέμβαση με τον παράγοντα A10 διαφέρει κατά πολύ από όλες τις υπόλοιπες, που κρίνονται ισοδύναμοι.

Συνοψίζοντας για τα τρία πειράματα παθογένειας, η εφαρμογή των παραγόντων στα φυτά *A. thaliana*, κατά του *V. dahliae*, δεν έδωσε όμοια αποτελέσματα. Ο παράγοντας A10 φαίνεται να περιορίζει το ποσοστό της ασθένειας αλλά χρειάζεται περαιτέρω πειραματισμός. Πιθανόν η ταυτόχρονη επανάληψη των πειραμάτων παθογένειας στο χώρο και το χρόνο να έδειχνε πιο σαφή αποτελέσματα, η οποία τώρα ήταν εμφανής λόγω του περιορισμένου αριθμού επαναλήψεων (5 φυτά) σε κάθε.



Διάγραμμα 3.6(A): Αξιολόγηση της επίδρασης των παραγόντων A και B στο ποσοστό ασθενών φύλλων μετά τη μόλυνση με τον *V. dahliae* σε φυτά *A. thaliana* στο τρίτο πείραμα παθογένειας. Η ένταση της ασθένειας υπολογίστηκε για κάθε μέρα καταγραφής των συμπτωμάτων ως το ποσοστό (%) του αριθμού των ασθενών φύλλων ως προς το συνολικό αριθμό των φύλλων για κάθε φυτό. Οι κάθετες μπάρες αντιπροσωπεύουν την απόκλιση από το μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα. Ο άξονας X αναπαριστά τις ημέρες μετά τη μόλυνση με το παθογόνο. Ως M αναφέρεται ο μάρτυρας, και οι παράγοντες A και B συνοδεύονται από ένα αριθμό, τη συγκέντρωση σε mM.



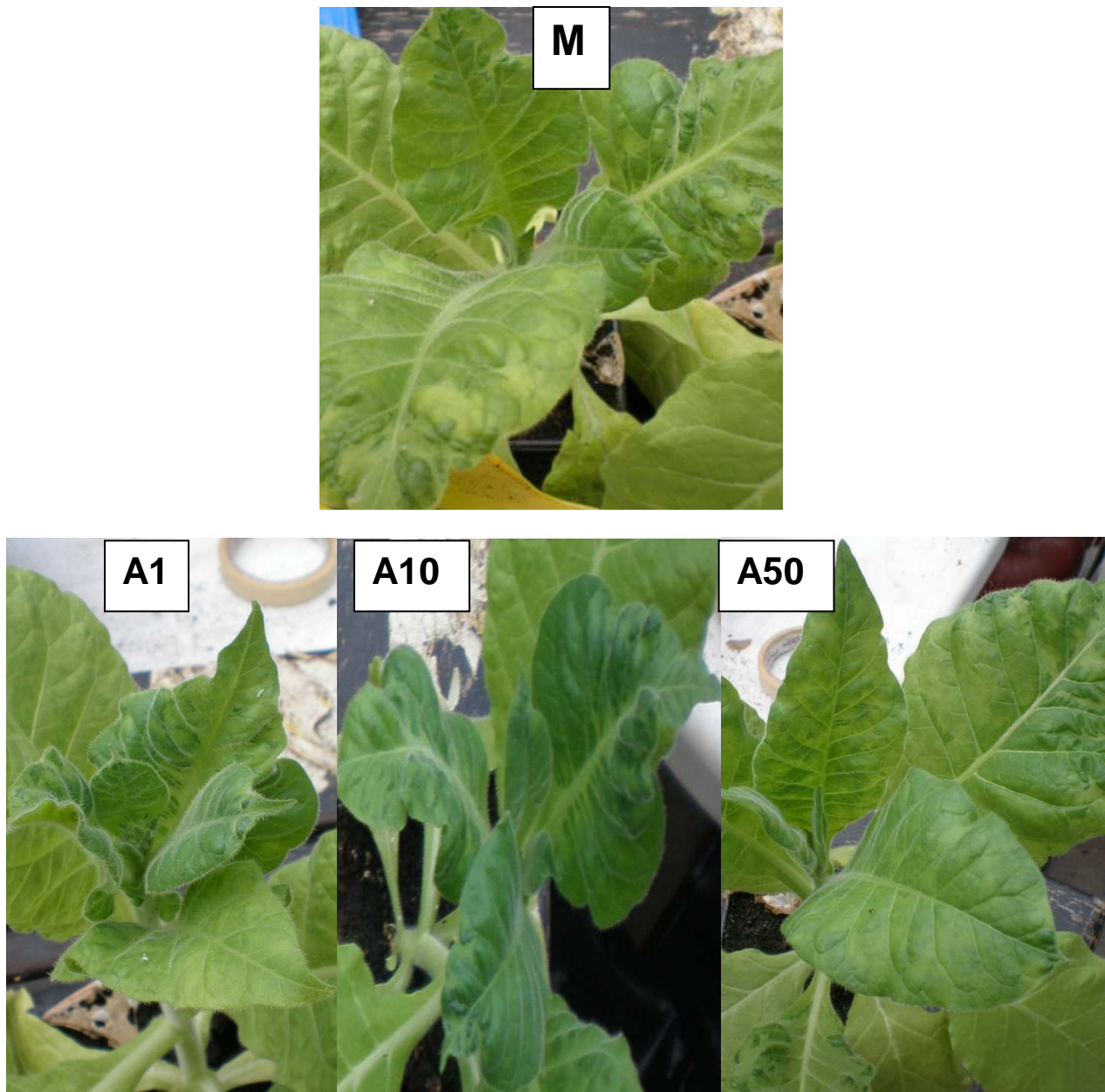
Διάγραμμα 3.6(B): Καμπύλη εξέλιξης της ασθένειας (AUDPC) με υπολογισμό του εμβαδού με τη μέθοδο της τραπεζοειδούς ολοκλήρωσης (Campbell και Madden, 1990). Υπολογίστηκε το εμβαδόν στη γραφική παράσταση 3.6 (A) με το χρόνο και η ασθένεια εκφράστηκε ως το ποσοστό του μέγιστου εμβαδού για όλη τη διάρκεια του πειράματος, (Σχετική AUDPC)(Koronel et al., 2001) . Πάνω από κάθε στήλη αναγράφεται ένα γράμμα ανάλογα με το διαχωρισμό που έγινε από το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης, και διαφέρουν στατιστικά σε επίπεδο σημαντικότητας ($P \leq 0.05$).

3.4 Αξιολόγηση της δράσης των επιφανειοδραστικών παραγόντων στον ιό του μωσαϊκού του καπνού TMV

Για την αξιολόγηση της ικανότητας των δύο παραγόντων A και B να επάγουν ανθεκτικότητα σε ιώσεις, έγιναν πειράματα παθογένειας με τον ιό του μωσαϊκού του καπνού, σε δύο ποικιλίες φυτών *Nicotiana tabacum*, τις Petite Gerard (PG) και Petite Havana (PH). Στα φυτά μία εβδομάδα πριν τη μόλυνση, είχε γίνει εφαρμογή παραγόντων όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 2.2. Τα φυτά της ποικιλίας Petite Gerard, εκδηλώσαν αντίδραση υπερευαισθησίας στον ιό του μωσαϊκού του καπνού, στα σημεία που εφαρμόστηκε το μόλυσμα. Τα φυτά της ποικιλίας Petite Havana όμως εμφάνισαν τα τυπικά συμπτώματα από τη μόλυνση με τον ιό, δηλαδή το χαρακτηριστικό μωσαϊκό, πρώτα στα νεώτερα φύλλα της κορυφής του στελέχους, σε διάστημα 2 εβδομάδων μετά τη μόλυνση. Στη συνέχεια τα συμπτώματα εξαπλώθηκαν διασυστηματικά και στα κατώτερα φύλλα με την εξέλιξη της ασθένειας (Εικόνα 3.7 (A) και (B)).

