

**Φυτοπαθολογική και Μοριακή Διερεύνηση των
μηχανισμών που εμπλέκονται στην άμυνα των
φυτών κατά των παθογόνων των αδρομυκώσεων**

ΙΑΚΩΒΟΣ ΠΑΝΤΕΛΙΔΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**που υποβλήθηκε στο
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών**

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

1. Επαμεινώνδας Παπλωματάς, Αναπληρωτής Καθηγητής, Επιβλέπων
2. Ελευθέριος Τζάμος, Καθηγητής, Μέλος (και Τριμελούς Επιτροπής)
3. Δημήτριος Τσιτσιγιάννης, Λέκτορας, Μέλος (και Τριμελούς Επιτροπής)
4. Παναγιώτης Κατινάκης, Καθηγητής, Μέλος
5. Αθανάσιος Παππάς, Καθηγητής, Μέλος
6. Αναστασία Λαγοπόδη, Επίκουρος Καθηγήτρια, Μέλος
7. Πολύμνια Αντωνίου, Επίκουρος Καθηγήτρια, Μέλος

ΑΘΗΝΑ 2009

*Στην οικογένεια μου,
για την αμέριστη συμπαράσταση και αγάπη τους*

Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Επαμεινώνδα Παπλωματά. Για την πραγματοποίηση της διατριβής ήταν σημαντική η χορήγηση υποτροφίας από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).

Θέλω να εκφράσω την βαθιά ευγνωμοσύνη μου στον Δρ. Παπλωματά που με καθοδήγησε και επέβλεψε για πολλά χρόνια από την πτυχιακή μου μελέτη μέχρι και την ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής και με εμπιστεύτηκε αναθέτοντάς μου ένα πολύ σύγχρονο και ενδιαφέρον θέμα. Το ενδιαφέρον του και οι συστάσεις του για την επίλυση προβλημάτων, συνέβαλαν καθοριστικά στην ολοκλήρωση της διατριβής. Επίσης ο χαρακτήρας του και το εξαιρετο επιστημονικό του υπόβαθρο με ενέπνευσαν για να ασχοληθώ με την έρευνα. Η φιλική του στάση απέναντι μου και η επικοινωνία μας όλα αυτά τα χρόνια ήταν εξαιρετική κάνοντας τη συνεργασία μας πραγματικά ευχάριστη. Κατά την διόρθωση της μελέτης οι ουσιαστικές παρεμβάσεις και η επισήμανση λαθών από τον Δρ. Παπλωματά βελτίωσαν ιδιαίτερα το τελικό κείμενο.

Για την εκπόνηση και ολοκλήρωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν καθοριστική η συμβολή του Λέκτορα Δημήτριου Τσιτσιγιάννη ο οποίος ήταν πάντα πρόθυμος να συζητήσει οποιαδήποτε απορία ή πρόβλημα αντιμετώπισα κατά τη διάρκεια της έρευνας μου. Θέλω να τον ευχαριστήσω ιδιαίτερα για την ανάγνωση και διόρθωση της παρούσας διατριβής αλλά και των δημοσιεύσεων των αποτελεσμάτων της που υποβλήθηκαν και έγιναν αποδεκτά σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά.

Ευχαριστώ θερμά τον Διευθυντή του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας, Καθηγητή Ελευθέριο Τζάμο για το συνεχές και ειλικρινές ενδιαφέρον του για την πρόοδο της εργασίας μου ως μέλος της συμβουλευτικής μου επιτροπής. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για τη φιλοξενία στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας και για την απόλυτη υποστήριξη που μου παρείχε όταν και όπου χρειάστηκε.

Επίσης ευχαριστώ όλα τα μέλη της επιταμελούς εξεταστικής επιτροπής για το χρόνο που διέθεσαν για την ανάγνωση της μελέτης μου, και για την επιείκειά τους κατά την κρίση της μελέτης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Δρ. Σωτήρη Τζάμο για τη διαρκή στήριξη του, το ειλικρινές ενδιαφέρον του και την άμεση συμμετοχή του στην έρευνα μου. Η βοήθεια του ήταν πολύτιμη τόσο στο πειραματικό μέρος όσο και στη συγγραφή των δημοσιεύσεων και την παροχή σχετικής βιβλιογραφίας αλλά και στη ψυχολογική υποστήριξη κατά τις δύσκολες περιόδους όταν τα πειράματα αρνούνταν να δώσουν αξιόλογα αποτελέσματα.

Ευχαριστώ επίσης το διδακτικό προσωπικό και τους φοιτητές του Εργαστηρίου Δενδροκομίας που ήταν πάντα εξυπηρετικοί για τη χρήση του φωτόμετρου. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τους διδακτορικούς φοιτητές Μίνα Κανκαλέτου και Μίλτο Χριστόπουλο για τη προθυμία τους και τη βοήθειά τους στην μέτρηση αιθυλενίου στο χρωματογράφο αέριας μάζας του εργαστηρίου. Από το εργαστήριο Φαρμακολογίας ευχαριστώ τον Λέκτορα Γιάννη Βόντα και που ήταν πάντα πρόθυμος να με συμβουλευτεί σχετικά με τις αντιδράσεις Real-time PCR..

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας, για το ενδιαφέρον τους και την φιλική τους διάθεση, που έκαναν ιδιαίτερα ευχάριστη την εργασία μου στο εργαστήριο.

Όλα αυτά τα χρόνια συνεργάστηκα και δούλεψα δίπλα σε υπέροχους ανθρώπους και εξαιρετικούς επιστήμονες με κοινούς στόχους και κοινά οράματα. Οι φίλιες που αναπτύχθηκαν με στήριξαν πάρα πολύ και με βελτίωσαν ως επιστήμονα και ως άνθρωπο. Ευχαριστώ τους διδάκτορες Αλίκη Τζίμα και Μανώλη Μαρκάκη, τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Μαριλένα Χριστοπούλου και Ιωάννα Μαλανδράκη και τους προπτυχιακούς φοιτητές Ιωάννη Στριγγλή και Μόδεστο Καργάκη. Ευχαριστώ την Αλίκη που τη θεωρώ ως την εργαστηριακή μου “μητέρα” αφού από αυτήν έμαθα σχεδόν όλες τις μοριακές τεχνικές. Οι συζητήσεις μας και η ανταλλαγή απόψεων, άρθρων και υλικών ήταν πάντα ουσιαστικές. Ευχαριστώ τον Μανώλη για την άριστη συνεργασία, για τη πολύτιμη βοήθειά του κυρίως στην εφαρμογή της Real-time PCR αλλά και για την ανιδιοτελή και πραγματική του φιλία. Ευχαριστώ ιδιαίτερα την Ιωάννα για την υπομονή της και για την πολυδιάστατη υποστήριξη της εντός και εκτός εργαστηρίου. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Γιάννη και τον Μόδεστο για τη βοήθεια τους κυρίως στα πειράματα θερμοκηπίου αλλά και για το συνεχές ενδιαφέρον τους και τη φιλία τους.

Τέλος, ευχαριστώ τον Δρ. Dinesh-Kumar από το Πανεπιστήμιο του Yale (USA) που είχε την ευγενική καλοσύνη να μου παραχωρήσει τους φορείς της γονιδιακής σύλληψης.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	4
1.1. Ο ΑΜΥΝΤΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ	4
1.1.1. Γενικά	4
1.1.2 Η άμυνα των φυτών στη μόλυνση από τα παθογόνα: τύποι και μηχανισμοί.	5
1.1.2.1 Βασικό ανοσοποιητικό σύστημα.....	6
1. Ανθεκτικότητα των μη-ξενιστών (non-host)	6
2. Βασική (basal) ανθεκτικότητα	7
1.1.2.2 Ανοσοποιητικό σύστημα των γονιδίων ανθεκτικότητας.....	8
1. Γόνου προς γόνο ανθεκτικότητα χωρίς Αντίδραση Υπερευαισθησίας.....	8
2. Γόνου προς γόνο ανθεκτικότητα που σχετίζεται με την Αντίδραση Υπερευαισθησίας	8
1.1.2.3 Μετα-μεταγραφική γονιδιακή σίγηση (Post-transcriptional gene silencing) .	14
1.1.2.4 Επίκτητη διασυστηματική ανοχή των φυτών	15
1. Επίκτητη ανοχή και ο ρόλος του σαλικυλικού οξέος.....	15
2. SA-ανεξάρτητη ενεργοποίηση της έκφρασης PR γονιδίων.....	17
3. Το ιασμονικό οξύ και το αιθυλένιο ρυθμίζουν την έκφραση των ντιφενσινών (defensins) και των θειονινών (thionins)	19
4. Διασυστηματική ανοχή που επάγεται από τραυματισμούς	21
5. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των σημάτων	21
1.1.3 Οι ασθένειες των αδρομυκώσεων	25
Αδρομυκώσεις που προκαλεί ο μύκητας <i>Fusarium sp.</i>	26
Αδρομυκώσεις που προκαλεί ο μύκητας <i>Verticillium sp.</i>	28
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	31
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	33
ΤΟ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ ΚΑΙ Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΜΥΝΑ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ	
ARABIDOPSIS THALIANA	33
2.1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	33
2.2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	35
2.2.1 Βιοσύνθεση του αιθυλενίου	36
2.2.1.1 Μεταγραφική ρύθμιση της βιοσύνθεσης του αιθυλενίου	37
2.2.1.2 Μετα-μεταγραφική ρύθμιση της βιοσύνθεσης του αιθυλενίου	38
2.2.2 Πρόσληψη και μεταγωγή στο κυτόπλασμα.....	39
2.2.2.1 Πρόσληψη του αιθυλενίου από τους υποδοχείς που βρίσκονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο	41
2.2.2.2 Ενδοκυτταρικό μονοπάτι μεταγωγής του αιθυλενίου.....	44
2.2.3 Μεταβίβαση του σήματος αιθυλενίου στον πυρήνα	45

2.2.3.1	Πρωτογενής μεταγραφική ρύθμιση: EIN3/EIL Μεταγραφικοί παράγοντες.....	45
2.2.3.2	Δευτερογενής μεταγραφική ρύθμιση: AP2/ERF Μεταγραφικοί παράγοντες.....	46
2.2.4	Το αιθυλένιο και οι αμυντικοί μηχανισμοί των φυτών.....	47
2.2.4.1	Επαγωγή μορίων διεγερτών άμυνας μέσω του αιθυλενίου.....	48
2.2.4.2	Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αρχικών σταδίων του μονοπατιού μεταγωγής του αιθυλενίου και άλλων μηχανισμών της επαγόμενης αντοχής.....	50
2.2.4.3	Ο ρόλος του αιθυλενίου στον καθορισμό του αποτελέσματος της αλληλεπίδρασης παθογόνου – ξενιστή.....	54
2.3.	ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	60
2.3.1	Φυτικό υλικό.....	60
2.3.2	Στελέχη φυτοπαθογόνων μυκήτων και προετοιμασία μολύσματος.....	61
2.3.3	Δοκιμές παθογένειας σε μεταλλαγμένα φυτά <i>Arabidopsis</i>	62
2.3.4	Σχεδιασμός εκκινήτων.....	62
2.3.5	Απομόνωση DNA από φυτά <i>A. thaliana</i>	64
2.3.6	Απομόνωση RNA από φυτά <i>A. thaliana</i>	65
2.3.7.	Μέτρηση νουκλεϊνικών οξέων.....	65
2.3.8	Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής.....	66
2.3.9	Εφαρμογή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).....	67
2.3.10	Προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων <i>Escherichia coli</i>	68
2.3.11	Κλωνοποίηση Προϊόντων PCR.....	68
2.3.12	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από το βακτήριο <i>Escherichia coli</i>	69
2.3.13	Πέψη νουκλεϊκών οξέων με περιοριστικά ένζυμα.....	70
2.3.14	Ηλεκτροφόρηση τμημάτων DNA.....	70
2.3.15	Μετασχηματισμός του μύκητα <i>V. dahliae</i> με το γονίδιο της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης.....	70
2.3.16	Ιστοπαθολογική παρατήρηση της διαδικασίας μόλυνσης σε υδροπονικό σύστημα καλλιέργειας.....	72
2.3.17	Προετοιμασία δειγμάτων για Microarrays και ανάλυση δεδομένων.....	72
2.3.18	Εφαρμογή PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR).....	73
2.4	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	76
2.4.1	Η αδυναμία πρόσληψης αιθυλενίου μέσω του υποδοχέα ETR1 μειώνει τα συμπτώματα που προκαλούν οι μύκητες <i>V. dahliae</i> και <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i> σε φυτά <i>A. thaliana</i>	76
2.4.2	Ιστοπαθολογική παρατήρηση της διαδικασίας μόλυνσης σε φυτά <i>A. thaliana</i>	82
2.4.3	Ποσοτικοποίηση των μυκήτων <i>V. dahliae</i> και <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i> σε φυτά <i>A. thaliana</i> με Real-time PCR.....	86
2.4.3.1	Ενίσχυση με PCR και κλωνοποίηση των γονιδίων 5.8S rRNA και PG5.....	87
2.4.3.2	Εφαρμογή και ανάλυση αποτελεσμάτων Real-time PCR.....	88
2.4.4	Μεταγραφικές μεταβολές σε φυτά WT και <i>etr1-1 A. thaliana</i> , μετά από μόλυνση με τον μύκητα <i>V. dahliae</i>	90

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

2.4.5	Μελέτη της επαγωγής γονιδίων σχετιζόμενων με τον μηχανισμό ανοχής σε φυτά WT, <i>etr1-1</i> και <i>ein4 A. thaliana</i> , εναντίον του μύκητα <i>V. dahliae</i>	96
2.5.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	100
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	109
	ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΟΥ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟΥ ΣΤΗΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ ΚΑΤΑ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ VERTICILLIUM DAHLIAE	109
3.1.	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	109
3.2.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	111
3.2.1	Γενικά	111
3.2.2	Η οικογένεια υποδοχέων αιθυλενίου στη τομάτα	111
3.2.2.1	Έκφραση των υποδοχέων της τομάτας	112
3.2.2.2	Γονιδιακή έκφραση και λειτουργία.....	113
3.2.3	RNA γονιδιακή σίγηση.....	116
3.2.3.1	Μονοπάτια της RNA σίγησης στα φυτά.....	117
3.2.3.2	Ο μηχανισμός της RNA σίγησης στα φυτά.....	118
3.2.3.3	Η πρωτεΐνη Dicer συμμετέχει στο σχηματισμό των siRNA και miRNA	118
3.2.3.4	Αλληλεπίδραση της Dicer με άλλες πρωτεΐνες μπορεί να καθορίσει την επεξεργασία των siRNA και miRNA.....	121
3.2.3.5	Εφαρμογή της RNA σίγησης στα φυτά.....	121
3.2.4	Ιϊκά επαγόμενη γονιδιακή σίγηση	123
3.2.5	Πρακτικά θέματα της τεχνολογίας VIGS	125
3.2.5.1	Το ιϊκό ένθετο	125
3.2.5.2	Ο ιϊκός φορέας.....	126
3.2.5.3	Φορείς για <i>in vitro</i> μεταγραφή και “Agro-εμβολιασμό”.....	127
3.2.5.4	Αποτίμηση της VIGS.....	128
3.3.	ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	130
3.3.1	Φυτικό υλικό	130
3.3.2	Σχεδιασμός εκκινήτων	130
3.3.3	Κατασκευή του <i>pTRV-ETR4</i> φορέα σίγησης.....	132
3.3.4	Εισαγωγή φορέα σίγησης στο βακτήριο <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	132
3.3.5	Εφαρμογή VIGS σε φυτά τομάτας.....	133
3.3.6	Στέλεχος φυτοπαθογόνου μύκητα και προετοιμασία μολύσματος	134
3.3.7	Δοκιμές παθογένειας σε φυτά τομάτας	134
3.3.8	Απομόνωση DNA από φυτά τομάτας	135
3.3.9	Απομόνωση RNA από φυτά <i>A. thaliana</i>	135
3.3.10.	Μέτρηση νουκλεϊνικών οξέων.....	136
3.3.11	Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής.....	136
3.3.12	Εφαρμογή PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR)	136

3.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	138
3.4.1 Ενίσχυση του γονιδίου <i>ETR4</i> από τομάτα και κλωνοποίηση σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς.....	138
3.4.2 Δημιουργία του φορέα σίγησης <i>pTRV-ETR4</i>	139
3.4.3 Ιικά επαγόμενη γονιδιακή σίγηση του γονιδίου <i>ETR4</i> της τομάτας	140
3.4.4 Η αδυναμία πρόσληψης αιθυλενίου μέσω των υποδοχέων <i>Never ripe</i> και <i>ETR4</i> μειώνει τα συμπτώματα που προκαλεί ο μύκητας <i>V. dahliae</i> σε φυτά τομάτας ..	144
3.4.5 Ποσοτικοποίηση του μύκητα <i>V. dahliae</i> σε φυτά τομάτας με Real-time PCR..	149
3.4.6 Έλεγχος της επαγωγής γονιδίων που σχετίζονται με το μηχανισμό αντοχής σε φυτά τομάτας WT και <i>Never ripe</i> κατά την μόλυνση με το μύκητα <i>V. dahliae</i>	152
3.5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	153
ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	159
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	165
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	186

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, διερευνήθηκαν οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην άμυνα των φυτών εναντίον των μυκήτων που προκαλούν αδρομυκώσεις, *Verticillium dahliae* και *Fusarium oxysporum*. Κατά τη διαδικασία της αναγνώρισης και της μόλυνσης των φυτών από τα παθογόνα έχει αναφερθεί η συμμετοχή του σαλικυλικού οξέος (SA), του ιασμονικού οξέος (JA) και του αιθυλενίου (ET), καθώς και των μονοπατιών πρόσληψης και μεταγωγής του σήματός τους στα φυτά. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι το αιθυλένιο και το μονοπάτι μεταγωγής του σήματός του συμμετέχουν στην άμυνα των φυτών εναντίον διαφόρων παθογόνων και ιδιαίτερα των νεκροτροφικών. Σε ορισμένες περιπτώσεις διαπιστώθηκε ότι η μη αντίληψη του αιθυλενίου προάγει την ασθένεια που προκαλούν τα παθογόνα ενώ σε άλλες φάνηκε ότι τα φυτά δεν παρουσίασαν τόσο έντονα συμπτώματα όσο τα φυτά αγρίου τύπου. Πάντως, σε καμία περίπτωση τα μειωμένα συμπτώματα δεν συσχετίστηκαν με τη μειωμένη ποσότητα των παθογόνων στους ιστούς των φυτών, υποδεικνύοντας ότι η μη αντίληψη του αιθυλενίου δεν ενεργοποιεί την καταστολή της ανάπτυξης των παθογόνων αλλά είναι μια αντίδραση που σχετίζεται κυρίως με τη φυσιολογία των φυτών.

Στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκαν πειράματα παθογένειας με τους μύκητες *V. dahliae* και *F. oxysporum* σε μια σειρά μεταλλαγμένων και γενετικώς τροποποιημένων φυτών *Arabidopsis thaliana* στα μονοπάτια του SA, του JA και του ET έτσι ώστε να μελετηθεί ο ρόλος τους στην άμυνα των φυτών κατά των αδρομυκώσεων. Διαπιστώθηκε ότι μόνο τα μεταλλαγμένα φυτά *etr1-1*, στα οποία ο υποδοχέας αιθυλενίου ETR1 είναι απενεργοποιημένος, παρουσίασαν στατιστικά λιγότερο έντονα συμπτώματα και χαμηλότερο ποσοστό ασθένειας μετά τη μόλυνσή τους με τους μύκητες *V. dahliae* και *F. oxysporum* σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα μεταλλαγμένα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν. Για να διερευνηθεί αν η μείωση αυτή οφείλεται σε μειωμένη ανάπτυξη των παθογόνων στους αγγειακούς ιστούς των φυτών *etr1-1*, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ποσοτικοποίησης των μυκήτων σε φυτά αγρίου τύπου και στα μεταλλαγμένα φυτά του αιθυλενίου, με αντιδράσεις Real-time PCR σε διάφορες χρονικές στιγμές μετά την μόλυνση τους με τους μύκητες. Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι η ποσότητα των παθογόνων στα *etr1-1* φυτά ήταν σημαντικά μικρότερη από τα υπόλοιπα μεταλλαγμένα φυτά υποδεικνύοντας ότι αναπτύσσεται κάποιος μηχανισμός που περιορίζει τα παθογόνα στους ξενιστές αυτούς. Για να διερευνηθεί ο μηχανισμός αυτός, μελετήθηκε το μεταγραφικό προφίλ των φυτών *etr1-1* σε σχέση με αυτό των αγρίου τύπου φυτών 6 ημέρες μετά τη

μόλυνση τους με τον μύκητα *V. dahliae* με τη βοήθεια της τεχνολογίας των μικροσυστοιχιών (microarrays). Τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού έδειξαν ότι 95 γονίδια υπερεκφράστηκαν τουλάχιστον δύο φορές μόνο στα *etr1-1* φυτά και από αυτά επιλέχθηκε μια ομάδα από εννέα γονίδια ως υποψήφια για επιβεβαίωση με Real-time PCR σε διάφορες χρονικές στιγμές μετά τη μόλυνση με τον *V. dahliae*. Σε αυτά τα πειράματα συμπεριλήφθηκαν 23 ακόμα γονίδια που αποτελούν δείκτες επαγωγής αμυντικών μηχανισμών μέσω των μονοπατιών αντίληψης του αιθυλενίου, του σαλικυλικού, του ιασμονικού και του αμπισσικού οξέος. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της Real-time PCR επιβεβαίωσαν την υπερέκφραση των γονιδίων *GSTF12*, *GSTU16* (glutathione-S-transferases), *CHI-1*, *CHI-2* (chitinases), *PR-5* (thaumatin-like), *PR-1*, *PR-2* (β -1,2 glucanase) και του μεταγραφικού παράγοντα *Myb75* στα *etr1-1* φυτά σε σχέση με τα αγρίου τύπου και *ein4* φυτά καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων, υποδεικνύοντας τη μοριακή βάση που ελέγχει την ανθεκτικότητα στον μύκητα *V. dahliae*.

Ακολούθως για να διερευνηθεί εάν η πρόσληψη του αιθυλενίου παίζει αντίστοιχο ρόλο στην άμυνα φυτών τομάτας εναντίον του μύκητα *V. dahliae* πραγματοποιήθηκαν πειράματα παθογένειας του μύκητα με τα μεταλλαγμένα φυτά *Never ripe (Nr)*, που έχουν απενεργοποιημένο τον υποδοχέα αιθυλενίου LeETR3, ο οποίος είναι ομόλογος του ETR1 του φυτού *A. thaliana*. Διαπιστώθηκε ότι τα μεταλλαγμένα φυτά *Nr* παρουσίασαν στατιστικά λιγότερα συμπτώματα από τα φυτά αγρίου τύπου. Τα πειράματα ποσοτικοποίησης που ακολούθησαν έδειξαν ότι στα *Nr* φυτά η ποσότητα του μύκητα ήταν σημαντικά μικρότερη σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου. Επίσης διερευνήθηκε η δυνατότητα επαγωγής RNA γονιδιακής σίγησης, μέσω της τεχνολογίας της ιικά επαγόμενης γονιδιακής σίγησης (virus induced gene silencing – VIGS), ώστε να επιτευχθεί μείωση της έκφρασης του γονιδίου *ETR4* που κωδικοποιεί έναν άλλο υποδοχέα αιθυλενίου στη τομάτα. Μετά την επίτευξη της γονιδιακής σίγησης του *ETR4* ακολούθησαν δοκιμές παθογένειας με τον μύκητα *V. dahliae* όπου βρέθηκε ότι τα φυτά που είχαν υποστεί σίγηση παρουσίασαν λιγότερα συμπτώματα από τα φυτά του μάρτυρα. Σε αυτή την περίπτωση δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση της ποσότητας του *V. dahliae* στα φυτά που είχαν υποστεί σίγηση σε σχέση με τα φυτά του μάρτυρα, τουλάχιστον τη χρονική στιγμή (τέλος πειράματος 37 ημέρες μετά τη μόλυνση) που πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα ποσοτικοποίησης.

Η εργασία αυτή έδειξε το σημαντικό ρόλο των υποδοχέων ETR1 και Nr στις αδρομυκώσεις υποδεικνύοντας ότι η αναστολή της λειτουργίας τους οδηγεί στην ενεργοποίηση μηχανισμών άμυνας των φυτών που περιορίζουν τα παθογόνα. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας συνεισφέρουν σε ένα βαθμό στη κατανόηση

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

της αλληλεπίδρασης των φυτών με τα παθογόνα των αδρομυκώσεων, που είναι απαραίτητη ώστε να αναπτυχθούν αποτελεσματικοί τρόποι αντιμετώπισης τους, αφού μέχρι σήμερα η καταπολέμηση τους δεν είναι αποτελεσματική.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ο ΑΜΥΝΤΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

1.1.1. Γενικά

Τα φυτά για να επιβιώσουν κατά τη διάρκεια της εξέλιξης τους έχουν εκτεθεί σε δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες και καταπονήσεις από παθογόνους οργανισμούς. Οι παθογόνοι αυτοί οργανισμοί - μύκητες, βακτήρια και ιοί - χρησιμοποιούν διαφορετικούς βιοχημικούς και μοριακούς μηχανισμούς προκειμένου να μολύνουν τα φυτά, τα οποία έχουν αναπτύξει αμυντικά συστήματα ώστε να προστατευθούν από τα παθογόνα. Αποτέλεσμα αυτής της αλληλεπίδρασης είναι μια σταθερή και παράλληλη εξέλιξη στο χρόνο του αμυντικού συστήματος των φυτών και των μηχανισμών μολυσματικότητας των παθογόνων (Agrios, 2005).

Η άμυνα των φυτών προς τα παθογόνα είναι αποτέλεσμα ενός πολύπλοκου συνδυασμού δομικών χαρακτηριστικών και επαγόμενων βιοχημικών αντιδράσεων. Τα δομικά χαρακτηριστικά, όπως το κυτταρικό τοίχωμα, αποτελούν ένα προϋπάρχον αμυντικό σύστημα, το οποίο λειτουργεί ως φυσικό εμπόδιο που αποτρέπει την είσοδο και εξάπλωση των παθογόνων σε όλο το φυτό. Επιπροσθέτως τα φυτά αντιλαμβάνονται άμεσα ή έμμεσα την παρουσία ενός παθογόνου με επακόλουθο την επαγωγή των αμυντικών αντιδράσεων. Αυτές οι αντιδράσεις περιλαμβάνουν τη σύνθεση σημάτων όπως είναι το σαλικυλικό οξύ, το αιθυλένιο και το ιασημονικό οξύ τα οποία ελέγχουν την έκφραση γονιδίων και την παραγωγή μορίων που σχετίζονται με την άμυνα του φυτού. Όλες αυτές οι επαγόμενες βιοχημικές αντιδράσεις τείνουν προς τη δημιουργία προστατευτικών φυσιολογικών συνθηκών με σκοπό τον περιορισμό της εισόδου και ανάπτυξης του παθογόνου στους ιστούς του φυτού. Το τελικό αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης φυτού-παθογόνου είναι η πρόκληση ασθένειας στο φυτό (συμβατότητα) ή η αντοχή του φυτού (ασύμβατη αντίδραση) και εξαρτάται από ένα συνδυασμό πολλών διαφορετικών παραμέτρων. Αυτές οι παράμετροι περιλαμβάνουν τα γενετικά χαρακτηριστικά και τη φυσιολογική κατάσταση του φυτού και του παθογόνου καθώς και πολλές περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως η θερμοκρασία, η υγρασία και το φως.

1.1.2 Η άμυνα των φυτών στη μόλυνση από τα παθογόνα: τύποι και μηχανισμοί

Τα φυτά έχουν αναπτύξει ένα παθητικό αμυντικό σύστημα (π.χ. φυσικοί παράγοντες και κατασκευές του φυτού, τοξικοί μεταβολίτες) και έναν εγγενές ενεργητικό μηχανισμό άμυνας που έχει διαφοροποιηθεί βιοχημικά στο (α) βασικό ανοσοποιητικό σύστημα (basal innate immune system) που ενεργοποιείται 10-30 min μετά την επαφή του φυτού με το παθογόνο και (β) στο ανοσοποιητικό σύστημα των γονιδίων ανθεκτικότητας (resistance (R) - gene-mediated innate immune system) που ενεργοποιείται 2-3 h μετά την επαφή και την απελευθέρωση των διεγερτών από το παθογόνο στο φυτικό κύτταρο.

Η επαφή αποτελεί το πρώτο στάδιο επικοινωνίας του παθογόνου με τον ξενιστή. Για τη μετάβαση όμως στα επόμενα στάδια της διεισδύσεως και εγκαταστάσεως του παθογόνου, μια ροή γενετικών πληροφοριών υφίσταται σε παθογόνο και ξενιστή, οι οποίες θα εξασφαλίσουν την αλληλοαναγνώριση. Η αναγνώριση αποτελεί το πρωταρχικό βήμα σε οποιαδήποτε άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ παθογόνων ή μη παθογόνων και ξενιστών φυτών. Πρόκειται για μια βιοχημική και μοριακή διεργασία που παρέχει τη δυνατότητα στα παθογόνα να αναγνωρίζουν τους ξενιστές στο περιβάλλον τους και ειδικότερα εξειδικευμένες επιφάνειες και χαρακτηριστικά τους, για να εξασφαλίσουν τη διείσδυση και τη μόλυνση (Montesano et al., 2003).

Μία ομάδα βιοχημικών παραγόντων που καλούνται διεγέρτες (elicitors) δρουν κατά τα αρχικά στάδια της αναγνώρισεως μεταξύ παθογόνου και ξενιστή με σκοπό την καταστολή ή τη διέγερση του εγγενούς φυτικού ανοσοποιητικού συστήματος. Οι διεγέρτες μεταβιβάζουν μέσω εξειδικευμένων προσδεουσών πρωτεϊνών (binding proteins), οι οποίες αποτελούν τους υποδοχείς-δέκτες στις κυτταρικές μεμβράνες ή στο κυτόπλασμα των φυτών, το μήνυμα στον ξενιστή για την επαπειλούμενη είσοδο και μόλυνση με αποτέλεσμα την πρόκληση ή την αποφυγή της ασθένειας από το συγκεκριμένο παθογόνο (Montesano et al., 2003).

Ο όρος διεγέρτης χρησιμοποιείται για όλες τις χημικές ουσίες που διεγείρουν οποιοδήποτε αμυντικό μηχανισμό του φυτού. Οι διεγέρτες περιλαμβάνουν μόρια παθογόνου προέλευσης (εξωγενείς διεγέρτες) και ενώσεις που απελευθερώνονται από τα φυτά κατά την επαφή τους με τα παθογόνα (ενδογενείς διεγέρτες) (Boller, 1995· Ebel και Cosio, 1994). Οι διεγέρτες κατατάσσονται σε 2 κατηγορίες, τους γενικούς (general) που έχουν την ικανότητα διεγέρσεως του βασικού ανοσοποιητικού συστήματος σε ξενιστές και μη-ξενιστές του παθογόνου και τους εξειδικευμένους σε φυλή παθογόνου (race-specific) διεγέρτες που οδηγούν στην ανάπτυξη ανοχής

μόνο σε φυτά ξενιστές μέσω του ανοσοποιητικού συστήματος των γονιδίων ανθεκτικότητας. Οι διεγέρτες έχουν την ικανότητα δράσης σε χαμηλές συγκεντρώσεις και δεν έχουν κοινή χημική δομή, αλλά ανήκουν σε μια ευρεία κλίμακα χημικών ενώσεων που συμπεριλαμβάνουν ολιγοσακχαρίτες, πεπτιδία, πρωτεΐνες και λιπίδια (Montesano et al., 2003). Οι περισσότεροι διεγέρτες είναι συστατικά στοιχεία των κυτταρικών τοιχωμάτων των παθογόνων όπως η γλουκάνη, η χιτίνη και τα λιποπολυσακχαρίδια όπως επίσης και η φλατζελίνη (flagellin), δομικό συστατικό του βακτηριακού μαστιγίου και ονομάζονται από κοινού PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) (Nürnbergger και Brunner, 2002). Μια άλλη κλάση διεγερτών που παίζουν ρόλο στην μολυσματική ικανότητα των παθογόνων είναι τα προϊόντα των γονιδίων αμολυσματικότητας (*Avr*) (Nürnbergger, 1999· Bonas και Lahaye, 2002).

1.1.2.1 Βασικό ανοσοποιητικό σύστημα

Το βασικό ανοσοποιητικό σύστημα των φυτών προσφέρει στα φυτά μη-εξειδικευμένη (γενική) ανθεκτικότητα (non-specific resistance), η οποία είναι αποτελεσματική εναντίον αρκετών φυτοπαθογόνων ειδών ή στελεχών (φυλών, βιοτύπων, παθοτύπων) ενός παθογόνου.

1. Ανθεκτικότητα των μη-ξενιστών (non-host)

Η πιο σημαντική και μεγάλης διάρκειας μορφή ανθεκτικότητας είναι η λεγόμενη ανθεκτικότητα του μη-ξενιστή (non-host resistance), που σημαίνει ότι όλα τα μέλη ενός φυτικού είδους είναι ανθεκτικά σε όλες τις φυλές ενός παθογόνου είδους (Mellersh et al., 2002· Thordal-Christensen, 2003· Mysore και Ryu, 2004). Παρόλο που αυτός είναι ο πιο κοινός τύπος ανθεκτικότητας, έχουν γίνει σχετικά λίγες έρευνες στις οποίες επιχειρήθηκε να εξηγηθεί αυτός ο μηχανισμός. Αυτές οι έρευνες έδειξαν ότι η ισορροπία μεταξύ των ενεργών ομάδων οξυγόνου (reactive oxygen species – ROS) και των αντιοξειδωτικών μπορεί να παίζει ρόλο στην ανάσχεση της εισόδου των παθογόνων στους μη-ξενιστές. Οι Trujillo et al., (2004) έδειξαν ότι οι ROS, και ιδιαίτερα το υπεροξειδίο του υδρογόνου, μπορεί να είναι η αιτία της ανθεκτικότητας του κριθαριού στο μύκητα *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. Είναι πιθανόν οι ROS να είναι υπεύθυνες για τον περιορισμό του παθογόνου τόσο στους μη-ξενιστές όσο και στις ασύμβατες αλληλεπιδράσεις (incompatible interactions). Οι Mellersh et al., (2002) αναφέρονται στη πιθανή συμμετοχή των ROS στη ανθεκτικότητα των φυτών *Vigna unguiculata* στον περονόσπορο *Erysiphe polygoni*, βασιζόμενοι στα αποτελέσματα της εφαρμογής αντιοξειδωτικών στα φυτά.