Τα πειράματα επαναλήφθηκαν δύο φορές ανεξάρτητα, με 6 επαναλήψεις σε κάθε επέμβαση. Στα φυτά *N. tabacum* της ποικιλίας Petite Gerard (PG), εμφάνισαν νεκρωτικές κηλίδες στην επιφάνεια του φύλλου που τοποθετήθηκε το μόλυσμα, σαν αποτέλεσμα της έκφρασης αντίδρασης υπερευαισθησίας (Εικόνα 3.8). Έγινε προσπάθεια μακροσκοπικής καταμέτρησης των νεκρωτικών κηλίδων στην επιφάνεια των φύλλων των μολυσμένων φυτών για όλες οι επεμβάσεις και στις δύο επαναλήψεις των πειραμάτων παθογένειας, στην προσπάθεια εξαγωγής χρήσιμων συμπερασμάτων για την αξιολόγηση των δύο παραγόντων, χωρίς αποτέλεσμα, αφού δεν εμφάνιζαν κάποια συσχέτιση.

Για τα φυτά *N. tabacum* της ποικιλίας Petite Havana (PH), έγινε γραφική αναπαράσταση του ποσοστού της ασθένειας, σε σχέση με τον χρόνο, ενώ υπολογίσθηκε ο δείκτης AUDPC και η σχετική AUDPC. Οι τιμές αυτές εισήχθησαν στο πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης STATGRAPHICS Plus και επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο ANOVA, και οι μέσοι όροι διαχωρίστηκαν με τη μέθοδο πολλαπλής δοκιμής του Fisher, Least Significant Difference (LSD).



Εικόνα 3.7 (Α): Αξιολόγηση της επίδρασης του παράγοντα A στην εμφάνιση της ασθένειας του TMV σε φυτά *N. tabacum*. Πάνω φαίνονται αντιπροσωπευτικά φυτά από τις επεμβάσεις με το μάρτυρα (M) (νερό και Agral 0,02% του τελικού όγκου) και τον παράγοντα A σε συγκεντρώσεις 1, 10 και 50 mM, και τα χαρακτηριστικά συμπτώματα μωσαϊκού στα φύλλα που προκαλεί το παθογόνο, 30 ημέρες μετά τη μόλυνση.

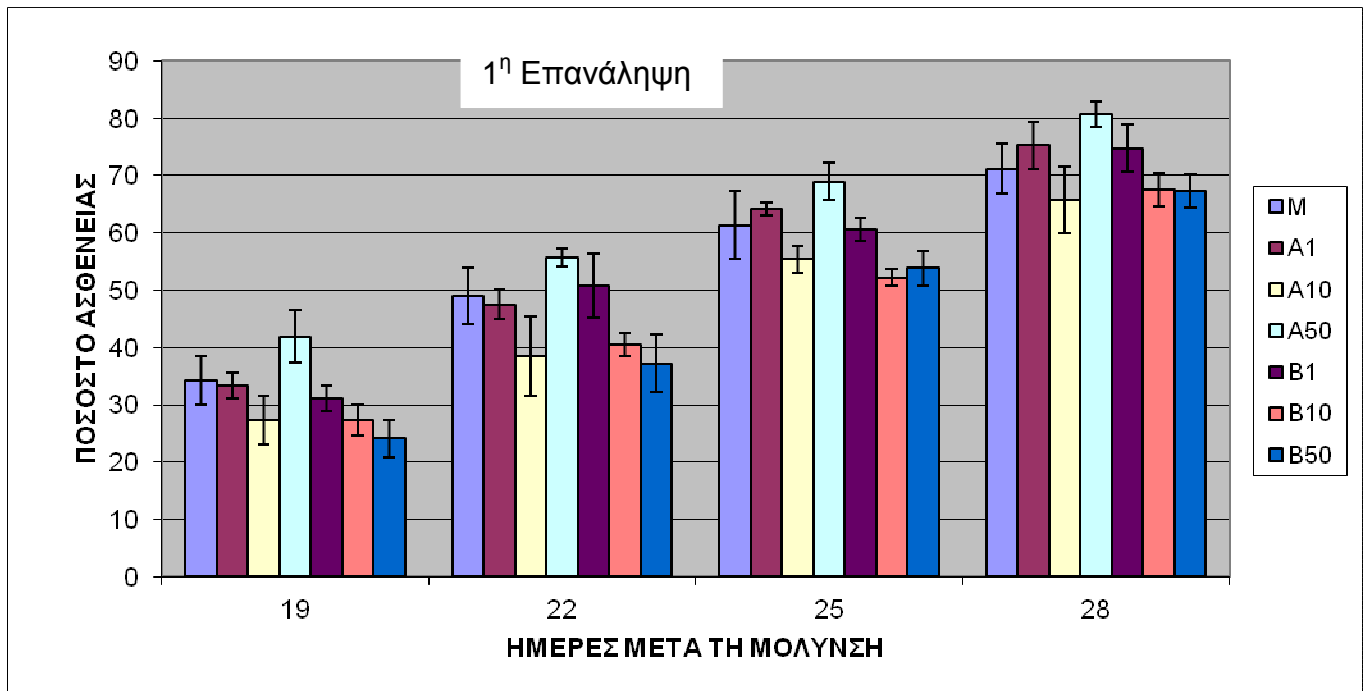


Εικόνα 3.7 (B) : Αξιολόγηση της επίδρασης του παράγοντα Β στην εμφάνιση της ασθένειας του TMV σε φυτά *N. tabacum* . Πάνω φαίνονται αντιπροσωπευτικά φυτά από τις επεμβάσεις με το μάρτυρα (M) (νερό και Agral 0,02% του τελικού όγκου) και τον παράγοντα Β σε συγκεντρώσεις 1, 10 και 50 mM, και τα χαρακτηριστικά συμπτώματα μωσαϊκού στα φύλλα που προκαλεί το παθογόνο, 30 ημέρες μετά τη μόλυνση.

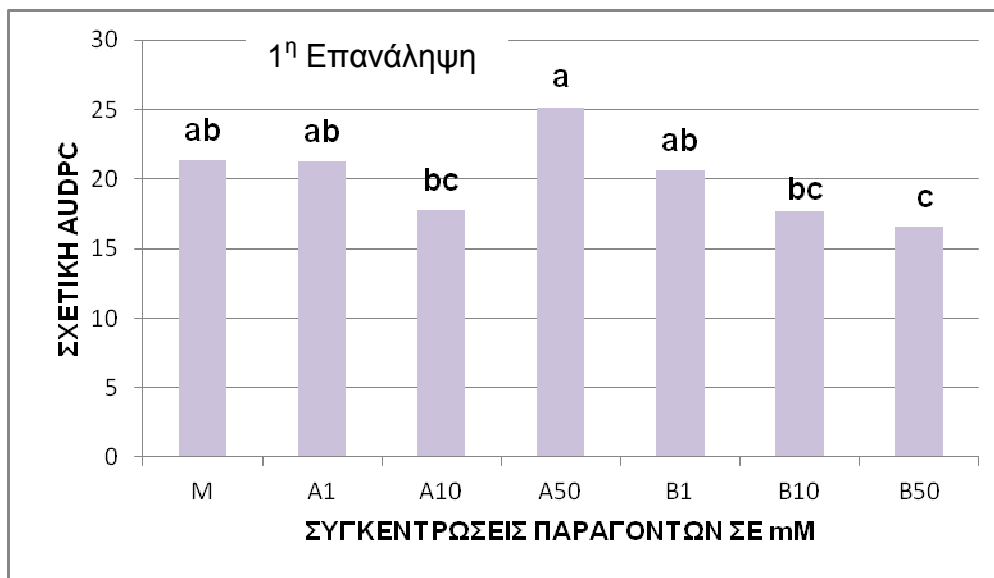


Εικόνα 3.8: Νεκρωτικές κηλίδες λόγω της αντίδρασης υπερευσθησίας σε φύλλο *Nicotiana tabacum* ποικιλία ΡΗ, 4 ημέρες μετά τη μόλυνση με τον ιό TMV.

Στο πρώτο πείραμα παθογένειας, από το Διάγραμμα 3.7(A), παρατηρούμε ότι οι επεμβάσεις με τον παράγοντα Β σε συγκεντρώσεις 10 και 50 mM, εμφανίζουν ελαφρώς χαμηλότερα ποσοστά ασθένειας συγκρινόμενες με τις άλλες επεμβάσεις 22, 25 και 28 ημέρες μετά τη μόλυνση με τον ιό. Στο Διάγραμμα 3.7(B), όπου απεικονίζονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης. Η επέμβαση Β50 εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά με το μάρτυρα, και η σχετική AUDPC μετρήθηκε για τον Β50 16,5% έναντι 21,3% του μάρτυρα. Η επέμβαση Α50 έχει την χειρότερη επίδοση καθώς η σχετική AUDPC είναι υψηλότερη από κάθε άλλη επέμβαση. Οι υπόλοιπες επεμβάσεις, συμπεριλαμβανομένου του μάρτυρα, εμφανίζουν κάποια τάση διαφοροποίησης σε σχέση με την επέμβαση Α50, το Β50 ή και τις δύο.

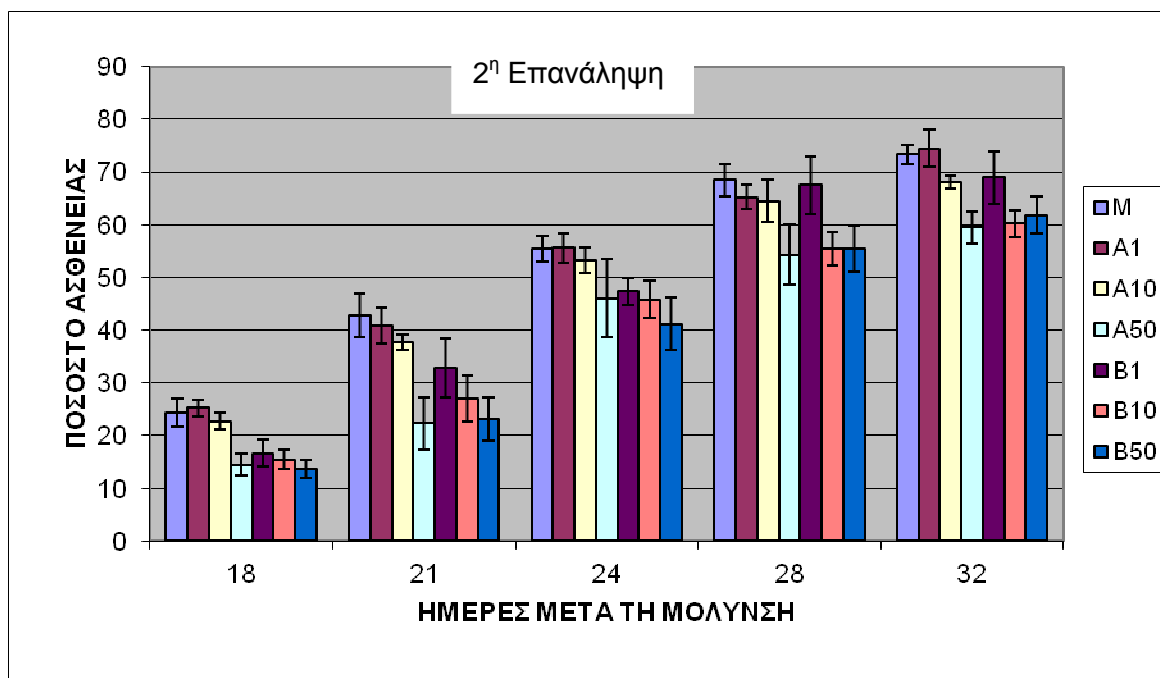


Διάγραμμα 3.7(A): Αξιολόγηση της επίδρασης των παραγόντων A και B στο ποσοστό ασθενών φύλλων μετά τη μόλυνση με τον TMV σε φυτά *N. tabacum* στο πρώτο πείραμα παθογένειας. Η ένταση της ασθένειας υπολογίστηκε για κάθε μέρα καταγραφής των συμπτωμάτων ως το ποσοστό (%) του αριθμού των ασθενών φύλλων ως προς το συνολικό αριθμό των φύλλων για κάθε φυτό. Οι κάθετες μπάρες αντιπροσωπεύουν την απόκλιση από το μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα. Ο άξονας X αναπαριστά τις ημέρες μετά τη μόλυνση με το παθογόνο. Ως M αναφέρεται ο μάρτυρας, και οι παράγοντες A και B συνοδεύονται από ένα αριθμό, τη συγκέντρωση σε mM

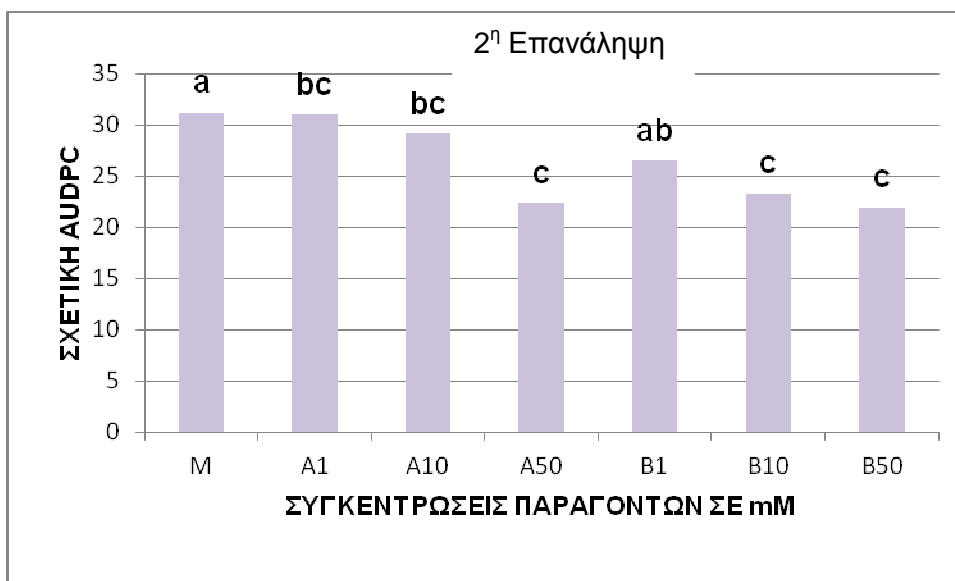


Διάγραμμα 3.7(B): Καμπύλη εξέλιξης της ασθένειας (AUDPC) με υπολογισμό του εμβαδού με τη μέθοδο της τραπεζοειδούς ολοκλήρωσης (Campbell και Madden, 1990). Υπολογίστηκε το εμβαδόν στη γραφική παράσταση 3.7 (A) με το χρόνο και η ασθένεια εκφράστηκε ως το ποσοστό του μέγιστου εμβαδού για όλη τη διάρκεια του πειράματος, (Σχετική AUDPC)(Kogonvel et al., 2001) . Πάνω από κάθε στήλη αναγράφεται ένα γράμμα ανάλογο με το διαχωρισμό που έγινε από το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης, και διαφέρουν στατιστικά σε επίπεδο σημαντικότητας ($P \leq 0.05$).

Στο δεύτερο πείραμα παθογένειας για την αξιολόγηση της δράσης των δύο παραγόντων κατά του ιού TMV (Διάγραμμα 3.8(A)), καταγράφηκε καλύτερη διαφοροποίηση των επεμβάσεων σε σχέση με το μάρτυρα. Οι επεμβάσεις A50, B10 και B50, εμφανίζουν ηπιότερη εξέλιξη της ασθένειας, με τη σχετική AUDPC να είναι 22,4%, 23,3% και 21,9% για τις επεμβάσεις A50, B10 και B50 αντίστοιχα, σε σχέση με το μάρτυρα (σχετική AUDPC 31,19%) (Διάγραμμα 3.8 (B)).