2. Βασική (*basal*) ανθεκτικότητα

Αυτή η μορφή ανθεκτικότητας εμφανίζεται κατά τα πρώτα στάδια της αλληλεπίδρασης παθογόνου-ξενιστή. Τα φυτά έχουν υποδοχείς με τους οποίους αντιλαμβάνονται τους “γενικούς διεγέρτες” (general elicitors) ή τα συντηρημένα μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με παθογόνα (pathogen-associated molecular patterns - PAMP), τα οποία παρατηρούνται σε πολλά παθογόνα (Abramovitch et al., 2006). Ένα τυπικό PAMP είναι ένα πεπτίδιο που προέρχεται από βακτηριακή φλατζελίνη (flagellin), μια πρωτεΐνη η οποία αποτελεί συστατικό των μαστιγίων στα κινούμενα βακτήρια. Άλλα PAMPs μπορεί να είναι λιποπολυσακχαρίτες (lipopolysaccharides), η χιτίνη και η εργοστερόλη των μυκήτων. Η αναγνώριση της φλατζελίνης γίνεται από τον υποδοχέα FLS2. Ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης της φλατζελίνης και του FLS2, το PAMP αναγνωρίζεται από πρωτεϊνικές κινάσες (Chinchilla et al., 2006) και αρκετά γονίδια ενεργοποιούνται στο μολυσμένο φυτό. Τα περισσότερα από αυτά τα γονίδια είναι ίδια με αυτά που ενεργοποιούνται αργότερα κατά την εκδήλωση του εγγενούς ανοσοποιητικού συστήματος των γονιδίων ανθεκτικότητας, όταν το προϊόν του γονιδίου *R* (resistance) του φυτού αλληλεπιδρά με το προϊόν του γονιδίου *Avr* (avirulence) του παθογόνου (Navarro et al., 2004; Zipfel et al., 2004). Όσον αφορά το μηχανισμό που περιορίζει ή νεκρώνει το παθογόνο έχουν αναφερθεί η αύξηση της δράσης χιτινασών και κάποιων άλλων ενζύμων που αποδομούν το κυτταρικό τοίχωμα και η συσσώρευση αντιμικροβιακών ουσιών. Η αυξημένη δραστηριότητα των χιτινασών αποδομεί τη χιτίνη στα κυτταρικά τοιχώματα των μυκήτων (van Loon et al., 2006). Είναι ενδιαφέρον επίσης το ότι η δραστηριότητα τέτοιων ενζύμων είναι χαρακτηριστικό φυτών που είναι ανθεκτικά σε ιϊκές ή βακτηριακές προσβολές. Μια πιθανή εξήγηση στη περίπτωση των βακτηρίων είναι ότι οι περισσότερες χιτινάσες παρουσιάζουν λυσοζυμική δραστηριότητα (lysozyme, ένζυμο που αποδομούν τα βακτηριακά κυτταρικά τοιχώματα).

Μια χαρακτηριστική μη-εξειδικευμένη ανθεκτικότητα, η οποία είναι αποτελεσματική εναντίον αρκετών φυλών παθογόνων που προκαλούν ωΐδιο στο κριθάρι, κωδικοποιείται από τους μεταλλαγμένους αλληλόμορφους *mlo* (χωρίς φαινοτυπική δράση) του γονιδίου *Mlo* που έχει διαρκή δράση. Αυτός ο τύπος ανθεκτικότητας εφαρμόστηκε αποτελεσματικά για αρκετές δεκαετίες στην πράξη. Το γονίδιο *Mlo* του κριθαριού κλωνοποιήθηκε και κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που είναι αρνητικός ρυθμιστής της κυτταρικής νέκρωσης και της ανθεκτικότητας στο ωΐδιο *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* (Büschges et al., 1997). Η υπερέκφραση μιας πρωτεΐνης που παρεμποδίζει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (programmed cell death – PCD) (Bax inhibitor-1) οδήγησε στην καταστολή

της ανθεκτικότητας μέσω *mlo* στο ωΐδιο του κριθαριού (Hückelhoven et al., 2003). Μια πρόσφατη εργασία έδειξε ότι υπάρχουν λειτουργικά *Mlo* γονίδια και στο φυτό *Arabidopsis thaliana* (Consonni et al., 2006). Επομένως η μη-εξειδικευμένη ανθεκτικότητα μέσω του *Mlo* στο ωΐδιο μπορεί να είναι πολύ πιο διαδεδομένο φαινόμενο στα φυτά από ότι φαινόταν αρχικά. Σε μια άλλη μορφή μη-εξειδικευμένης ανθεκτικότητας ο ξενιστής φαίνεται να είναι ευπαθής και να μολύνεται, ωστόσο ο μύκητας αναπαράγεται πολύ αργά και σε χαμηλά επίπεδα. Αυτή η μορφή ανθεκτικότητας έχει παρατηρηθεί στις σκωριάσεις και στον *Phytophthora infestans* στην πατάτα (Song et al., 2003). Οι λεπτομέρειες του μηχανισμού δεν είναι ακόμα γνωστές. Όλες οι αναφερθείσες μορφές γενικής ανθεκτικότητας δεν συσχετίζονται με την αντίδραση υπερευαισθησίας (hypersensitive response - HR). Ωστόσο στην περίπτωση της *mlo* ανθεκτικότητας τα μολυσμένα κύτταρα του ξενιστή αντιδρούν στη διείσδυση του παθογόνου με το σχηματισμό θηλών (papillae) (πάχυνση των κυτταρικών τοιχωμάτων), που θεωρείται ότι περιορίζουν την ανάπτυξη του παθογόνου. Προγενέστερες έρευνες έδειξαν ότι συσσωρεύονται ROS (π.χ. H_2O_2) ως αντίδραση στα φύλλα των *mlo* φυτών, αλλά ο ρόλος τους δεν έχει συσχετιστεί με την ανθεκτικότητα (Thordal-Christensen et al., 1997; Hückelhoven et al., 1999).

1.1.2.2 Άνοσοποιητικό σύστημα των γονιδίων ανθεκτικότητας

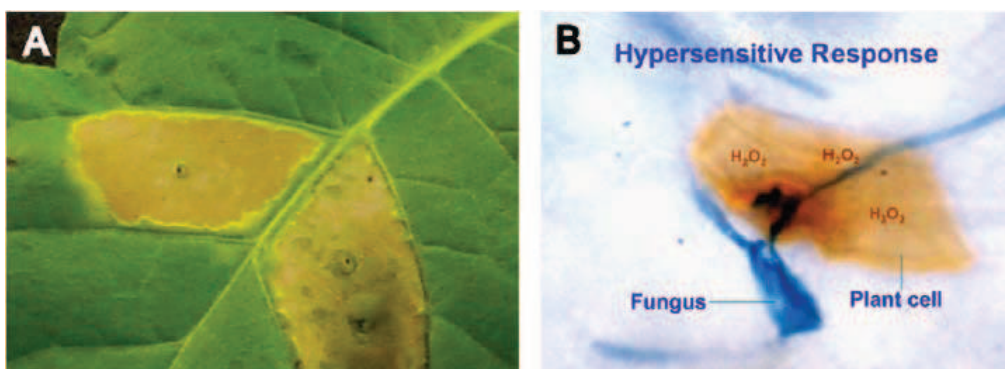
1. Γόνου προς γόνο ανθεκτικότητα χωρίς Αντίδραση Υπερευαισθησίας

Μια ιδιαίτερη μορφή εξειδικευμένης ανθεκτικότητας είναι η ανθεκτικότητα που λέγεται και “αντίδραση άνοσοποίησης”. Αυτός ο τύπος ανθεκτικότητας δεν σχετίζεται με την HR, αφού δεν παρατηρούνται νεκρωτικά σημεία στο σημείο μόλυνσης του ανθεκτικού φυτού. Μια από τις πιο καλά μελετημένες μορφές γόνου προς γόνο ανθεκτικότητας είναι αυτή που προέρχεται από το γονίδιο *Rx* της πατάτας, και που είναι αποτελεσματική εναντίον της μόλυνσης από τον ιό *Potato virus X* (Bendahmane et al., 1999). Η ανθεκτικότητα που προσφέρει το γονίδιο *Rx* καθορίζεται από τυπικό γόνου προς γόνο μηχανισμό. Ο περιορισμός του ιού συμβαίνει άμεσα στα μολυσμένα φυτά, πριν την εκδήλωση της HR. Οι βιοχημικοί ή μοριακοί μηχανισμοί που διέπουν την πιο πάνω ανθεκτικότητα δεν είναι γνωστοί.

2. Γόνου προς γόνο ανθεκτικότητα που σχετίζεται με την Αντίδραση Υπερευαισθησίας

Αυτός ο τύπος εξειδικευμένης ανθεκτικότητας σχετίζεται με το μηχανισμό του γόνου προς γόνο και την HR των φυτών. Έχει μελετηθεί πιο πολύ από κάθε άλλη μορφή ανθεκτικότητας στα φυτά και χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό νεκρώσεων

σε μικρά τμήματα του φυτικού ιστού στα ανθεκτικά φυτά. Το παθογόνο παραμένει εντός των ορίων του σημείου προσβολής και περιορίζεται ή και νεκρώνεται στους ανθεκτικούς ιστούς (Klement et al., 1964) (Εικόνα 1.1). Παλαιότερα, επικρατούσε η άποψη ότι το παθογόνο περιορίζεται ή νεκρώνεται από την έλλειψη θρεπτικών στοιχείων στα νεκρά κύτταρα στις HR. Αυτή η εξήγηση έχει λογική στην περίπτωση των σκωριάσεων και των ιώσεων που προκαλούνται από υποχρεωτικά παράσιτα (βιοτροφικά) αλλά σύγχρονες μελέτες έχουν αποδείξει την ανάπτυξη πολύπλοκων αμυντικών μηχανισμών που σταματούν την ανάπτυξη των παθογόνων (Hofius et al., 2007). Τα νεκροτροφικά παθογόνα ωστόσο προτιμούν τους νεκρούς φυτικούς ιστούς, που σε μερικές περιπτώσεις είναι αποτέλεσμα των τοξικών επιδράσεων των νεκροτροφικών παθογόνων. Παρ' όλα αυτά δεν είναι γνωστό γιατί τα νεκροτροφικά παθογόνα περιορίζονται στα φυτά που αναπτύσσουν HR (Király et al., 2007).



Εικόνα 1.1: Α. Αντίδραση υπερευαισθησίας με τοπική νέκρωση σε φύλλα καπνού μετά από ένεση πυκνής συγκεντρώσεως του διεγέρτη Avr9 του μύκητα *Cladosporium fulvum*. Ο διεγέρτης Avr9 αναγνωρίζεται από την πρωτεΐνη ανθεκτικότητας Cf9 και προκαλεί την HR. Β. Διεπίδραση του μύκητα *Erysiphe cichoracearum* (μπλε υφές) σε ένα επιδερμικό κύτταρο και εκδήλωση της αντίδρασης υπερευαισθησίας ως αποτέλεσμα της παραγωγής H₂O₂ (ανιχνεύεται με diaminobenzidine ως καφέ προϊόν αντίδρασης).

Προσαρμογή από Hofius D., Tsitsigiannis D.I., Jones J.D. και Mundy J. 2007

Η εξειδίκευση είναι σημαντικό χαρακτηριστικό αυτού του τύπου ανθεκτικότητας. Αυτό σημαίνει ότι κάποιες ποικιλίες φυτών είναι ανθεκτικές μόνο σε κάποια στελέχη (φυλές) παθογόνων. Αυτός είναι ένας κλασικός μηχανισμός γόνου προς γόνου που εξαρτάται από την αλληλεπίδραση των προϊόντων του γονιδίου ανθεκτικότητας του φυτού (*R*) και του γονιδίου αμολυσματικότητας (*avirulence - Avr*) του παθογόνου (Flor, 1971). Η ανθεκτικότητα που σχετίζεται με την HR καλείται επίσης και “race-specific”, λόγω του ότι είναι αποτελεσματική μόνο εναντίον ενός ή μερικών παθογόνων στελεχών. Αυτό το χαρακτηριστικό αποτελεί μειονέκτημα αυτού του τύπου ανθεκτικότητας από την πλευρά της πρακτικής εφαρμογής στη βελτίωση των φυτών. Η “race-specific” ανθεκτικότητα δεν έχει μεγάλη διάρκεια και συνήθως

δεν κρατάει πάνω από 5 – 10 χρόνια. Η σύνθεση των φυλών ενός παθογόνου πληθυσμού αλλάζει σημαντικά περίπου μέσα σε μια δεκαετία, επομένως προκύπτουν νέες πιο προσαρμοσμένες παθογόνες φυλές, μερικές από τις οποίες θα έχουν την ικανότητα να μολύνουν την ποικιλία που προηγουμένως παρουσίαζε “race-specific” ανθεκτικότητα. Ο μηχανισμός της γόνου προς γόνο ανθεκτικότητας έχει αναλυθεί εκτενώς βιοχημικά και μοριακά. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα προϊόντα των *R* και *Anr* γονιδίων αλληλεπιδρούν μεταξύ τους στην εξειδικευμένη ανθεκτικότητα παρουσία της HR. Αρκετές εργασίες έδειξαν ότι η αλληλεπίδραση των δύο προϊόντων οδηγεί σε HR και ανθεκτικότητα (Hammond-Kosack et al., 1994; Joosten και deWit, 1999). Αμόλυντα φυτά που έφεραν το *R* γονίδιο και μετασηματίστηκαν με το αντίστοιχο *Anr* γονίδιο του παθογόνου ανέπτυξαν HR και τελικά νεκρώθηκαν. Η νέκρωση των φυτικών κυττάρων και ο περιορισμός (ή νέκρωση) του παθογόνου είναι αποτέλεσμα παραγωγής αρκετών αντιμικροβιακών ριζών (radicals) και διαφόρων άλλων ουσιών (ενεργές ομάδες οξυγόνου, προϊόντα οξειδωσης φαινολών, φυτοαλεξίνες κ.τ.λ.) στα ανθεκτικά φυτά που εκδηλώνουν την HR. Επομένως, η κυτταρική νέκρωση που παρατηρείται στην HR φαίνεται να είναι το αποτέλεσμα και όχι η αιτία της ανθεκτικότητας. Η τελευταία διαπίστωση αποδείχθηκε αρχικά το 1972 (Király et al., 1972). Πιο πρόσφατα δημοσιεύθηκαν αντίστοιχα αποτελέσματα που έδειχναν την αποτελεσματικότητα της HR εναντίον βακτηριακών (Yu et al., 1998; Gassmann, 2005) και ιικών μολύνσεων (Bendahmane et al., 1999; Cole et al., 2001; Schoelz et al., 2003).

Η κυτταρική νέκρωση κατά την HR και ο επακόλουθος περιορισμός ή η θανάτωση του παθογόνου είναι δύο διαφορετικές αντιδράσεις, που μπορούν να διαχωριστούν πειραματικά. Η ανθεκτικότητα με τη μορφή του περιορισμού ή τη νέκρωση του παθογόνου και η κυτταρική νέκρωση μέσω της HR μπορεί να μην σχετίζεται με την ανθεκτικότητα στην ασθένεια (Király και Király, 2006). Η θεωρία του γόνου προς γόνο γίνεται πιο κατανοητή με το μοντέλο της πρωτεΐνης επίδρασης – υποδοχέα (effector – receptor model). Το προϊόν του γονιδίου *R* μπορεί να θεωρηθεί ως υποδοχέας πρωτεϊνών που αποτελούν προϊόντα του γονιδίου *Anr* των παθογόνων (Mudgett, 2005; Ellis et al., 2006). Η αλληλεπίδραση γόνου προς γόνο ξεκινά με την αναγνώριση του παθογόνου και επακολουθεί η φάση της ενεργοποίησης των μονοπατιών μεταγωγής σημάτων (Martin et al., 2003) που έχουν ως αποτέλεσμα να περιορίζεται ή να νεκρώνεται το παθογόνο στα ανθεκτικά φυτά (Staskawicz et al., 1995). Αυτή η διαδικασία πιθανόν να σχετίζεται με την HR.

Τα τελευταία χρόνια έχουν απομονωθεί και προσδιορισθεί γονίδια ανθεκτικότητας από πολλά καλλιεργούμενα φυτά ή φυτά-πρότυπα (*Arabidopsis*

thaliana). Τα λειτουργικά γονίδια ανθεκτικότητας που έχουν απομονωθεί μέχρι σήμερα, συμβάλλουν στην αντοχή σε βακτηριολογικές, ιολογικές και μυκητολογικές ασθένειες των φυτών και μοιάζουν δομικά με τις αντίστοιχες πρωτεΐνες των ασπόνδυλων ζώων. Παρά τη μεγάλη διαφοροποίηση μεταξύ των παθογόνων σχετικά με τις ιδιότητες των πρωτεϊνών επίδρασης (effectors), οι γόνιοι ανθεκτικότητας των φυτών κωδικοποιούν πέντε κατηγορίες πρωτεϊνών-υποδοχέων (ανεξάρτητα από την κατηγορία του παθογόνου) που μπορεί να είναι είτε εξωκυτταρικές είτε ενδοκυτταρικές (Εικόνα 1.2):

(α) Οι Receptor-Like Proteins (RLPs), όπως οι υποδοχείς της τομάτας Cf-2 και Cf-9 που κωδικοποιούν διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες, αποτελούνται κατά κύριο λόγο από μια εξωκυτταρική περιοχή από επαναλαμβανόμενα πεπτιδικά μόρια πλούσια στο αμινοξύ λευκίνη (Leucine Rich Repeats - LRRs) και ένα μικρό κυτταροπλασματικό τομέα. Οι RLP πρωτεΐνες μπορούν να λειτουργήσουν ως υποδοχείς εξωκυτταρικών ή ενδοκυτταρικών Avr πρωτεϊνών (Dangl και Jones, 2001).

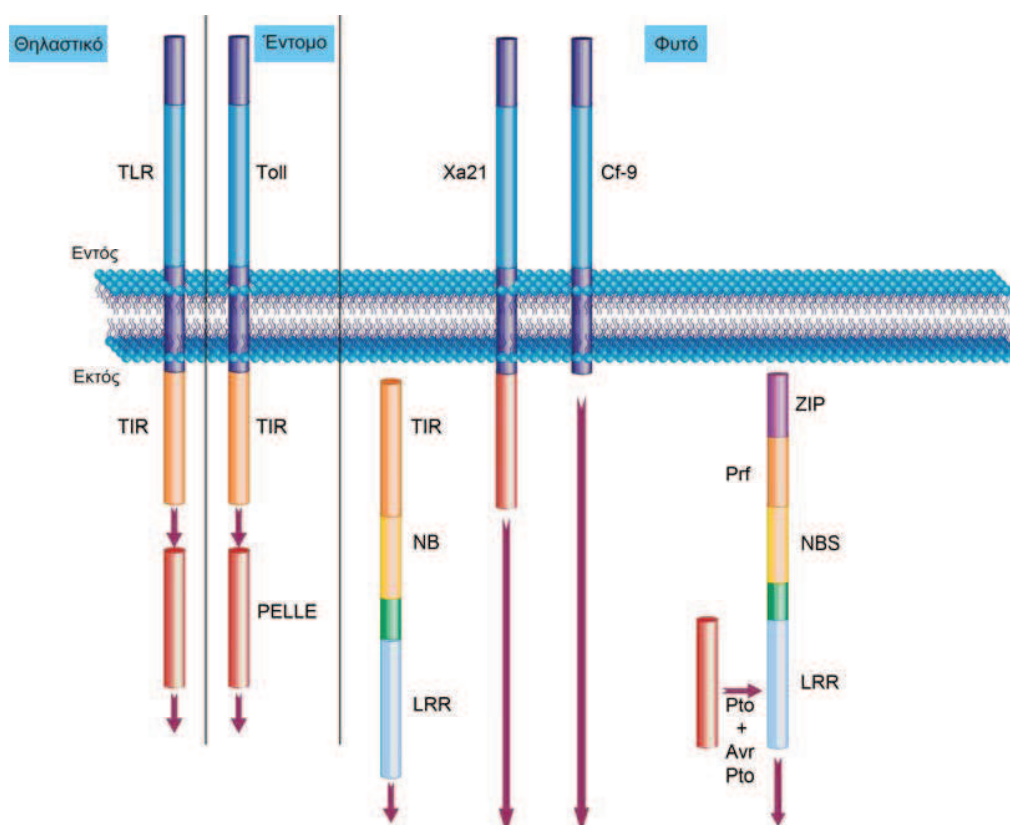
(β) Οι Receptor-like Kinases (RLKs), όπως ο υποδοχέας της τομάτας Χα21, ο οποίος αναγνωρίζει τον τελεστή AvrΧα21 του *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Οι RLKs είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες πλούσιες σε εξωκυτταρικές περιοχές LRRs και περιέχουν μια κυτοπλασματική περιοχή κινάσης της σερίνης-θρεονίνης που μεταβιβάζει το σήμα σε άλλες κινάσες για περαιτέρω ενίσχυσή του (Dangl και Jones, 2001).

(γ) Οι TIR-NB-LRR R πρωτεΐνες, όπως για παράδειγμα οι κυτοπλασματικές πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *N* του καπνού κατά του ιού TMV, *L* του λιναριού κατά του μύκητα σκωρίασης *Melampora lini* και *RPP5* της Αραβίδοψης κατά του ωομύκητα *Hyaloperonospora parasitica*. Επιπλέον της περιοχής LRR, οι υποδοχείς αυτοί διαθέτουν και την περιοχή προσδέσεως νουκλεοτιδίων (Nucleotide Binding, NB) καθώς και την περιοχή TIR που είναι ομόλογη της ενδοκυτταρικής περιοχής του Toll-υποδοχέα ιντερλευκίνης (Toll/Interleukin 1) των υποδοχέων των θηλαστικών, περιοχές που εμπλέκονται στην αντίληψη και μεταγωγή των σημάτων της αντοχής του φυτού (Meyers et al., 2003). Οι περιοχές NB-LRR λειτουργούν ως θέσεις αντιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών-πρωτεϊνών, πρωτεϊνών-προσδεμάτων (ligands) και πρωτεϊνών-υδατανθράκων και προσδίδουν την εκλεκτικότητα στην αναγνώριση των διαφόρων παθογόνων από τα φυτά (Dangl και Jones, 2001).

(δ) Η CC-NB-LRR ομάδα των κυτοπλασματικών R πρωτεϊνών έχει LRR και NB περιοχές και διαθέτει μια αμινοτελική περιοχή που μοιάζει με περιελιγμένο σπείραμα (Coiled Coil - CC). Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν οι R πρωτεΐνες RPS2

και RPM1 που δρουν σε πρωτεΐνες επίδρασης του βακτηρίου *Pseudomonas syringae*. Η οικογένεια αυτή των υποδοχέων περιλαμβάνει πολλές υπο-οικογένειες που ποικίλουν στο μέγεθος και στην ακριβή θέση της CC περιοχής (Dangl και Jones, 2001).

(v) Τα γονίδια ανθεκτικότητας που κωδικοποιούν κινάσες της σερίνης-θρεονίνης όπως είναι το *R* γονίδιο *Pto* της τομάτας που αναγνωρίζει την πρωτεΐνη επίδρασης *AvrPto* του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* (Dangl και Jones, 2001).

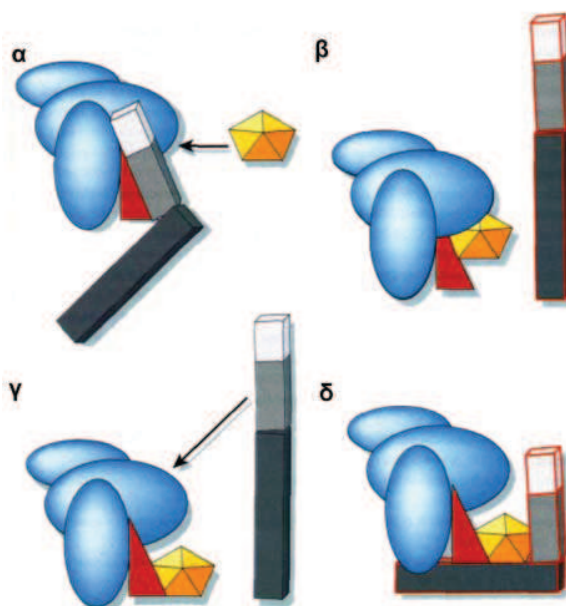


Εικόνα 1.2: Σύγκριση των πρωτεϊνών ανθεκτικότητας των φυτών με πρωτεΐνες που υπεισέρχονται στο εγγενές ανοσοποιητικό σύστημα των ζώων και των εντόμων.

Σύγχρονες έρευνες έδειξαν ότι οι *R* πρωτεΐνες λειτουργούν είτε με απευθείας αναγνώριση και πρόσδεσή τους στην πρωτεΐνη επίδρασης (θεωρία γόνου προς γόνου) ή αναγνωρίζοντας μια άλλη πρωτεΐνη του φυτού η οποία είναι ο στόχος της πρωτεΐνης επίδρασης (υπόθεση του φρουρού - guard hypothesis) (Dangl και Jones, 2001). Η υπόθεση του φρουρού αρχικά προτάθηκε για να ερμηνεύσει το γεγονός ότι η *R* πρωτεϊνική κινάση *Pto* αναγνωρίζει και προσδένεται στην πρωτεΐνη επίδρασης *AvrPto* έμμεσα μέσω της *NB-LRR* πρωτεΐνης *Prf* με σκοπό να δραστηριοποιήσει το εγγενές ανοσοποιητικό σύστημα. Σε ένα άλλο παράδειγμα, η πρωτεΐνη επίδρασης *Avr2* του μύκητα *Cladosporium fulvum* εκκρίνεται από τον μύκητα στον αποπλαστικό χώρο

φυτών τομάτας και αλληλεπιδρά με την εξωκυτταρική πρωτεάση της κυστεΐνης (cysteine protease) Rcr3 της τομάτας. Στη συνέχεια το σύμπλοκο Rcr3-Anr2 σε συνδυασμό με την πρωτεΐνη ανθεκτικότητας Cf-2 ενεργοποιεί το εγγενές ανοσοποιητικό σύστημα και την αντίδραση υπερευαισθησίας.

Σύμφωνα με το παραπάνω πρότυπο, οι R πρωτεΐνες λειτουργούν ως ρυθμιστικοί προσαρμοστές σε ένα σύμπλοκο δύο ή περισσότερων πρωτεϊνών που ενεργοποιείται από τις πρωτεΐνες επίδρασης των παθογόνων. Με άλλα λόγια οι R πρωτεΐνες επιτηρούν/ανιχνεύουν εάν η κυτταρική πρωτεΐνη-στόχος ευρίσκεται υπό απειλή επιθέσεως από πρωτεΐνες επίδρασης των παθογόνων. Οι περιοχές LRRs των R πρωτεϊνών εξασφαλίζουν ότι η ενεργοποίηση του συμπλόκου γίνεται εξειδικευμένα για κάθε πρωτεΐνη επίδρασης. Όταν απουσιάζει μια εξειδικευμένη πρωτεΐνη αντοχής ή ο ενδιάμεσος στόχος του ξενιστή, ο τελεστής του παθογόνου δεν αναγνωρίζεται και ακολουθεί η ασθένεια (Εικόνα 1.3) (Dangl και Jones, 2001).



Εικόνα 1.3: **α.** Ένα κυτταρικό σύμπλοκο πρωτεϊνών (μπλε) που περιλαμβάνει το μόριο του «φλασσομένου/προστατευόμενου» (κόκκινο) μορίου και μια πρωτεΐνη ανθεκτικότητας (γκρίζα σκιαζόμενη από το αμινοτελικό άκρο μέσω των δομικών περιοχών NB και LRR) είναι το σύμπλοκο στόχος για έναν τελεστή ενός παθογόνου (πορτοκαλί). **β.** Η συνένωση του τελεστή (πορτοκαλί) στο σύμπλοκο καταλήγει στην αποσύνδεση και δραστηριοποίηση της R πρωτεΐνης και στην εκδήλωση αντοχής (Αντίδραση υπερευαισθησίας). **γ.** Εναλλακτικά η πρωτεΐνη ανθεκτικότητας μπορεί να μην αποτελεί μέρος του συμπλόκου στόχου έως ότου συνδεθεί ο τελεστής. **δ.** Η συνένωση του τελεστή στο σύμπλοκο με τον στόχο ενεργοποιεί την R πρωτεΐνη.

Προσαρμογή από Dangl JL, Jones JDG 2001

Στα ανθεκτικά φυτά, οι πρωτεΐνες επίδρασης των παθογόνων αλληλεπιδρούν άμεσα ή έμμεσα με τους φυτικούς υποδοχείς κατά την αναγνώριση και ως αποτέλεσμα ενεργοποιείται μια σειρά γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα. Οι

μεταγραφικές αλλαγές που παρατηρήθηκαν στην περίπτωση ανθεκτικότητας μέσω του βασικού ανοσοποιητικού συστήματος παρουσίασαν επικάλυψη με την Αντ-εξαρτώμενη race-specific ανθεκτικότητα (Navarro et al., 2004; Zipfel et al., 2004). Αυτό υποδεικνύει ότι διαφορετικοί διεγέρτες των παθογόνων που αλληλεπιδρούν με διάφορους υποδοχείς των φυτών επάγουν όμοιες ομάδες γονιδίων. Παρ' όλα αυτά αυτό δεν εξηγεί την έλλειψη HR στο βασικό ανοσοποιητικό σύστημα ή την εμφάνιση της στις περισσότερες περιπτώσεις γόνου προς γόνου "race-specific" ανθεκτικότητας. Επιπρόσθετα, οι Tao et al., (2003) έδειξαν ότι τα πρώτα στάδια της ασύμβατης αλληλεπίδρασης μεταξύ *A. thaliana* και *Pseudomonas syringae* και τα τελευταία στάδια συμβατών αλληλεπιδράσεων έχουν ποιοτικά όμοιες αντιδράσεις, προτείνοντας ότι οι μηχανισμοί της μεταγωγής σημάτων που εμπλέκονται και στις δύο περιπτώσεις είναι κοινοί. Η μόνη διαφορά είναι η ποσοτική έκφραση, αφού τα επίπεδα του mRNA των R γονιδίων *RPS2* και *RPM1* στα ανθεκτικά φυτά επάγονται νωρίτερα και είναι πιο υψηλά σε σχέση με τα ευπαθή φυτά. Επομένως, στα φυτά αναπτύσσονται όμοιες φάσεις ασθένειας στα ευπαθή και στα ανθεκτικά φυτά, αλλά στα τελευταία συμβαίνουν πολύ αργότερα. Συμπερασματικά με βάση τις πιο πάνω πληροφορίες φαίνεται ότι μετά την αναγνώριση του παθογόνου, όμοια γονίδια επάγονται στα φυτά είτε αυτά είναι ανθεκτικά (βασική ή γόνου προς γόνου ανθεκτικότητα) ή ευπαθή. Ο χρόνος που συμβαίνουν οι αντιδράσεις φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της ανθεκτικότητας ή της ευπάθειας και στην ανάπτυξη ή όχι HR. Αυτό σημαίνει ότι υπάρχει ένας κοινός μηχανισμός άμυνας ο οποίος αναπτύσσεται μετά την αναγνώριση.

1.1.2.3 Μετα-μεταγραφική γονιδιακή σίγηση (Post-transcriptional gene silencing)

Για πολλά χρόνια υπήρχε η γενική άποψη ότι τα μολυσμένα φυτά δεν μπορούν να αναρρώσουν από την ασθένεια. Πρόσφατα, παρουσιάστηκαν περιπτώσεις ανάρρωσης σε κάποιες ιικές προσβολές. Τα μολυσμένα φυτά έδειξαν αρχικά τα τυπικά συμπτώματα της ασθένειας και τα παθογόνα είχαν εξαπλωθεί διασυστηματικά ωστόσο οι νέες βλαστήσεις δεν παρουσίαζαν συμπτώματα και δεν περιείχαν τους ιούς (Covey et al., 1997; Ratcliff et al., 1997). Επιπρόσθετα, τα φυτά αυτά παρουσίασαν ανθεκτικότητα σε επακόλουθες ιικές προσβολές, υποδεικνύοντας μια μορφή επίκτητης ανοχής. Αυτός ο τύπος ανθεκτικότητας μπορεί να βασίζεται σε μια ειδική μορφή γονιδιακής σίγησης (Baulcombe, 1996). Η σημαντικότητα της γονιδιακής σίγησης διαπιστώθηκε αρχικά σε γενετικώς τροποποιημένα φυτά, στα οποία το μετασχηματισμένο γονίδιο δεν εκφραζόταν επιτυχώς (Naroli et al., 1990).

van der Krol et al., 1990). Στις περισσότερες περιπτώσεις το γονίδιο που υπόκειται τη σίγηση μεταγράφεται στο φυτό, ωστόσο το mRNA του αποδομείται. Το φαινόμενο αναφέρεται ως μετα-μεταγραφική γονιδιακή σίγηση (post-transcriptional gene silencing - PTGS). Η γονιδιακή σίγηση συμβαίνει μόνο σε ομόλογες αλληλουχίες νουκλεϊκών οξέων και θεωρείται ως πολύ εξειδικευμένη ανθεκτικότητα που λειτουργεί περισσότερο στο επίπεδο των νουκλεοξέων παρά των πρωτεϊνών. Σύμφωνα με το μηχανισμό της γονιδιακής σίγησης, ως αποτέλεσμα της αυξημένης δραστηριότητας της RNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης, παράγονται αντικωδικά μόρια RNA που παρουσιάζουν ομολογία αλληλουχίας με το διαγονιδιακό ή το ιϊκό RNA. Αυτό είναι η αιτία της παραγωγής δομών διπλής έλικας RNA, που είναι “ξένες” προς το φυτό, το οποίο αποδομεί αυτά τα μόρια με τη δράση διαφόρων ριβονουκλεασών. Περισσότερες λεπτομέρειες που αφορούν το μηχανισμό της γονιδιακής σίγησης αναφέρονται στο 2^ο κεφάλαιο, στην παράγραφο 3.2.3.

1.1.2.4 Επίκτητη διασυστηματική ανοχή των φυτών

1. Επίκτητη ανοχή και ο ρόλος του σαλικυλικού οξέος

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η επίκτητη ανοχή αναπτύσσεται στα φυτά μετά την αρχική προσβολή όταν οι περιβάλλοντες ιστοί του σημείου προσβολής καθώς και τα απομακρυσμένα τμήματα του φυτού γίνονται ανθεκτικά στην παραπέρα μόλυνση. Αυτός ο τύπος ανθεκτικότητας είναι ανάλογος με την ανοσοποίηση των ανώτερων ζώων. Ωστόσο, ο μηχανισμός της επίκτητης ανοχής στα φυτά είναι πολύ διαφορετικός από αυτόν στα ζώα. Η επίκτητη ανοχή στα φυτά επάγεται στους απομακρυσμένους ιστούς μετά την προσπάθεια μόλυνσης από παθογόνα που συνήθως προκαλούν νεκρωτικά συμπτώματα στο σημείο προσβολής ή και από άλλους παράγοντες όπως κάποια άλατα και ριζοσφαιρικά βακτήρια. Το φυτό αναπτύσσει μια “μνήμη καταπόνησης” ως αποτέλεσμα της αρχικής μόλυνσης, εναντίον μιας επακόλουθης μόλυνσης. Αυτή η “μνήμη καταπόνησης” των φυτών δεν λειτουργεί απαραίτητα εναντίον του παθογόνου ωστόσο τα συμπτώματα που προκαλεί καταστέλλονται. Η επίκτητη ανοχή των φυτών μπορεί να δράσει τοπικά σε κύτταρα που συνορεύουν την αρχική μόλυνση ή διασυστηματικά σε απομακρυσμένους ιστούς του φυτού (Εικόνα 1.4). Αυτή η ανθεκτικότητα είναι μη-εξειδικευμένη και είναι αποτελεσματική εναντίον διαφόρων καταπονήσεων και μολύνσεων που προκαλούν νέκρωση των μολυσμένων κυττάρων και ιστών των φυτών. Η τοπική επίκτητη ανοχή αναφέρθηκε αρχικά από τον Yarwood (1960) και τον Ross (1961α) σε σχέση με ιϊκές μολύνσεις. Η εργασία του Ross (1961β) απέδειξε για πρώτη φορά την ύπαρξη της διασυστηματικής επίκτητης ανοχής (systemic

acquired resistance – SAR) σε φυτά καπνού που είχαν μολυνθεί με τον ιό *Tobacco mosaic virus (TMV)*. Περίπου 30 χρόνια αργότερα, δύο ερευνητικές ομάδες ανακάλυψαν τον κεντρικό ρόλο του σαλικυλικού οξέος (salicylic acid - SA) σε αυτή τη διαδικασία. Οι εργασίες τους έδειξαν ότι το SA συσσωρεύτηκε σε φύλλα καπνού τόσο τοπικά όσο και διασυστηματικά λίγο μετά τη μόλυνση με τον ιό *TMV* (Malamy et al., 1990; Métraux et al., 1990). Ο σημαντικός ρόλος του SA στη SAR επιβεβαιώθηκε σε πειράματα με γενετικώς τροποποιημένα φυτά καπνού *NahG*, τα οποία φέρουν το γονίδιο της βακτηριακής υδροξυλάσης του SA, το οποίο μετατρέπει το SA σε κατεχόλη και έτσι δεν μπορούν να συσσωρεύσουν SA σε μεγάλες ποσότητες. Μετά τη μόλυνση *NahG* φυτών καπνού με τον *TMV*, δεν αναπτύχθηκε SAR διασυστηματικά στα απομακρυσμένα φύλλα και παρατηρήθηκε έλλειψη συσσώρευσης SA (Gaffney et al., 1993). Επιπρόσθετα, σε αυτά τα φυτά τα νεκρωτικά συμπτώματα ήταν σε πολύ μεγαλύτερη έκταση, σε σχέση με τα αγρίου τύπου φυτά και συνεπώς ήταν πιο ευπαθή στον *TMV*.