Διάγραμμα 3.8(A): Αξιολόγηση της επίδρασης των παραγόντων A και B στο ποσοστό ασθενών φύλλων μετά τη μόλυνση με τον TMV σε φυτά *N. tabacum* στο πρώτο πείραμα παθογένειας. Η ένταση της ασθένειας υπολογίστηκε για κάθε μέρα καταγραφής των συμπτωμάτων ως το ποσοστό (%) του αριθμού των ασθενών φύλλων ως προς το συνολικό αριθμό των φύλλων για κάθε φυτό. Οι κάθετες μπάρες αντιπροσωπεύουν την απόκλιση από το μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα. Ο άξονας X αναπαριστά τις ημέρες μετά τη μόλυνση με το παθογόνο. Ως M αναφέρεται ο μάρτυρας, και οι παράγοντες A και B συνοδεύονται από ένα αριθμό, τη συγκέντρωση σε mM



Διάγραμμα 3.8(B): Καμπύλη εξέλιξης της ασθένειας (AUDPC) με υπολογισμό του εμβαδού με τη μέθοδο της τραπεζοειδούς ολοκλήρωσης (Campbell και Madden, 1990). Υπολογίστηκε το εμβαδόν στη γραφική παράσταση 3.8 (A) με το χρόνο και η ασθένεια εκφράστηκε ως το ποσοστό του μέγιστου εμβαδού για όλη τη διάρκεια του πειράματος, (Σχετική ΑΥΔΡC)(Koroneel et al., 2001) . Πάνω από κάθε στήλη αναγράφεται ένα γράμμα ανάλογα με το διαχωρισμό που έγινε από το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης, και διαφέρουν στατιστικά σε επίπεδο σημαντικότητας ($P \leq 0.05$)

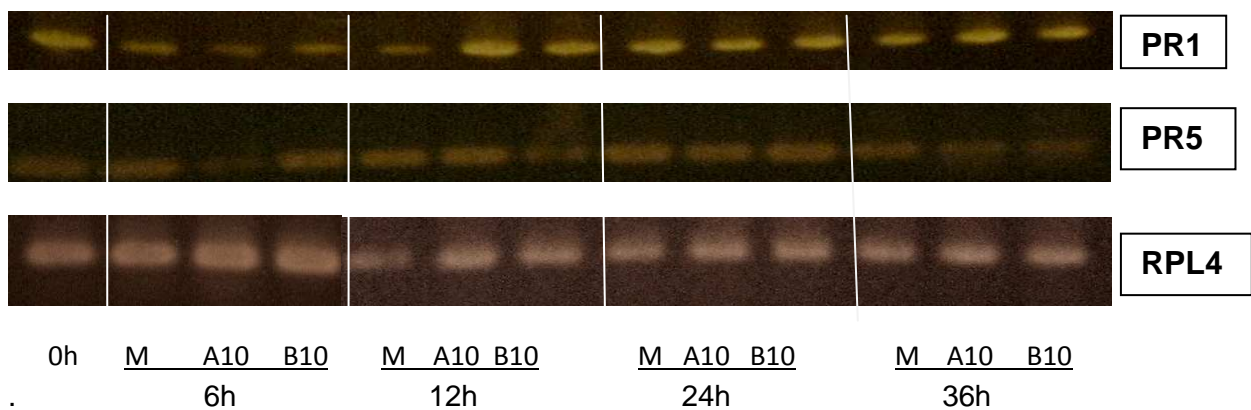
Στα δύο πειράματα σε φυτά καπνού, κατά του ιού TMV, υπήρχαν ενδείξεις ότι ο επεμβάσεις με τον παράγοντα B στις συγκεντρώσεις 10 και 50 mM έχουν κάποιο αποτέλεσμα στον έλεγχο του ιού. Ωστόσο, με περαιτέρω πειραματισμό, που θα επικεντρωθεί στην αξιολόγηση του παράγοντα B σε αυτές τις δύο συγκεντρώσεις, μπορεί να προκύψουν πιο σαφή αποτελέσματα για τη δράση του παράγοντα για τον έλεγχο του TMV.

3.5 Μοριακή διερεύνηση της επαγωγής PR γονιδίων από την εφαρμογή των επιφανειοδραστικών παραγόντων A και B σε φυτά *Arabidopsis thaliana*

Στα πλαίσια της αξιολόγησης των παραγόντων A και B ώστε να βρεθεί αν έχουν τη δυνατότητα να επάγουν τον αμυντικό μηχανισμό των φυτών, έγινε μοριακή ανίχνευση δύο PR γονιδίων (PR1 και PR5), που έχει αναγνωρισθεί ότι εμπλέκονται στην άμυνα των φυτών. Η παρουσία των δύο γονιδίων ανιχνεύθηκε με τη μέθοδο της PCR, σε cDNA που προήλθε από το RNA που εξήχθη από φυτά *A. thaliana*, στα οποία είχαν τοποθετηθεί οι παράγοντες A και B σε συγκέντρωση 10mM και Agral 0.02%. Η συγκεκριμένη συγκέντρωση επιλέχθηκε καθώς τα δεδομένα από τα πειράματα παθογένειας την διέκριναν πολλές φορές ως τον αποτελεσματικότερη επέμβαση. Ταυτόχρονα υπήρχαν και φυτά μάρτυρες, με νερό και Agral (0,02% του συνολικού όγκου). Το RNA εξήχθη από τα φυτά σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα από την εφαρμογή των παραγόντων.

Η μέθοδος της PCR εφαρμόστηκε με 3 διαφορετικούς εκκινητές. Τον εκκινητή για το γονίδιο RPL4 (Ribosomal protein L4) (καθοδικό και ανοδικό), η παρουσία του οποίου στο γονιδίωμα της *A. thaliana* είναι ιδιαίτερα συντηρημένη, οπότε χρησιμοποιείται ως μάρτυρας για να πιστοποιήσει ότι σε όλα τα δείγματα χρησιμοποιήθηκε η ίδια ποσότητα cDNA. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές για τα γονίδια PR1 και PR5 (καθοδικοί και ανοδικοί). Τα αποτελέσματα των ηλεκτροφορήσεων των αποτελεσμάτων της RT-PCR φαίνονται στην (Εικόνα 3.9).

Για το γονίδιο PR1, τις πρώτες 6 ώρες, και η συγκέντρωση στην επέμβαση Ag 12 ώρες, οι ζώνες είναι αισθητά μικρότερες από ότι οι υπόλοιπες στις 12, 24 και 36 ώρες. Επίσης στις 12 ώρες η συγκέντρωση του A10, είναι ελαφρά μεγαλύτερη από τις αντίστοιχες Ag και B10 στις 12 ώρες. Ωστόσο η ύπαρξη ζώνης στις 0 ώρες, και μάλιστα στο ίδιο πάχος με αυτές στις 12, 24 και 36 ώρες, δεν ήταν αναμενόμενη, καθώς τα φυτά δεν είχαν δεχθεί καμία επέμβαση.



Εικόνα 3.9: Ενίσχυση με τη μέθοδο της RT-PCR σε 30 κύκλους του τμήματος PR1, του τμήματος PR5 και του τμήματος RPL4. Ως M αναφέρεται ο μάρτυρας με το Agral, ενώ ως A10 και B10 οι παράγοντες A και B σε συγκέντρωση 10 mM. Επίσης αναφέρεται το χρονικό διάστημα που είχε παρέλθει από την εφαρμογή των επεμβάσεων.

Για το γονίδιο PR5, μετά τις 24 ώρες παρατηρείται μείωση του μεγέθους των ζωνών, ενώ στις τις πρώτες 6 ώρες, στην επέμβαση με το A10 υπάρχει ένα αχνό μόνο σημάδι στη θέση της ζώνης. Στις υπόλοιπες δοκιμές οι ζώνες που σχηματίστηκαν δεν έχουν μεγάλη διαφορά μεταξύ τους.

Με βάση τα αποτελέσματα των PR-1 και PR-5, η εξαγωγή ξεκάθαρων συμπερασμάτων βασισμένων στο αποτέλεσμα της PCR, δεν μπορεί να είναι τεκμηριωμένη και απαιτείται η χρήση περατέρω πειραματισμού και της Real-Time PCR.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι μηχανισμοί άμυνας των φυτών, αποτελούν αντικείμενο έρευνας εδώ και πολλά χρόνια. Πολλές εργασίες και μελέτες είναι αφιερωμένες στους μηχανισμούς επαγωγής της άμυνας του φυτού, των γονιδίων τα οποία εμπλέκονται άμεσα ή έμμεσα με αυτήν και τις αλληλεπιδράσεις ξενιστή – παθογόνου όπου κρίνεται τελικά η εμφάνιση ή όχι της ασθένειας. Η χρήση του φυτού-προτύπου *Arabidopsis thaliana*, με το πλήρως αποκρυπτογραφημένο γονιδίωμα του οδήγησε την έρευνα σε ένα ακόμα υψηλότερο επίπεδο, καθώς οι μοριακές τεχνικές προσδίδουν μεγαλύτερη εγκυρότητα και καλύτερη κατανόηση των πολύπλοκων και λεπτεπίλεπτων αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στους μηχανισμούς άμυνας των φυτών. Στα πλαίσια αυτά, η επαγόμενη διασυστηματική ανοχή SAR, είναι ένα πεδίο στο οποίο διεξάγεται εντατική έρευνα και αποτελεί σημαντικό πόλο ενδιαφέροντος για την επιστημονική κοινότητα. Όχι μόνο γιατί ακόμα και σήμερα σημαντικοί μηχανισμοί της αλληλεπίδρασης ξενιστή – παθογόνου παραμένουν ανεξερεύνητοι, αλλά και επειδή η στροφή προς την υιοθέτηση βιολογικών τρόπων αντιμετώπισης των ασθενειών, πιέζει συνεχώς για την ανακάλυψη νέων παραγόντων βιολογικού ελέγχου. Παραγόντων που θα μπορούσαν να αποτελέσουν ένα αποτελεσματικό σύμμαχο για την αντιμετώπιση των ασθενειών, χωρίς να επιβαρύνουν περαιτέρω το περιβάλλον.

Σε αυτή τη μελέτη έγινε προσπάθεια αξιολόγησης δύο επιφανειοδραστικών παραγόντων, τόσο με την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας τους στον περιορισμό των συμπτωμάτων ασθενειών που προκαλούνται από συγκεκριμένα παθογόνα που έχουν βρεθεί στο παρελθόν να σχετίζονται με το φαινόμενο της SAR, αλλά και με τη διερεύνηση σε μοριακό επίπεδο, της δυνατότητάς τους να επάγουν τη παραγωγή στο φυτό γονιδίων που σχετίζονται με το αμυντικό σύστημα των φυτών.

Πιο αναλυτικά:

1. Οι παράγοντες A και B φάνηκε να προκαλούν νέκρωση στην φυλλική επιφάνεια του φυτού στο οποίο εφαρμόζονταν. Η νέκρωση πιθανόν να σχετίζεται α) με την τοξικότητα τους στα φυτά αλλά και β) με τη δυνατότητα τους να επάγουν τον αμυντικό μηχανισμό των φυτών αφού η πρόκληση κυτταρικής νέκρωσης στο φύλλο που γίνεται η εφαρμογή του παράγοντα θα μπορούσε να ερμηνευθεί από το φυτό σαν “επίθεση”, και αφορμή κινητοποίησης των αμυντικών αντιδράσεων. Η νέκρωση

επιδεινώθηκε όταν οι παράγοντες εφαρμόστηκαν με ψεκασμό ακόμα και σε μικρότερες συγκεντρώσεις, σε ένα φύλλο ή και σε ολόκληρη τη φυλλική επιφάνεια τόσο των φυτών *Arabidopsis thaliana*, όσο και των φυτών *Nicotiana tabacum*, ενώ η παρουσία νεκρώσεων ακόμα και όταν δεν χρησιμοποιήθηκε προσκολλητικό Agral, δείχνει ότι οι νεκρώσεις είναι καθαρά επακόλουθο της εφαρμογής των παραγόντων. Σύμφωνα με τα παραπάνω, σε μελλοντικά πειράματα με τους δύο αυτούς παράγοντες, θα πρέπει η εφαρμογή τους να γίνει με τον ίδιο τρόπο που εφαρμόστηκαν και σε αυτή την εργασία, δηλαδή με την τοποθέτηση σταγόνων στην επιφάνεια των φύλλων. Με αυτή τη μέθοδο, η νέκρωση δεν είναι αρκετά εκτεταμένη και δεν επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τη φυσιολογία του φυτού ώστε να μην μπορεί να ανταπεξέλθει φυσιολογικά στην επικείμενη προσβολή. Ένα θέμα που επιδέχεται σημαντική διερεύνηση, είναι το χρονικό περιθώριο από την εφαρμογή των παραγόντων μέχρι την μόλυνση με το εκάστοτε παθογόνο. Σε ανάλογες εργασίες (Jung et al., 2009) το διάστημα αυτό έχει κυμανθεί από 12 έως 24 ώρες, με το διάστημα κάτω από 12 ώρες να βρίσκεται μη ικανοποιητικό για την επαγωγή των αμυντικών μηχανισμών από τον υπό μελέτη παράγοντα. Δεδομένου ότι σε αυτή την εργασία το εν λόγω διάστημα ήταν σταθερά 7 ημέρες, ίσως θα φανεί ιδιαίτερα χρήσιμη η μείωση του και η εφαρμογή των παθογόνων 24 ώρες ή και 48 ώρες μετά την εφαρμογή των παραγόντων όταν η πιθανή επαγωγή των αντιδράσεων από την εφαρμογή τους πιθανόν να βρίσκεται στο μέγιστο της. Τέλος, ίσως αξίζει να μελετηθεί αν η επίδραση του παράγοντα στα φυτά σχετίζεται με την ηλικία τους, παρατηρώντας το πώς μεταβάλλεται η νέκρωση και η συνολική επίδραση στο φυτό από την εφαρμογή των δύο παραγόντων σε φυτά διαφορετικής ηλικίας.

2. Με βάση τα πειράματα παθογένειας με το παθογόνο *Hyaloperonospora parasitica*, αποκομίστηκαν τα πιο ξεκάθαρα αποτελέσματα. Η επέμβαση με τον παράγοντα A σε συγκέντρωση 10 mM, έδωσε πολύ καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με το μάρτυρα και τους άλλους χειρισμούς μειώνοντας τα επίπεδα της ασθένειας κατά 50%. Στο πρώτο πείραμα που υπήρχε μόνο ένα φυτό *A. thaliana* /γλαστράκι, ξεχώρισε ως αποτελεσματικότερος ο παράγοντας A σε συγκέντρωση 50 mM. Για να διευκρινιστεί λοιπόν περαιτέρω αυτό, χρήσιμη θα ήταν η επανάληψη του πειράματος παθογένειας με αυτό το παθογόνο με μεγαλύτερο αριθμό επαναλήψεων ανά επέμβαση μόνο με τους παράγοντες A σε συγκέντρωση 10 και 50 mM. Πολύ σημαντικό για τα πειράματα με αυτό το παθογόνο αποδείχθηκε η τοποθέτηση 5

φυτών/γλαστράκι. Αυτό κατά πάσα πιθανότητα οφείλεται στην πιθανή δημιουργία καλύτερων συνθηκών υγρασίας κατά την ανάπτυξη της ασθένειας και την παραγωγή κονιδίων και γιατί όταν τοποθετούνται 5 φυτά στο δοκιμαστικό σωλήνα κατά την διαδικασία της μέτρησης των κονιδίων, υπάρχει πολύ μικρότερη απόκλιση.