Εικόνα 1.4: Η επίκτητη διασυστηματική ανοχή των φυτών (SAR). Η ανάπτυξη της SAR εξαρτάται από το σαλικυλικό οξύ. Η πρωτεΐνη επίδρασης του παθογόνου (Avr) αναγνωρίζεται από την πρωτεΐνη ανοχής (R) του φυτού και ενεργοποιείται η αντίδραση υπερευαισθησίας (HR). Η HR μπορεί να ενεργοποιήσει την SAR η οποία οδηγεί στη παραγωγή PR πρωτεϊνών που προστατεύουν τους απομακρυσμένους φυτικούς ιστούς από το ίδιο ή και άλλα παθογόνα.

Προσαρμογή από Hofius D., Tsitsigiannis D.I., Jones J.D., και Mundy J. 2007

Εκτός από το SA έχουν προταθεί κι άλλα μόρια ως υπεύθυνα σήματα της SAR. Η έρευνα των Maldonado et al., (2002) έδειξε τον πιθανό ρόλο μιας πρωτεΐνης μεταφοράς λιπιδίων στη μετάδοση του σήματος της SAR. Ένα άλλο μόριο που προτάθηκε ως το σήμα, ήταν μια πρωτεΐνη πρόσδεσης του SA (salicylic acid-binding protein - SABP2) σε φυτά καπνού η οποία μετατρέπει το βιολογικά μη ενεργό methyl salicylate σε ενεργό SA στους διασυστηματικούς ιστούς (Forouhar et al., 2005). Τα τελευταία χρόνια έχει αποδειχθεί ότι η επίδραση του SA στην SAR βασίζεται στην ενεργοποίηση αρκετών αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως η superoxide dismutase, η glutathione reductase, η glutathione-S-transferase, όπως επίσης και στα επίπεδα μη ενζυματικών αντιοξειδωτικών, όπως η glutathione (Fodor et al., 1997· Király et al., 2002). Η υπερέκφραση των αντιοξειδωτικών διαπιστώθηκε τόσο σε ιστούς όπου είχε συσσωρευτεί SA όσο και σε μη μολυσμένους ιστούς φύλλων στα οποία είχε εφαρμοστεί SA. Η αυξημένη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών μπορεί να μειώσει την κυτταρική νέκρωση μετά τη μόλυνση. Επίσης, τα αντιοξειδωτικά μπορούν να εξουδετερώνουν τα επιζήμια αποτελέσματα των ενεργών ομάδων οξυγόνου (reactive oxygen species - ROS). Στα *NahG* φυτά στα οποία δεν συσσωρεύεται SA και δεν αναπτύσσεται η SAR (Gaffney et al., 1993) η δραστηριότητα πολλών αντιοξειδωτικών ενζύμων επίσης καταστέλλεται (Király et al., 2002). Συνεπώς, ο ρόλος του SA στην επαγωγή της SAR θα μπορούσε να είναι μέσω της επίδρασης του στην αύξηση των αντιοξειδωτικών.

Μια άλλη μορφή διασυστηματικής αντοχής είναι η “επαγόμενη διασυστηματική αντοχή” (induced systemic resistance – ISR) η οποία ενεργοποιείται από τα βακτήρια της ριζόσφαιρας (van Loon et al., 1998· Tuzun και Bent, 2005). Ένας μεγάλος αριθμός μη παθογόνων βακτηρίων της ριζόσφαιρας είναι ικανός να επάγει μη-εξειδικευμένη ανθεκτικότητα στους ιστούς κάποιων φυτών. Το πιο πιθανόν είναι ότι αυτή η μορφή διασυστηματικής αντοχής λειτουργεί κάτω από φυσικές συνθήκες όπως και η SAR. Ωστόσο, τα ριζοβακτήρια δεν προκαλούν ορατά συμπτώματα HR στα φυτά και επιπλέον είναι ικανά να προάγουν την ανάπτυξη των φυτών. Κάποια ριζοβακτήρια ενεργοποιούν τη δράση του SA ενώ κάποια άλλα ενεργοποιούν φυτικές ορμόνες, όπως το ιασμονικό οξύ ή το αιθυλένιο (Tuzun και Bent, 2005).

2. SA-ανεξάρτητη ενεργοποίηση της έκφρασης PR γονιδίων

Οι πρωτεΐνες PR (pathogenesis related proteins) συσσωρεύονται στα φυτά μετά την προσβολή από παθογόνα και ανακαλύφθηκαν αρχικά σε φύλλα καπνού που παρουσίαζαν HR στον ιό *Tobacco mosaic virus (TMV)* (van Loon, 1997). Κάποιες από αυτές τις PR, όπως οι χιτινάσες και οι γλουκανάσες, έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες και θεωρείται ότι συμβάλλουν στην ανθεκτικότητα που

ενεργοποιείται κατά τη μόλυνση με κάποιο νεκροτροφικό οργανισμό. Η επαγόμενη από τα παθογόνα έκφραση των περισσότερων *PR* γονιδίων σχετίζεται με την έναρξη της SAR στους αμόλυντους ιστούς η οποία μπορεί να ενεργοποιηθεί και από την εξωγενή εφαρμογή SA (Ward et al., 1991). Ωστόσο, υπάρχουν αρκετά δεδομένα που δείχνουν ότι το SA δεν είναι το μόνο σήμα που εμπλέκεται στην επαγωγή των *PR* γονιδίων. Κατ' αρχήν, η ενεργοποίηση των *PR* γονιδίων δεν συμπίπτει πάντα με τα αυξημένα επίπεδα του SA (Vallélian-Bindschedler et al., 1998). Κατά δεύτερον, η ομάδα των *PR* γονιδίων που ενεργοποιείται κατά τη μόλυνση δεν αντιστοιχεί πάντα με αυτήν που ενεργοποιείται από το SA ή τα λειτουργικά του ανάλογα, 2,6-dichloroisonicotinic acid (INA) και benzothiadiazole (BTH) (Schweizer et al., 1997, Schaffrath et al., 1997). Για παράδειγμα, η μόλυνση του καπνού με το παθογόνο βακτήριο *Erwinia carotovora* ή η εφαρμογή των διεγερτών του (elicitors) σε φύλλα καπνού, ενεργοποίησαν διασυστηματικά μια ομάδα *PR* γονιδίων που είναι διαφορετικά από αυτά που επάγονται από το SA (Vidal et al., 1997, Vidal et al., 1998). Κατά τις πρώτες 12 ώρες μετά τη μόλυνση, το *E. carotovora* ενεργοποίησε εξειδικευμένα το γονίδιο της βασικής β -1,3-γλουκανάσης (*PR*-2) και της βασικής χιπινάσης (*PR*-3) αλλά όχι του SA-επαγόμενου γονιδίου *PR*-1, ενώ η εξωγενής εφαρμογή SA ενεργοποίησε την έκφραση του *PR*-1 αλλά όχι των *PR*-2 ή *PR*-3 γονιδίων. Ενδιαφέρον προκάλεσε το γεγονός ότι η επαγωγή των γονιδίων *PR* από το *E. carotovora* ανταγωνίστηκε από το SA ενώ η έκφραση των SA-επαγόμενων γονιδίων *PR* ανταγωνίστηκε από τους διεγέρτες του *E. carotovora* (Vidal et al., 1997). Η επαγωγή των γονιδίων *PR* μέσω του *E. carotovora* δεν επηρεάστηκε στα μετασχηματισμένα *NahG* φυτά καπνού. Επιπλέον οι διεγέρτες του *E. carotovora* αύξησαν τη διασυστηματική αντοχή σε αγρίου τύπου και μετασχηματισμένα *NahG* φυτά καπνού (Vidal et al., 1998), υποδεικνύοντας ότι η αντοχή είναι ανεξάρτητη του μονοπατιού μεταγωγής του SA. Ακόμα ένα παράδειγμα στο οποίο φαίνεται ότι *PR* γονίδια επάγονται ανεξάρτητα του SA παρατηρήθηκε σε φυτά καπνού μετασχηματισμένα με το γονίδιο PAP (pokeweed antiviral protein) από το φυτό *Phytolacca americana*. Το γονίδιο PAP κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που παρεμποδίζει τη μετάφραση μέσω της αφαίρεσης πουρίνης (depurinating) από τα ευκαρυωτικά ριβοσώματα (Bonnes et al., 1994). Μετασχηματισμένα φυτά με το γονίδιο PAP ήταν ανθεκτικά σε ένα ευρύ φάσμα ιών και έδειξαν αυξημένη ανθεκτικότητα στο μύκητα *Rhizoctonia solani*, κάτι που σχετίζεται με την υψηλή έκφραση κάποιων *PR* γονιδίων. Πάντως αυτά τα φυτά δεν είχαν αυξημένα επίπεδα SA, υποδεικνύοντας ότι η έκφραση των *PR* γονιδίων σε αυτά δεν εξαρτάται από το SA (Zoubenko et al., 1997). Τα αποτελέσματα μιας άλλης έρευνας έδειξαν ότι τα αγρίου τύπου εμβόλια καπνού

που εμβολιάστηκαν σε υποκείμενα που εξέφραζαν το γονίδιο PAP παρουσίασαν αυξημένη ανθεκτικότητα στους ιούς *TMV* και *Potato virus X* απουσία έκφρασης *PR* γονιδίων ή αυξημένων επιπέδων SA, που αποτέλεσε ακόμα μια περίπτωση στην οποία φάνηκε ότι η ενζυματική δραστηριότητα του PAP επάγει τον αμυντικό μηχανισμό ανεξάρτητα του SA (Smirnov et al., 1997). Ωστόσο δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα το PAP να αυξάνει την ευαισθησία στο SA που να οδηγεί σε αυξημένες αντιδράσεις SA χωρίς να αυξάνονται τα πραγματικά επίπεδα του στα φυτά. Σε φυτά *Arabidopsis thaliana* και καπνού η έκφραση του γονιδίου *PR-1* ήταν άμεσα συνδεδεμένη με το SA και για αυτό το λόγο χρησιμοποιείται συχνά ως δείκτης της επαγωγής της SAR μέσω του SA (Ryals et al., 1996). Στο καπνό, η έκφραση του γονιδίου *PR-1* ελέγχεται από δύο τουλάχιστον διαφορετικά μονοπάτια μεταγωγής σημάτων. Το πολυακρυλικό οξύ (Polyacrylic acid - PAA) ενεργοποίησε την έκφραση του γονιδίου *PR-1* και αύξησε την ανθεκτικότητα στον *TMV* στον καπνό στο σημείο εφαρμογής. Ένας πιθανός μηχανισμός μέσω του οποίου το PAA ενεργοποίησε την έκφραση του γονιδίου *PR-1* ήταν με την επαγωγή της συσσώρευσης του SA αφού τα φυτά που είχε εφαρμοστεί PAA είχαν αυξημένα επίπεδα SA. Ωστόσο, σε αγρίου τύπου και *NahG* μετασχηματισμένα φυτά καπνού, το PAA ήταν το ίδιο ικανό να επάγει την συσσώρευση της *PR-1* πρωτεΐνης (Malamy et al., 1996), υποδεικνύοντας την ύπαρξη περισσότερων του ενός μονοπατιών που οδηγούν στην έκφραση του γονιδίου *PR-1*, από τα οποία το ένα εξαρτάται από το SA. Αρκετά δεδομένα υποστηρίζουν ότι το ιασμονικό οξύ και το αιθυλένιο παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο. Για παράδειγμα, το methyl jasmonate, ένα φυσικό παράγωγο του ιασμονικού οξέος, αύξησε τα επίπεδα έκφρασης του SA-επαγόμενου γονιδίου *PR-1* σε φυτά καπνού (Xu et al., 1994). Επίσης, συνδυασμός του methyl jasmonate και του αιθυλενίου λειτούργησε συνεργιστικά στην επαγωγή μελών τόσο της *PR-1* όσο και της *PR-5* οικογένειας γονιδίων στο καπνό. Μια άλλη έρευνα έδειξε ότι η ενεργοποίηση *PR* γονιδίων από τους διεγέρτες του *E. carotovora* απαιτεί την κοινή δράση του ιασμονικού οξέος και του αιθυλενίου και συμβαίνει ανεξάρτητα του SA (Brederode et al., 1991).

3. Το ιασμονικό οξύ και το αιθυλένιο ρυθμίζουν την έκφραση των ντιφενσινών (defensins) και των θειονινών (thionins)

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει αρκετές εργασίες που δείχνουν ότι οι φυτικές ορμόνες ιασμονικό οξύ (jasmonic acid – JA) και αιθυλένιο (ethylene – ET) είναι όντως σημαντικά σήματα στην επαγωγή της διασυστηματικής αντοχής των φυτών. Τόσο το JA όσο και το ET παράγονται άμεσα όταν τα φυτά μολύνονται από παθογόνα, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις των νεκροτροφικών παθογόνων, όπου τα επίπεδα του JA

αυξάνονται διασυστηματικά (Penninckx et al., 1996). Επίσης η εξωγενής εφαρμογή των JA και ET ενεργοποίησε μια ομάδα γονιδίων άμυνας που επάγονται και κατά την μόλυνση από παθογόνα, ανάμεσα στα οποία είναι γονίδια που κωδικοποιούν ντιφενσίνες και θειονίνες, που είναι μικρές, πλούσιες σε κυστεΐνη βασικές πρωτεΐνες με αντιμικροβιακή δράση (Erple et al., 1997; Terras et al., 1995). Στα φυτά *Arabidopsis thaliana*, τα γονίδια της θειονίνης *Thi2.1* και της ντιφενσίνης *PDF1.2* ενεργοποιήθηκαν τοπικά και διασυστηματικά μετά από μόλυνση με νεκροτροφικά παθογόνα ή εξωγενή εφαρμογή methyl jasmonate, αλλά όχι μετά την εφαρμογή SA (Erple et al., 1995; Penninckx et al., 1996; Vignutelli et al., 1998). Σε φυτά *A. thaliana* μετασχηματισμένα με το γονίδιο *NahG*, η διασυστηματική ενεργοποίηση του *PDF1.2* παρέμεινε αναλλοίωτη (Penninckx et al., 1996), υποδεικνύοντας ότι αυτό το μονοπάτι είναι ανεξάρτητο από το SA. Είναι ενδιαφέρον πάντως ότι η έκφραση του γονιδίου *PDF1.2* εμποδίστηκε στο μεταλλαγμένο *ein2* (δεν αντιλαμβάνεται το αιθυλένιο) και το *coi1* (δεν αντιλαμβάνεται το ιασμονικό οξύ) (Penninckx et al., 1996), δείχνοντας ότι το μονοπάτι που εμπλέκεται στην επαγωγή του *PDF1.2* απαιτεί τόσο το ET όσο και το JA. Μια άλλη εργασία έδειξε ότι τα μονοπάτια του JA και του ET πρέπει να ενεργοποιηθούν ταυτόχρονα για την επαγωγή του γονιδίου *PDF1.2* κατά την μόλυνση (Penninckx et al., 1998). Η μόλυνση με νεκροτροφικό παθογόνο ενεργοποίησε ταυτόχρονα την επαγωγή SA-εξαρτώμενων *PR* γονιδίων αλλά και των SA-ανεξάρτητων γονιδίων *PDF1.2* και *Thi2.1*. Επομένως φαίνεται ότι τα διάφορα μονοπάτια που ενεργοποιούν μηχανισμούς άμυνας έχουν κοινά συστατικά στοιχεία. Έχουν γίνει αρκετά πειράματα για το γενετικό διαχωρισμό των μονοπατιών μεταγωγής που ελέγχουν τη διασυστηματική αντοχή (Dong, 1998). Τα μεταλλαγμένα φυτά *npr1* και *nim1*, δεν ήταν ικανά να επάγουν τη SAR ή να εκφράσουν *PR* γονίδια μετά από μόλυνση με παθογόνα ή εφαρμογή SA. Αντίθετα τα μεταλλαγμένα φυτά *cpr* και *cim*, εξέφραζαν συνεχώς *PR* γονίδια και ήταν πιο ανθεκτικά στη μόλυνση από παθογόνα. Πειραματικές εργασίες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν τα μεταλλαγμένα φυτά *npr1* και *cpr1* έδειξαν ότι η διασυστηματική ενεργοποίηση του *PDF1.2* έμεινε ανεπηρέαστη, υποδεικνύοντας ότι αυτές οι μεταλλαγές στο μονοπάτι της SAR δεν επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση του γονιδίου *PDF1.2* (Penninckx et al., 1996). Τα μονοπάτια μεταγωγής που οδηγούν στην έκφραση των γονιδίων *PR* και *PDF1.2* είναι ξεχωριστά. Ωστόσο, τα μεταλλαγμένα φυτά *A. thaliana cpr5*, *cpr6* και *acd2* έδειξαν συνεχή έκφραση γονιδίων *PR* καθώς και των *PDF1.2* (Penninckx et al., 1996; Bowling et al., 1997; Clarke et al., 1998) και *Thi2.1* (Clarke et al., 1998), υποδεικνύοντας ότι τα εμπλεκόμενα μονοπάτια συνδέονται, πιθανώς στα πρώτα στάδια της μεταγωγής. Η επαγωγή της έκφρασης του *PDF1.2* από παθογόνα είναι

στενά συνδεδεμένη με την αύξηση των επιπέδων του ενδογενούς JA (Penninckx et al., 1996), ενώ η έκφραση των *PR* γονιδίων συσχετίζεται με τα αυξημένα επίπεδα SA (Bowling et al., 1997). Τα μεταλλαγμένα φυτά *cpr5* και *acd2* σχηματίζουν αυτενεργά τραυματισμούς οι οποίοι οδηγούν σε αύξηση των επιπέδων του SA και του JA (Penninckx et al., 1996· Bowling et al., 1997), υποδεικνύοντας ότι τα πρώτα βήματα στα δύο μονοπάτια που είναι κοινά είναι μάλλον η έναρξη του σχηματισμού των τραυματισμών.

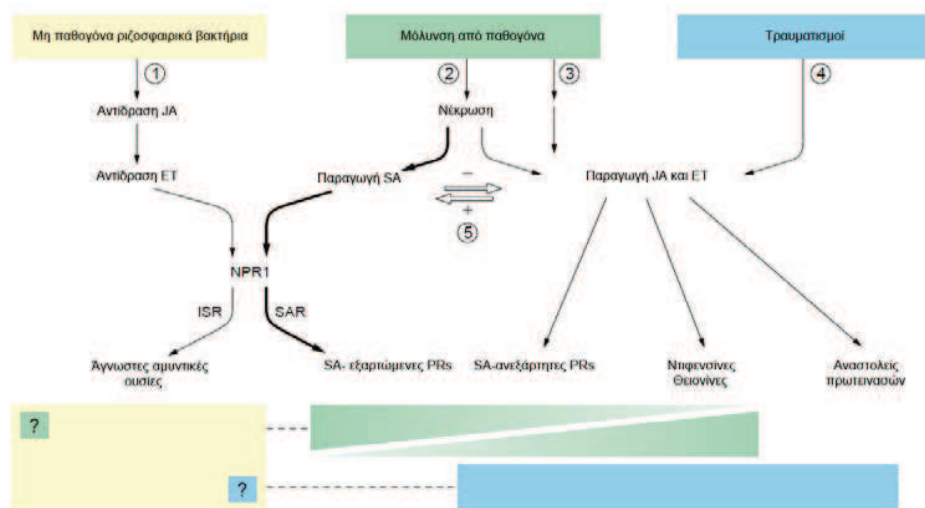
4. Διασυστηματική αντοχή που επάγεται από τραυματισμούς

Κάποιοι μηχανισμοί άμυνας ενεργοποιούνται μετά από τραυματισμό και μερικοί από αυτούς είναι διασυστηματικοί. Ένα κλασικό παράδειγμα ήταν η διασυστηματική συσσώρευση παρεμποδιστών πρωτεϊνών (*proteinase inhibitor - pin*) σε φύλλα τομάτας μετά την επίθεση φυτοφάγου εντόμου. Οι *pin* είναι πρωτεΐνες που περιορίζουν την παραπέρα διατροφή του εντόμου (Ryan, 1992). Μια άλλη εργασία έδειξε ότι υπάρχει και διασυστηματική αντοχή σε παθογόνα που επάγεται από τραυματισμούς. Ο τραυματισμός νεαρών φυτών ρυζιού ενεργοποίησε τη διασυστηματική αντοχή που οδήγησε στη προστασία των φυτών στη μόλυνση από το μύκητα *Magnaporthe grisea* απουσία έκφρασης γονιδίων *PR* (Schweizer et al., 1998). Το ιασμονικό οξύ φάνηκε να παίζει τον πιο σημαντικό ρόλο στη ανθεκτικότητα μετά από τραυματισμό (Wasternack και Parthier, 1997). Ο τραυματισμός όχι μόνο προκάλεσε ταχεία παραγωγή του JA, αλλά αυξήθηκαν ταυτόχρονα και τα επίπεδα του αιθυλενίου. Μια άλλη εργασία έδειξε ότι ούτε το JA ούτε ο τραυματισμός ήταν ικανά να επάγουν την έκφραση του γονιδίου *pin* στην παρουσία αναστολέων της δράσης του αιθυλενίου. Από μόνο του πάντως το αιθυλένιο δεν ήταν ικανό να ενεργοποιήσει την έκφραση *pin* γονιδίων, υποδεικνύοντας ότι το αιθυλένιο ευαισθητοποίησε τους ιστούς στην επαγωγική δράση του JA (O'Donnell et al., 1996).

5. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των σημάτων

Τόσο οι τραυματισμοί όσο και η μόλυνση από παθογόνα προάγουν το σχηματισμό ιασμονικού οξέος και αιθυλενίου. Ωστόσο, υπάρχουν αρκετά δεδομένα που υποδεικνύουν ότι τα μονοπάτια μεταγωγής τους είναι ξεχωριστά ή και ανταγωνιστικά σε ορισμένες περιπτώσεις. Για παράδειγμα στον καπνό ο τραυματισμός και η μόλυνση από παθογόνα ενεργοποίησαν διαφορετικά *PR* γονίδια (Bol et al., 1996). Ο τραυματισμός φάνηκε να ενεργοποιεί βασικά *PR* γονίδια ενώ τα παθογόνα οδήγησαν σε ενεργοποίηση όξινων *PR* γονιδίων. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι κατά τους τραυματισμούς μόνο το ιασμονικό οξύ και το αιθυλένιο φαίνεται να παίζουν ρόλο ενώ μετά από τη μόλυνση με παθογόνα παράγεται επίσης και

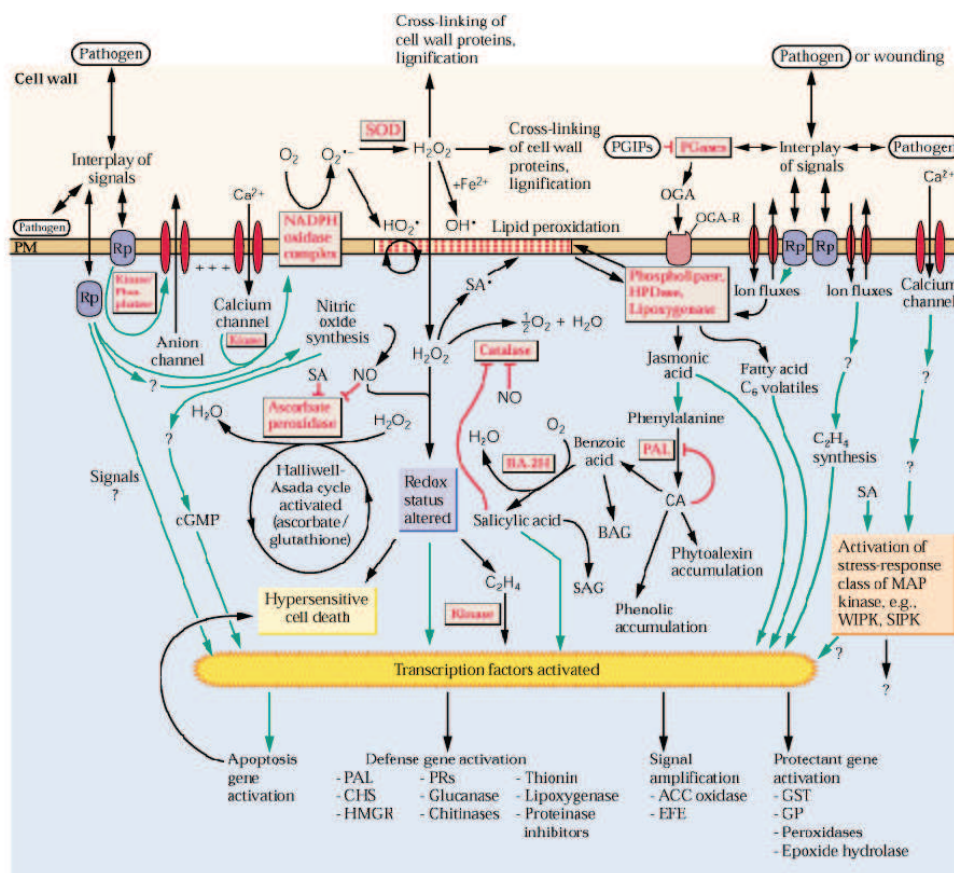
σαλικυλικό οξύ. Το SA και τα λειτουργικά του ανάλογα περιόρισαν την JA-επαγόμενη γονιδιακή έκφραση (Peña-Cortés et al., 1993; Doares et al., 1995; Niki et al., 1998). Σε φυτά *A. thaliana*, η έκφραση του JA- και ET-επαγόμενου γονιδίου *PDF1.2* αυξήθηκε στα *NahG* φυτά (δεν συσσωρεύουν SA) (Penninckx et al., 1996), υποδεικνύοντας ότι στα αγρίου τύπου φυτά η επαγωγή του γονιδίου *PDF1.2* καταστέλλεται σε ένα βαθμό από το ενδογενές SA. Αυτό φάνηκε από την παρατήρηση ότι η συσσώρευση mRNA του *PDF1.2* περιορίστηκε μετά από εφαρμογή του INA, που είναι ανάλογο του SA (Bowling et al., 1997). Ωστόσο, έχει αναφερθεί συνεργιστική επίδραση του JA και του ET στις SA-εξαρτώμενες αντιδράσεις. Στον καπνό, η συνδυασμένη εφαρμογή methyl jasmonate και σαλικυλικού οξέος οδήγησε σε ισχυρότερη επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου *PR-1* από ότι η εφαρμογή SA μόνο (Xu et al., 1994). Επιπρόσθετα, το αιθυλένιο ευαισθητοποίησε τα φυτά *A. thaliana* στη δράση του SA, που οδήγησε σε υψηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης mRNA του *PR-1* μετά από εφαρμογή SA (Lawton et al., 1994). Συμπερασματικά, φαίνεται ότι τα φυτά είναι ικανά να ενεργοποιούν ξεχωριστά μονοπάτια άμυνας ή συνδυασμό τους ανάλογα με τον τύπο της επίθεσης που δέχονται (Εικόνα 1.5).



Εικόνα 1.5: Μοντέλο που αναπαριστά τα μονοπάτια μεταγωγής των σημάτων που μπορούν να ενεργοποιηθούν στα φυτά από μη-παθογόνα ριζοσφαιρικά βακτήρια, μόλυνση από παθογόνα ή τραυματισμούς. Σε όλες τις περιπτώσεις, ενεργοποιείται ένα SA-ανεξάρτητο μονοπάτι που εμπλέκει το JA και το ET. Η μόλυνση από νεκροτροφικό παθογόνο οδηγεί στην ενεργοποίηση της SA-εξαρτώμενης SAR που έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση PR πρωτεϊνών. Επιπρόσθετα, οι αμυντικές αντιδράσεις που επάγονται από το JA και το ET μπορεί να μοιάζουν με αυτές που επάγονται μετά από μόλυνση με μη-νεκροτροφικά παθογόνα. Ανάλογα με το είδος του παθογόνου, η σύσταση των αμυντικών ουσιών που παράγονται μετά τη μόλυνση διαφέρει ανάλογα με το αν εξαρτώνται από το SA ή τα JA/ET (πράσινη ράβδος). Το JA και το ET έχουν θετική επίδραση στη δράση του SA ενώ το SA φαίνεται να έχει αρνητική επίδραση στην επαγόμενη ανοχή από τα JA και ET. Οι τραυματισμοί επίσης οδηγούν στην ενεργοποίηση των JA- και ET-εξαρτώμενων αμυντικών αντιδράσεων. Ωστόσο, η σύσταση των ουσιών διαφέρει σε σχέση με αυτές που επάγονται από τα παθογόνα (μπλε ράβδος). Στη περίπτωση της ISR, στοιχεία των μονοπατιών του JA και του ET εμπλέκονται στην ενεργοποίηση της διασυστηματικής ανοχής που, όπως και η επαγόμενη από τα παθογόνα SAR, εξαρτάται από τη πρωτεΐνη NPR1. Η ISR έχει κοινά στοιχεία με τα μονοπάτια που ενεργοποιούνται κατά τη προσβολή από παθογόνα αλλά δε σχετίζεται με την ενεργοποίηση γονιδίων που κωδικοποιούν νιφενσίνες, θιονίνες ή PR πρωτεΐνες (κίτρινη ράβδος) (Προσαρμογή από Pieterse και van Loon, 1999)

Τα μόρια SA, JA και ET παίζουν σημαντικό ρόλο σε αυτό το δίκτυο σημάτων. Η διακοπή της αντίδρασης σε κάποιο από αυτά τα σήματα μπορεί να καταστήσει τα φυτά πιο ευπαθή στα παθογόνα ή και στα έντομα (Gaffney et al., 1994· McConn et al., 1997· Knoester et al., 1998· Staswick et al., 1998· Vijayan et al., 1998). Η ανθεκτικότητα που επάγεται μέσω του μονοπατιού του SA φαίνεται να στοχεύει σε κάποιους τύπους παθογόνων που είναι διαφορετικά από αυτά που στοχεύει η ανθεκτικότητα που επάγεται από τα JA και ET. Μια εργασία που υποστηρίζει αυτή την υπόθεση έδειξε ότι τα μεταλλαγμένα φυτά *A. thaliana coi1* (δεν αντιλαμβάνονται το JA) έχασαν μέρος της ανθεκτικότητας τους στα νεκροτροφικά παθογόνα *Alternaria brassicicola* και *Botrytis cinerea* ενώ η ανθεκτικότητά τους εναντίον του βιοτροφικού παθογόνου *Peronospora parasitica* δεν επηρεάστηκε (Thomma et. al., 1998). Σε αντίθεση, τα μεταλλαγμένα *npr1* και γενετικώς τροποποιημένα *NahG* φυτά (δεν συσσωρεύουν SA) έδειξαν χαμηλότερα επίπεδα ανθεκτικότητας εναντίον του *P. parasitica*, ενώ η ανθεκτικότητά στα παθογόνα *B. cinerea* και *A. brassicicola* δεν επηρεάστηκε. Αυτό υποδεικνύει ότι η ανθεκτικότητα που επάγεται από τα διαφορετικά μονοπάτια έχει διαφορετική εξειδίκευση. Το πως τα φυτά ενεργοποιούν το σωστό συνδυασμό μηχανισμών άμυνας για να αντιμετωπίσουν το κάθε παθογόνο έχει μεγάλο ενδιαφέρον.

Συνοψίζοντας, η αλυσίδα των σημαντικότερων και ιδιαίτερα πολύπλοκων μεταβολών που ακολουθούν την αναγνώριση των διεγερτών – πρωτεϊνών επίδρασης από τα γονίδια αντοχής και τη μεταγωγή των διαφόρων μοριακών σημάτων μέχρι την τελική εκδήλωση της άμυνας του φυτού απεικονίζονται στην Εικόνα 1.6.



Εικόνα 1.6: Μονοπάτια μεταγωγής των σημάτων που οδηγούν στην ενεργοποίηση και συγχρονισμό των αμυντικών μηχανισμών του φυτού.

Επεξήγηση ορολογίας και συντομεύσεων: ACC: 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid; ACC oxidase: οξειδάση του ACC; Activation of stress-response class of MAP kinase, e.g. WIPK, SIPK: Ενεργοποίηση της κατηγορίας των MAP κινάσων που σχετίζονται με το στρες των φυτών όπως η WIPK (wound-induced protein kinase) και η SIPK (salicylic acid-induced protein kinase); Anion channel: κανάλι ανιόντων; Apoptosis gene activation: Ενεργοποίηση γονιδίων απόπτωσης; Ascorbate peroxidase: Υπεροξειδάση του ασκορβικού; BA: βενζοϊκό οξύ; BAG: Benzoic acid glucoside; BA-2H: Benzoic acid-2 hydroxylase; CA: cinnamic acid; C₂H₄ synthesis: Σύνθεση αιθυλενίου; Calcium channel: κανάλι ιόντων ασβεστίου; Catalase: κατάκλαση; Cell wall: κυτταρικό τοίχωμα; camp: Cyclic guano sine 5'-monophosphate; Chitinases: Χιτινάσες; CHS: chalcone synthase; Cross-linking of cell wall proteins, lignification: Διασταυρωτή σύνδεση πρωτεϊνών του κυτταρικού τοιχώματος, εναπόθεση λιγνίνης; Defense gene activation: Ενεργοποίηση γονιδίων άμυνας; EFE: ethylene forming enzyme: ένζυμο σύνθεσης αιθυλενίου; Epoxide hydrolase: υδρολάση του υποξειδίου; Fatty acid C₆ volatiles: Πτηνικά λιπαρά οξέα C₆; Glucanase: Γλουκανάση; GP: glutathione peroxidase; GST: Glutathione S-transferase; Phenylalanine: Φαινυλαλανίνη; Phosphatase: φωσφατάση; Phospholipase: φωσφολιπάση; Phytoalexin accumulation: Συσσώρευση φυτοαλεξινών; Protectant gene activation: Ενεργοποίηση γονιδίων προστασίας; Proteinase inhibitors: Παρεμποδιστές των πρωτεϊνών; PRs: Pathogenesis related proteins; Redox status altered: Αλλαγή της οξειδοαναγωγικής κατάστασης; SA, Salicylic acid: σαλικυλικό οξύ; SAG: salicylic acid glucoside; Signal amplification: Επαύξηση σήματος; Signals: σήματα; Thionin: Θειονίνη; Transcription factors activated: Ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων; Wounding: Τραυματισμός. (Προσαρμογή από Hammond-Kosack και Jones, 2000)

1.1.3 Οι ασθένειες των αδρομυκώσεων

Οι ασθένειες των αδρομυκώσεων είναι ασθένειες των φυτών που παρουσιάζουν μεγάλη εξάπλωση και είναι πολύ καταστροφικές για τους ξενιστές τους. Τα συμπτώματα τους εμφανίζονται συνήθως με τη μορφή μάρανσης, χλώρωσης και νέκρωσης της φύλλων που ακολουθείται από τη νέκρωση όλου του φυτού. Οι αδρομυκώσεις εμφανίζονται ως αποτέλεσμα της παρουσίας και της δραστηριότητας των παθογόνων στα αγγεία του ξύλου των φυτών. Η νέκρωση των φυτών μπορεί να συμβεί μέσα σε μερικές εβδομάδες, ωστόσο στις δενδρώδεις καλλιέργειες η νέκρωση μπορεί να επέλθει μετά από αρκετούς μήνες ή και χρόνια μετά την προσβολή. Όσο το φυτό είναι ζωντανό, οι μύκητες βρίσκονται στους αγγειακούς ιστούς (ξύλο) και σε μερικά περιβάλλοντα κύτταρα. Μόνο μετά το θάνατο των φυτών μετακινούνται σε άλλους ιστούς και σχηματίζουν σπόρια κοντά στην επιφάνεια των νεκρών φυτών (Agrios, 2005).