3. Τα πειράματα παθογένειας με το παθογόνο *Verticillium dahliae*, έδωσαν συγκεχυμένα αποτελέσματα για την αξιολόγηση της δυνατότητας των δύο παραγόντων A και B να περιορίσουν την ασθένεια. Δεν υπήρξε κάποια συγκέντρωση ενός από τους δύο παράγοντες που να υπερτερεί σταθερά από τις υπόλοιπες και στα 3 πειράματα παθογένειας για την αποτελεσματικότητα της. Ίσως αυτό να οφείλεται στο ότι η εξέλιξη της ασθένειας και των συμπτωμάτων, να επηρεάστηκε σημαντικά από τις διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούσαν στα τρία πειράματα παθογένειας, παρότι χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιοι χώροι ελεγχόμενων συνθηκών σε όλα. Η ταυτόχρονη επανάληψη και των τριών πειραμάτων παθογένειας και η χρήση περισσότερων επαναλήψεων ανά επέμβαση θα έδινε τη δυνατότητα για ίσως πιο σαφή αποτελέσματα με σημαντική μείωση της τυπικής απόκλισης. Ωστόσο στηριζόμενοι στα αποτελέσματα των συγκεκριμένων πειραμάτων, μπορούμε να αποκλείσουμε κάποιους χειρισμούς από μελλοντικά πειράματα παθογένειας. Οι χειρισμοί θα μπορούσαν να περιοριστούν στο μάρτυρα και τους παράγοντες A σε συγκέντρωση 10 και 50 mM και B σε συγκέντρωση 10 mM, αφού φάνηκαν αποτελεσματικότεροι, ή οι πλησιέστεροι στον αποτελεσματικότερη επέμβαση, όπως καταγράφηκε από τα πειράματα της εργασίας αυτής.

4. Στα πειράματα παθογένειας σε φυτά *Nicotiana tabacum* για την αξιολόγηση των δύο παραγόντων κατά του TMV, ο παράγοντας B στις συγκεντρώσεις 10 και 50 mM, παρουσιάζεται αποτελεσματικότερος στον έλεγχο του ιού. Με βάση τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, μελλοντικές προσπάθειες αξιολόγησης των παραγόντων για τον έλεγχο του TMV σε φυτά καπνού, θα μπορούσαν να περιοριστούν στη χρήση μόνο του παράγοντα B σε συγκέντρωση 10 και 50 mM, και ίσως του παράγοντα A σε συγκέντρωση 10 mM, εφόσον κανένας από τους άλλους χειρισμούς δεν φάνηκε να επηρεάζει ιδιαίτερα την εξέλιξη ή τη δριμύτητα της ασθένειας στη παρούσα μελέτη. Σε κάθε νέα ανάλογη προσπάθεια, θα είχε ενδιαφέρον να πραγματοποιηθούν ταυτόχρονα τρεις επαναλήψεις των πειραμάτων παθογένειας, καθώς αυτό θα ελαχιστοποιούσε την επίδραση των περιβαλλοντικών

συνθηκών στην εξέλιξη της ασθένειας. Επίσης, θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί η εφαρμογή των παραγόντων στα φυτά, και επακόλουθα η μόλυνση, σε μικρότερη ηλικία από αυτή που έγινε στην εργασία, δηλαδή τις 5 εβδομάδες. Καθοριστικής σημασίας σε κάθε πείραμα με φυτά καπνού είναι η χρήση των κανόνων υγιεινής στο θερμοκήπιο (ψεκάσμοι κ.α.) ώστε να μην επηρεάζονται τα αποτελέσματα από εξωτερικούς παράγοντες.

5. Τα αποτελέσματα από τη μοριακή ανίχνευση για την παρουσία των PR γονιδίων PR1 και PR5, σε φυτά *Arabidopsis thaliana* μετά από την εφαρμογή των δύο παραγόντων A και B σε συγκέντρωση 10 mM, υποδεικνύουν ότι ο αριθμός των κύκλων στους οποίους πραγματοποιήθηκε η ενίσχυση των γονιδίων στόχων με τη μέθοδο της RT-PCR (30 κύκλοι) ήταν πολλοί και πιθανόν να δημιουργήθηκε κορεσμός των προϊόντων που πολλαπλασιάστηκαν. Η ηλεκτροφόρηση των αποτελεσμάτων της RT-PCR για τα PR1 και PR5 έδωσε ζώνες σε όλα τα χρονικά διαστήματα από την εφαρμογή των δύο παραγόντων και στην επέμβαση -μάρτυρα, με πολύ μικρές διαφορές ώστε να μην είναι ασφαλής η ανάλυση και η εξαγωγή πολύτιμων συμπερασμάτων. Η εφαρμογή PCR πραγματικού χρόνου, (Real-time PCR) στα συγκεκριμένα πειράματα μπορεί να ανιχνεύει, να επιβεβαιώνει και να ποσοτικοποιεί το PCR-προϊόν σε πραγματικό χρόνο, οπότε θα γινόταν σύγκριση των αποτελεσμάτων της εφαρμογής των παραγόντων, πριν πολλαπλασιαστούν σε βαθμό που να κορεστεί ο πολλαπλασιασμός τους. Επιπλέον, καθώς δεν χρειάζονται επιπλέον διαδικασίες για την ανίχνευση του προϊόντος της αντίδρασης (gel, ηλεκτροφορήσεις κλ.) ο συνολικός χρόνος της διαδικασίας μειώνεται σημαντικά, με τη μέθοδο αυτή, με μοναδικό της μειονέκτημα το κόστος της. Επίσης θα μπορούσε να μελετηθεί στο μέλλον μια σειρά διαφόρων γονιδίων παθογένειας, μεταγραφικών παραγόντων, πρωτεϊνικών και MAP κινασών καθώς και άλλων γονιδίων που εμπλέκονται στο εγγενές ανοσοποιητικό σύστημα των φυτών, ώστε να δημιουργηθεί μια πιο πλήρης εικόνα της δράσης των επιφανειοδραστικών ουσιών A και B.

Συνοψίζοντας, σε αυτή τη μεταπτυχιακή εργασία, έγινε μια προσπάθεια σφαιρικής αξιολόγησης των δύο κατιονικών επιφανειοδραστικών ουσιών του βρωμιούχου αμμωνίου, των παραγόντων A και B σε 3 παθογόνα με διαφορετική

φυσιολογία. Ταυτόχρονα μελετήθηκε η επίδραση της εφαρμογής τους στο φυτό σε συνθήκες θερμοκηπίου, ενώ έγινε και μία προσπάθεια αξιολόγησης τους και σε μοριακό επίπεδο. Σύμφωνα με τα ευρήματα αυτής της μελέτης ο παράγοντας A εμφανίζει σχετικά καλύτερα αποτελέσματα στον έλεγχο των ασθενειών που δοκιμάστηκαν, με ιδιαίτερα εντυπωσιακό περιορισμό της ασθένειας του περονοσπόρου που προκαλείται από τον ωομύκητα *Hyaloperonospora parasitica*, όταν χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 10 mM. Τα αποτελέσματα από αυτή την εργασία μπορούν να αποτελέσουν χρήσιμο εργαλείο σε κάθε νέα προσπάθεια αξιολόγησης των δύο παραγόντων, η οποία δεν είναι ανάγκη να είναι τόσο γενικευμένη, αλλά θα έχει τη δυνατότητα να ερευνησει περαιτέρω σε βάθος τη δράση τους.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alonso JM, Stephanova AN**, 2004. The ethylene signaling pathway. *Science*, **306**, 1513-1515.
- Anand A, Uppalapati SR, Ryu C-M, Allen SN, Kang L, Tang Y, and Mysore KS**, 2008. Salicylic Acid and Systemic Acquired Resistance Play a Role in Attenuating Crown Gall Disease Caused by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology*, **146**, 703–715.
- Agrios GN**, 2005. *Plant Pathology*. Elsevier, CA, Academy Press.
- Bennett M, Gallagher M, Fagg J, Bestwick C, Paul T, Beale M, and Mansfield J**, 1996. The hypersensitive reaction, membrane damage and accumulation of autofluorescent phenolics in lettuce cells challenged by *Bremia lactucae*. *Plant Journal*, **9**, 851-865.
- Botella MA, Parker JE, Frost LN, Bittner-Eddy PD, Beynon JL, Daniels MJ, Holub EB, and Jones JDG**, 1998. Three Genes of the Arabidopsis *RPP1* Complex Resistance Locus Recognize Distinct *Peronospora parasitica* Avirulence Determinants. *The Plant Cell*, **10**, 1847–1860.
- Bruinsma M, Posthumus MA, Mumm R, Mueller MJ, van Loon JJA, and Dicke M**, 2009. Jasmonic acid-induced volatiles of *Brassica oleracea* attract parasitoids: effects of time and dose, and comparison with induction by herbivores. *Journal of Experimental Botany*, **60**, 2575–2587.
- Broekaert WF, Delauré SL, De Bolle MFC, Cammue BPA**, 2006. The Role of Ethylene in Host- Pathogen Interactions. *Annual Review of Phytopathology*, **44**, 393-416.
- Buchanan B.B, Gruissem W, and Jones R.L**, 2000. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists.
- Burch-Smith T.M, Schiff M, Caplan J.L, Tsao J, Czymbek K, Dinesh-Kumar S.P**, 2007. A Novel Role for the TIR Domain in Association with Pathogen-Derived Elicitors. *Plos Biology*, **5(3)**, 501-514.
- Campbell CL, Madden LV**, 1990. *Introduction to Plant Disease Epidemiology*. John Wiley & Sons Inc., New York.
- Cao H, Glazebrook J, Clarke JD, Volko S, Dong X**, 1997. The Arabidopsis *NPR1* Gene That Controls Systemic Acquired Resistance Encodes a Novel Protein Containing Ankyrin Repeats. *The Plant Cell*, **88**, 57-63.
- Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ**, 2006. Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. *The Plant Cell*, **124**, 803-814.

- Dicke M, Hilker M**, 2003. Induced plant defences, From molecular biology to evolutionary ecology. *Basic And Applied Ecology*, **4**, 315-325.
- Dong H, and Beer SV**, 2000. Riboflavin Induces Disease Resistance in Plants by Activating a Novel Signal Transduction Pathway. *The American Phytopathological Society*, **90**, No. 8, 801-811.
- Dong X**, 1998. SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, **1**, 316-323.
- Dong X**, 2001. Genetic dissection of systemic acquired resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, **4**, 309–314
- Dong X, Durrant W.E**, 2004. Systemic Acquired Resistance, *Annual Review of Phytopathology*, **42** , 185-209.
- Ebel J, Cosio EG**, 1994. Elicitors of plant defence responses. *International Reviews of Cytology*, **148**, 1-36.
- Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE**, 2000. The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in plant science Reviews*, **5**, No. 5, 199-206.
- Feys BJ, Parker JE**, 2000. Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends in Genetics*, **16**, 449-455.
- Fodor J, Gullner G, Adam AL, Barna B, Komives V, Király Z**, 1997. Local and systemic Responses of antioxidants to tobacco mosaic virus infection and to salicylic acid in Tobacco. *Plant Physiology*, **114**, 1443-1451.
- Fluhr R**, 2001. Sentinels of Disease. Plant Resistance Genes. *Plant Physiology*, **127** ,1367–1374.
- Fradin EF, AND Thomma BPHJ**, 2006. Physiology and molecular aspects of Verticillium wilt diseases caused by *V. dahlia* and *V. albo-atrum*. *Molecular Plant Pathology*, **7**(2), 71–86.
- Gaffney T, Friedrich L, Vemooij B, Negrotto D, Nye G, et al. 1993**. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*, **261**, 754-56.
- Gómez-Gómez L, Boller T**, 2002. Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends in Plant Science*, **7** No.6 , 251-256.
- Hammond-Kosack KE, Jones DG**, 1996. Resistance Gene-Dependent Plant Defense Responses. *The Plant Cell*, **8**, 1773-1791.
- Hammond-Kosack KE, Jones DG**, 1997. Plant Disease Resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molecular Biology*, **48**, 575–607.

- Hammond-Kosack KE, Parker JE**, 2003. Deciphering plant–pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology*, **14**, 177–193.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, and Williams PM**, 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research*, **6**, 986-994.
- Heidel AJ, and Dong X**, 2006. Fitness Benefits of Systemic Acquired Resistance During *Hyaloperonospora parasitica* Infection in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, **173**, 1621–1628.
- Higgins VJ, Lu H, Xing T, Gelli A, and Blumwald E**, 1998. The gene-for-gene concept And beyond: Interactions and signals. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **20** , 150- 157.
- Hofius DI, Tsitsigiannis DI, Jones JDG, Mundy J**, 2007. Inducible cell death in plant immunity. *Seminars in Cancer Biology*, **17**, 166-187.
- Holt BF, Hubert D.A, Dangl JL**, 2003. Resistance gene signaling in plants – complex similarities to animal innate immunity. *Current Opinion in Immunology* , **15**, 20-25.
- Holten-Andersen L, Doherty T. M, Korsholm K. S, and Andersen P**, 2003. Combination of the Cationic Surfactant Dimethyl Dioctadecyl Ammonium Bromide and Synthetic Mycobacterial Cord Factor as an Efficient Adjuvant for Tuberculosis Subunit Vaccines. *Infection and Immunity*, **72** ,1608–1617.
- Hudgins JW, and Franceschi V.R**, 2004. Methyl Jasmonate-Induced Ethylene Production Is Responsible for Conifer Phloem Defense Responses and Reprogramming of Stem Cambial Zone for Traumatic Resin Duct Formation. *Plant Physiology*, **135**: 2134– 2149.
- Huitema E, Vleeshouwers VGAA, Francis DM, and Kamoun S**, 2003. Active defence responses associated with non-host resistance of *Arabidopsis thaliana* to the oomycete pathogen *Phytophthora infestans* . *Molecular Plant Pathology*, **4** (6) , 487–500.
- Jackson AO, and Crispin BT**, 1996. Plant-Microbe Interactions: Life and Death at the Interface. *The Plant Cell*, **8**, 1651-1668.
- Jones JDG, Dangl JL**, 2006. The plant immune system. *Nature*, **444**, 323-329.
- Jung HW, Tschaplinski TJ, Wang L, Glazebrook J, Greenberg JT**, 2009. Priming in Systemic Plant Immunity. *Science*, **324**, 89-91.
- Kesarwani M, Yoo J, and Dong X**, 2007. Genetic Interactions of TGA Transcription Factors in the Regulation of Pathogenesis-Related Genes and Disease Resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **144**, 336–346.

- Király L, Barna B, Kecskes A, Fodor J**, 2002. Down-regulation of antioxidative capacity in a transgenic tobacco which fails to develop acquired resistance to necrotization caused by TMV. *Free Radical Research*, **36**, 981-991.
- Knapp E, AND Lewandowski DJ**, 2001. Tobacco mosaic virus, not just a single component virus anymore. *Molecular Plant Pathology*, **2** (3) , 117–123.
- Korovel N, Pérez-Artés E, Bejarano-Alcázar J, Rodríguez-Jurado D, Katan J, Katan T, Jiménez-Díaz RM**, 2001. Comparative study of genetic diversity and pathogenicity among populations of *Verticillium dahliae* from cotton in Spain and Israel. *European Journal of Plant Pathology*, **107**, 443-456.
- Lawrence G.J, Finnegan E.J, Ayliffelb MA. and Ellisai JG**, 1995. The *L6* Gene for Flax Rust Resistance 1s Related to the Arabidopsis Bacterial Resistance Gene *RPSP* and The Tobacco *Vira1* Resistance Gene *N*. *The Plant Cell*, **7**, 1195-1206.
- Li Y, Yang S, Yang H, Hua J**, 2007. The TIR-NB-LRR Gene *SNC1* Is Regulated at the Transcript Level by Multiple Factors. *The American Phytopathological Society*, **20**, No. 11,1449–1456.
- Lorenzo O, Piqueras R, Sanchez-Serrano JJ, Solano R**, 2003. Ethylene Response Factor1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell*, **15**, 165-178.
- Lugtenberg BJJ, Chin-A-Woeng TFC, & Bloemberg GV**, Microbe–plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie van Leeuwenhoek*, **81**, 373–383.
- Maldonado AM, Doerner P, Dixonk RA, Lamb CJ, Cameron RK**, 2002. A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in Arabidopsis. *Nature*, **419**, 399-403.
- Maleck K, Levine A, Eulgem T, Morgan A, Schmid J, Lawton KA, Dangl JL, & Dietrich RA**, 2000. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nature genetics*, **26**, 403-410.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J**, 1982. *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbour, New York.
- Mauch-Mani B, and Métraux JP**, 1998. Salicylic Acid and Systemic Acquired Resistance to Pathogen Attack. *Annals of Botany*, **82**, 535-540.
- Mauch-Mani B, and Slusarenko AJ**, 1993. Arabidopsis as a model host for studying plant–pathogen interactions. *Trends in Microbiology*, **1**, 265–270.
- Mauch-Mani B, and Slusarenko AJ**, 1994. Systemic Acquired Resistance in *Arabidopsis thaliana* Induced by a Predisposing Infection with a Pathogenic Isolate of *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **7**, 378–383.