Υπάρχουν 4 γένη που προκαλούν αδρομυκώσεις και είναι τα *Ceratocystis*, *Ophiostoma*, *Phoma*, *Fusarium* και *Verticillium*. Το καθένα προκαλεί ασθένεια σε αρκετά καλλιεργούμενα είδη αλλά και σε δασικά ή καλλωπιστικά φυτά. Το γένος *Ceratocystis* προκαλεί την αδρομύκωση της βελανιδιάς (*C. fagacearum*), του κακαόδεντρου (*T. cacao*) και του ευκαλύπτου (*E. Globulus*). Το γένος *Ophiostoma* προκαλεί αδρομύκωση στη φτελιά (*O. novo-ulmi*) ενώ το είδος *Phoma tracheiphila* την αδρομύκωση των εσπεριδοειδών (Agrios, 2005).

Το γένος *Fusarium* προκαλεί αδρομυκώσεις σε λαχανικά και ανθοκομικά φυτά, σε πολυετή και ποώδη, σε φυτά μεγάλης καλλιέργειας και στο βαμβάκι (Beckman, 1987). Οι περισσότεροι από τους μύκητες του γένους *Fusarium* που προκαλούν αδρομυκώσεις ανήκουν στο είδος *Fusarium oxysporum*. Οι διάφοροι ξενιστές προσβάλλονται από ειδικές μορφές ή φυλές του μύκητα. Ο μύκητας μπορεί να προσβάλει πάνω από 100 είδη φυτών (Agrios, 2005).

Ο μύκητας *Verticillium* προκαλεί αδρομυκώσεις σε λαχανικά, ανθοκομικά, φυτά μεγάλης καλλιέργειας, ζιζάνια, δασικά και καρποφόρα δέντρα. Δύο είδη, τα *Verticillium albo-atrum* και *V. dahliae*, προσβάλλουν εκατοντάδες είδη φυτών προκαλώντας αδρομυκώσεις και απώλειες παραγωγής ποικίλης σοβαρότητας (Agrios, 2005).

Όλες οι αδρομυκώσεις έχουν κάποια συγκεκριμένα κοινά χαρακτηριστικά. Τα φύλλα των προσβεβλημένων φυτών ή τμήματα των προσβεβλημένων ξενιστών χάνουν την σπαργή τους, γίνονται μαλακά και χλωρωτικά και στη συνέχεια μαραίνονται, κιτρινίζουν και τελικά νεκρώνονται. Οι νεαροί και τρυφεροί βλαστοί

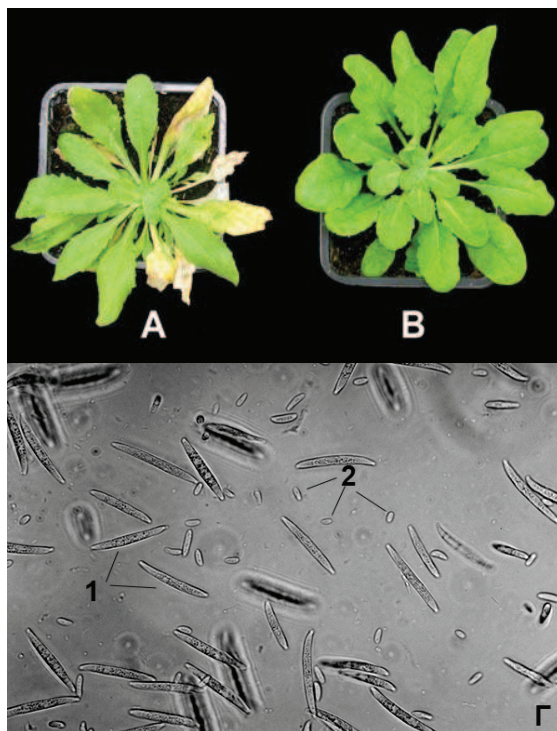
επίσης μαραίνονται και νεκρώνονται. Στα προσβεβλημένα στελέχη και κλαδιά εμφανίζονται καστανοί μεταχρωματισμοί στους αγγειακούς ιστούς. Κάποια από τα αγγεία μπορεί να φράσσονται από μυκήλιο, σπόρια ή πολυσακχαρίτες που παράγονται από το μύκητα. Το φράξιμο επιτείνεται από πύγματα που σχηματίζονται από τη συγκέντρωση και οξειδωση δευτερογενών μεταβολιτών της αποδόμησης των φυτικών κυττάρων από τη δράση ενζύμων των παθογόνων (Green, 1981· DeVay, 1989). Η οξειδωση και μετατόπιση τέτοιων προϊόντων αποδόμησης έχουν αναφερθεί ως υπεύθυνα για τον καστανό μεταχρωματισμό των αγγείων του ξύλου (Pegg, 1981· Pegg, 1989). Σε πρόσφατα μολυσμένους νεαρούς βλαστούς, ο αριθμός των αγγείων του ξύλου που σχηματίζεται είναι μειωμένος και τα κυτταρικά τοιχώματα είναι λεπτότερα από τα κανονικά. Συχνά τα παρεγχυματικά κύτταρα επηρεάζονται από εκκρίσεις των παθογόνων και πολλαπλασιάζονται υπερβολικά και σε συνδυασμό με τα λεπτότερα κυτταρικά τοιχώματα μειώνεται η διάμετρος ή προκαλείται κατάρρευση των αγγείων. Σε κάποιους ξενιστές, παρατηρείται η δημιουργία τυλώσεων που δημιουργούν τα γειτονικά παρεγχυματικά κύτταρα. Οι τυλώσεις προεξέχουν μέσα στα αγγεία και συμβάλλουν στο φράξιμο τους. Τοξίνες που εκκρίνονται από τα παθογόνα στα αγγεία μεταφέρονται στα φύλλα όπου προκαλούν μείωση της σύνθεσης της χλωροφύλλης κατά μήκος των νευρώσεων και μειωμένη φωτοσύνθεση, καταστρέφουν τη διαπερατότητα των μεμβρανών των κυττάρων και την ικανότητα τους να ελέγχουν την απώλεια νερού μέσω της εξαμισοδιαπνοής και έτσι προκαλούν επιναστία των φύλλων, μάρανση, ενδοαγγειακή νέκρωση, καστανό μεταχρωματισμό και νέκρωση (Agrios, 2005).

Αδρομυκώσεις που προκαλεί ο μύκητας *Fusarium sp.*

Οι αδρομυκώσεις που προκαλούν οι μύκητες του γένους *Fusarium* είναι πιο σοβαρές σε περιοχές με θερμά κλίματα και σε θερμοκήπια (Di Pietro et al., 2003· Roncero et al., 2003· Okubara και Paulitz, 2005).

Ως εδαφογενές παθογόνο, ο μύκητας *F. oxysporum* μπορεί να επιβιώσει για μεγάλες περιόδους απουσία ξενιστή, κυρίως με τη μορφή χλαμυδοσπορίων, που είναι μονοκύτταρα ή δικύτταρα σπόρια με χοντρό κυτταρικό τοίχωμα. Όταν οι ρίζες προσεγγίζουν τα χλαμυδοσπόρια, αυτά βλαστάνουν και οι αναπτυσσόμενες υφές προσκολλούνται στις ρίζες των φυτών (Bishop και Cooper, 1983α· Di Pietro et al., 2001) στις οποίες εισχωρεί είτε άμεσα (Rodriguez-Gálvez και Mendgen, 1995) ή έμμεσα μέσω πληγών και στα σημεία έκπτυξης των δευτερευουσών ριζών (Agrios, 2005). Το μυκήλιο προχωρά από τους μεσοκυττάριους χώρους μέχρι να φτάσει στα αγγεία του ξύλου στα οποία εισέρχεται μέσω των βοθρίων (Bishop και Cooper, 1983β). Σε αυτό το σημείο ο μύκητας μπαίνει σε μια ιδιαίτερη φάση της μόλυνσης,

κατά την οποία παραμένει αποκλειστικά στα αγγεία του ξύλου, μέσω των οποίων αποικίζει τον ξενιστή (Bishop και Cooper, 1983α). Αυτό επιτυγχάνεται με τη παραγωγή μικροκονιδίων (Εικόνα 1.7 Γ), τα οποία μεταφέρονται προς τα πάνω μέσω της ροής του ανιόντος χυμού. Τα μικροκονίδια τελικά βλαστάνουν και το μυκήλιο διαπερνά τα άνω τοιχώματα των αγγείων παράγοντας περισσότερα μικροκονίδια μέσα στο επόμενο αγγείο. Τα χαρακτηριστικά συμπτώματα μάρανσης εμφανίζονται ως αποτέλεσμα της σημαντικής υδατικής καταπόνησης, κυρίως λόγω απόφραξης των αγγείων (Εικόνα 1.7 Α). Η μάρανση προκαλείται από ένα συνδυασμό δραστηριοτήτων του μύκητα, όπως η συσσώρευση μυκηλίου και/ή παραγωγή τοξινών καθώς και από τις αντιδράσεις άμυνας του ξενιστή, όπως είναι ο σχηματισμός πηγμάτων, τυλώσεων και η κατάρρευση των αγγείων από τον πολλαπλασιασμό των γειτονικών παρεγχυματικών κυττάρων (Beckman, 1987). Όσο το φυτό είναι ζωντανό ο μύκητας παραμένει αυστηρά μέσα στα αγγεία του ξύλου και σε μερικά γειτονικά κύτταρα. Μόνο μετά τη νέκρωση του ξενιστή εισβάλλει στον παρεγχυματικό ιστό και πολλαπλασιάζεται στην επιφάνεια των φυτών. Αυτή η εξειδικευμένη συμπεριφορά του *F. oxysporum* είναι κοινή μόνο σε μερικά άλλα παθογόνα όπως οι μύκητες *Verticillium dahliae* και *Ceratocystis ulmi* και *Phoma tracheiphila* (Agrios, 2005).



Εικόνα 1.7: Χαρακτηριστικά συμπτώματα του μύκητα *F. oxysporum* f. sp. *raphani* σε φυτό *A. thaliana* (A) σε σχέση με τον αμόλυντο μάρτυρα (B). Μακροκονίδια (Γ1) και μικροκονίδια (Γ2) του μύκητα *F. oxysporum*.

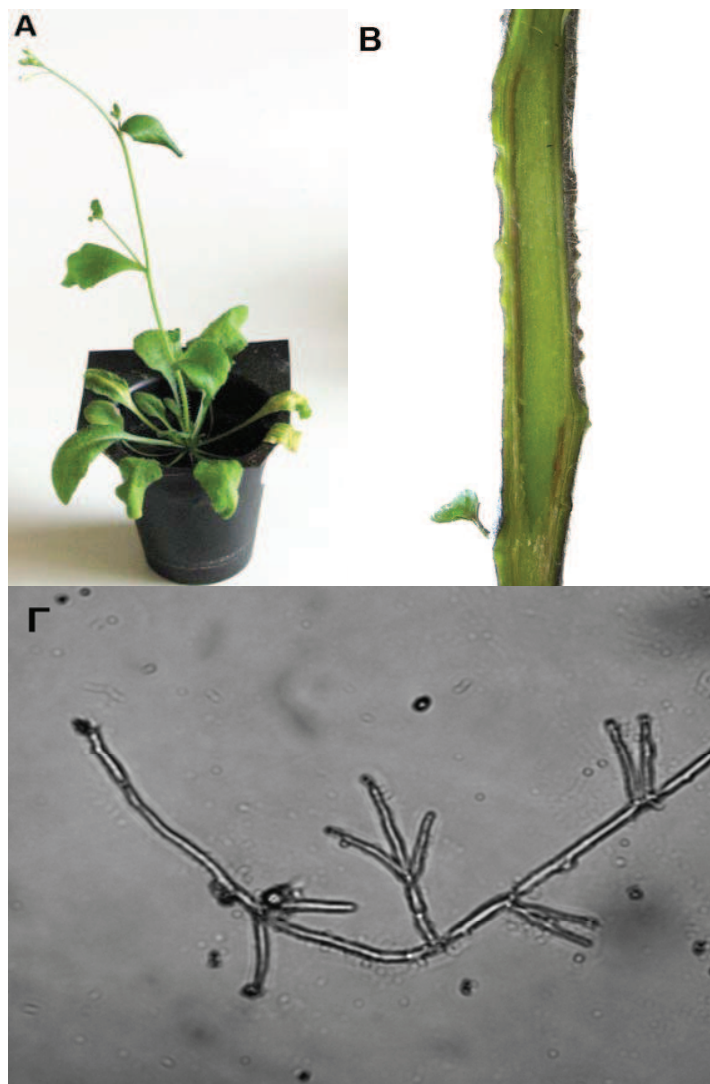
Η αντιμετώπιση της ασθένειας που προκαλεί ο *F. oxysporum* στηρίζεται κυρίως σε ανθεκτικές ποικιλίες και σε εμβολιασμό σε ανθεκτικά υποκείμενα . Ο μύκητας είναι πολύ διαδεδομένος και πολύ επίμονος και η εναλλαγή καλλιεργειών και η απολύμανση των εδαφών έχει περιορισμένα αποτελέσματα. Η χρήση υγιούς σπόρου και φυτικού υλικού είναι απαραίτητη και η θερμική επεξεργασία ύποπτων σπόρων πρέπει να προηγείται της σποράς (Agrios, 2005).

Τα τελευταία χρόνια ο βιολογικός έλεγχος του *F. oxysporum* έδωσε ελπιδοφόρα αποτελέσματα. Τέτοιες εφαρμογές αφορούν τον εμβολιασμό των φυτών με μη παθογόνα στελέχη του *F. oxysporum* ή άλλων ανταγωνιστικών μυκήτων, όπως οι *Trichoderma* και *Gliocladium*, και βακτηρίων όπως τα *Pseudomonas fluorescens* και *Burkholderia cepacia*. Ωστόσο, κανένα από αυτά δεν έχει εφαρμοστεί στη πράξη με επιτυχία μέχρι σήμερα. Σε αρκετές περιπτώσεις πάντως, η ηλιοαπολύμανση μείωσε σημαντικά την εμφάνιση της ασθένειας (Agrios, 2005).

Αδρομυκώσεις που προκαλεί ο μύκητας *Verticillium sp.*

Οι αδρομυκώσεις που προκαλούν οι μύκητες του γένους *Verticillium* παρατηρούνται παγκόσμια αλλά είναι πιο σημαντικές σε περιοχές με εύκρατο κλίμα.

Τα συμπτώματα που προκαλεί ο μύκητας είναι σχεδόν τα ίδια με αυτά που προκαλούν οι μύκητες του γένους *Fusarium*. Σε πολλούς ξενιστές και πολλές περιοχές ωστόσο ο μύκητας *Verticillium* προκαλεί ασθένεια σε χαμηλότερες θερμοκρασίες από ότι ο *Fusarium*. Επίσης, τα συμπτώματα εκδηλώνονται πιο αργά και συχνά εμφανίζονται μόνο στα κατώτερα φύλλα ή μόνο σε κάποιους κλάδους των φυτών προκαλώντας το χαρακτηριστικό σύμπτωμα της ημιπληγίας. Σε κάποιους ξενιστές η αδρομύκωση αναπτύσσεται κυρίως σε νεαρά φυτάρια, τα οποία συνήθως νεκρώνονται λίγο μετά την προσβολή. Πιο συχνές είναι οι μεταγενέστερες μολύνσεις οι οποίες προκαλούν συμπτώματα φύλλου σημαίας σε κάποια φύλλα και σε άλλα αναπτύσσονται χλωρωτικές περιοχές που εξελίσσονται σε νεκρωτικές (Εικόνα 1.8 Α). Τα μεγαλύτερα φυτά όταν προσβάλλονται από το μύκητα *Verticillium* συνήθως εμφανίζουν νανισμό και οι αγγειακοί τους ιστοί παρουσιάζουν καστανό μεταχρωματισμό (Pegg, 1981; Pegg, 1989) (Εικόνα 1.8 Β). Η μόλυνση μπορεί να οδηγήσει στην πλήρη αποφύλλωση, σταδιακή μάρανση και νέκρωση διαδοχικών βραχιόνων ή αιφνίδια κατάρρευση και νέκρωση ολόκληρων των φυτών (Agrios, 2005).



Εικόνα 1.8 **A**: Χαρακτηριστικά συμπτώματα του της ασθένειας που προκαλεί ο μύκητας *V. dahliae* στο φυτό *A. thaliana*. **B**: Καστανός μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου σε φυτά τομάτας μετά από προσβολή του μύκητα *V. dahliae*. **Γ**: χαρακτηριστικοί κονιδιοφόροι του μύκητα *V. dahliae*.

Όταν η ασθένεια εμφανίζεται αρχικά στον αγρό είναι ήπια και εντοπισμένη. Στα επόμενα χρόνια καθώς το μόλυσμα αυξάνεται οι μολύνσεις είναι περισσότερες, πιο έντονες και εκτεταμένες μέχρι η καλλιέργεια να διακοπεί ή να αντικατασταθεί με ανθεκτικές ποικιλίες (Agrios, 2005).

Δύο είδη *Verticillium*, τα *V. albo-atrum* και *V. dahliae*, προκαλούν αδρομυκώσεις στα περισσότερα φυτά. Και τα δύο είδη σχηματίζουν άφθονους, ανορθωμένους, υαλώδεις κονιδιοφόρους που διακλαδίζονται χαρακτηριστικά κατά σπονδύλους σε 3-4 φιαλίδια στα άκρα των οποίων σχηματίζονται κονίδια που έχουν μικρό χρόνο ζωής (Εικόνα 1.8 Γ). Το είδος *Verticillium dahliae* παράγει μικροσκληρώτια ενώ το είδος *V. albo-atrum* παράγει σκοτεινόχρωμα μυκήλια με χοντρό τοίχωμα (Green, 1981). Ο *Verticillium albo-atrum* αναπτύσσεται άριστα στους

20 με 25°C, ενώ ο *V. dahliae* προτιμά ελαφρώς υψηλότερες θερμοκρασίες (25–28°C) και είναι κάπως πιο κοινός σε θερμότερες περιοχές (Agrios, 2005). Μερικά στελέχη του *Verticillium* παρουσιάζουν εξειδίκευση ως προς τον ξενιστή, αλλά τα περισσότερα από αυτά μολύνουν μεγάλο εύρος ξενιστών (Bhat και Subbarao, 1999). Ο *Verticillium dahliae* διαχειμάζει στο έδαφος με τη μορφή μικροσκληρωτίων και μπορεί να επιβιώσει μέχρι 15 χρόνια (Schnathorst, 1981). Ωστόσο, και τα δύο είδη μπορούν να διαχειμάσουν μυκηλιακά σε πολυετείς ξενιστές, σε αναπαραγωγικά όργανα ή φυτικά υπολείμματα (Agrios, 2005).

Ο μύκητας *Verticillium* εισβάλλει στις νεαρές ρίζες των ξενιστών άμεσα ή μέσω πληγών (Schnathorst, 1981· Huisman και Gerik, 1989· Van Aflen, 1989). Ο μύκητας μεταδίδεται με μολυσμένα μοσχεύματα και κονδύλους, με το νερό και το έδαφος (Agrios, 2005). Πολλές περιοχές έχουν επιμολυνθεί με το μύκητα *Verticillium* για πρώτη φορά με τη φύτευση μολυσμένων κονδύλων πατάτας ή άλλων καλλιεργειών. Οι σολανώδεις καλλιέργειες όπως η πατάτα, η μελιτζάνα και η τομάτα αυξάνουν το επίπεδο μόλυσματος στο έδαφος. Ωστόσο ο μύκητας *Verticillium* βρίσκεται σε μη καλλιεργούμενες περιοχές, κάτι που δείχνει ότι ο μύκητας είναι γηγενής στα εδάφη και μπορεί να μολύνει ευπαθείς καλλιέργειες όταν αυτές εγκατασταθούν (Agrios, 2005).

Ο έλεγχος της ασθένειας βασίζεται στη φύτευση υγιών φυτών σε υγιείς αγρούς, στη χρήση ανθεκτικών ποικιλιών και στην αποφυγή φύτευσης ευπαθών καλλιεργειών όπου έχει προηγηθεί καλλιέργεια σολανωδών επί σειρά ετών. Η θερμική απενεργοποίηση των μολυσμάτων μέσω ηλιοαπολύμανσης αποδεικνύεται ιδιαίτερα χρήσιμη για τον έλεγχο της ασθένειας σε περιοχές με υψηλές θερινές θερμοκρασίες και χαμηλή βροχόπτωση (Tjamos και Paplomatas, 1988, Tjamos, 1989α, Agrios, 2005).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Οι εδαφογενείς φυτοπαθογόνοι μύκητες όπως είναι ο *Verticillium dahliae* και ο *Fusarium oxysporum* είναι δύσκολο να αντιμετωπιστούν εξαιτίας της διατήρησης ή επιβίωσής τους στο έδαφος. Ιδιαίτερα για τις περιπτώσεις των μυκήτων *V. dahliae* και *F. oxysporum* που επιβιώνουν για πολλά χρόνια στο έδαφος και εγκαθίστανται στα αγγεία των ξενιστών, οι εναλλακτικές μέθοδοι ελέγχου των παθογόνων είναι πολύ λίγες. Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες για να χαρακτηριστούν οι μοριακοί μηχανισμοί που καθορίζουν την ασθένεια κυρίως για τα αερομεταφερόμενα παθογόνα και πολύ λιγότερες για τους εδαφογενείς μύκητες που προκαλούν αδρομυκώσεις.

Σκοπός της παρούσας μελέτης αποτελεί η κατανόηση σε μοριακό επίπεδο των αντιδράσεων των φυτών που σχετίζονται με τους μηχανισμούς άμυνας εναντίον των παθογόνων *V. dahliae* και *F. oxysporum* που προκαλούν αδρομυκώσεις σε ένα μεγάλο εύρος ξενιστών. Η ευπάθεια ή η ανθεκτικότητα των φυτών είναι αποτέλεσμα μιας σειράς διαδικασιών που περιλαμβάνει την αρχική επικοινωνία του παθογόνου με τον ξενιστή στην οποία εμπλέκονται γονίδια μετάδοσης σημάτων τόσο στο φυτό όσο και στο παθογόνο, και την επακόλουθη ενεργοποίηση ή όχι των μηχανισμών άμυνας των φυτών που θα οδηγήσουν είτε στον περιορισμό του παθογόνου και της ασθένειας ή σε επιτυχή μόλυνση και εγκατάσταση του παθογόνου.

Για τη διερεύνηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στην άμυνα των φυτών εναντίον των αδρομυκώσεων θα χρησιμοποιηθεί μια σειρά μεταλλαγμένων φυτών *A. thaliana* στα μονοπάτια του σαλικυλικού οξέος, του ιασμονικού οξέος και του αιθυλενίου έτσι ώστε να διαπιστωθεί ποιο μονοπάτι ή και ποιο συγκεκριμένο στοιχείο του επηρεάζει αρνητικά την εκδήλωση των αδρομυκώσεων. Τα μονοπάτια μεταγωγής του σαλικυλικού οξέος, του ιασμονικού οξέος και του αιθυλενίου παίζουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα των φυτών εναντίον πολλών άλλων παθογόνων. Συνεπώς η μελέτη γονιδίων που εμπλέκονται στα μονοπάτια αυτά θα δώσει πληροφορίες για τους μηχανισμούς του φυτού που ελέγχουν τα γονίδια αυτά κατά τη μόλυνση τους με τα παθογόνα των αδρομυκώσεων. Στους συνδυασμούς ξενιστή – μύκητα που πιθανόν να παρατηρηθούν μειωμένα συμπτώματα, θα ελεγχθεί η συσχέτιση των συμπτωμάτων με τη βιομάζα των παθογόνων που βρίσκεται στους ιστούς των φυτών και οι μεταγραφικές αλλαγές γονιδίων που καθορίζουν το φαινόμενο.

Ακολούθως θα μελετηθεί ο ρόλος γονιδίων που εμπλέκονται στην άμυνα των φυτών τομάτας εναντίον του μύκητα *V. dahliae* με βάση τα αποτελέσματα των

πειραμάτων με τα φυτά *A. thaliana*. Στα πειράματα παθογένειας θα χρησιμοποιηθούν μεταλλαγμένα φυτά τομάτας στα υπό μελέτη γονίδια, όπου αυτό είναι δυνατόν. Σαν εναλλακτική μέθοδος για την μελέτη γονιδίων άμυνας στην τομάτα, επιλέχθηκε η τεχνική της ιϊκά επαγόμενης γονιδιακής σίγησης που έχει εφαρμοστεί πρόσφατα για την μελέτη διαφόρων γονιδίων. Η πρωτοπορία αυτής της εργασίας έγκειται στο γεγονός ότι η τεχνολογία αυτή θα χρησιμοποιηθεί για πρώτη φορά στη μελέτη της αλληλεπίδρασης της τομάτας με ένα φυτοπαθογόνο που προκαλεί αδρομύκωση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΤΟ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ ΚΑΙ Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΜΥΝΑ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ *ARABIDOPSIS THALIANA*

2.1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι αδρομυκώσεις που προκαλούνται από τους μύκητες των γενών *Verticillium* και *Fusarium* είναι πολύ δύσκολο να αντιμετωπιστούν με αποτέλεσμα να επιφέρουν σημαντικές απώλειες της παραγωγής σε ένα μεγάλο εύρος καλλιεργειών μεγάλης οικονομικής σημασίας. Για να διερευνηθούν οι αμυντικοί μηχανισμοί που πιθανώς να εμπλέκονται στην αντίδραση των φυτών στους μύκητες *Verticillium dahliae* και *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*, μια σειρά από μεταλλαγμένα και γενετικώς τροποποιημένα φυτά *Arabidopsis thaliana* σε γονίδια που είναι γνωστό ότι συμμετέχουν σε μονοπάτια του αμυντικού μηχανισμού των φυτών σε παθογόνους μικροοργανισμούς, χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα παθογένειας με τους μύκητες. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έδειξαν σημαντική μείωση των συμπτωμάτων μόνο των φυτών *etr1-1* (ethylene receptor mutant, δεν αντιλαμβάνονται το αιθυλένιο), και όχι των υπολοίπων μεταλλαγμένων φυτών στο μονοπάτι του αιθυλενίου καθώς και αυτών των μονοπατιών του σαλικυλικού και του ιασμονικού οξέος, υποδεικνύοντας το σημαντικό ρόλο του γονιδίου *ETR1* στην αντίδραση των φυτών εναντίον αυτών των παθογόνων. Ακολούθως, για να διερευνηθεί εάν τα μειωμένα συμπτώματα που παρουσίασαν τα *etr1-1* φυτά σχετίζονται με μειωμένη ανάπτυξη των παθογόνων στους αγγειακούς τους ιστούς, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ποσοτικοποίησης των μυκήτων με αντιδράσεις Real-time PCR. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι η ποσότητα των παθογόνων ήταν σημαντικά μικρότερη στα *etr1-1* φυτά, τόσο σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου όσο και με τα υπόλοιπα μεταλλαγμένα φυτά στο μονοπάτι του αιθυλενίου, υποδεικνύοντας ότι η μειωμένη πρόσληψη του αιθυλενίου μέσω του υποδοχέα ETR1 οδηγεί σε αυξημένη ανθεκτικότητα των φυτών εναντίον των μυκήτων *V. dahliae* και *F. oxysporum* f. sp. *raphani*. Για να διερευνηθούν οι μεταγραφικές μεταβολές που πιθανόν να σχετίζονται με τον ανθεκτικό φαινότυπο, δείγματα RNA από *etr1-1* και αγρίου τύπου φυτά έξι ημέρες μετά την μόλυνσή τους με το μύκητα *V. dahliae* χρησιμοποιήθηκαν σε πείραμα μικροσυστοιχιών (microarrays). Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, επιλέχθηκαν υποψήφια γονίδια που παρουσίαζαν αυξημένα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΤΟ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ ΚΑΙ Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΜΥΝΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

επίπεδα έκφρασης στα *etr1-1* φυτά, των οποίων μελετήθηκε η έκφραση σε φυτά *etr1-1*, *ein4* και WT με αντιδράσεις Real-time PCR, σε διάφορα χρονικά σημεία μετά τη μόλυνση τους με τον μύκητα *V. dahliae*. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε την επαγωγή των γονιδίων *PR-1*, *PR-2*, *PR-5*, *GSTF12*, *GSTU16*, *CHI-1*, *CHI-2* και *Myb75* στα *etr1-1* φυτά, υποδεικνύοντας ότι το αποτέλεσμα της αυξημένης ανθεκτικότητας των φυτών αυτών σχετίζεται με μια ομάδα γονιδίων άμυνας που ενεργοποιούνται κατά την αλληλεπίδραση των φυτών με το μύκητα *V. dahliae*.

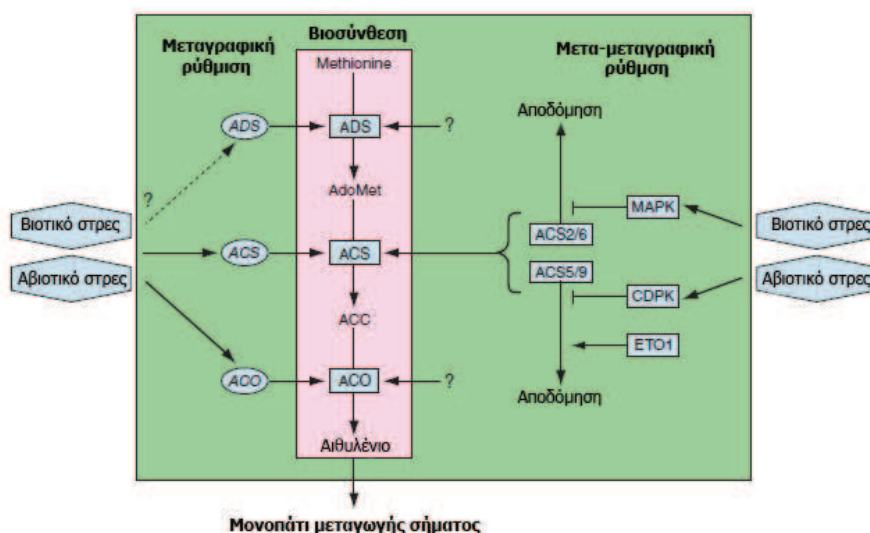
2.2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα φυτά προκειμένου να αντιμετωπίσουν τη συνεχή απειλή των παθογόνων μικροοργανισμών που βρίσκονται στο άμεσο περιβάλλον τους, έχουν αναπτύξει διάφορους αμυντικούς μηχανισμούς. Αυτοί περιλαμβάνουν τα φυσικά εμπόδια και την παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών, που είτε προϋπάρχουν είτε επάγονται. Οι επαγόμενοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν την αντίληψη της επίθεσης των παθογόνων μικροοργανισμών και την επακόλουθη ανάπτυξη των κατάλληλων αμυντικών αντιδράσεων. Τα πρώτα στάδια της επαγόμενης ανοχής χαρακτηρίζονται από την παραγωγή ενεργών ομάδων οξυγόνου (reactive oxygen species) όπως το οξυγόνο (O_2), το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) και το νιτρικό οξειδίο (NO). Ανάλογα με την έκταση της αντίδρασης, οι ενεργές ομάδες οξυγόνου μπορούν να οδηγήσουν σε αντίδραση υπερευαισθησίας (HR) που χαρακτηρίζεται από γρήγορο προγραμματισμένο θάνατο των κυττάρων των ξενιστών (Neill et al., 2002· Wendehenne et al., 2004). Αν και η HR είναι γενικά αποτελεσματική στην ανάρχηση της περαιτέρω εισόδου των βιοτροφικών παθογόνων, τα οποία χρειάζονται τα ζωντανά κύτταρα των ξενιστών για το θρεπτικό τους ανεφοδιασμό, συνήθως δεν είναι αποτελεσματική, ή ακόμα και προάγει τη μόλυνση από τα νεκροτροφικά παθογόνα. Οι αντιδράσεις των φυτών που απαντώνται μεταγενέστερα, βασίζονται σε ένα δίκτυο αλληλοεπικοινωνίας μηχανισμών μεταγωγής μοριακών σημάτων από τα οποία το σαλικυλικό οξύ (salicylic acid - SA), το ιασμονικό οξύ (jasmonic acid - JA), και το αιθυλένιο (ET) είναι οι κύριοι μεσολαβητές (Thomma et al., 2001· De Vos et al., 2005). Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι τα μονοπάτια μεταγωγής του JA και ET λειτουργούν συχνά συνεργιστικά για την επαγωγή των πρωτεϊνών επίδρασης (effectors) των μηχανισμών άμυνας των φυτών (Penninckx et al., 1996· Pieterse και Van Loon, 1999· Schenk et al., 2000· Ellis και Turner, 2001).

Αν και το ET εμπλέκεται σε διάφορες πτυχές της ζωής των φυτών, ένα σημαντικό μέρος του μονοπατιού αντίληψης και μεταγωγής του ET φαίνεται να είναι το ίδιο για όλες τις επαγόμενες από το ET αντιδράσεις. Ο ρόλος του ET είναι πολύ σημαντικός αφού πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για τη βιοσύνθεση του ET (Bleecker και Kende, 2000· Wang και Ecker, 2002) και των επακόλουθων στοιχείων της μεταγωγής του (Wang και Ecker, 2002· Alonso και Stepanova, 2004· Guo και Ecker, 2004· Chen et al., 2005), καθώς και για το ρόλο τους στην άμυνα των φυτών (Schenk et al., 2000· Thomma et al., 2001· Glazebrook, 2005· Thatcher et al., 2005).