- McDowell JM, Cuzick A, Can C, Beynon J, Dangl JL, and Holub EB**, 2000. Downy mildew (*Peronospora parasitica*) resistance genes in *Arabidopsis* vary in functional requirements for NDR1, EDS1, NPR1 and salicylic acid accumulation. *The Plant Journal*, **22**(6), 523-529.
- McDowell J.M, Williams S.G, Funderburg N.T, Eulgem T, and Dangl J.L**, 2005. Genetic Analysis of Developmentally Regulated Resistance to Downy Mildew (*Hyaloperonospora parasitica*) in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **18**, No. 11:1226–1234.
- McDowell JM, and Woffenden BJ**, 2003. Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. *Trends in Biotechnology*, **21** No.4, 178-183.
- Métraux JP, Nawrath C, and Genoud T**, 2002. Systemic acquired resistance. *Euphytica*, **124**, 237–243.
- Molina A, Hunt MD, and Ryals JA**, 1998. Impaired Fungicide Activity in Plants Blocked in Disease Resistance Signal Transduction. *The Plant Cell*, **10** , 1903–1914.
- Montesano M, Brader G, Pqalva T**, 2003. Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. *Molecular Plant Pathology*, **4**, 73–79.
- Nürnberger T**, 1999. Signal perception in plant pathogen defense. *Cellular and Molecular Life Science*, **55**, 167–182.
- Nürnberger T, Brunner F**, (2002). Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Current Opinion in Plant Biology*, **5**, 318–324.
- Nürnberger T, Brunner F, Kemmerling B, and Piater L**, 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunology Reviews*, **198**, 249–266.
- Thordal-Christensen H**, 2003. Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, **6**, 351–357.
- Parker JE**, 2003. Plant recognition of microbial patterns. *Trends in Plant Science*, **8** No.6, 245-247.
- Parker JE, Holub EB, Frost LN, Falk A, Gunn ND, and Daniels MJ**, 1996. Characterization of *eds1*, a Mutation in *Arabidopsis* Suppressing Resistance to *Peronospora parasitica* Specified by Several Different *RPP* Genes. *The Plant Cell*, **8**, 2033-2046.
- Petersen M, Brodersen P, Naested H, Andreasson E, Lindhart U, Johansen B, Nielsen HB, Lacy M, Austin MJ, Parker JE, Sharma SB, Klessig DF, Martienssen B, Mattsson O, Jensen AB, and Mundy J**, 2000. *Arabidopsis* MAP Kinase 4 Negatively Regulates Systemic Acquired Resistance. *Cell*, **103**, 1111–1120.

- Penninckx IA, Thomma BP, Buchala A, Métraux JP, Broekaert WF**, 1998. Concomitant Activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in Arabidopsis. *Plant Cell*, **8**, 2309-2323.
- Potlakayala SD, Reed DW, Covello PS, and Fobert PR**, 2007. Systemic acquired resistance in canola is linked with pathogenesis-related gene expression and requires salicylic acid. *Phytopathology*, **97**, 794-802.
- Rairdan GJ, and Delaney TP**, 2002. Role of Salicylic Acid and NIM1/NPR1 in Race-Specific Resistance in Arabidopsis. *Genetics*, **161**, 803–811.
- Ramsey SL, and Wernsman EA**, 2001. Efforts to Initiate Construction of a Disease Resistance Package on a Designer Chromosome in Tobacco. *Crop Science*, **41**, 1420–1427.
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MW, Molina A, Steiner HY, and Hunt MD**, 1996. Systemic Acquired Resistance. *The Plant Cell*, **8**, 1809-1819.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T**, 1989. *Molecular Cloning, "A Laboratory Manual"*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Schweizer P**, et al 1998. Induced systemic resistance in wounded rice plants. *Plant Journal*, **14**, 475-481.
- Shah J**, 2003. The salicylic acid loop in plant defense. *Current Opinion in Plant Biology*, **6**, 365–371 .
- Singh KB, Foleyand RC, Oñate-Sánchez L**, 2002. Transcription factors in plant defense and stress responses . *Current Opinion in Plant Biology*, **5**, 430–436.
- Slusarenko AJ, and Schlaich NL**, 2003. Downy mildew of Arabidopsis thaliana caused by *Hyaloperonospora parasitica* (formerly *Peronospora parasitica*). *Molecular Plant Pathology*, **4**(3), 159–170.
- Snippe H, Willers JMN, Inman JK, & Merchant B**, 1980. The specificity of antibody formation in mice following immunization with hapten-carrier complexes mixed with the surfactant, dimethyl dioctadecyl ammonium bromide. *Immunology*, **39**, 361-366.
- Staskawicz BJ**, 2001. Genetics of Plant-Pathogen Interactions Specifying Plant Disease Resistance. *Plant Physiology*, **125** , 73–76.
- Sticher L, Mauch-Mani B, and Métraux JP**, 1997. Systemic Acquired resistance. *Annual Reviews of Phytopathology*, **35**, 235–270.
- Uknes S, Mauch-Mani B, Moyer M, Potter S, Williams S**, et al., 1992. Acquired resistance in Arabidopsis. *Plant Cell*, **4**, 645-656.

- Vallad G, Goodman RM**, 2004. Review and Interpretation ; Systemic Acquired Resistance and Induced Systemic Resistance in Conventional Agriculture. *Crop Science*, **44**, 1920-1934 (2004).
- Van der Biezen EA, and Jones, JDG**, 1998. Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends in Biochemical Sciences*, **12**, 454–456.
- van den Burg HA, Tsitsigiannis DI, Rowland O, Lo J, Rallapalli G, MacLean D, Takken FLW, and Jones JDG**, 2008. The F-Box Protein ACRE189/ACIF1 Regulates Cell Death and Defense Responses Activated during Pathogen Recognition in Tobacco and Tomato. *The Plant Cell*, **20**, 697–719.
- Van der Hoorn RAL, De Wit PJGM, and Joosten MHAJ**, 2002. Balancing selection favors guarding resistance proteins. *Trends in Plant Science*, **7** No.2 , 67-71.
- Wang D, Amornsiripanitch N, Dong X**, 2006. A Genomic Approach to Identify Regulatory Nodes in the Transcriptional Network of Systemic Acquired Resistance in Plants. *Plos Pathogens*, **2**, 1042-1050.
- Wang D, Weaver ND, Kesarwani M, Dong X**, 2005. Induction of Protein Secretory Pathway is Pequired for Systemic Acquired Resistance. *Science*, **308**, 1036 – 1040.
- Weaver LM, Swiderski MR, Li Y, and Jones JDG**, 2006. The *Arabidopsis thaliana* TIR-NB-LRR R-protein, RPP1A; protein localization and constitutive activation of defence by truncated alleles in tobacco and Arabidopsis. *The Plant Journal*, **47**, 829-840.
- Whitham S, McCormick S, and Baker B**, 1996. The N gene of tobacco confers resistance to tobacco mosaic virus in transgenic tomato. *Plant Biology*, **93**, 8776-8781.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Γεωργόπουλος ΣΓ**, 1984. Βασικές Γνώσεις Φυτοπαθολογίας. Εκδόσεις Γεωπονική Σχολής Αθηνών.
- Ζιώγας ΒΝ, και Μαρκόγλου ΑΝ**, 2007. Γεωργική Φαρμακολογία. Βιοχημεία, Φυσιολογία, Μηχανισμός Δράσης και Χρήσεις των Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων. Έκδοση Βασίλειος Ζιώγας, Αναστάσιος Μαρκόγλου.
- Τζάμος ΕΚ**, 2007. Φυτοπαθολογία Β' Έκδοση. Εκδόσεις Σταμούλη.