2.2.1 Βιοσύνθεση του αιθυλενίου

Η είσοδος των παθογόνων στους φυτικούς ιστούς σε πολλές περιπτώσεις προάγει την αυξημένη παραγωγή αιθυλενίου (Mauch et al., 1984· Boller, 1991· Penninckx et al., 1998· Cohn και Martin, 2005). Τα πρώτα στάδια που προηγούνται της ενεργοποίησης των γονιδίων βιοσύνθεσης ή ενζύμων του αιθυλενίου (ET), περιλαμβάνουν την αναγνώριση των μορίων των διεγερτών ή/και των αμολυσματικών (Avr) μορίων που προέρχονται από το παθογόνο, από τους υποδοχείς των φυτών. Το βιοσυνθετικό μονοπάτι του ET μελετήθηκε σε μεγάλο βαθμό από την πρωτοπόρο έρευνα του Yang και των συνεργατών του τη δεκαετία 1970–1980 (Kende, 1993). Το αιθυλένιο συντίθεται από το αμινοξύ μεθειονίνη, το οποίο μετατρέπεται σε S-adenosyl-methionine (AdoMet) με το ένζυμο S-AdoMet synthase (ADS). Η AdoMet είναι ο μεγαλύτερος δότης μεθυλίου στα φυτά και εμπλέκεται στις αντιδράσεις μεθυλίωσης λιπιδίων, πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων (Fontecave et al., 2004). Η AdoMet μετατρέπεται με το ένζυμο ACC synthase (ACS) σε 5-methylthioadenosine (MTA) η οποία μετατρέπεται πάλι σε μεθειονίνη μέσω του κύκλου του Yang και σε 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), που είναι η πρόδρομος ουσία του αιθυλενίου. Το ACC τελικά οξειδώνεται από την ACC oxidase (ACO) για να δημιουργηθεί αιθυλένιο, κυανίδιο (cyanide) και διοξείδιο του άνθρακα (carbon dioxide). Η μετατροπή της AdoMet σε ACC από το ACS γενικά θεωρείται ως το όριο του ρυθμού βιοσύνθεσης του αιθυλενίου και ως εκ τούτου έχει μελετηθεί πιο έντονα (Εικόνα 2.1).



Εικόνα 2.1: Απλοποιημένη σχηματική αναπαράσταση της βιοσυνθετικής οδού του αιθυλενίου. Τα βέλη υποδεικνύουν θετική ρύθμιση και οι γραμμές με το κλειστό τέλος υποδεικνύουν αρνητική ρύθμιση. Τα γονίδια και οι πρωτεΐνες αναπαριστούνται σε γαλάζιους κύκλους και τετράγωνα, αντίστοιχα. (Προσαρμογή από *Annu. Rev. Phytopathol.* 2006, 44: 393-416)

2.2.1.1 Μεταγραφική ρύθμιση της βιοσύνθεσης του αιθυλενίου

Γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα *ADS* σε φυτά, έχουν κλωνοποιηθεί από πολλά φυτικά είδη και ο χαρακτηρισμός τους έδειξε ότι είναι πολύ συντηρημένα σε όλους τους οργανισμούς και κωδικοποιούνται από μια οικογένεια γονιδίων (Ravanel et al., 1998). Το *ADS* εμπλέκεται σε πολλά μεταβολικά μονοπάτια πέρα από τη βιοσύνθεση του αιθυλενίου (Ravanel et al., 1998). Πάντως, δεν έχει αναφερθεί η εξειδικευμένη επαγωγή γονιδίων *ADS* κατά την επίθεση παθογόνων ή σε ερεθίσματα αβιοτικού στρες. Μετά από ανάλυση στοιχείων από βάση δεδομένων γονιδιακής έκφρασης (με τη χρήση του "Genevestigator") δεν ήταν δυνατό να διακριθεί η επαγωγή (induction) ή καταστολή (repression) γονιδίων *ADS* που να έχει προκληθεί από παθογόνα (Zimmerman et al., 2004).

Τα *ACO* ένζυμα κωδικοποιούνται από πολυγονιδιακές οικογένειες σε όλα τα φυτικά είδη (Wang et al., 2002). Τα γονίδια *ACO* εκφράζονται διαφορετικά κατά την ανάπτυξη των φυτών ή κατά την επίθεση παθογόνων και ερεθισμάτων αβιοτικού στρες όπως σε τραυματισμούς, υπερβολική υγρασία και έκθεση σε όζον (Nakatsuka et al., 1998; Moeder et al., 2002; Nie et al., 2002; Cohn και Martin, 2005; Woltering et al., 2005). Πρόσφατα, οι Cohn και Martin (2005) έδειξαν τη συμμετοχή των μολυσματικών/αμολυσματικών (virulence/avirulence) παραγόντων *AnrPto* και *AnrPtoB* από το παθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* στη βιοσύνθεση του αιθυλενίου σε μια ευπαθή ποικιλία. Πιο συγκεκριμένα, αυτές οι πρωτεΐνες επίδρασης που προέρχονται από το βακτήριο, οδήγησαν στην υπερέκφραση 2 συγκεκριμένων γονιδίων *ACO* (*LeACO1/2*), ενώ άλλα γονίδια *ACO* παρέμειναν ανεπηρέαστα. Επίσης, η εξέταση όλων των *ACO* γονιδίων από δεδομένα έκφρασης στο φυτό *Arabidopsis* (Zimmerman et al., 2004) έδειξε σημαντική ρύθμιση συγκεκριμένων υποομάδων γονιδίων *ACO* από αβιοτικό και βιοτικό στρες. Για παράδειγμα, τα *ACO* γονίδια *At1g62380* και *At1g05010* φαίνεται να υπερεκφράζονται σε φυτά *Arabidopsis* μετά από την εφαρμογή αιθυλενίου και του μύκητα *Botrytis cinerea*, ενώ το *ACO* γονίδιο *At1g12010* εκφράζεται σε χαμηλότερα επίπεδα μετά από εφαρμογή των *P. syringae* και *Alternaria brassicicola*. Τα άλλα γονίδια *ACO* δεν επηρεάστηκαν σε αυτά τα πειράματα. Συμπερασματικά, τα διαφορετικά μοτίβα έκφρασης των *ACO* γονιδίων υποδεικνύουν ότι ο μεταγραφικός έλεγχος αυτών των γονιδίων συμβάλλει στη ρύθμιση της παραγωγής αιθυλενίου.

Ωστόσο, ο έλεγχος της παραγωγής αιθυλενίου συνεχίζει να αποδίδεται σε μεγαλύτερο βαθμό στα γονίδια *ACS*. Τα ένζυμα *ACS* κωδικοποιούνται από πολυγονιδιακές οικογένειες στα φυτά (Johnsson και Ecker, 1998; Bleecker και Kende, 2000). Η πλειονότητα των ερευνών που μελέτησαν την έκφραση των *ACS*

έχουν γίνει σε τομάτα που περιέχει τουλάχιστον 10 ACS γονίδια, και σε *Arabidopsis thaliana*, που έχει 9 ACS γονίδια. Λόγω της σημαντικότητας τους στη βιοσύνθεση του αιθυλενίου, η ρύθμιση των ACS γονιδίων έχει μελετηθεί εκτεταμένα. Το πρώτο στάδιο της ρύθμισης της βιοσύνθεσης του αιθυλενίου συμβαίνει στο επίπεδο έκφρασης των ACS γονιδίων. Πολλές έρευνες έχουν δείξει ότι διαφορετικά επίπεδα μεταγραφής σε διάφορα ACS γονίδια είναι σημαντικός παράγοντας που ρυθμίζει την παραγωγή αιθυλενίου σαν αντίδραση σε διάφορα ερεθίσματα (Peck και Kende, 1998; Barry et al., 2000). Πρόσφατα, οι Tsuchisaka και Theologis (2004) εξέτασαν στο χρόνο τα μοτίβα έκφρασης των μελών της οικογένειας ACS γονιδίων στο φυτό *Arabidopsis* κατά τη διάρκεια ανάπτυξης των φυτών και κάτω από διαφορετικά ερεθίσματα αβιοτικού στρες, δείχνοντας συγκεκριμένα και μερικώς επικαλυπτόμενα προφίλ έκφρασης ανάμεσα στα διάφορα ACS γονίδια στους διαφορετικούς ιστούς. Για παράδειγμα, ο τραυματισμός του υποκοτυλίου παρεμπόδισε την έκφραση των *AtACS1* και *AtACS5* σε αυτό τον ιστό και προκάλεσε την έκφραση των *AtACS2*, 4, 6, 7, 8 και 11. Ωστόσο η έκφραση των γονιδίων ACS δεν έχει ακόμα μελετηθεί σε σχέση με την προσβολή από παθογόνα. Σε μια προκαταρκτική εργασία στην έκφραση των 9 γονιδίων ACS του φυτού *Arabidopsis*, βρέθηκε ότι κάποια γονίδια υπερεκφράστηκαν, κάποια καταστάληκαν ενώ άλλα παρέμειναν ανεπηρέαστα μετά την εφαρμογή διαφόρων παθογόνων. Συγκεκριμένα, το *AtASC2* υπερεκφράστηκε σε μεγάλο βαθμό μετά από την εφαρμογή των *P. syringae*, *B. cinerea* και *Alternaria brassicicola*, ενώ το *AtACS5* και το *AtACS11* έδειξαν να καταστέλλονται μετά την προσβολή τους με το *P. syringae*. Τα υπόλοιπα ACS γονίδια δεν έδειξαν να επηρεάζονται από αυτές τις πειραματικές συνθήκες (Zimmerman et al., 2004).

2.2.1.2 Μετα-μεταγραφική ρύθμιση της βιοσύνθεσης του αιθυλενίου

Πέρα από το σημαντικό ρόλο της μεταγραφικής σύνθεσης των γονιδίων ACS για την παραγωγή αιθυλενίου, πρόσφατα δεδομένα έδειξαν τον επίσης ισχυρό ρόλο των επιπέδων πρωτεΐνης που παράγουν, που λειτουργεί ως ρυθμιστής κλειδί της παραγωγής αιθυλενίου (Chae και Kieber, 2005). Μελέτες που έγιναν σε φυτά *Arabidopsis* που υπερπαράγουν αιθυλένιο (ethylene-overproducer - *eto*) (Guzman και Ecker, 1990; Kieber et al., 1993) έδειξαν ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης όντως ρυθμίζονται μετα-μεταγραφικά και ότι αυτή η ρύθμιση επηρεάζει την παραγωγή αιθυλενίου (Woeste et al., 1999; Chae και Kieber, 2005). Οι μοριακοί μηχανισμοί που ελέγχουν την δραστηριότητα του *AtACS5* και την τελική παραγωγή πρωτεΐνης διεκρινίσθησαν με την κλωνοποίηση του γονιδίου που είναι υπεύθυνο για την μεταλλαγή των *eto1* φυτών (Wang et al., 2004). Η πρωτεΐνη ETO1 είναι μέλος μιας νέας οικογένειας πρωτεϊνών, που είναι μοναδική στο φυτικό βασίλειο, και που

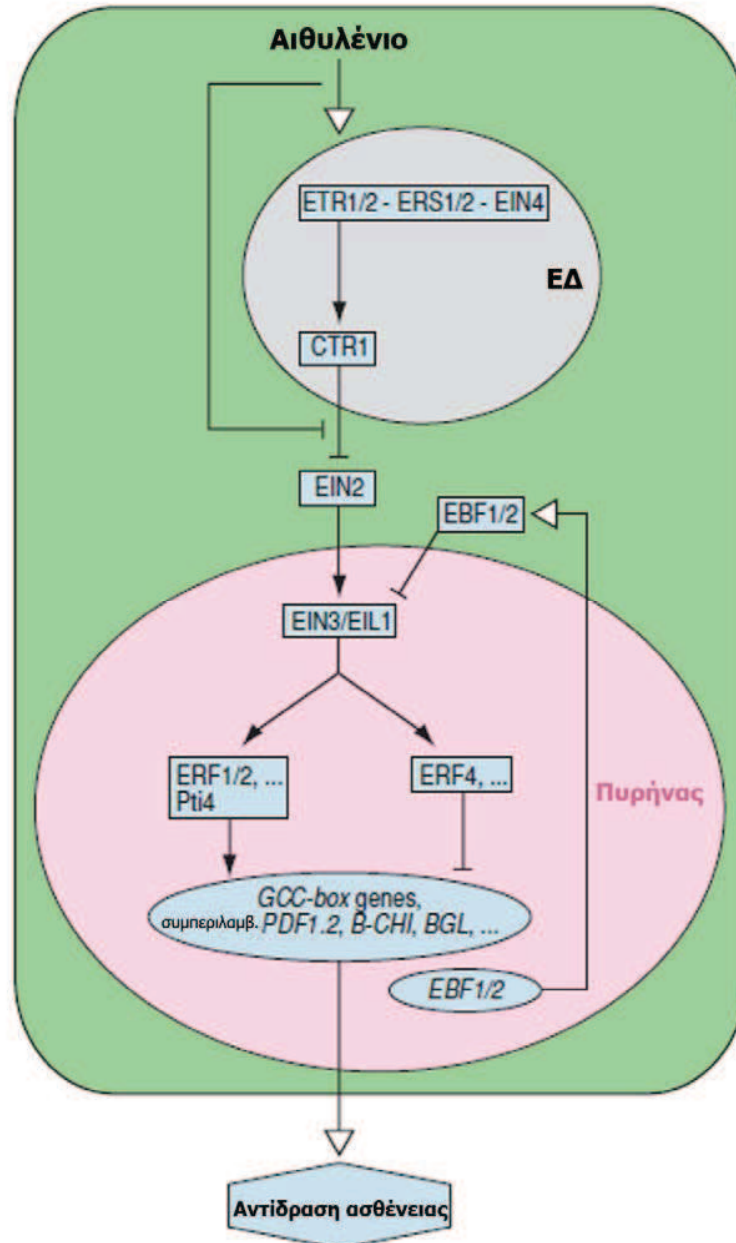
παίζουν σημαντικό ρόλο σε κάποια μοτίβα αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών με πρωτεΐνες που συμπεριλαμβάνουν την BTB περιοχή (Broad-complex, Tram-track, Bric-à-brac). Έχει βρεθεί ότι οι πρωτεΐνες που συμπεριλαμβάνουν την BTB-περιοχή συνδέουν την CUL3 λιγάση αμπικουΐτινης (CUL3-ubiquitin ligase) σε πρωτεΐνες υποστρώματος (Pintard et al., 2004). Οι Wang και συνεργάτες (Wang et al., 2004) έδειξαν άμεση αλληλεπίδραση της ETO1 με τα AtACS5 και CUL3 με *in vitro* δοκιμές ανοσοκατακρήμησης, υποδεικνύοντας ότι η ETO1 λειτουργεί εξειδικευμένα ως προσαρμογέας για το AtACS5 και πιθανόν και για άλλα ACS ισοένζυμα, στοχεύοντας έτσι αυτές τις ACS πρωτεΐνες για αποδόμηση από το 26S πρωτεάσωμα (proteasome). Επιπρόσθετα, η ETO1 παρεμποδίζει τη δράση του AtACS5 στα αγρίου τύπου φυτά αλλά όχι του μεταλλαγμένου *eto2* σε *in vitro* πειράματα (Wang et al., 2004). Αυτή η έρευνα υποδεικνύει ότι η ETO1 παρεμποδίζει άμεσα την ενζυματική δράση του AtACS5 πέρα από την επίδραση της στην σταθερότητα (μέσω πρωτεόλυσης) της ACS5 πρωτεΐνης. Παρόλο που υπάρχουν αρκετά δεδομένα στη ρύθμιση της βιοσύνθεσης του αιθυλενίου μέσω πρωτεόλυσης της ACS, δεν έχει απαντηθεί ακόμα ένα σημαντικό ερώτημα που αφορά τον έλεγχο αυτού του μηχανισμού. Ο μηχανισμός αποδόμησης της ACS θα προϋπόθετε την μετατροπή των ACS πρωτεϊνών με τέτοιο τρόπο ώστε να αποτελούν στόχο για το μηχανισμό του ubiquitin-26S-proteasome. Ένας πιθανός τρόπος για μια τέτοια μετατροπή θα ήταν η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης. Αρκετές έρευνες στη τομάτα και φυτά *Arabidopsis* υπέδειξαν ότι η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης ρυθμίζει τα επίπεδα των ACS πρωτεϊνών.

2.2.2 Πρόσληψη και μεταγωγή στο κυτόπλασμα

Το αιθυλένιο που παράγεται είτε από εσωτερικό ή από εξωτερικό ερέθισμα προσλαμβάνεται από το κύτταρο και αυτό το σήμα μεταδίδεται περαιτέρω μέσω ενός καλά συντηρημένου μονοπατιού (Guo και Ecker, 2004; Chen et al., 2005; Stepanova και Alonso, 2005). Τα περισσότερα από τα στοιχεία του μονοπατιού αυτού έχουν ανακαλυφθεί με τη χρήση απλών γενετικών σαρώσεων σε μεταλλαγμένα φυτά *Arabidopsis* που δεν αντιλαμβάνονται το αιθυλένιο, βασιζόμενες στη μορφολογική παρατήρηση της “τριπλής απόκρισης” των νεαρών φυταρίων στην έκθεση στο αιθυλένιο (Guzman και Ecker, 1990). Η “τριπλή απόκριση” χαρακτηρίζεται από τον περιορισμό του υποκοτυλίου και επιμήκυνση των κυττάρων της ρίζας, την ακτινωτή πάχυνση του υποκοτυλίου και την υπερκύρτωση του ακραίου μεριστώματος. Μεταλλαγμένα φυτά που παρουσίαζαν αυτό το φαινόμενο κατηγοριοποιήθηκαν είτε ως φυτά που δεν αντιλαμβάνονται το αιθυλένιο ή φυτά με μόνιμη αντίδραση

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΤΟ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ ΚΑΙ Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΜΥΝΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

αιθυλενίου. Και οι δύο ομάδες μεταλλαγμένων φυτών αποδείχτηκαν πολύτιμα εργαλεία για την εξακρίβωση του μηχανισμού πρόσληψης του αιθυλενίου και του επακόλουθου μονοπατιού της μεταγωγής του σήματός του (Εικόνα 2.2).



Εικόνα 2.2: Απλοποιημένη σχηματική αναπαράσταση του μονοπατιού μεταγωγής του αιθυλενίου όπως αναφέρεται στο κείμενο. Τα βέλη υποδεικνύουν θετική ρύθμιση και οι γραμμές με το κλειστό τέλος υποδεικνύουν αρνητική ρύθμιση. Τα γονίδια και οι πρωτεΐνες αναπαριστούνται σε γαλάζιους κύκλους και τετράγωνα, αντίστοιχα. ΕΔ: ενδοπλασματικό δίκτυο

(Προσαρμογή από *Annu. Rev. Phytopathol.* 2006, 44: 393-416)

2.2.2.1 Πρόσληψη του αιθυλενίου από τους υποδοχείς που βρίσκονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο

Με βάση την ανάλυση των ET-μεταλλαγμένων φυτών που αδυνατούν να προσλάβουν το αιθυλένιο, αναγνωρίστηκε μια οικογένεια υποδοχέων του αιθυλενίου που συμπεριλαμβάνει 5 μέλη (ETR1, ETR2, ERS1, ERS2, EIN4) (Bleecker et al., 1988; Chang et al., 1993; Hua et al., 1995; Hua et al., 1998; Sakai et al., 1998) που οι αλληλουχίες τους έχουν ομοιότητες με τους βακτηριακούς ρυθμιστές δυο-συνιστωσών (two-component regulators, μηχανισμός ερεθίσματος-αντίδρασης) (Pirrung, 1999). Το πιο συντηρημένο κομμάτι και των 5 υποδοχέων είναι το N-τελικό τους άκρο (N-terminal part), που αποτελείται από 3 ή 4 διαμεμβρανικές περιοχές στους υποδοχείς της υποοικογένειας-I (ETR1, ERS1) και της υποοικογένειας-II (ETR2, ERS2, EIN4), αντίστοιχα. Το N-τελικό άκρο έχει αποδειχθεί ότι είναι υπεύθυνο για την πρόσδεση του ET στους υποδοχείς ETR1 και ERS1 (Schaller και Bleecker, 1995; Rodriguez et al., 1999; Hall et al., 2000). Έχει επίσης αποδειχθεί ότι οι υποδοχείς ETR1 και ERS1 βρίσκονται στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ) ως ομοδιμερή δισουλφίδια (Schaller et al., 1995; Hall et al., 2000). Το κάθε ομοδιμερές δημιουργεί ένα υδρόφοβο θύλακα που αποτελεί την περιοχή πρόσδεσης του αιθυλενίου και η πρόσδεση σε αυτό γίνεται μέσω ενός συμπαραγόντα χαλκού (copper cofactor) (Hirayama, 1999; Woeste και Kieber, 2000).

Σε αντίθεση με την καλά συντηρημένη αλληλουχία της περιοχής πρόσδεσης του αιθυλενίου, στις υπόλοιπες περιοχές των υποδοχέων οι ομοιότητες μειώνονται από το N προς το C άκρο. Άλλες περιοχές που υπάρχουν στους υποδοχείς περιλαμβάνουν ένα cGMP σημείο πρόσδεσης (Chang και Shockey, 1999) και μια περιοχή κινάσης-ιστιδίνης (His/Kin) που πιστεύεται ότι είναι λειτουργική μόνο στην υποοικογένεια-I των υποδοχέων (Gamble et al., 1998; Hua et al., 1998). Ωστόσο, ο ρόλος αυτών των περιοχών στην πρόσληψη του αιθυλενίου και στη παραπέρα μεταγωγή του σήματος δεν έχει αποσαφηνιστεί (Gamble et al., 2002; Wang et al., 2003). Με βάση *in vitro* δοκιμές, έχει προταθεί η λειτουργία κινάσης-σερίνης (Ser/Kin) για τους υποδοχείς της υποοικογένειας-II καθώς και για τον ERS1 ως εναλλακτικό μηχανισμό της His/Kin για την περαιτέρω μεταγωγή του σήματος φωσφορυλίωσης στα επακόλουθα στοιχεία του μονοπατιού του αιθυλενίου (Moussatche και Klee, 2004).

Ακόμα λιγότερα είναι γνωστά για το ρόλο του C-τελικού άκρου των υποδοχέων, που αποτελείται από μια συγκεκριμένη περιοχή “δέκτης” (receiver)

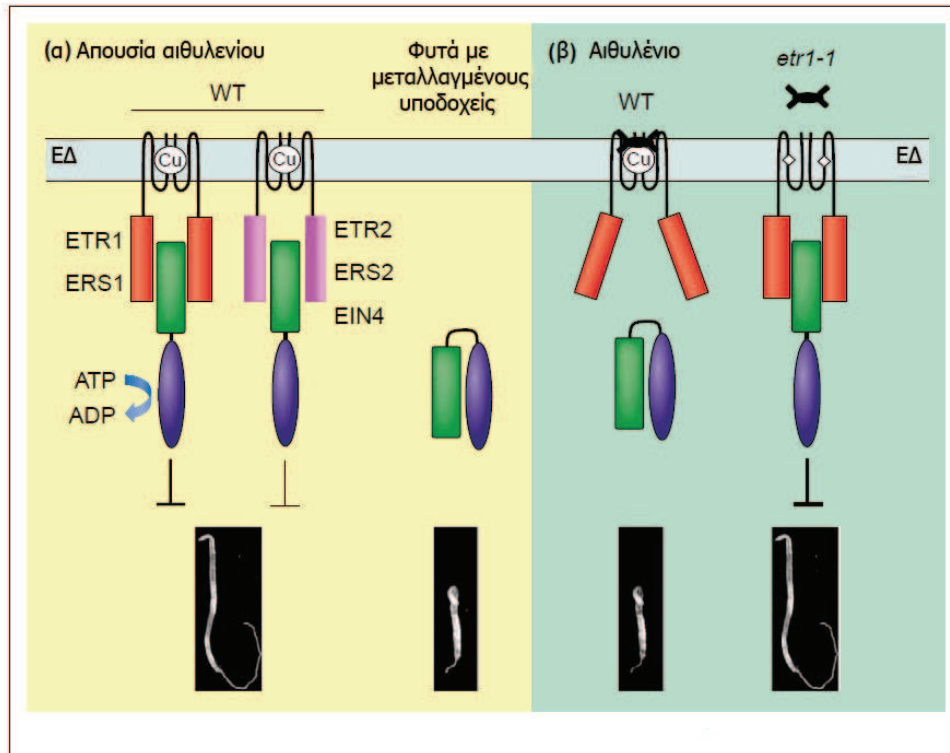
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΤΟ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ ΚΑΙ Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΜΥΝΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

στους ETR1, ETR2 και EIN4 υποδοχείς. Μαζί με την περιοχή της κινάσης, το τμήμα “δέκτης” του ETR1 φαίνεται ότι συμμετέχει στην αλληλεπίδραση του υποδοχέα με το CTR1 (constitutive triple response), που αποτελεί επακόλουθο στοιχείο του μονοπατιού μεταγωγής του αιθυλενίου (Clark et al., 1998). Για τους υποδοχείς του τύπου ERS, στους οποίους απουσιάζει η περιοχή αυτή, έχει υποθεθεί ότι μπορεί να χρησιμοποιούν την περιοχή “δέκτης” από άλλες πρωτεΐνες μέσω του σχηματισμού ετεροδιμερών (Hua et al., 1998).

Παρ’ όλες τις δομικές διαφορές ανάμεσα στους υποδοχείς του αιθυλενίου, πολλές γενετικές και βιοχημικές εργασίες αποκάλυψαν αξιοσημείωτη λειτουργική ομοιότητα. Όλοι οι υποδοχείς φαίνεται να παρεμποδίζονται από την πρόσδεση του αιθυλενίου και να λειτουργούν ως αρνητικοί ρυθμιστές των αντιδράσεων αιθυλενίου (Schaller και Bleecker, 1995· Hua και Meyerowitz, 1998· Rodriguez et al., 1999). Η επαγωγή των γονιδίων τους που προκαλείται από το αιθυλένιο θα πρέπει να αντιμετωπίζεται ως μέσο για την επανα-ευαισθητοποίηση των φυτών στο αιθυλένιο.

Υπάρχουν αρκετά στοιχεία που αποδεικνύουν ότι η πρόσληψη του αιθυλενίου πραγματοποιείται στο ΕΔ, όπως για παράδειγμα το γεγονός ότι οι υποδοχείς εντοπίζονται στη μεμβράνη του ΕΔ (Chen et al., 2002· Chen et al., 2005). Αυτή η παρατήρηση είναι σύμφωνη με το ότι το ΕΔ είναι σημείο όπου συναντούνται πολλές διαφορετικές κυτταρικές διαδικασίες όπως αρκετές αντιδράσεις στρες (Hara-Nishimura και Matsushima, 2003) για πολλές από τις οποίες το αιθυλένιο παίζει σημαντικό ρόλο (Johnsson και Ecker, 1998· Chang και Shockey, 1999· Bleecker και Kende, 2000· Wang et al., 2002). Το μοντέλο πρόσληψης του αιθυλενίου από τους υποδοχείς στο ΕΔ καθώς και η αλληλεπίδραση τους με το CTR1 φαίνεται στην Εικόνα 2.3.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΤΟ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ ΚΑΙ Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΜΥΝΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ



Εικόνα 2.3: Πρόσληψη του αιθυλενίου από τους υποδοχείς και αλληλεπίδραση τους με το CTR1 στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Υπάρχουν 2 τύποι υποδοχέων αιθυλενίου στα φυτά *Arabidopsis*. Οι υποδοχείς της υποοικογένειας-I (ETR1 και ERS1) έχουν μια συντηρημένη περιοχή κινάσης ιστιδίνης (κόκκινο), ενώ στους υποδοχείς της υποοικογένειας-II (ETR2, ERS2 και EIN4) η περιοχή αυτή είναι εκφυλισμένη (ροζ) με πιθανή έλλειψη καταλυτικής δράσης. Η δραστηριότητα κινάσης ιστιδίνης που παρατηρείται στους υποδοχείς της υποοικογένειας-I δεν απαιτείται για την μεταγωγή του σήματος. Οι αμινοτελικές περιοχές των υποδοχέων περιέχουν ένα συμππαράγοντα χαλκού (Cu) που είναι απαραίτητος για την πρόσδεση του αιθυλενίου και είναι συνδεδεμένοι με την μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου. Το αμινοτελικό άκρο του CTR1 (πράσινο) αλληλεπιδρά με την περιοχή κινάσης ιστιδίνης των υποδοχέων, και με μεγαλύτερη συγγένεια με τους υποδοχείς της υποοικογένειας-I από ότι της υποοικογένειας-II. Αυτή η αλληλεπίδραση επιτρέπει στο CTR1 να εντοπίζεται στο ΕΔ. (α) Σε απουσία αιθυλενίου, ο υποδοχείς παραμένουν σε κατάσταση λειτουργικής δραστηριότητας, που τους επιτρέπει να αλληλεπιδρούν με το CTR1. Το CTR1 ενεργοποιείται με τη σύνδεση του στους συνδεδεμένους στο ΕΔ υποδοχείς και καταστέλλει τις επακόλουθες αντιδράσεις του αιθυλενίου μέσω ενός μηχανισμού που απαιτεί την C-τελική περιοχή κινάσης σερίνης/θρεονίνης (Ser/Thr) (μπλε). Μεταλλαγή των υποδοχέων που τους κάνει μη λειτουργικούς οδηγεί στο διαχωρισμό του CTR1 από το ΕΔ. Το διαλυτό CTR1 απενεργοποιείται, πιθανότατα μέσω μιας αυτο-σύνδεσης με μια αρνητική ρυθμιστική περιοχή όπως συμβαίνει σε κάποιες Raf κινάσες. Ως αποτέλεσμα, η καταστολή των επακόλουθων αντιδράσεων απελευθερώνεται. Η απενεργοποίηση 2 υποδοχέων της υποοικογένειας-I οδηγεί σε φαινοτύπους αντίδρασης αιθυλενίου που είναι εντονότεροι από αυτούς που συμβαίνουν από τη μεταλλαγή οποιουδήποτε άλλου συνδυασμού 2 υποδοχέων. Η εξήγηση γι' αυτή την αντίδραση μπορεί να είναι άσχετη με το γεγονός ότι οι υποδοχείς της υποοικογένειας-I έχουν δραστηριότητα κινάσης ιστιδίνης. Αντί αυτού, θα μπορούσε να συμβαίνει λόγω του ότι η συγγένεια του αμινοτελικού άκρου του CTR1 με τους υποδοχείς της υποοικογένειας-I είναι μεγαλύτερη από ότι στους υποδοχείς της υποοικογένειας-II (β) Όταν υπάρχει αιθυλένιο, προσδένεται στους υποδοχείς και πιθανότατα προκαλεί μια αλλαγή της διαμόρφωσής τους, κάνοντας τους ανενεργούς. Το CTR1 απελευθερώνεται από το ΕΔ και επίσης γίνεται ανενεργό. Σε αντίθεση, μεταλλαγές στους υποδοχείς που διακόπτουν την πρόσδεση του αιθυλενίου ίσως να οδηγούν στη μόνιμη αλληλεπίδραση υποδοχέα – CTR1 και την καταστολή των επακόλουθων αντιδράσεων στο μονοπάτι μεταγωγής του αιθυλενίου.

Προσαρμογή από *TRENDS in Plant Science*, 2006 11: 184-191

2.2.2.2 Ενδοκυτταρικό μονοπάτι μεταγωγής του αιθυλενίου

Έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε μεταλλαγμένα στο γονίδιο *CTR1* φυτά *Arabidopsis* (constitutive triple response - *ctr1*) έδειξαν ότι το *CTR1* αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή των αντιδράσεων του αιθυλενίου (Kieber et al., 1993). Κλωνοποίηση του *CTR1* γονιδίου αποκάλυψε ότι αποτελείται από μια N-τελική περιοχή άγνωστης λειτουργίας και μια C-τελική περιοχή κινάσης με μεγάλη ομοιότητα με τις τύπου Raf κινάσες σερίνης-θρεονίνης (Ser/Thr kinase) (Kieber et al., 1993). Έχει αποδειχθεί ότι τέτοιες Raf-κινάσες στα θηλαστικά λειτουργούν σε μεταγωγικά MAPK (mitogen activated protein kinase) μονοπάτια (Pelegk και Sanghere, 1992). Όπως και οι υποδοχείς του αιθυλενίου, το *CTR1* συνδέεται με το ΕΔ (Gao et al., 2003), παρόλο που δεν έχει καμία διαμεμβρανική περιοχή ή κάποιο μοτίβο μεμβρανικής πρόσδεσης. Η θέση του στο ΕΔ έχει εξηγηθεί μέσω της σύνδεσης του με τους υποδοχείς του αιθυλενίου (Clark et al., 1998; Hua και Meyerowitz, 1998; Cancel και Larsen, 2002; Gao et al., 2003; Huang et al., 2003). Οι Gao και συνεργάτες (2003) πρότειναν ένα μοντέλο του μονοπατιού μεταγωγής του αιθυλενίου μέσω του συμπλέγματος ETR1-CTR1. Σε απουσία αιθυλενίου, η πρόσδεση του *CTR1* στους υποδοχείς διατηρεί τη δομή του έτσι ώστε να παραμένει ενεργό και λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής ικανός να καταστέλλει τις επακόλουθες αντιδράσεις αιθυλενίου. Η πρόσδεση του αιθυλενίου προκαλεί αλλαγή στη διαμόρφωση του *CTR1*, που έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση των επακόλουθων κατασταλτικών επιδράσεων. Ένα μοντέλο που προτάθηκε νωρίτερα για την πρωτεΐνη Raf κινάση των θηλαστικών υπέθετε ότι τέτοια δομική αλλαγή στο N-τελικό άκρο θα προκαλούσε αυτο-αναστολή της δράσης σερίνης-θρεονίνης κινάσης του C-τελικού άκρου (Heidecker et al., 1990). Σε αναλογία με την μεταγωγή της Raf κινάσης, ένα μονοπάτι MAPK κινάσης προτάθηκε να λειτουργεί και στο μονοπάτι του αιθυλενίου (Novikova et al., 2000; Ouaked et al., 2003). Ωστόσο, πιο πρόσφατες έρευνες αμφισβητούν την εγκυρότητα αυτών των συμπερασμάτων (Ecker, 2004; Liu και Zhang, 2004), και προτείνουν πως αυτό το μονοπάτι τοποθετείται πριν την πρόσληψη του αιθυλενίου.

Άλλο ένα μεταλλαγμένο φυτό *Arabidopsis*, με σημαντικό ρόλο, που προέκυψε από την αδυναμία αντίληψης του αιθυλενίου ήταν το *ein2* (Guzman και Ecker, 1990). Η κλωνοποίηση του *EIN2* γονιδίου οδήγησε στην αναγνώριση μιας νέας πρωτεΐνης των φυτών που αποτελείτο από 2 καλά προσδιορισμένες περιοχές: μια μοναδική υδρόφιλη C-τελική περιοχή που περιείχε τυπικά μοτίβα αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης με πρωτεΐνη και μια υδρόφοβη N-τελική περιοχή που περιείχε 12 διαμεμβρανικούς έλικες που είχαν ομοιότητα με τις Nramp-πρωτεΐνες (Alonso et al., 1999). Οι Nramp-

πρωτεΐνες είναι μεταφορείς μετάλλων σε διάφορους οργανισμούς από τα βακτήρια μέχρι τον άνθρωπο (Suppek et al., 1997· Kehres et al., 2000). Παρόλα αυτά, δεν έχει βρεθεί μέχρι σήμερα δραστηριότητα μεταφοράς μετάλλων για το EIN2 (Alonso et al., 1999). Η παντελής έλλειψη αντίληψης του αιθυλενίου στα μεταλλαγμένα φυτά *ein2* υποδεικνύει το σημαντικό ρόλο αυτής της πρωτεΐνης ως τον πρώτο θετικό ρυθμιστή των αντιδράσεων αιθυλενίου. Η υπερέκφραση του C-τελικού άκρου ήταν αρκετή για να ενεργοποιήσει τις αντιδράσεις αιθυλενίου, υποδεικνύοντας ότι αυτό το άκρο του *EIN2* είναι υπεύθυνο για την επακόλουθη μεταγωγή του σήματος (Alonso et al., 1999).

2.2.3 Μεταβίβαση του σήματος αιθυλενίου στον πυρήνα

2.2.3.1 Πρωτογενής μεταγραφική ρύθμιση: *EIN3/EIL* Μεταγραφικοί παράγοντες

Το σήμα του αιθυλενίου φτάνει στον πυρήνα μέσω της άρσης της καταστολής του EIN2 από το CTR1 και που οδηγεί στην ενεργοποίηση των EIN3 και ψευδο-EIN3 μεταγραφικών παραγόντων (Chao et al., 1997) (Εικόνα 2.2). Στο φυτό *Arabidopsis*, υπάρχουν 6 μέλη στην οικογένεια EIN3 πρωτεϊνών (EIN3 και EIL1–5) ανάμεσα στις οποίες οι EIN3 και EIL1 είναι οι πιο στενά συνδεδεμένες και προφανώς οι πιο σημαντικές για την αντίληψη του αιθυλενίου (Alonso et al., 2003). Τα άλλα μέλη της οικογένειας (EIL2–5) φαίνεται ότι παίζουν μικρότερο ρόλο στην αντίδραση του αιθυλενίου ή εναλλακτικά πιθανώς να συμμετέχουν σε συγκεκριμένους ιστούς ή ακόμα μπορεί να λειτουργούν σε διαφορετικά μεταγωγικά μονοπάτια ανεξάρτητα του αιθυλενίου (Tieman et al., 2001· Rieu et al., 2003· Chen et al., 2004· Guo και Ecker, 2004· Iordachescu και Verlinden, 2005). Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν τη συμμετοχή των EIL2–5-like μεταγραφικών παραγόντων σε συγκεκριμένους ιστούς κατά την ανάπτυξη των φυτών (Yokotani et al., 2003· Iordachescu και Verlinden, 2005).

Η ρύθμιση της δραστηριότητας των EIN3/EIL1 από το αιθυλένιο δεν επιτυγχάνεται από τη μεταγραφική ρύθμιση αλλά μέσω του ελέγχου πρωτεόλυσης των EIN3 πρωτεϊνών από το σύμπλοκο SCF (SKP1/Cullin/F-box protein) E3 ubiquitin ligase (Chao et al., 1997· Tieman et al., 2001· Guo και Ecker, 2003· Potuschak et al., 2003· Rieu et al., 2003· Yanagisawa et al., 2003· Gagne et al., 2004). Οι F-box πρωτεΐνες του *Arabidopsis* AtEBF1 και AtEBF2 αλληλεπιδρούν με την EIN3 και η ανάλυση των μεταλλαγμένων *atebf1/2* φυτών καθώς και των σειρών που υπερεκφράζουν το *AtEBF* επιβεβαίωσε το ρόλο τους στην αποσταθεροποίηση της EIN3 (Guo και Ecker· 2003, Potuschak et al., 2003· Gagne et al., 2004). Επομένως,

φαίνεται πως σε απουσία αιθυλενίου, οι EIN3/EIL1 πρωτεΐνες αποδομούνται διαρκώς μέσω του μονοπατιού του πρωτεασώματος και του AtEBF1/2, με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η ενεργοποίηση των μεταγραφικών τους στόχων. Σε παρουσία αιθυλενίου, η αποδόμηση της EIN3 σταματάει, επιτρέποντας έτσι να αυξηθούν τα επίπεδα της EIN3 πρωτεΐνης και να συνεχιστεί το μεταγωγικό μονοπάτι. Το *AtEBF2* υπερεκφράζεται από το αιθυλένιο (Potuschak et al., 2003; Gagne et al., 2004), υποδεικνύοντας ότι ένας αρνητικός μηχανισμός ανάδρασης μπορεί να ισορροπεί τα επίπεδα των EIN3/EIL πρωτεϊνών. Εφόσον πολλές πρωτεϊνικές κινάσες έχουν τοποθετηθεί πριν τις EIN3/EIL (Guo και Ecker, 2004), είναι επίσης πιθανόν ότι η φωσφορυλίωση της EIN3 να παρεμποδίζει τη σύνδεση της με την AtEBF1/2, κι έτσι να προλαμβάνεται η αποδόμηση της (Guo και Ecker, 2003; Potuschak et al., 2003; Gagne et al., 2004). Το εάν και πως αυτή η αλλαγή ελέγχεται από την λειτουργία της EIN2 δεν έχει αποσαφηνιστεί. Ωστόσο, οι EIN3/EIL πρωτεΐνες είναι απαραίτητα μόρια που λειτουργούν σαν “διακόπτες αιθυλενίου” αφού με μικρές αλλαγές στα επίπεδα τους ελέγχουν τη ροή του σήματος προς τον πυρήνα.

2.2.3.2 Δευτερογενής μεταγραφική ρύθμιση: AP2/ERF Μεταγραφικοί παράγοντες

Βιοχημικές και γενετικές έρευνες σε φυτά *Arabidopsis* έδειξαν ότι ο μεταγραφικός παράγοντας AtERF1 είναι ένας ενδιάμεσος στόχος του πρωτογενούς EIN3 μεταγραφικού παράγοντα (Solano et al., 1998; Alonso και Stepanova, 2004; Guo και Ecker, 2004). Η υπερέκφραση του *ERF1* γονιδίου στην *Arabidopsis*, στην τομάτα, στον καπνό και στο ρύζι προστάτευσε την λειτουργία των EIN2 και EIN3 (Solano et al., 1998; Brown et al., 2003; Lorenzo et al., 2003; Guo και Ecker, 2004; McGrath et al., 2005), αποδεικνύοντας ότι ο ERF1 λειτουργεί μετά τον EIN3.

Ο AtERF1 ανήκει σε μια οικογένεια που λέγεται Ethylene Response Factors (ERFs) (Ohme-Takagi και Shinshi, 1995; Zhou et al., 1997; Solano et al., 1998; Guo και Ecker, 2004; Gutterson και Reuber, 2004). Οι ERF μεταγραφικοί παράγοντες έχουν αναγνωριστεί σε διάφορα φυτικά είδη ως πρωτεΐνες που προσδένονται στα λεγόμενα GCC-box που βρίσκονται στους υποκινητές διαφόρων γονιδίων που επάγονται από το αιθυλένιο, όπως για παράδειγμα των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες σχετιζόμενες με τη παθογένεση (pathogenesis-related - PR proteins). Οι ERF αλληλεπιδρούν *in vitro* με τα GCC-box μέσω μιας περιοχής που είναι ομόλογη με μια που παρατηρήθηκε νωρίτερα στην πρωτεΐνη APETALA2 (AP2) στην *Arabidopsis* (Gutterson και Reuber, 2004). Οι ERF έχουν επίσης ομολογία με μεταγραφικούς παράγοντες που προσδένονται στο DREB (dehydration-responsive

element binding) των υποκινητών γονιδίων που είναι υπεύθυνα για αβιοτικά στρες (Gutterson και Reuber, 2004, McGrath et al., 2005). Μαζί, η υπεροικογένεια των AP/ERF μεταγραφικών παραγόντων περιλαμβάνει τουλάχιστον 145 μέλη στην *Arabidopsis* (Gutterson και Reuber, 2004).

Οι περισσότερες από τις ERF πρωτεΐνες που έχουν αναγνωριστεί μέχρι σήμερα, λειτουργούν ως μεταγραφικοί ενεργοποιητές (transcriptional activators) (Zhou et al., 1997· Solano et al., 1998· Fujimoto et al., 2000· Ohta et al., 2000· Onate-Sanchez και Singh, 2002· Wu et al., 2002). Για παράδειγμα, οι AtERF1, AtERF2 και AtERF5 ενεργοποιούν γονίδια που περιλαμβάνουν GCC-box (Fujimoto et al., 2000). Ωστόσο, μια δεύτερη ομάδα ERF πρωτεϊνών λειτουργούν ως μεταγραφικοί καταστολείς (transcriptional repressors). Οι AtERF3, AtERF4, AtERF7, AtERF10–12 της *Arabidopsis* και ο ERF3 του καπνού καταστέλλουν την έκφραση ενός γονιδίου που περιέχει GCC-box (Fujimoto et al., 2000· Ohta et al., 2000· Ohta et al., 2001). Πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι η υπερέκφραση του *AtERF4* οδήγησε σε φαινότυπο μη αντίληψης του αιθυλενίου και προκάλεσε καταστολή της έκφρασης των γονιδίων μιας βασικής χιτίνωσης και μιας β-γλουκανάσης που και τα δύο περιέχουν GCC-box (Yang et al., 2005). Αξίζει να σημειωθεί ότι η υπερέκφραση των *AtERF2* και *AtERF4* οδήγησε σε αντίθετα αποτελέσματα ανθεκτικότητας στη μόλυνση με τον παθογόνο μύκητα *Fusarium oxysporum* (McGrath et al., 2005), γεγονός που δείχνει την πολυπλοκότητα και εξειδίκευση του δικτύου του αιθυλενίου στη δευτερογενή μεταγραφική ρύθμιση.

Συγκεκριμένες λειτουργίες των διάφορων ERF μεταγραφικών παραγόντων που είτε ενεργοποιούν ή καταστέλλουν συγκεκριμένα γονίδια που σχετίζονται με την άμυνα πιθανόν να προσφέρουν στο συντονισμό των αντιδράσεων των φυτών ανάλογα με το είδος του βιοτικού στρες που υποβάλλονται τα φυτά. Τέτοια λεπτή ρύθμιση των αμυντικών μηχανισμών προλαμβάνει ενδεχόμενες αχρείαστες ενέργειες από τα φυτά.

2.2.4 Το αιθυλένιο και οι αμυντικοί μηχανισμοί των φυτών

Όπως περιγράφηκε νωρίτερα, η βιοσύνθεση του αιθυλενίου ενεργοποιείται σε πολλά φυτά κατά την προσβολή τους με παθογόνα και η αυξημένη παραγωγή του επάγει γονίδια που ενεργοποιούν τους αμυντικούς μηχανισμούς των φυτών μέσω μιας αλληλουχίας γεγονότων από τα οποία το προτελευταίο είναι η ενεργοποίηση των τύπου ERF μεταγραφικών παραγόντων. Πιο κάτω αναφέρονται οι διάφοροι τύποι γονιδίων που ενεργοποιούνται στους μηχανισμούς άμυνας των φυτών κατά την μόλυνση με παθογόνα και ακολούθως περιγράφεται σε συντομία η

αλληλοεπικοινωνία (cross-talk) μεταξύ του μονοπατιού μεταγωγής του αιθυλενίου και άλλων μηχανισμών επαγόμενης ανοχής, μεταξύ των οποίων είναι και τα μονοπάτια μεταγωγής του σαλικυλικού και ιασμονικού οξέος. Στο τέλος γίνεται μια προσπάθεια να συζητηθεί ο ρόλος του αιθυλενίου και του μονοπατιού μεταγωγής του στη διαμόρφωση της ανθεκτικότητας ή της ευπάθειας στις αλληλεπιδράσεις παθογόνου – ξενιστή.

2.2.4.1 Επαγωγή μορίων διεγερτών άμυνας μέσω του αιθυλενίου

Οι επαγόμενες από τα παθογόνα αντιδράσεις άμυνας των φυτών οδηγούν τελικά στην έκφραση ενός αριθμού γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα. Οι αντίστοιχες πρωτεΐνες περιλαμβάνουν: (i) πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη δημιουργία φυσικών εμποδίων και στο φυσικό περιορισμό του παθογόνου, (ii) ένζυμα δευτερογενούς μεταβολισμού όπως για παράδειγμα τα ένζυμα που λειτουργούν στη βιοσύνθεση αντιμικροβιακών ουσιών και (iii) πρωτεΐνες σχετιζόμενες με τη παθογένεση (PRs), με τις τελευταίες να αντιπροσωπεύουν τις μεγαλύτερες ποσοτικές αλλαγές στη διαλυτή πρωτεΐνη κατά τη διάρκεια των αμυντικών αντιδράσεων.

Ο συγκεκριμένος ρόλος του μονοπατιού μεταγωγής του αιθυλενίου στο σχηματισμό των επαγόμενων δομικών εμποδίων έχει μέχρι τώρα λάβει σχετικά μικρή σημασία. Πρωτεΐνες πλούσιες σε υδροξυ-προλίνη συσσωρεύονται στα φυτά και “ενδυναμώνουν” το κυτταρικό τοίχωμα μετά από εφαρμογή αιθυλενίου (Esquerre-Tugaye et al., 1979· Ecker και Davis, 1987· Tagu et al., 1992). Τέτοιες πρωτεΐνες αποτελούν δομικά στοιχεία που εναποτίθενται στο κυτταρικό τοίχωμα και η παρουσία τους έχει συσχετιστεί με την οχύρωση του κυτταρικού τοιχώματος, ιδιαίτερα μετά από οξειδωτικό πολυμερισμό τους (Brisson et al., 1994). Επιπρόσθετα, οι VanderMolen και συνεργάτες (1993) έδειξαν ότι το αιθυλένιο είναι απαραίτητο για την απόφραξη των αγγείων του ξύλου που συμβαίνει στα φυτά για να αντιμετωπίσουν την περαιτέρω εξάπλωση μυκήτων που προκαλούν αδρομυκώσεις όπως ο *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, μέσω του αγγειακού συστήματος των φυτών. Αντίθετα, η τοπική εναπόθεση καλλόζης στα κυτταρικά τοιχώματα στα σημεία όπου επιχειρήθηκε διείσδυση από παθογόνα φαίνεται ότι δεν επιτυγχάνεται από το αιθυλένιο αλλά συνδέεται με τη σύνθεση και πρόσληψη του αμπισισικού οξέος (Ton και Mauch-Mani, 2004).

Ο ρόλος του αιθυλενίου στην παραγωγή αντιμικροβιακών δευτερογενών μεταβολιτών (φυτοαλεξίνες) (Pedras et al., 2000) φαίνεται ότι εξαρτάται από τον τύπο της φυτοαλεξίνης και της εμπλεκόμενης μεταβολικής οδού. Για παράδειγμα, σε φύλλα ρυζιού το αιθυλένιο επάγει την παραγωγή της φαινυλπροπανοειδούς φυτοαλεξίνης

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΤΟ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ ΚΑΙ Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΜΥΝΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

σακουρανετίνης (sakuranetin), αλλά όχι της τερπενοειδούς φυτοαλεξίνης momilactone A (Nakazato et al., 2000). Γενικά, οι φαινυλπροπανοειδείς φυτοαλεξίνες είναι επαγόμενες από το αιθυλένιο σε διάφορα φυτικά είδη (Kamo et al., 2000; Ishigaki et al., 2004). Στα φυτά *Arabidopsis*, η επαγόμενη από παθογόνα καμαλεξίνη (camalexin), που είναι μια ινδολο-αλκαλοειδής φυτοαλεξίνη, ελέγχεται από τις ενεργές ομάδες οξυγόνου που παρουσιάζει ελάχιστη έως καθόλου αλληλο-επικοινωνία (cross-talk) με τα μονοπάτια μεταγωγής του αιθυλενίου και του ιασμονικού οξέος, και μεταλλαγμένα φυτά στο μονοπάτι του αιθυλενίου, όπως το *ein2*, είναι ικανά να συνθέτουν καμαλεξίνη ως αντίδραση σε επίθεση από παθογόνα (Glazebrook και Ausubel, 1994; Thomma et al., 1999; Ferrari et al., 2003).

Τα μόρια που έχουν μελετηθεί σε μεγαλύτερο βαθμό και που επάγονται από το αιθυλένιο κατά τις αντιδράσεις άμυνας των φυτών είναι οι PR πρωτεΐνες. Μέχρι σήμερα, έχουν αναγνωρισθεί 17 κλάσεις PR πρωτεϊνών (Van Loon και Van Strein, 1999) οι περισσότερες από τις οποίες έχουν δείξει άμεση αντιμικροβιακή δραστηριότητα εναντίον φυτοπαθογόνων μυκήτων και σε μερικές περιπτώσεις εναντίον φυτοπαθογόνων βακτηρίων (Broekaert et al., 2000). Ξεχωριστές κλάσεις PR γονιδίων έχουν βρεθεί να σχετίζονται με το αιθυλένιο μέσω του GCC-box στις περιοχές των υποκινητών τους, που συμπεριλαμβάνουν τις ενδοκυττάριας β-1,3-γλουκανάσες (PR-2), τις ενδοκυττάριας βασικές χιτινάσες (PR-3), τις όξινης hevein-like πρωτεΐνες (PR-4) και τις plant defensins (PDFs; PR-12) (Broglie et al., 1989; Ohme-Takagi και Shinshi, 1990; Samac et al., 1990; Eyal et al., 1993; Penninckx et al., 1996; Thomma et al., 1999; Chakravarthy et al., 2003; Lorenzo et al., 2003). Η επαγωγή αυτών των γονιδίων πραγματοποιείται μέσω ενός μονοπατιού στο οποίο το αιθυλένιο και το ιασμονικό οξύ λειτουργούν συνεργιστικά (Penninckx et al., 1998). Άλλοι τύποι PR γονιδίων, όπως οι PR-1 πρωτεΐνες και οι εξωκυττάριας β-1,3-γλουκανάσες και χιτινάσες, επάγονται από το μονοπάτι του σαλικυλικού οξέος, τουλάχιστον στα φυτά *Arabidopsis* και στον καπνό (Brederode et al., 1991; Friedrich et al., 1995; Uknes et al., 1992). Όλα τα PR γονίδια επάγονται τόσο στην προσβληθείσα περιοχή όσο και διασυστηματικά (Broekaert et al., 2000).

Πρόσφατες μεγάλου εύρους έρευνες μεταγραφικού προφίλ έδειξαν ότι μια ομάδα PR γονιδίων επάγονται σε φυτά *Arabidopsis* στα οποία υπερεκφράζονται είτε το *AtERF1* ή το ομόλογο του στη τομάτα *Pti4*, επιβεβαιώνοντας την εμπλοκή του αιθυλενίου σε αυτά τα PR γονίδια και προσθέτοντας στη λίστα αρκετά νέα μόρια που είναι ενδεχομένως ρυθμιζόμενα από το αιθυλένιο (Chakravarthy et al., 2003; Lorenzo et al., 2003). Αξίζει να σημειωθεί ότι σε πρόσφατες πρωτεομικές (proteomics) έρευνες σε πρωτεΐνες που εκκρίνονται από φυτά *Arabidopsis* μετά από προσβολή

από παθογόνα αποκάλυψαν ότι μια καινούργια λιπάση που επάγεται από το αιθυλένιο, η GLIP1, έχει αντιμικροβιακές ιδιότητες και είναι αποφασιστικής σημασίας για την άμυνα των φυτών στην ασύμβατη αλληλεπίδραση με το μύκητα *A. brassicicola* (Oh et al., 2005).

Η πρωτεΐνη defensin AtPDF1.2 (ομάδα PR-12) του φυτού *A. thaliana* χρησιμοποιείται ευρέως ως δείκτης επαγωγής της άμυνας σε φυτά *Arabidopsis* μέσω του μονοπατιού του αιθυλενίου/ιασμονικού οξέος (Penninckx et al., 1996; Penninckx et al., 1998). Το γονίδιο περιέχει στοιχεία GCC box στον υποκινητή του και επάγεται τόσο από το αιθυλένιο όσο και από το ιασμονικό οξύ μέσω της ενεργοποίησης του *AtERF1* (Penninckx et al., 1996; Chao et al., 1997; Solano et al., 1998; Lorenzo et al., 2003). Οι defensins είναι γενικά μικρά, βασικά πεπτιδία που έχουν μια χαρακτηριστική τρισδιάστατη αναδιπλούμενη μορφή που σταθεροποιείται από 8 δισουλφιδικές κυστεΐνες και τυπικά παρεμποδίζουν την ανάπτυξη ενός φάσματος μυκήτων μετά από εξειδικευμένη πρόσδεση σε μεμβρανικούς στόχους (Thomma et al., 2002; Thomma et al., 2003; Thevissen et al., 2004). Πρόσφατες έρευνες έδειξαν την παρουσία 317 καινούργιων defensin-like (DEFL) γονιδίων στο γονιδίωμα του *Arabidopsis* (Silverstein et al., 2005), που συμπεριλάμβαναν και τα 13 προηγούμενα *AtPDF* γονίδια (Thomma et al., 2002). Το αν όλα αυτά τα γονίδια ή μια υποομάδα από αυτά επάγονται από το αιθυλένιο δεν έχει απαντηθεί ακόμα. Στα *AtPDF* γονίδια πάντως, που είχαν αρχικά αναγνωριστεί, παρατηρούνται μεγάλες διαφορές έκφρασης σε αντίδραση στο αιθυλένιο, το σαλικυλικό και το ιασμονικό οξύ καθώς και σε διάφορα παθογόνα δείκτες. Για παράδειγμα, τα γονίδια που κωδικοποιούν τις *AtPDF1.2a/b/c* επάγονται από το αιθυλένιο και το ιασμονικό οξύ και καταστέλλονται από το σαλικυλικό οξύ ενώ η *AtPDF1.4* επάγεται από το σαλικυλικό οξύ και όχι από το αιθυλένιο και το ιασμονικό οξύ. Η ανάλυση των περιοχών των υποκινητών τους έδειξε την παρουσία GCC-box περιοχής και στα τρία *AtPDF1.2* γονίδια, αλλά όχι στο *AtPDF1.4*. Αντίθετα, το *AtPDF1.5* γονίδιο φαίνεται ανεπηρέαστο από όλες τις επεμβάσεις παρόλο που φέρει κι αυτό GCC-box περιοχή. Αυτό υποδεικνύει ότι υπάρχει ένα πιο περίπλοκο δίκτυο στο οποίο διαφορετικές ομάδες από *DEFL* γονίδια ανταποκρίνονται σε ένα ή περισσότερα μεταγωγικά μονοπάτια.

2.2.4.2 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αρχικών σταδίων του μονοπατιού μεταγωγής του αιθυλενίου και άλλων μηχανισμών της επαγόμενης ανοχής

Τα αρχικά στάδια του μονοπατιού μεταγωγής του αιθυλενίου που περιγράφηκαν νωρίτερα (ETR/ERS/EIN4, CTR, EIN2, EIN3/EIL) απαιτούνται για

όλες τις αντιδράσεις του αιθυλενίου και μέχρι σήμερα κανένα δεν έχει βρεθεί να αντιδρά σε σήματα εκτός από το αιθυλένιο (Alonso και Stepanova, 2004· Guo και Ecker, 2004· Thatcher et al., 2005). Σημεία διακλάδωσης στο μονοπάτι του αιθυλενίου πρέπει να βρίσκονται μετά τα EIN3/EIL. Πράγματι, αρκετές έρευνες έχουν δείξει ότι υπάρχει διαφορετική ρύθμιση για αρκετά *ERF* γονίδια από το αιθυλένιο, το σαλικυλικό και το ιασμονικό οξύ καθώς και από τη μόλυνση από διάφορους μολυσματικούς και μη μικροοργανισμούς (Fujimoto et al., 2000· Gu et al., 2000· Onate-Sanchez και Singh, 2002· Brown et al., 2003· Chakravarthy et al., 2003· Chen et al., 2003· Lorenzo et al., 2003· Guo και Ecker, 2004· McGrath et al., 2005). Σε αυτό το επίπεδο φαίνεται να υπάρχει σημαντική αλληλο-επικοινωνία (cross-talk) μεταξύ των διαφόρων μονοπατιών μεταγωγής.

2.2.4.2.1 Ανθεκτικότητα γόνου-προς-γόνο

Στην ανθεκτικότητα γόνου προς γόνο, η αλληλεπίδραση παθογόνου – ξενιστή και η επακόλουθη μεταγωγή του σήματος στα φυτά μετά την αναγνώριση των αμολυσματικών πρωτεϊνών (avirulence proteins) του παθογόνου, οδηγεί σε ανθεκτικότητα εναντίον του παθογόνου μέσω της αντίδρασης υπερευαισθησίας (HR) στις περισσότερες περιπτώσεις. Η HR εμπλέκει και οφείλει την αποτελεσματικότητα της στο σαλικυλικό οξύ (Hammond-Kosack και Jones, 1997· Glazebrook, 2005). Ωστόσο σε ορισμένες περιπτώσεις οι αλληλεπιδράσεις γόνου προς γόνο συσχετίστηκαν επίσης με έκφραση γονιδίων εξαρτώμενων από το αιθυλένιο, όπως στο παράδειγμα της μελέτης της πρωτεϊνικής κινάσης που κωδικοποιεί το γονίδιο ανθεκτικότητας *Pto* στη τομάτα. Η αναγνώριση της αμολυσματικής πρωτεΐνης AvrPto του *P. syringae* pv. *tomato* από την Pto επάγει αλλαγές έκφρασης σε περισσότερα από 400 γονίδια, προκαλεί “οξειδωτική έκρηξη” (oxidative burst) και HR (Scofield et al., 1996· Frederick et al., 1998· Mysore et al., 2002). Αξίζει να σημειωθεί ότι το Pto αλληλεπιδρά άμεσα με τους AP2/ERF μεταγραφικούς ενεργοποιητές Pti4, Pti5 και Pti6 (Zhou et al., 1997· Gu et al., 2002). Επιπρόσθετα, η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Pti4 επάγεται από το αιθυλένιο, και η πρόσδεση του Pti4 στο GCC box των γονιδίων άμυνας ρυθμίζεται από τη φωσφορυλίωση μέσω της κινάσης του Pto (Gu et al., 2000). Ωστόσο, το Pti4 είναι ικανό να προσδένεται και σε μη GCC-box περιοχές (Chakravarthy et al., 2003), για την επαγωγή PR γονιδίων εξαρτώμενων από το σαλικυλικό οξύ και να αυξάνει την ανθεκτικότητα σε βιοτροφικά παθογόνα όταν υπερεκφράζεται σε φυτά *Arabidopsis* (Gu et al., 2002). Επομένως, είναι ασαφές εάν το αιθυλένιο εμπλέκεται στην ανθεκτικότητα γόνου προς γόνο ή εάν οι αλληλεπιδράσεις γόνου προς γόνο προκαλούν την επαγωγή των γονιδίων που ελέγχονται από το αιθυλένιο. Είναι γεγονός πάντως ότι τα μεταλλαγμένα στο

αιθυλένιο φυτά *Arabidopsis etr1* και *ein2* έδειξαν να μην χάνουν την γόννο προς γόννο ανθεκτικότητα τους σε βιοτροφικά παθογόνα όπως στον ωομύκητα *Hyaloperonospora (Peronospora) parasitica* και το βακτήριο *P. syringae*, υποδεικνύοντας ότι το αιθυλένιο δεν είναι αυτό καθαυτό απαραίτητο για την ανθεκτικότητα γόνου προς γόννο (Lawton et al., 1994; Lawton et al., 1995; Pieterse et al., 1998).

2.2.4.2.2 Επαγόμενη ανθεκτικότητα εξαρτώμενη από το ιασμονικό οξύ

Τα μονοπάτια μεταγωγής του αιθυλενίου και του ιασμονικού οξέος λειτουργούν συνεργιστικά στις αντιδράσεις άμυνας των φυτών (Penninckx et al., 1996; Pieterse et al., 1998; Ellis και Turner, 2001). Τέτοιος συνεργισμός υποστηρίζεται από πειράματα μικροσυστοιχιών (microarrays) που δείχνουν πως κοινές δέσμες γονιδίων επάγονται από το αιθυλένιο και το ιασμονικό οξύ (Schenk et al., 2000; Glazebrook et al., 2003). Επιπρόσθετα, η περιοχή GCC-box που απαιτείται για την πρόσδεση του AtERF1 για την επαγωγή του γονιδίου *AtPDF1.2* στα φυτά *Arabidopsis* έχει αναγνωριστεί και ως στοιχείο αντίδρασης του ιασμονικού οξέος, υποδεικνύοντας ότι το *AtERF1* είναι σημείο κοινής δράσης για το αιθυλένιο και το ιασμονικό οξύ που λειτουργεί και στα 2 μεταγωγικά μονοπάτια (Brown et al., 2003; Lorenzo et al., 2003). Ένας άγνωστος μεταγραφικός παράγοντας που επάγεται από το ιασμονικό οξύ έχει προταθεί να αλληλεπιδρά συνεργιστικά με το EIN3 στον υποκινητή του *AtERF1* γονιδίου (Guo και Ecker, 2004). Η παρουσία μεταγωγικών στοιχείων είτε του αιθυλενίου ή του ιασμονικού οξέος θα ήταν αρκετή για την έκφραση του *AtERF1*. Μια πρόσφατη εργασία αναγνώρισε τουλάχιστον 10 διαφορετικά μέλη της οικογένειας AP2/ERF του φυτού *Arabidopsis* να επάγονται μεταγραφικά μετά την ταυτόχρονη εφαρμογή μεθυλιωμένου ιασμονικού οξέος και του μύκητα *A. brassicicola*, που συμπεριλάμβανε τους θετικούς ρυθμιστές AtERF1/2 και τον αρνητικό ρυθμιστή AtERF4 (McGrath et al., 2005).

2.2.4.2.3 Επαγόμενη ανθεκτικότητα εξαρτώμενη από το σαλικυλικό οξύ

Αρκετές έρευνες έχουν δείξει ότι ενώ το αιθυλένιο και το ιασμονικό οξύ αλληλεπιδρούν συνεργιστικά για την ενεργοποίηση συγκεκριμένων αντιδράσεων άμυνας, τα μονοπάτια αυτά λειτουργούν τουλάχιστον ανεξάρτητα ή και ανταγωνιστικά σε σχέση με το μονοπάτι του σαλικυλικού οξέος. Φυτά *Arabidopsis* μεταλλαγμένα στην αντίληψη του αιθυλενίου ή του ιασμονικού οξέος είναι πλήρως ικανά να υποστηρίζουν αντιδράσεις εξαρτώμενες από το σαλικυλικό οξύ (Penninckx et al., 1998; Thomma et al., 1998; Thomma et al., 1999) ή να επάγουν την έκφραση γονιδίων που ελέγχονται από το σαλικυλικό οξύ (Glazebrook et al., 2003). Αντίθετα,

γενετικώς τροποποιημένα φυτά *Arabidopsis* που δεν μπορούν να συσσωρεύσουν σαλικυλικό οξύ (π.χ. τα *NahG* φυτά) και μεταλλαγμένα φυτά με μειωμένη σύνθεση σαλικυλικού (π.χ. τα *sid2* και *eds5*) ή ικανότητα μεταγωγής του (π.χ. *npr1/nim1*), δεν επάγουν τα PR γονίδια που είναι εξαρτώμενα από το σαλικυλικό οξύ αλλά δείχνουν την ίδια ή και μεγαλύτερη επαγωγή των PR γονιδίων που εξαρτώνται από το αιθυλένιο και το ιασημονικό οξύ (Thomma et al., 2001; Glazebrook et al., 2003). Η αρνητική ρύθμιση μεταξύ του αιθυλενίου και του σαλικυλικού οξέος φαίνεται και από την τελική αντίδραση τους στο αποτέλεσμα της άμυνας των φυτών. Για παράδειγμα, η υπερέκφραση του *AtERF1* στα φυτά *Arabidopsis* οδηγεί σε αυξημένη ανθεκτικότητα στο μύκητα *B. cinerea* (εξαρτώμενη από το αιθυλένιο) αλλά μειώνει την ανθεκτικότητα στο βακτήριο *P. syringae* pv. *tomato* (εξαρτώμενη από το σαλικυλικό οξύ) (Berrocal-Lobo et al., 2002).

2.2.4.2.4 Ανθεκτικότητα επαγόμενη από ριζοβακτήρια

Ένα ιδιαίτερο είδος αλληλοεπικοινωνίας (cross-talk) μεταξύ της διασυστηματικής αντοχής που συμβαίνει στα φυτά κατά την αποίκηση του ριζικού τους συστήματος από μη παθογόνα στελέχη *Pseudomonas* spp., οδηγεί στην ανάπτυξη μιας αυξημένης αμυντικής ικανότητας εναντίον ενός ευρέως φάσματος παθογόνων. Σε αντίθεση με την επίκτητη διασυστηματική αντοχή (systemic acquired resistance - SAR) που επάγεται από τα παθογόνα και που συσχετίζεται με μια αύξηση του σαλικυλικού οξέος και την επαγωγή μιας ομάδας PR γονιδίων σε απομακρυσμένους και μη προσβεβλημένους ιστούς, η επαγόμενη από ριζοβακτήρια διασυστηματική αντοχή (induced systemic resistance - ISR) δεν συσχετίζεται με το σαλικυλικό οξύ ή την αυξημένη έκφραση των PR γονιδίων (Pieterse et al., 1998; Ton et al., 2001; Iavicoli et al., 2003). Ωστόσο, το NPR1, που είναι σημαντικό στοιχείο του μονοπατιού του σαλικυλικού οξέος, έχει αποδειχθεί ότι είναι απαραίτητο για την ISR (Pieterse et al., 1998; Pieterse et al., 2000) καθώς και ο υποδοχέας του αιθυλενίου ETR1 και κάποια στοιχεία του μονοπατιού μεταγωγής του ιασημονικού οξέος (Pieterse et al., 1998; Iavicoli et al., 2003; Ton et al., 2004). Είναι αξιοσημείωτο πάντως ότι το φυτό φαίνεται να ενεργοποιεί διαφορετικές ομάδες γονιδίων για την επαγωγή της άμυνας του με βάση το στέλεχος του ριζοβακτηρίου που αποικίζει το ριζικό του σύστημα (Ton et al., 2001; Iavicoli et al., 2003). Μια πρόσφατη έρευνα στην ISR που επάγεται από το *P. fluorescens* σε φυτά *Arabidopsis* έδειξε αξιοσημείωτες αλλαγές στην έκφραση αρκετών γονιδίων εξαρτωμένων από το αιθυλένιο και το ιασημονικό οξύ (Verhagen et al., 2004), υποδεικνύοντας ότι αυτά τα γονίδια αντιδρούν έντονα και συνεπώς πιο αποτελεσματικά στην μόλυνση από παθογόνα. Άλλη μια πρόσφατη εργασία έδειξε ότι η ISR επαγωγή ενός *PR-5* γονιδίου που είναι εξειδικευμένο στη

ρίζα (*AtTLP1*) μπορεί να μιμηθεί την εφαρμογή της προδρόμου ουσίας του αιθυλενίου ACC, αλλά όχι του ιασμονικού και του σαλικυλικού οξέος (Leon-Kloosterziel et al., 2005), επιβεβαιώνοντας την εξειδικευμένη συμμετοχή του αιθυλενίου στον αμυντικό μηχανισμό που προκαλείται από τα ριζοβακτήρια. Πέρα από την αλληλο-επικοινωνία με άλλες αμυντικές αντιδράσεις, οι ERF μεταγραφικοί παράγοντες δείχνουν επίσης να λειτουργούν ως συνδετικά στοιχεία με γενικότερα μονοπάτια μεταγωγής καταπόνησης. Ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ πολλών στοιχείων της ορμόνης του αμπισσικού οξέος (ABA), που είναι υπεύθυνη για πολλά αβιοτικά στρες και των μονοπατιών του αιθυλενίου και του ιασμονικού οξέος φαίνεται να συντονίζουν την γονιδιακή έκφραση ως αντίδραση σε διάφορα βιοτικά και αβιοτικά στρες (Fujimoto et al., 2000· Chen et al., 2002· Anderson et al., 2004· Yang et al., 2005). Εκτός από την αυξημένη ευπάθεια (McGrath et al., 2005), η υπερέκφραση του *AtERF4* σε φυτά *Arabidopsis* έδειξε αυξημένη ανθεκτικότητα σε αβιοτικά στρες συνοδευόμενη με την καταστολή των γονιδίων που περιέχουν GCC-box περιοχές (Yang et al., 2005), υποδεικνύοντας ότι ο αρνητικός μεταγραφικός ρυθμιστής *AtERF4* έχει την ικανότητα να συντονίζει τις αντιδράσεις του αιθυλενίου και του αμπισσικού οξέος. Είναι πιθανόν το *AtERF4* να είναι υπεύθυνο για τη ρύθμιση του ανταγωνισμού που παρατηρείται μεταξύ των αντιδράσεων του αιθυλενίου και του αμπισσικού οξέος (Anderson et al., 2004· McGrath et al., 2005). Η ρύθμιση των γενικών αντιδράσεων στρες είναι πιθανόν να οργανώνονται στο επίπεδο των μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας AP2/ERF, οι οποίοι θα διαμόρφωναν την γονιδιακή έκφραση με τέτοιο τρόπο ώστε να εξασφαλιστεί ότι η πιο κατάλληλη αντίδραση άμυνας θα ενεργοποιηθεί ανάλογα με το συγκεκριμένο τύπο απειλής.

2.2.4.3 Ο ρόλος του αιθυλενίου στον καθορισμό του αποτελέσματος της αλληλεπίδρασης παθογόνου – ξενιστή

Το αιθυλένιο επηρεάζει το τελικό αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης παθογόνου – ξενιστή επιδρώντας είτε στην εκδήλωση των συμπτωμάτων που προκαλούνται από τα διάφορα παθογόνα ή μέσω της αντίληψης του στα φυτά και της επακόλουθης μεταγωγής του σήματος του.

2.2.4.3.1 Επίδραση του αιθυλενίου στην εκδήλωση συμπτωμάτων που προκαλούνται από διάφορα παθογόνα

Η εφαρμογή αιθυλενίου στα φυτά είτε αυξάνει την ευπάθεια τους ή την ανθεκτικότητά τους, ανάλογα με την αλληλεπίδραση παθογόνου ξενιστή. Αυτή η ασυμφωνία έχει μελετηθεί σε πολλές έρευνες αλληλεπιδράσεων παθογόνου – ξενιστή. Σε κάποιες εργασίες εφαρμόστηκε στα φυτά αιθυλένιο ή ethephon (2-

chloroethylphosphonic acid), που είναι ένας χημικός ρυθμιστής που μετατρέπεται σε αιθυλένιο, υδροχλωρικό οξύ και φωσφορικό οξύ όταν προσλαμβάνεται από τα φυτά (Boller, 1991; Abeles et al., 1992). Σε άλλες έρευνες χρησιμοποιήθηκαν αναστολείς της σύνθεσης ή της δράσης του αιθυλενίου. Το βήμα της βιοσύνθεσης του αιθυλενίου από S-adenosylmethionine σε 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) μέσω του ενζύμου ACC synthase (ACS) μπορεί να εμποδιστεί από τον χημικό παρεμποδιστή aminoethoxyvinylglycine. Το ACC μετατρέπεται σε αιθυλένιο από την ACC oxidase (ACO). Αυτή η αντίδραση μπορεί να παρεμποδιστεί από ιόντα κοβαλτίου ή από το aminoxyacetic acid. Οι μικροοργανισμοί παράγουν αιθυλένιο από τη μεθειονίνη από διαφορετικό βιοσυνθετικό μονοπάτι ή χρησιμοποιούν το ακετογλουταρικό οξύ ως πρόδρομο ουσία (Arshad και Frankenberger, 1992; Fukuda et al., 1993) επιτρέποντας έτσι τη διάκριση μεταξύ του αιθυλενίου που παράγεται από τα φυτά και από τους μικροοργανισμούς. Η πρόσληψη του αιθυλενίου μπορεί να αποτραπεί από ουσίες (π.χ. ιόντα σιδήρου) ή από ανταγωνιστικά αέρια (π.χ. 2,5-norbornadiene ή methylpropene) (Sisler και Serek, 2003). Οι διάφορες έρευνες έχουν δώσει αντιφατικά αποτελέσματα ανάλογα με τις συνθήκες των πειραμάτων ή/και την συγκεκριμένη αλληλεπίδραση παθογόνου – ξενιστή (Boller, 1991; Abeles et al., 1992; Arshad και Frankenberger, 1992). Για παράδειγμα, η εφαρμογή αιθυλενίου σε φυτά τομάτας αύξησε την ανθεκτικότητα στο μύκητα *B. cinerea* (Diaz et al., 2002), καθώς σε άλλες περιπτώσεις έκθεση των φυτών στο αιθυλένιο δεν είχε καμία επίδραση ή μείωσε το επίπεδο ανθεκτικότητας στα παθογόνα (Brown και Lee, 1993; El-Kazzaz et al., 1983; Van Loon και Pennings, 1993). Γενικά, η εφαρμογή αιθυλενίου προάγει την γήρανση των φύλλων και την ωρίμανση των καρπών, που μπορεί να κάνει τους ιστούς είτε πιο ευπαθείς ή πιο ανθεκτικούς στα παθογόνα (Panter και Jones, 2002). Συχνά, η εφαρμογή αιθυλενίου προάγει την ασθένεια απλά μέσω της επιτάχυνσης της ωρίμανσης ή της γήρανσης των φυτών. Ωστόσο, αρκετοί ερευνητές έδειξαν ότι όταν το αιθυλένιο εφαρμόζεται πριν τη μόλυνση από το παθογόνο, μειώνει ή δεν έχει καμία επίδραση στην ασθένεια, ενώ η ασθένεια επιταχύνεται όταν εφαρμόζεται αιθυλένιο στα φυτά μετά τη μόλυνση τους (Abeles et al., 1992). Χαρακτηριστικό είναι το ότι έκθεση των φυτών σε αιθυλένιο προκάλεσε μάρανση, χλώρωση, αποκοπή και νέκρωση φύλλων, αλλά και δημιουργία πηγμάτων στα αγγεία του ξύλου που έμοιαζαν με συμπτώματα από παθογόνο αδρομύκωσης (Pegg, 1981; Vander Molen et al., 1983; DeVay, 1989). Για το λόγο αυτό θεωρήθηκε ότι το αιθυλένιο είναι η κύρια αιτία για την εκδήλωση συμπτωμάτων από παθογόνα αδρομύκωσης (Pegg, 1981). Σε συμφωνία με αυτή την υπόθεση, μόλυνση με τον μύκητα *V. albo-atrum* προκάλεσε αύξηση στη συγκέντρωση αιθυλενίου μόνο σε φυτά

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΤΟ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ ΚΑΙ Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΜΥΝΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

τομάτας ευαίσθητης ποικιλίας και όχι στην ανθεκτική ποικιλία, περίπου δέκα μέρες μετά τη μόλυνση που ταυτίζεται με την εμφάνιση συμπτωμάτων (Pegg και Cronshaw, 1976). Ωστόσο, φαίνεται ότι το αιθυλένιο παίζει επίσης συνεργιστικό ρόλο στην εκδήλωση συμπτωμάτων είτε με ηκτηνολυτικά ένζυμα ή πολυσακχαρίτες. Συγκεκριμένα εκχύλισμα καλλιέργειας του μύκητα *V. albo-atrum* διαχωρίστηκε σε στήλη σε κλάσματα, από τα οποία αυτά που περιείχαν ηκτηνινάσες και πολυσακχαρίτες, αντίστοιχα εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να προκαλούν συμπτώματα σε φύλλα τομάτας, με ή χωρίς την επίδραση αιθυλενίου. Κλάσματα που περιείχαν ηκτηνολυτικές πρωτεΐνες προκάλεσαν χλώρωση και μάρανση. Στα φύλλα αυτά παρατηρήθηκε αυξημένη έκλυση αιθυλενίου ως τις 20 ώρες στα φύλλα ευαίσθητης ποικιλίας, ενώ σε ανθεκτική ποικιλία η έκλυση αυξήθηκε μετά από 45-90 ώρες. Τα συμπτώματα από το ηκτηνολυτικό κλάσμα γίνονταν πιο έντονα όταν είχε προηγηθεί χειρισμός με αιθυλένιο. Το κλάσμα πολυσακχαριτών δεν προκαλούσε συμπτώματα, ούτε επαγωγή έκλυσης αιθυλενίου από τα φυτά. Ωστόσο σε συνδυασμό με αιθυλένιο ο χειρισμός των φύλλων προκαλούσε επαγωγή συμπτωμάτων χλώρωσης και μαρασμού (Cronshaw και Pegg, 1976). Γενικά θεωρείται ότι ένζυμα ενδοηκτηνινάσων και πολυγαλακτορουνασών (που επηρεάζονται από την παρουσία ασβεστίου) ελευθερώνουν υπεροξειδάσες του κυτταρικού τοιχώματος και παράγουν αιθυλένιο κατά την υδρόλυση μεμβρανών βοθρίων (Pegg, 1989). Οι πολυσακχαρίτες που ελευθερώνονται πιθανόν συμβάλλουν στη φραγή αγγείων του ξύλου, ανάλογα με το μοριακό τους βάρος (Green, 1981). Ωστόσο, εφαρμογή αιθυλενίου σε φυτά τομάτας πριν ή ταυτόχρονα με την μόλυνση από το μύκητα *V. albo-atrum* προκάλεσε μείωση των συμπτωμάτων της ασθένειας (Pegg και Cronshaw, 1976).

Συνεπώς φαίνεται ότι ο ρόλος του αιθυλενίου στην παθογένεια μυκήτων αδρομυκώσεων είναι πολλαπλός και ότι ο χρόνος της έκθεσης των φυτών στο αιθυλένιο και πιθανόν και η συγκέντρωση του μπορεί να καθορίσει την ευπάθεια ή την ανθεκτικότητά τους στα παθογόνα. Όταν εφαρμόζεται στο φυτό πριν τη μόλυνση από ένα παθογόνο δρα σαν επαγωγέας ανθεκτικότητας, ενώ όταν πραγματοποιείται χειρισμός μετά την μόλυνση επιταχύνει την ανάπτυξη της ασθένειας, δρώντας συνεργιστικά με άλλους μεταβολίτες σαν τοξίνη (Pegg και Cronshaw, 1976· Van Loon et al., 2006).

2.2.4.3.2 Επίδραση των παθογόνων σε μεταλλαγμένα και γενετικώς τροποποιημένα φυτά στο μονοπάτι του αιθυλενίου

Η χρήση χαρακτηρισμένων μεταλλαγμένων και γενετικώς τροποποιημένων φυτών έδωσε περισσότερα στοιχεία για το ρόλο του αιθυλενίου στην ανθεκτικότητα των φυτών σε συγκεκριμένα παθογόνα. Έχει κατασκευαστεί μια γενετικώς τροποποιημένη σειρά τομάτας που εκφράζει το γονίδιο της ACC απαμινάσης (ACD) από το στέλεχος 6G5 του *Pseudomonas* sp. (Klee et al., 1991) και που δεν παράγει αιθυλένιο και μια μεταλλαγμένη σειρά καπνού (*Tetr*) που δεν αντιλαμβάνεται το αιθυλένιο (Knoester et al., 1998) μέσω του μετασχηματισμού της με τον μεταλλαγμένο υποδοχέα του αιθυλενίου *etr1-1* από το *Arabidopsis* (Bleecker et al., 1988). Τα φυτά αυτά παρουσίασαν είτε περισσότερη ή λιγότερη ασθένεια όταν μολύνθηκαν με διάφορα παθογόνα (Πίνακας 2.1). Το αιθυλένιο φάνηκε να μειώνει την ασθένεια σε διάφορους νεκροτροφικούς μύκητες και βακτήρια ή σε παθογόνα που έχουν ανάμικτο νεκροτροφικό – βιοτροφικό κύκλο ζωής αφού φυτά που δεν αντιλαμβάνονται το αιθυλένιο έδειξαν αυξημένα συμπτώματα σε αυτά τα παθογόνα. Σε αντίθεση, η εμφάνιση λιγότερων συμπτωμάτων στα παραπάνω μεταλλαγμένα φυτά υπέδειξε ότι το αιθυλένιο προκάλεσε ασθένειες από διάφορα άλλα παθογόνα και βακτήρια καθώς και την μόλυνση από ένα νηματώδη και την επίθεση ενός εντόμου (Πίνακας 2.1). Επίσης, η αδυναμία πρόσληψης αιθυλενίου στον *Tetr* καπνό οδήγησε τα φυτά στο να μολυνθούν σοβαρά από εδαφογενείς μη παθογόνους κατά κανόνα μύκητες (Knoester et al., 1998; Geraats et al., 2002; Geraats et al., 2003). Ωστόσο, άλλα αποτελέσματα είναι αντιφατικά και δείχνουν είτε αύξηση της ασθένειας ή μειωμένα συμπτώματα κατά τη μόλυνση σε ένα ξενιστή από το ίδιο παθογόνο (π.χ. το βακτήριο *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* σε φυτά *Arabidopsis* Col-0) (Πίνακας 2.1). Οι Bent και συνεργάτες (Bent et al., 1992) έδειξαν ότι το μεταλλαγμένο φυτό *ein2*, που δεν μπορεί να μεταδώσει το σήμα του αιθυλενίου, ήταν ανθεκτικό στο βακτήριο *X. campestris* pv. *campestris* ενώ οι O'Donnell και συνεργάτες (2003) ανέφεραν πιο έντονα συμπτώματα στα μεταλλαγμένα φυτά *etr1* και *etr2*, υποδεικνύοντας αυξημένη ευπάθεια των φυτών στο συγκεκριμένο βακτήριο. Επιπρόσθετα τα φυτά *ein2* παρουσίασαν αυξημένη ευπάθεια στο νεκροτροφικό μύκητα *B. cinerea* (Thomma et al., 1999; Brouwer et al., 2003) και στο νεκροτροφικό βακτήριο *Erwinia carotovora* (Norman-Setterblad et al., 2000) ενώ δεν έδειξαν κάποια αλλαγή στην ευπάθειά τους στο βιοτροφικό ωομύκητα *Hyaloperonospora parasitica* και το βιοτροφικό βακτήριο *P. syringae* pv. *tomato* (Lawton et al., 1994; Lawton et al., 1995; Pieterse et al., 1998). Αντίθετα, η υπερ-ενεργοποίηση των αντιδράσεων αιθυλενίου μέσω της υπερέκφρασης του *AtERF1* σε φυτά *Arabidopsis* αύξησε την ανθεκτικότητα στα παθογόνα *B. cinerea*, *Plectosphaerella cucumerina*, και διάφορα είδη *F. oxysporum* αλλά μείωσε την SA-εξαρτώμενη ανεκτικότητα εναντίον του

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΤΟ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ ΚΑΙ Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΜΥΝΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

βακτηρίου *P. syringae* pv. *tomato* (Berrocal-Lobo et al., 2002; Berrocal-Lobo και Molina, 2004; McGrath et al., 2005). Από την άλλη, η υπερέκφραση του *NtERF5* από το *Nicotiana tabacum* οδήγησε σε αυξημένη ανθεκτικότητα των μετασχηματισμένων φυτών στον ιό *TMV* (Fischer και Droge-Laser, 2004). Ομοίως, η υπερέκφραση των *ERF* γονιδίων *Pti4* και *Pti5* από τομάτα σε φυτά *Arabidopsis* οδήγησε σε ανθεκτικότητα στα παθογόνα *P. syringae* και *Erysiphe orontii* (He et al., 2001; Gu et al., 2002). Μερικές πρόσφατες εργασίες που έγιναν με παθογόνα του γένους *Verticillium* spp. έδειξαν ότι από όλα τα μεταλλαγμένα στο μονοπάτι του αιθυλενίου φυτά *Arabidopsis* που χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα *etr1-1* έδειξαν αυξημένη ανθεκτικότητα στην προσβολή από τον μύκητα (Veronese et al., 2003; Tjamos et al., 2005; Johansson et al., 2006), τα *ein3-1* και *eto1-1* φυτά είχαν όμοιες αντιδράσεις με τα φυτά αγρίου τύπου ενώ τα *ein2-1*, *ein4-1* και *ein6-1* έδειξαν αυξημένη ευπάθεια (Johansson et al., 2006). Σε μια άλλη πρόσφατη εργασία που χρησιμοποιήθηκαν παθογόνα του γένους *Fusarium* spp. οι Berrocal-Lobo και Molina (2007) παρατήρησαν ότι τα φυτά *ein2-5* ήταν πιο ευπαθή στους μύκητες *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* και *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου. Γενικά, αυτά τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες ERF εμπλέκονται στους αμυντικούς μηχανισμούς πολλών φυτικών ειδών, αλλά η επίδρασή τους στην ανθεκτικότητα βασίζεται στη συγκεκριμένη αλληλεπίδραση παθογόνου – ξενιστή.

Το αιθυλένιο, πέρα από τη συμμετοχή του στους αμυντικούς μηχανισμούς των φυτών, φαίνεται να επηρεάζει και εκδήλωση των συμπτωμάτων των ασθενειών. Για παράδειγμα, τα μεταλλαγμένα *ein2* φυτά έδειξαν λιγότερα χλωρωτικά συμπτώματα σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου μετά από μόλυνση με τα βακτήρια *Xanthomonas campestris* ή *P. syringae*, παρόλο που η ποσότητα των παθογόνων ήταν η ίδια στους ιστούς των ξενιστών (Bent et al., 1992). Ομοίως τα μη ευαίσθητα στο αιθυλένιο φυτά σόγιας ήταν λιγότερο χλωρωτικά από τα αγρίου τύπου φυτά μετά τη μόλυνση με παθογόνα στελέχη *P. syringae* pv. *glycinea* (Hoffman et al., 1999). Αυτή η ασυμφωνία μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι, εκτός από το ρόλο του στους αμυντικούς μηχανισμούς, το αιθυλένιο εμπλέκεται σε πολλές άλλες φυσιολογικές διαδικασίες των φυτών που συμπεριλαμβάνουν τους μηχανισμούς της χλώρωσης, γήρανσης και κυτταρικής νέκρωσης (Abeles et al., 1992). Είναι προφανές ότι παρ' όλες τις έρευνες που έγιναν, είναι πολύ δύσκολο να προσδιοριστεί ο ρόλος του αιθυλενίου στην κάθε ασθένεια όταν περιγράφεται μόνο η συμπτωματολογική εικόνα. Σαν τελική παρατήρηση, έχει αποδειχθεί ότι διάφορα φυτοπαθογόνα παράγουν αυτόνομα αιθυλένιο τόσο *in vitro* όσο και *in planta*. Τέτοια παραδείγματα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΤΟ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ ΚΑΙ Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΜΥΝΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

παθογόνων που παράγουν αιθυλένιο είναι οι μύκητες *B. cinerea* (Cristescu et al., 2002) *V. dahliae* και *F. oxysporum* (Tzeng και De Vay, 1984) και το βακτήριο *P. syringae* (Nagahama et al., 1991; Weingart και Voelksch, 1997). Ο ρόλος της παραγωγής αιθυλενίου από τα παθογόνα είναι ασαφής όπως και η σημαντικότητα του στις αλληλεπιδράσεις παθογόνου – ξενιστή. Όταν παράγεται αιθυλένιο από τους παθογόνους μύκητες ή βακτήρια ως παράγοντας μόλυνσης, η έλλειψη αντίληψης του αιθυλενίου σε μεταλλαγμένα φυτά είναι πιθανόν να παρεμποδίζει την δραστηριότητα του παθογόνου και την εκδήλωση των συμπτωμάτων ανεξάρτητα από τα πραγματικά επίπεδα ανθεκτικότητας των φυτών.

Πίνακας 2.1. Μεταλλαγμένα και γενετικώς τροποποιημένα φυτά του αιθυλενίου με μεταβληθείσα ευπάθεια στα παθογόνα. ^a**Ασθένεια:** +, αυξημένη -, μειωμένη; = χωρίς αλλαγή; ανεκτικά, τα φυτά είναι ευπαθή και αποικίζονται από το παθογόνο αλλά δεν έχουν εμφανή συμπτώματα.

Είδος φυτού	Μετάλλαξη ή γενετική τροποποίηση	Παθογόνο	Είδος	Ασθένεια ^a
<i>Arabidopsis</i>	<i>ein2-1</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Νεκροτροφικό	+
<i>Arabidopsis</i>	<i>ein2-5, ein3-1</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Νεκροτροφικό	+
<i>Arabidopsis</i>	<i>etr1-1, ein2-1</i>	<i>Chalara elegans</i>	Νεκροτροφικό	+
<i>Arabidopsis</i>	<i>ein2-1</i>	<i>Erwinia carotovora</i> pv. <i>carotovora</i>	Νεκροτροφικό	+
<i>Arabidopsis</i>	<i>ein2-5</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>conglutinans</i>	Νεκροτροφικό	+
<i>Arabidopsis</i>	<i>ein2-5</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	Νεκροτροφικό	+
<i>Arabidopsis</i>	<i>etr1-1, ein2-1</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>matthiolae</i>	Νεκροτροφικό	+
<i>Arabidopsis</i>	<i>etr1-1, ein2-1</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>raphani</i>	Ανάμικτος	-
<i>Arabidopsis</i>	<i>eto1 – eto3</i>	<i>Heterodera schachtii</i>	Βιοτροφικό	+
<i>Arabidopsis</i>	<i>etr1-1, ein2-1</i>	<i>Heterodera schachtii</i>	Βιοτροφικό	-
<i>Arabidopsis</i>	<i>ein3-1, eir1-1, axr2</i>	<i>Heterodera schachtii</i>	Βιοτροφικό	-
<i>Arabidopsis</i>	<i>ein2-5</i>	<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	Νεκροτροφικό	+
<i>Arabidopsis</i>	<i>ein2-1</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	Ανάμικτος	- (ανεκτικά)
<i>Arabidopsis</i>	<i>ein2-1,-3,-4,-5</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Ανάμικτος	-
<i>Arabidopsis</i>	<i>etr1-1, ein2-1</i>	<i>Pythium</i> spp.	Νεκροτροφικό	+
<i>Arabidopsis</i>	<i>ein2-1, eto3</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Νεκροτροφικό	-
<i>Arabidopsis</i>	<i>etr1</i>	<i>Spodoptera exigua</i>	Φυτοφάγο	-
<i>Arabidopsis</i>	<i>ein2-1, hls1-1</i>	<i>Spodoptera littoralis</i>	Φυτοφάγο	-
<i>Arabidopsis</i>	<i>etr1-1</i>	<i>Verticillium dahliae</i>	Νεκροτροφικό	-
<i>Arabidopsis</i>	<i>etr1-1, etr2-1</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Ανάμικτος	+
<i>Arabidopsis</i>	<i>ein2-1</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Ανάμικτος	-
<i>Arabidopsis</i>	<i>eto1-1</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Ανάμικτος	+
Πατάτα	<i>AtEtr1, AtEtr1AS</i>	<i>Phytophthora infestans</i>	Ανάμικτος	+
Σόγια	<i>Gmetr1, Gmetr2</i>	<i>Phytophthora sojae</i>	Ανάμικτος	-/=
Σόγια	<i>Gmetr1, Gmetr2</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycinea</i>	Ανάμικτος	-/=
Σόγια	<i>Gmetr1, Gmetr2</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Νεκροτροφικό	=/+
Σόγια	<i>Gmetr1, Gmetr2</i>	<i>Septoria glycines</i>	Νεκροτροφικό	=/+
Καπνός	<i>Atetr1-1 (Tetr)</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Νεκροτροφικό	+
Καπνός	<i>Atetr1-1 (Tetr)</i>	<i>Cercospora nicotianae</i>	Νεκροτροφικό	+
Καπνός	<i>Atetr1-1 (Tetr)</i>	<i>Chalara elegans</i>	Νεκροτροφικό	+
Καπνός	<i>Atetr1-1 (Tetr)</i>	<i>Colletotrichum destructivum</i>	Ανάμικτος	+
Καπνός	<i>Atetr1-1 (Tetr)</i>	<i>Erwinia carotovora</i> pv. <i>carotovora</i>	Νεκροτροφικό	+
Καπνός	<i>Atetr1-1 (Tetr)</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Νεκροτροφικό	+
Καπνός	<i>Atetr1-1 (Tetr)</i>	<i>Fusarium solani</i>	Νεκροτροφικό	+
Καπνός	<i>Atetr1-1 (Tetr)</i>	<i>Oidium neolycopersici</i>	Βιοτροφικό	-/=
Καπνός	<i>Atetr1-1 (Tetr)</i>	<i>Peronospora parasitica</i>	Βιοτροφικό	-
Καπνός	<i>Atetr1-1 (Tetr)</i>	<i>Pythium sylvaticum</i>	Νεκροτροφικό	+
Καπνός	<i>Atetr1-1 (Tetr)</i>	<i>Pythium</i> spp.	Νεκροτροφικό	+
Καπνός	<i>Atetr1-1 (Tetr)</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Νεκροτροφικό	=/+
Τομάτα	<i>ACD</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Νεκροτροφικό	+
Τομάτα	<i>Epi</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Νεκροτροφικό	-
Τομάτα	<i>ACD</i>	<i>Verticillium dahliae</i>	Νεκροτροφικό	- (ανεκτικά)
Τομάτα	<i>ACD</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Ανάμικτος	- (ανεκτικά)
Τομάτα	<i>NR, Nr</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Ανάμικτος	- (ανεκτικά)
Τομάτα	<i>Nr</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	Νεκροτροφικό	-
Τομάτα	<i>Nr</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Τομάτα</i>	Ανάμικτος	- (ανεκτικά)
Τομάτα	<i>Nr</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Ανάμικτος	- (ανεκτικά)
Τομάτα	<i>Atetr1-1-LeEtr3</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Ανάμικτος	-

Προσαρμογή από *TRENDS in Plant Science*, 2006 11: 184-191

2.3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.3.1 Φυτικό υλικό

Τα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραμάτων ανήκουν στο είδος *A. thaliana*, οικότυπος Columbia, της οικογένειας των Σταυρανθών.

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής φυτά:

- Ο άγριος τύπος του φυτού, WT.
- Διαγονιδιακά *NahG*, (Lawton et al., 1995) πού φέρουν το βακτηριακό γονίδιο *NahG* που κωδικοποιεί την υδροξυλάση του σαλικυλικού οξέος και μετατρέπει το σαλικυλικό οξύ σε κατεχόλη (Dalaney et al, 1994), με αποτέλεσμα τη μη συσσώρευση σαλικυλικού οξέος στο φυτό.
- Μεταλλαγμένα *sid2* (Nawrath και Metraux, 1999) στα οποία δεν κωδικοποιείται η ισοχορισμική συνθετάση που καταλύει την αντίδραση σύνθεσης σαλικυλικού οξέος από το χορισμικό οξύ (Wildermuth et al, 2001).
- Μεταλλαγμένα *sid1/eds5* (Nawrath και Metraux, 1999) στα οποία δεν κωδικοποιείται η πρωτεΐνη μεμβράνης που συμμετέχει στη σύνθεση σαλικυλικού οξέος από το χορισμικό οξύ.
- Μεταλλαγμένα *etr1* (Bleecker et al., 1988), στα οποία δεν αναγνωρίζεται το αιθυλένιο και δεν κωδικοποιείται ο ETR1 υποδοχέας αιθυλενίου της υποοικογένειας I.
- Μεταλλαγμένα *ein2-1* (Roman et al., 1995), στα οποία δεν αναγνωρίζεται το αιθυλένιο και δεν κωδικοποιείται η πρωτεΐνη EIN2 που είναι θετικός ρυθμιστής των αντιδράσεων αιθυλενίου.
- Μεταλλαγμένα *ein3-1* (Roman et al., 1995), στα οποία δεν αναγνωρίζεται το αιθυλένιο και δεν κωδικοποιείται ο μεταγραφικός παράγοντας EIN3 που είναι θετικός ρυθμιστής των αντιδράσεων αιθυλενίου.
- Μεταλλαγμένα *ein4* (Roman et al., 1995), στα οποία δεν αναγνωρίζεται το αιθυλένιο και δεν κωδικοποιείται ο EIN4 υποδοχέας αιθυλενίου της υποοικογένειας II.
- Μεταλλαγμένα *ein5-1* (Roman et al., 1995), στα οποία δεν αναγνωρίζεται το αιθυλένιο και δεν κωδικοποιείται ο μεταγραφικός παράγοντας EIN5 που είναι θετικός ρυθμιστής των αντιδράσεων αιθυλενίου.
- Μεταλλαγμένα *jar1* (Staswick et al., 1992), στα οποία δεν αναγνωρίζεται το ιασμονικό οξύ
- Μεταλλαγμένα *pad3* (Glazebrook και Ausubel, 1994), δεν σχηματίζουν την φυτοαλεξίνη καμαλεξίνη (camalexin).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΤΟ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ ΚΑΙ Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΜΥΝΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

- Μεταλλαγμένα *pad4* (Glazebrook et al., 1996), στα οποία δεν κωδικοποιείται πρωτεΐνη που φέρει μια δομική περιοχή λιπάσης και που ελέγχει τη παραγωγή της φυτολεξίνης καμαλεξίνη.
- Μεταλλαγμένα *npr1* (Cao et al., 1997), στα οποία δεν εκφράζονται οι PR πρωτεΐνες, διακόπτεται η δράση του σαλικυλικού οξέος ως σήμα επαγωγής.

Σπόροι *A. thaliana* του οικότυπου Columbia (Col-0) και της γενετικής τροποποιημένης σειράς *NahG* προήλθαν από την Syngenta (Basel, Switzerland); οι μεταλλαγμένες σειρές *etr1-1*, *ein2-1*, *ein3-1*, *ein4*, *ein5-1*, *jar1-1*, *npr1-1*, *pad3-1*, *pad4-1* αποκτήθηκαν από το Nottingham Arabidopsis Stock Center (Nottingham, U.K.) και οι *eds5/sid1* και *sid2*, προσφέρθηκαν από τον Δρ. J. P. Métraux (University of Fribourg, Switzerland). Όλοι οι σπόροι αποθηκεύτηκαν στους 4°C. Οι σπόροι τοποθετήθηκαν σε γλαστράκια διαμέτρου 6 εκατοστών, τα οποία περιείχαν περίπου 200 cm³ χώμα (Potground; Klasmann, Deilmann, Germany), καλύφθηκαν με διαφανή μεμβράνη και τοποθετήθηκαν στους 4°C για 4 ημέρες για τη διακοπή του ληθάργου. Ακολούθως μεταφέρθηκαν σε θερμοκήπιο ελεγχόμενων συνθηκών θερμοκρασίας και φωτός στους 25 °C με φωτοπερίοδο 14 ωρών. Η μεμβράνη απομακρύνθηκε από τα γλαστράκια 5 ημέρες μετά τη βλάστηση των σπόρων. Τα φυτά ποτίστηκαν και λιπάνθηκαν με θρεπτικό διάλυμα (XL 60, Hortifeeds, Lincoln, UK) όποτε αυτό ήταν απαραίτητο.

2.3.2 Στελέχη φυτοπαθογόνων μυκήτων και προετοιμασία μολύσματος

Οι απομονώσεις *V. dahliae* (Tjamos et al., 2005) και *F. oxysporum* f. sp. *raphani* WCS600 (Pieterse et al., 1996) με γνωστή παθογένεια σε φυτά *A. thaliana*, χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα. Και τα δύο στελέχη διατηρήθηκαν στους -80°C ως αιώρημα κονιδίων 4x10⁷ ml⁻¹ σε 25% υδατική γλυκερόλη (Maniatis et al., 1982). Πριν χρησιμοποιηθούν, οι μύκητες μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό υλικό PDA (Merck) και τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 25°C για πέντε ημέρες. Για την παρασκευή του μολύσματος των πειραμάτων παθογένειας, συλλέχθηκε τμήμα της αναπτυσσόμενης καλλιέργειας των υπό μελέτη στελεχών από τρυβλίο και μεταφέρθηκε για επώαση σε φιάλη Earlenmayer 250 ml που περιείχε 100 ml θρεπτικού υποστρώματος sucrose sodium nitrate (SSN) (Sinha και Wood, 1968). Τα στελέχη *V. dahliae* και *F. oxysporum* f. sp. *raphani* επωάστηκαν σε περιστρεφόμενο επωαστικό κλίβανο στις 120 ή 180 στροφές ανά λεπτό και στους 22 ή 28 °C για πέντε ή δύο μέρες, αντίστοιχα. Ακολούθησε διήθηση των καλλιεργειών σε τυρόπανο, φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 10000 g, στους 12 °C και επαναιωρηματοποίηση σε

αποστειρωμένο απιονισμένο νερό. Πριν την εφαρμογή τους στα φυτά, δημιουργήθηκε αιώρημα συγκέντρωσης 10^7 κονιδίων ανά ml με τη βοήθεια αιματοκυτομέτρου.

2.3.3 Δοκιμές παθογένειας σε μεταλλαγμένα φυτά *Arabidopsis*.

Για την διερεύνηση του ρόλου των γονιδίων των μονοπατιών αντίληψης του σαλικυλικού οξέος, του ιασμονικού οξέος και του αιθυλενίου στην άμυνα των φυτών εναντίον των μυκήτων *V. dahliae* και *F. oxysporum* f. sp. *raphani*, μεταλλαγμένα φυτά *A. thaliana* στα παραπάνω γονίδια, ηλικίας τριών εβδομάδων, μολύνθηκαν με 10 ml αιωρήματος συγκέντρωσης 10^7 κονιδίων ανά ml των μυκήτων με ριζοπότισμα. Τα φυτά μάρτυρες ριζοποτίστηκαν με 10 ml αποστειρωμένο απιονισμένο νερό. Τα πειράματα παθογένειας επαναλήφθηκαν τρεις φορές. Το ποσοστό της ασθένειας σε κάθε μέτρηση υπολογίστηκε από τον αριθμό των φύλλων που παρουσίασαν συμπτώματα σε σχέση με το συνολικό αριθμό φύλλων κάθε φυτού. Η πρόοδος της ασθένειας καταγράφηκε για κάθε παθογόνο σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα και υπολογίστηκε ο δείκτης AUDPC (area under the disease progress curve, εμβαδόν κάτω από την καμπύλη προόδου της ασθένειας). Ακολούθησε γραφική παράσταση των ποσοστών ασθένειας κάθε επέμβασης σε σχέση με το χρόνο. Με βάση το εμβαδόν της καμπύλης προόδου της ασθένειας που προέκυψε υπολογίστηκε ο δείκτης AUDPC, σύμφωνα με τη μέθοδο των Campbell και Madden (1990). Προκειμένου να συσχετιστεί ο δείκτης AUDPC με την ένταση της ασθένειας, ο δείκτης αυτός εκφράστηκε ως ποσοστό της μέγιστης τιμής AUDPC για όλη την διάρκεια του πειράματος (που αντιστοιχεί σε 100 % προσβολή) και αναφέρθηκε ως ποσοστό ασθένειας βάση AUDPC (Korolev et al., 2001). Τιμές με βάση αυτό το ποσοστό για κάθε επέμβαση υποβλήθηκαν σε στατιστική ανάλυση με τη μέθοδο ANOVA και οι μέσοι όροι διαχωρίστηκαν με πολλαπλή δοκιμή κατά Tukey (Tukey's multiple range test). Τα πειράματα παθογένειας επαναλήφθηκαν 3 φορές με 15 επαναλήψεις ανά πείραμα.

2.3.4 Σχεδιασμός εκκινητών

Για τα πειράματα ποσοτικοποίησης της βιομάζας των παθογόνων στα φυτά *A. thaliana* σχεδιάστηκαν εκκινητές πάνω στις ITS1 και ITS2 περιοχές του γονιδίου 5.8S ριβοσωμικού RNA (Z29511) του μύκητα *V. dahliae* έτσι ώστε να ενισχύεται τμήμα μήκους 347 ζευγών βάσεων. Στην περίπτωση του *F. ox. f. sp. raphani*, πραγματοποιήθηκε σχεδιασμός εκκινητών πάνω στο γονίδιο της ενδοπολυγαλακτουρονάσης PG5 (AB256876), έτσι ώστε να ενισχύεται ένα τμήμα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΤΟ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ ΚΑΙ Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΜΥΝΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

331 ζευγών βάσεων. Σχεδιάστηκαν επίσης εξειδικευμένοι εκκινητές για τη μελέτη της έκφρασης γονιδίων του φυτού *A. thaliana*, που εμπλέκονται στην άμυνα των φυτών, που χρησιμοποιήθηκαν σε cDNA από φυτά που είχαν μολυνθεί με το μύκητα *Verticillium dahliae*. Τέλος, σχεδιάστηκαν εκκινητές πάνω στην αλληλουχία του γονιδίου *α2-tubulin* (M84696) του φυτού *A. thaliana* που χρησιμοποιήθηκαν ως εσωτερική σταθερά για την κανονικοποίηση διαφορών στις αρχικές ποσότητες DNA και cDNA που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις Real-time PCR. Στον Πίνακα 2.3.1 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι αλληλουχίες όλων των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα. Στο Παράρτημα δίνονται όλες οι αλληλουχίες των υπό μελέτη γονιδίων όπου έχουν επισημανθεί οι περιοχές πάνω στις οποίες σχεδιάστηκαν οι εκκινητές.

Πίνακας 2.3.1: Λίστα όλων των υπό εξέταση γονιδίων και τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις Real-time PCR.

Γονίδιο	AGI ¹ code	Ζεύγη εκκινητών
<i>PR-1</i>	AT2G14610	5'-TCACAACCAGGCACGAGGAG-3' 5'-CACCGCTACCCCAGGCTAAG-3'
<i>PR-2</i>	AT3G57260	5'-GCTCTCCGTGGCTCTGACATC-3' 5'-TACCGGAATCTGACACCATCTCTG-3'
<i>PR-3</i>	AT3G12500	5'-TTATCACCGCTGCAAAGTCCT-3' 5'-TGGCGCTCGGTTACAGTA-3'
<i>PR-4</i>	AT3G04720	5'-ATAATCCGGCGCAGAATAAT-3' 5'-GCGGTCCAGCCATACTTG-3'
<i>PR-5</i>	AT1G75040	5'-GACTCCAGGTGCTTCCCGACAG-3' 5'-ACTCCGCCGCCGTTACATCTT-3'
<i>PDF1.2</i>	AT5G44420	5'-CTGTTACGTCCCATGTTAAATCTACC-3' 5'-CAACGGGAAAATAAACATTAACAG-3'
<i>CHI-1</i>	AT2G43620	5'-CGGCTGCCAATCGTTTCG-3' 5'-ACCGCGGCCGTAGTAGTCTTTTC-3'
<i>CHI-2</i>	AT2G43570	5'-GCTTCGGTGCTTCCATCTCC-3' 5'-GCCATAGTAGCCCTTTTCCTTGTG-3'
<i>WRKY18</i>	AT4G31800	5'-AGCGCAAGTGAGTTACGAG-3' 5'-ATCCGGGTCTTGTTCCTTTCT-3'
<i>WRKY22</i>	AT4G01250	5'-CCCGTAAACAAGTGGAGCGAAATA-3' 5'-CACCGGAGACGATGAATAAGTAGC-3'
<i>WRKY30</i>	AT2G38470	5'-AGTACGGACAAAAACAGGTGAAA-3' 5'-TCGTTGGACAATTAGGGAAAGT-3'
<i>WRKY40</i>	AT1G80840	5'-GCTTAAACCGCCACATCTCT-3' 5'-GTAGTCACCGGCACAGTCAAG-3'
<i>WRKY53</i>	AT4G23810	5'-CAGACGGGGATGCTACGGTTTTTC-3' 5'-CGGCGAGGCTAATGGTGGTGT-3'
<i>WRKY60</i>	AT2G25000	5'-TAATCTTATGGAGGAGTTGC-3' 5'-ACCGTCGCTTTATCGTT-3'
<i>ERF1</i>	AT5G50080	5'-GTTTGGCTCGGGACGTTTGATAC-3' 5'-AGAGGAGGGGGAGGAGGAAGAAT-3'
<i>ERF2</i>	AT3G16770	5'-CGGGGAAACGGAGGAAGAGG-3' 5'-GCGATGACGGCGGAGGAGTAT-3'
<i>Myb32</i>	AT4G34990	5'-TCATCAAACCTACATAGCCTTCTCG-3' 5'-CCCTTTTCTTAATAGCTTCCTCTT-3'
<i>Myb75</i>	AT1G56650	5'-GATCTTCTTCTTCGCCTTCA-3' 5'-CACGGTTCATGTTTCTTACTCA-3'
<i>VSP1</i>	AT5G24780	5'-TTTTACGCCAAAGGACTTGC-3'

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΤΟ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ ΚΑΙ Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΜΥΝΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

		5'-AATCCCGAGTTCCAAGAGGT-3'
VSP2	AT5G24770	5'-TCAGTGACCGTTGGAAGTTGTG-3' 5'-GTTCGAACCATTAGGCTTCAATATG-3'
ATGSTF8	AT2G47730	5'-CTCGAAGGTAAGCTCCAGAAAAG-3' 5'-TCACCAGCCAAGAAGCTCAGATT-3'
ATGSTF12	AT5G17220	5'-GGTCAAGTTCCAGCCATAGA-3' 5'-TTGCCCAAAGGTTTCGT-3'
ATGSTU16	AT1G59700	5'-TCGCTCTTCGTCTCAAATCAGTGG-3' 5'-AATCGGTTTGTGTTGTGGAGGAG-3'
ATGSL05	AT4G03550	5'-GAATGCATTATGGCCACCCTGAT-3' 5'-TTAAACCCGGCAAAGATGTCCCTC-3'
RAB	AT3G02480	5'-AGGATGCTGCTGCTTCA-3' 5'-TTAGTGGCTTTTGTTCAT-3'
RAB18	AT5G66400	5'-AGTGGTGGTGGCTTGGGAGGAAT-3' 5'-ACCACCGTAGCCACCAGCATCAT-3'
UGT73B1	AT4G34138	5'-CATATCGGTCCGCTTTCCCTTAG-3' 5'-CTTGCCTTTTTGCCTCTTCTG-3'
SDR1	AT1G52340	5'-AACTCGCTTTGGCTCATTTG-3' 5'-GTCAGTTCACCCCTTTTAGATTC-3'
AtMYC2	AT1G32640	5'-TCATACGACGGTTGCCAGAA-3' 5'-AGCAACGTTTACAAGCTTTGATTG-3'
RD22	AT5G25610	5'-CTGTTTCCACTGAGGTGGCTAAG-3' 5'-TGGCAGTAGAACACCGCGA-3'
ABI1	AT4G26080	5'-CGGCAAACTGCACTTCCAT-3' 5'-CACGAGCTCCATTCCACTGAA-3'
KIN1	AT5G15960	5'-GCTGGCAAAGCTGAGGAGAA-3' 5'-TTCCCGCCTGTTGTGCTC-3'
Γονίδιο	GenBank accession no	Ζεύγη εκκινητών
5.8S rRNA	Z29511	5'-CCGCCGGTCCATCAGTCTCTCTGTTTATAC-3' 5'-CGCCTGCGGGACTCCGATGCGAGCTGTAAC-3'
PG5	AB256876	5'-CGAGGGTAAGAGATGGTGGGATGG-3' 5'-GCCGCCGGTGAAGGTGATGT-3'
<i>a2-tubulin</i>	M84696	5'-TCCGCGAAACGAAAATG-3' 5'-TGGCTCAAGATCAACAAAGAC-3'

¹AGI, Arabidopsis Genome Initiative

Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα PrimerSelect του λογισμικού πακέτου Lasergene v8.0 (DNASTAR, Inc., Madison, USA).

2.3.5 Απομόνωση DNA από φυτά *A. thaliana*

Η απομόνωση γονιδιακού DNA από φυτά *A. thaliana* πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Dellaporta et al., (1983). Συγκεκριμένα, το υπέργειο μέρος κάθε φυτού κόπηκε στο επίπεδο του χώματος, ξεπλύθηκε με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό και κονιορτοποιήθηκε με χρήση υγρού αζώτου σε αποστειρωμένα ιγδία. Δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε και από τις ρίζες των φυτών, αλλά δεν συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση των αποτελεσμάτων αφού τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης των μυκήτων παρουσίασαν σημαντική διακύμανση. Η διακύμανση είναι πιθανόν να οφείλεται στο ότι ήταν ανέφικτο να διαχωριστεί η βιομάζα του παθογόνου μέσα στις ρίζες από αυτήν των μυκήτων που ήταν εν μέρει προσκολλημένη στη επιφάνεια των ριζών μετά τον εμβολιασμό των παθογόνων στο

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΤΟ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ ΚΑΙ Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΜΥΝΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

χώμα (Eynck et al., 2007). Περίπου 80-100 mg κονιορτοποιημένου ιστού αναμίχθηκαν με 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος απομόνωσης (50 mM EDTA pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM β-mercaptoethanol) και 33μl SDS και επώαση στους 65°C για 20 λεπτά. Στη συνέχεια προστέθηκαν 160 μl ρυθμιστικού διαλύματος οξικού καλίου (pH 4.5) και μετά από ανάδευση τοποθετήθηκαν στο πάγο για 20 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 10.000g για 10 λεπτά στους 4 °C και μεταφορά της υπερκείμενης φάσης. Στη συνέχεια έγινε κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων με 0.5 όγκους ισοπροπανόλης. Το DNA παραλήφθηκε ως ίζημα μετά από φυγοκέντρηση για 15min στις 10.000g και απομάκρυνση των αλάτων με έκπλυση με διάλυμα αιθανόλης 70%. Ακολούθησε στέγνωμα του ιζήματος DNA για 5-10 min σε θερμοκρασία δωματίου και επαναιώρηση του σε 50μl TE (10mM Tris-HCl, 0.1M EDTA).

2.3.6 Απομόνωση RNA από φυτά *A. thaliana*

Η απομόνωση ολικού RNA από τα φυτά *A. thaliana* πραγματοποιήθηκε με τη χρήση Trizol της εταιρείας Ambion (Αμερική) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για τη διαδικασία αυτή, το υπέργειο μέρος κάθε φυτού κόπηκε στο επίπεδο του χώματος, ξεπλύθηκε με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό και κονιορτοποιήθηκε με χρήση υγρού αζώτου σε αποστειρωμένα ιγδία. 80-100 mg κονιορτοποιημένου φυτικού ιστού τοποθετήθηκαν σε πλαστικό σωλήνα 1.5 ml και αναμείχθηκαν με 1 ml Trizol. Μετά από 5 min, ακολούθησε ανάμειξη με 200 μl χλωροφόρμιο, παραμονή για 3 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm στους 4 °C για 15 min. Η υπερκείμενη φάση μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα 1.5 ml και ακολούθησε εκχύλιση με ίσο όγκο φαινόλη: χλωροφόρμιο (1:1, v:v). Μετά από ανάδευση, φυγοκέντρηση (για 15 min στις 12.000 rpm και 4 °C) και μεταφορά της υπερκείμενης φάσης, ακολούθησε κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων με προσθήκη 500μl ισοπροπανόλης, ανάμειξη και παραμονή για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το ίζημα RNA παραλήφθηκε μετά από φυγοκέντρηση για 15min στις 12.000 rpm και 4 °C και απομάκρυνση των αλάτων με έκπλυση με διάλυμα αιθανόλης 70%. Ακολούθησε στέγνωμα του ιζήματος RNA για 5 – 10 min σε θερμοκρασία δωματίου και επαναιώρηση του σε 50μl υπερκάθαρο νερό, απαλλαγμένο από ριβοζονουκλεάσες (RNase free water). Το RNA φυλάχτηκε σε βαθιά κατάψυξη (-80 °C) για περαιτέρω χρήση.

2.3.7. Μέτρηση νουκλεϊνικών οξέων

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του DNA πραγματοποιήθηκε με τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων στα 260 nm. Είναι γνωστό ότι

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΤΟ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ ΚΑΙ Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΜΥΝΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

οπτική απορρόφηση στα 260 nm ίση με τη μονάδα ($O.D_{260} = 1,0$) αντιστοιχεί σε συγκέντρωση σε DNA ίση με 50 $\mu\text{g/ml}$. Συνεπώς ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης DNA υπολογίστηκε με βάση την εξίσωση

$50 \mu\text{g/ml (DNA)} \times O.D_{260} \text{ του δείγματος} \times \text{Συντελεστής αραιώσης}$

Η συγκέντρωση του RNA υπολογίστηκε σε Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Saveen Werner, Malmö, Sweden).

2.3.8 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής

Η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής εφαρμόστηκε για τον καθορισμό του επιπέδου μεταγραφής των υπό μελέτη γονιδίων που εμπλέκονται στην άμυνα των φυτών καθώς και του γονιδίου της α -τουμπουλίνης του φυτού *A. thaliana* που χρησιμοποιήθηκε σαν γονίδιο αναφοράς.

Προκειμένου να αποφευχθεί η επιμόλυνση με DNA, πραγματοποιήθηκε αρχικά χειρισμός του RNA με ένζυμο δεσοξυριβοζονουκλεάσης (DNase, Invitrogen) και επώαση στους 37 °C για 15 min. Στη συνέχεια προστέθηκε 1 μl EDTA και τα δείγματα επωάστηκαν στους 65 °C για 10 min έτσι ώστε να σταματήσει η αντίδραση.

Συστατικά Αντίδρασης	Πυκνό Διάλυμα	Όγκος	Τελική Συγκέντρωση
Ρυθμιστικό Διάλυμα DNase I	10 x	1 μl	1x
DNase I (Invitrogen)	2 units/ μl	1 μl	2 units
EDTA (Invitrogen)	10mM	1 μl	1mM
Ολικό RNA	-	-	3- 5 μg
α.α. H ₂ O	-	έως τα 10 μl	-
Τελικός όγκος αντίδρασης 10 μl			

Για την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο της Superscript II H⁻ αντίστροφης μεταγραφάσης της εταιρείας Invitrogen. Η σύνθεση cDNA πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο έγινε αποδιάταξη ποσότητας 0,1-5 μg ολικού RNA με 0.5 μg εκκινητή oligo-dT σε τελικό όγκο 11 μl στους 65 °C για 5 min και ακολούθως η αντίδραση τοποθετήθηκε σε πάγο. Τα συστατικά και οι συγκεντρώσεις του πρώτου σταδίου είναι οι ακόλουθες.

Συστατικά Αντίδρασης	Πυκνό Διάλυμα	Όγκος	Τελική Συγκέντρωση
Ολικό RNA	-	-	2,5 μg
Εκκινητής oligo (dT) ₁₇	38 μM	1,5 μl	4,75 μM
dNTPs	10 mM	2 μl	1,66 mM
α.α. H ₂ O	-	έως τα 12 μl	-
Τελικός όγκος αντίδρασης 12 μl			

Κατά το δεύτερο στάδιο προστέθηκαν τα υπόλοιπα αντιδραστήρια μετά από σύντομη φυγοκέντρηση (Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης RT τελικής συγκέντρωσης

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΤΟ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ ΚΑΙ Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΜΥΝΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

1X, DTT 10μM, μείγμα νουκλεοτιδίων τελικής συγκέντρωσης 1mM, 20 U παρεμποδιστή ριβοζονουκλεασών, 200 U ένζυμο Superscript II H⁺).

Συστατικά Αντίδρασης	Πυκνό Διάλυμα	Όγκος	Τελική Συγκέντρωση
Ρυθμιστικό διάλυμα αντίστροφης μεταγραφάσης	5x	4μl	1x
DTT	100mM	2μl	10 μM
Αναστολέας RNase (Invitrogen)	40 units/μl	1μl	20 units
Αντίστροφη Μεταγραφάση Superscript II H ⁺ (Invitrogen)	200 units/μl	1μl	200 units
Τελικός όγκος αντίδρασης 20 μl			

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 20 μl και επωάστηκε για 50 min στους 42 °C. Ακολούθησε απενεργοποίηση του ενζύμου στους 75 °C για 15 min. Για την ενίσχυση με PCR του μεταγραφήματος του υπό μελέτη γονιδίου πραγματοποιήθηκε αντίδραση σε 1 μl από την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιώντας εκκινητές που είχαν σχεδιαστεί στις κωδικές περιοχές των υπό μελέτη γονιδίων (Sambrook et al., 1989).

2.3.9 Εφαρμογή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

Για την ενίσχυση τμημάτων των γονιδίων 5.8S rRNA και *PG5* του *V. dahliae* και *F. oxysporum* f. sp. *raphani*, αντίστοιχα πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR σε 25 -50 ng ολικό γονιδιακό DNA φυτών *A. thaliana*. Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκε ένζυμο πολυμεράσης της εταιρείας Finzyme (Φινλανδία), με τη συνιστώμενη συγκέντρωση των αντιδραστηρίων (1 U DNA πολυμεράση, 2mM MgCl₂, 1X συγκέντρωση ρυθμιστικού διαλύματος, 200μM νουκλεοτίδια). Οι εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 0,8-1μM, σε θερμοκρασία υβριδισμού 60 °C. Μια τυπική αντίδραση περιελάμβανε αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 2 min, 30 κύκλους με αποδιάταξη 1 min στους 94 °C, υβριδισμό 1 min στους 60 °C και επέκταση 2 min (ή ανάλογα με το μήκος του τμήματος) στους 72 °C κι ένα τελικό βήμα επέκτασης στους 72 °C για 10 min.

Τέλος, PCR πραγματοποιήθηκε σε cDNA φυτών *A. thaliana* για τον έλεγχο των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν ακολούθως στις αντιδράσεις Real-time PCR για τον προσδιορισμό της έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στην άμυνα των φυτών (Sambrook et al., 1989).

2.3.10 Προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων *Escherichia coli*

Για τη δημιουργία επιδεκτικών κυττάρων, 100μl ανεπτυγμένης καλλιέργειας της φυλής DH5α του βακτηρίου *E. coli* εμβολιάστηκαν σε γυάλινους σωλήνες που περιείχαν 1 ml υλικό LB, που ακολούθως τοποθετήθηκαν για επώαση στους 37 °C στις 250 στροφές/λεπτό για 4-4,5 ώρες. Οι καλλιέργειες μεταφέρθηκαν σε σωλήνες τύπου Errendorf, φυγοκεντρήθηκαν στις 12.000 στροφές/λεπτό για 2 λεπτά και το υπερκείμενο απομακρύνθηκε. Το ίζημα επαναιωρηματοποιήθηκε με προσοχή σε 500 μl παγωμένου CaCl₂ (0.1M), φυγοκεντρήθηκε στις 12.000 στροφές/λεπτό για 2 λεπτά και το υπερκείμενο απομακρύνθηκε. Το ίζημα επαναιωρηματοποιήθηκε προσεχτικά σε 100μl παγωμένου CaCl₂ (0.1M) (Sambrook et al., 1989).

2.3.11 Κλωνοποίηση Προϊόντων PCR

Για την κλωνοποίηση των προϊόντων PCR χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pGEM-T Easy της εταιρείας Promega. Μετά τον καθαρισμό των αντιδράσεων με τη χρήση του MinElute PCR purification kit (Qiagen) ακολούθησε αντίδραση συνένωσης (ligation) των τμημάτων DNA με τον πλασμιδιακό φορέα (σε αναλογία εισδοχή/φορέα περίπου 3/1) χρησιμοποιώντας το ένζυμο λιγάση (Fermentas). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε όγκο 10 μl και η επώαση έγινε στους 16 °C κατά τη διάρκεια της νύχτας. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εισαγωγή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου (από την αντίδραση συνένωσης) σε επιδεκτικά κύτταρα (competent cells) DH5α του βακτηρίου *E. coli*. Για το σκοπό αυτό 5μl της αντίδρασης συνένωσης αναμείχθηκαν με 50μl επιδεκτικών κυττάρων και μετά από παραμονή 30 min στον πάγο πραγματοποιήθηκε θερμικό σοκ σε υδατόλουτρο 42°C για 50 sec. Μετά από καλλιέργεια των κυττάρων σε θρεπτικό υλικό (LB) για 1 h, τα κύτταρα επωάστηκαν για 24 h στους 37 °C σε στερεό θρεπτικό υλικό παρουσία του αντιβιοτικού αμπικιλίνη, του οποίου το γονίδιο ανθεκτικότητας φέρει ο φορέας pGEM. Για το σκοπό αυτό 200 μl από τη καλλιέργεια του ανασυνδυασμένου βακτηρίου επιστρώθηκαν σε τριβλία με LB που περιείχαν αμπικιλίνη (50 μg/ml θρεπτικού υποστρώματος), ενώ στην επιφάνεια του στερεοποιημένου υλικού είχαν προηγουμένως επιστρωθεί 200 μl LB με IPTG και XGal (170 μl LB, 10μl IPTG από stock 24 mg/ml και 20 μl XGal από stock 25 mg/ml). Οι αποικίες που έφεραν μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο είχαν κυανό χρώμα λόγω της δράσης της β-γαλακτοσιδάσης ενώ αυτές που έφεραν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο εμφανίζονταν λευκές (Sambrook et al., 1989). Για τον έλεγχο της κλωνοποίησης τμήματος DNA επιθυμητού μεγέθους στο πλασμίδιο, οι λευκές αποικίες αναλύθηκαν με PCR ή με πέψη του πλασμιδιακού DNA με περιοριστικά ένζυμα.

Σύμφωνα με την παραπάνω διαδικασία κλωνοποιήθηκαν στον φορέα pGEM-T Easy τμήμα 347 βάσεων της ITS περιοχής του 5.8S rRNA γονιδίου του μύκητα *V. dahliae* και τμήμα 331 βάσεων του γονιδίου *PG5* του μύκητα *F. oxysporum* f. sp. *raphani*.

2.3.12 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από το βακτήριο *Escherishia coli*

Απομόνωση μικρής κλίμακας πλασμιδιακού DNA από το βακτήριο *E. coli* πραγματοποιήθηκε μετά από την κλωνοποίηση τμήματος των γονιδίων 5.8S rRNA και *PG5* των μυκήτων *V. dahliae* και *F. oxysporum* f. sp. *raphani*, αντίστοιχα. Με τον τρόπο αυτό ελέγχθηκε η παρουσία κλώνου με το επιθυμητό τμήμα DNA, και ταυτόχρονα παραλήφθηκε το πλασμίδιο με το τμήμα αυτό για περαιτέρω χειρισμό. Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA, κύτταρα από 1.5 ml καλλιέργειας του βακτηρίου *E. coli* (που αναπτύχθηκε για 24 h σε υλικό LB) επαναιωρηματοποιήθηκαν σε 100μl διάλυμα I (50mM γλυκόζη, 25mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA pH 8.0). Μετά την πάροδο 5min σε θερμοκρασία δωματίου ακολούθησε προσεκτική ανάμειξη με 200μl φρεσκοπαρασκευασμένου διαλύματος II (0.2N NaOH, 1% SDS, H₂O) και τοποθέτηση των σωληνίσκων σε πάγο για 5min. Στη συνέχεια τα κύτταρα αναμείχθηκαν προσεκτικά με 150μl Διαλύματος III (CH₃ COOK, με συγκέντρωση 5 M CH₃ COO⁻ και 3 M K⁺) και τοποθετήθηκαν σε πάγο για 5min. Οι πρωτεΐνες και τα κυτταρικά τοιχώματα των βακτηριακών κυττάρων αφαιρέθηκαν με φυγοκέντρηση για 5min στις 12.000 g και μεταφορά της υπερκείμενης υδάτινης φάσης (περίπου 0.4 ml) σε νέο σωληνάκι. Ακολούθησε μία επιπλέον εκχύλιση με ίσο όγκο διαλύματος φαινόλης-χλωροφόρμιο (1:1) για την απομάκρυνση των εναπομείναντων πρωτεϊνών. Μετά από ανάδευση, φυγοκέντρηση και μεταφορά της υπερκείμενης φάσης, πραγματοποιήθηκε κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων με προσθήκη 700μl απόλυτης αιθυλικής αλκοόλης (σε θερμοκρασία δωματίου), καλή ανάμειξη και παραμονή για 2min σε θερμοκρασία δωματίου. Το ίζημα πλασμιδιακού DNA παραλήφθηκε μετά από φυγοκέντρηση για 5min στις 10.000g και απομάκρυνση των αλάτων με διάλυμα αιθανόλης 70%. Ακολούθησε στέγνωμα του ιζήματος για 5 -10 min σε θερμοκρασία δωματίου και επαναιώρηση του σε 30μl TE (10mM Tris-HCl, 0.1M EDTA), που περιείχε Ριβοζονουκλεάση Α σε συγκέντρωση 10μg/ml. Το πλασμιδιακό DNA αποθηκεύτηκε στους -20 °C (Sambrook et al., 1989).

2.3.13 Πέψη νουκλεϊκών οξέων με περιοριστικά ένζυμα

Η πέψη (digestion) νουκλεϊκών οξέων με περιοριστικά ένζυμα (restriction enzymes) πραγματοποιήθηκε για να ελεγχθεί η παρουσία του επιθυμητού τμήματος DNA στον πλασμιδιακό φορέα pGEM-T. Μια τυπική αντίδραση πέψης σε τελικό όγκο 10 μl περιλάμβανε ρυθμιστικό διάλυμα συγκέντρωσης 1X (1 μl), 0.5 μl του περιοριστικού ενζύμου και 1μg πλασμιδιακού DNA. Η επώαση της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε για 4-16 h, σε θερμοκρασία που καθοριζόταν από τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν (Sambrook et al., 1989).

2.3.14 Ηλεκτροφόρηση τμημάτων DNA

Τα δείγματα DNA αναμείχθηκαν με διάλυμα φόρτωσης (loading buffer) (0,1% bromophenyl blue, 50% γλυκερίνη, 10mM Tris-HCl pH 8) πυκνότητας 6X, τέτοιου όγκου, ώστε η περιεκτικότητα του διαλύματος φόρτωσης στον τελικό όγκο δείγματος που ηλεκτροφορείτο να είναι 1X. Ως σταθερά χρησιμοποιήθηκε η κλίμακα μοριακών βαρών Gene Ruler 1Kb DNA ladder (Fermentas). Το πήγμα ηλεκτροφόρησης περιείχε 1% αγαρόζη σε 1X ρυθμιστικό διάλυμα TAE (Sambrook et al., 1989). Η ηλεκτροφόρηση του πηγματος πραγματοποιήθηκε στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα με εφαρμογή τάσης 100 Volt στα άκρα της συσκευής ηλεκτροφόρησης.

Μετά την ηλεκτροφόρηση ακολούθησε χειρισμός των πηγμάτων αγαρόζης με υδατικό διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (συγκέντρωσης περίπου 1μg/ml) για 20-30 min και παρατήρηση σε τράπεζα UV ακτινοβολίας (365 nm).

2.3.15 Μετασχηματισμός του μύκητα *V. dahliae* με το γονίδιο της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης

Το στέλεχος του μύκητα *V. dahliae*, που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα παθογένειας, μετασχηματίστηκε με την κασέτα έκφρασης του γονιδίου της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (*GFP*, green fluorescent protein), προκειμένου να είναι δυνατή η ιστοπαθολογική παρατήρηση της διαδικασίας μόλυνσης, ώστε να διερευνηθεί περαιτέρω ο ρόλος των υπό μελέτη γονιδίων στην παθογένεια.

Για τον μετασχηματισμό του μύκητα *V. dahliae* (Mullins et al., 2001), παρασκευάστηκαν τα απαραίτητα υλικά σύμφωνα με τον πίνακα 2.3.2. Στη συνέχεια, κλώνος *Agrobacterium*, που έφερε δυαδικό φορέα με το γονίδιο ανθεκτικότητας στην υγρομυκίνη και την κασέτα έκφρασης του γονιδίου *GFP* υπό τον έλεγχο του υποκινητή *GAPD* του μύκητα *Cochliobolus heterstrophus* (που μας παραχώρησε ο καθηγητής S. Kang, Pennsylvania State University, USA), επωάστηκε σε Minimal Medium (MM) στους 28°C με περιστροφή 250 rpm για 2 ημέρες. Τα κύτταρα του

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΤΟ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ ΚΑΙ Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΜΥΝΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

Agrobacterium της φυλής AGL1 αραιώθηκαν σε υλικό Induction Medium (IM), που περιείχε καναμυκίνη και ακετοσυριγγκόνη, μέχρι να αποκτήσουν οπτική πυκνότητα (OD) 0.15 και επωάστηκαν για 6 h στους 28°C με περιστροφή 250 rpm. Ακολούθησε ανάμιξη 100μl αιωρήματος κονιδίων του μύκητα *V. dahliae* (συγκέντρωσης 10⁶ κονίδια / ml) με 100μl ανεπτυγμένης καλλιέργειας *Agrobacterium* και άπλωμα σε αποστειρωμένη μεμβράνη Hybond που είχε τοποθετηθεί σε υλικό συγκαλλιέργειας (Co-cultivation medium). Μετά από συγκαλλιέργεια δύο ημερών οι μεμβράνες Hybond μεταφέρθηκαν σε υλικό επιλογής (PDA) που περιείχε κατάλληλη συγκέντρωση του αντιβιοτικού υγρομυκίνη, 200 μM σεφοταξίμη και 100 μg/ml μοξαλακτάμη. Οι μετασχηματισμένες αποικίες του μύκητα εμφανίστηκαν μετά από 3-4 μέρες επώασης στο υλικό επιλογής. Οι αποικίες που αναπτύχθηκαν υποβλήθηκαν σε διαδοχικές αραιώσεις και τα *GFP* στελέχη που προέκυψαν από βλάστηση μεμονωμένου κονιδίου επιλέχθηκαν με βάση τον ικανοποιητικό *GFP* φθορισμό και αφού επιβεβαιώθηκε η παθογόνος τους ικανότητα.

Πίνακας 2.3.2. Παρασκευή πυκνών διαλυμάτων και υλικών για ATMT μετασχηματισμό

Διαλύματα - Αντιδραστήρια	Πυκνό διάλυμα (100 ml) ¹		MM ²	IM ³	CM ⁴
	Χημική Ουσία	Ποσότητα			
Phosphate-buffer (pH 7.0)	K ₂ HPO ₄	20,00 g	1,00 ml	1,00 ml	1,00 ml
	KH ₂ PO ₄	14,50 g			
M-N	MgSO ₄ · 7H ₂ O	3,00 g	2,00 ml	2,00 ml	2,00 ml
	NaCl	1,50 g			
1% CaCl ₂ · 2H ₂ O	CaCl ₂ · 2H ₂ O	1,00 g	0,10 ml	0,10 ml	0,10 ml
Διάλυμα ιχνοστοιχείων	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,01 g	1,00 ml	1,00 ml	1,00 ml
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,01 g			
	H ₃ BO ₃	0,01 g			
	MnSO ₄ · H ₂ O	0,01 g			
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,01 g			
20% NH ₄ NO ₃	NH ₄ NO ₃	20,00 g	0,25 ml	0,25 ml	0,25 ml
20% Γλυκόζη	Γλυκόζη	20,00 g	1,00 ml	1,00 ml	1,00 ml
0.01% FeSO ₄	FeSO ₄	0,01 g	1,00 ml	1,00 ml	1,00 ml
50% Γλυκερόλη	Γλυκερόλη	50 ml	-	1,00 ml	1,00 ml
1M MES (pH 5.3)	MES	21,32 g	-	4,00 ml	4,00 ml
Αποστειρωμένο H ₂ O			93,5 ml	88,5 ml	88,50 ml
Καναμυκίνη (50mg/ml)			0.15 ml	0.15 ml	0,15 ml
Ακετοσυριγγκόνη (200 μM)			-	0.2 ml	0,20 ml
Agar			-	-	1,50 g

¹ Όλα τα πυκνά διαλύματα παρασκευάστηκαν σε αποιονισμένο νερό, με εξαίρεση την ακετοσυριγγκόνη που παρασκευάστηκε σε 95% αιθανόλη. Το πυκνό αυτό διάλυμα δεν αποστειρώθηκε επιπλέον. Τα διαλύματα καναμυκίνης και MES αποστειρώθηκαν με διέλευση από φίλτρο 0.22-μm. ^{2, 3, 4} Τα υλικά MM (minimal medium), IM (induction medium, υλικό επαγωγής) και CM (co-cultivation medium, υλικό συγκαλλιέργειας) παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τον πίνακα 2.3.1, χωρίς την προσθήκη καναμυκίνης, ακετοσυριγγκόνης και MES (τα οποία προστέθηκαν κατά τον μετασχηματισμό). Ακολούθησε αποστείρωση για 20 λεπτά στους 120 °C, με πίεση 1 atm. Όλα τα παραπάνω υλικά και διαλύματα διατηρήθηκαν στους 4°C, με εξαίρεση τα διαλύματα καναμυκίνης, ακετοσυριγγκόνης και MES που αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

2.3.16 Ιστοπαθολογική παρατήρηση της διαδικασίας μόλυνσης σε υδροπονικό σύστημα καλλιέργειας

Προκειμένου να οπτικοποιηθεί η διαδικασία μόλυνσης των φυτών *A. thaliana* κατά τα αρχικά στάδια, πραγματοποιήθηκε παρατήρηση της αλληλεπίδρασης σε υδροπονικό σύστημα καλλιέργειας ώστε να είναι δυνατή η απ' ευθείας μικροσκοπική παρατήρηση. Πριν χρησιμοποιηθούν στο υδροπονικό σύστημα οι σπόροι των φυτών *A. thaliana* απολυμάνθηκαν επιφανειακά με 70% αιθανόλη για 30 sec. Η αιθανόλη αφαιρέθηκε και οι σπόροι ξεπλύθηκαν με αποστειρωμένο νερό. Ακολούθησε εμβάπτιση των σπόρων σε 10% χλωρίνη για 30 sec και τρεις διαδοχικές πλύσεις με αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό. Στη συνέχεια οι σπόροι τοποθετήθηκαν μεμονωμένα σε tips T400 κομμένα στη μέση όπου είχε τοποθετηθεί 0,7% αποστειρωμένο αгар. Τα tips τοποθετήθηκαν σε πλωτήρα που είχε εφαρμοστεί σε δοχείο που περιείχε θρεπτικό διάλυμα (2mM Ca(NO₃)₂·4H₂O, 5mM KNO₃, 2.5mM KH₂PO₄, 2mM MgSO₄, 20 mg/l Fe-EDTA, 5.4 mg/l H₃BO₄, 1.7 mg/l MnCl₂, 161 μg/l ZnSO₄, 80 μg/l CuSO₄, 44 μg/l NaMo₇O₄, 650 μg/l NaCl, 13 μg/l CoCl₂) (Sang-Woo Lee, προσωπική επικοινωνία, Pennsylvania State University, USA). Τα φυτά *A. thaliana* αναπτύχθηκαν ασηπτικά σε επωαστικό θάλαμο στους 25 °C και φωτοπερίοδο 14 ωρών μέχρι την εμφάνιση των πρώτων πραγματικών φύλλων. Στη συνέχεια μέσα στο θρεπτικό διάλυμα τοποθετήθηκε αιώρημα κονιδίων του μύκητα *V. dahliae* (μετασχηματισμένου με *GFP*) έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 10⁷ κονίδια ανά ml. Μικροσκοπική παρατήρηση της διαδικασίας μόλυνσης πραγματοποιήθηκε μετά από 24, 48 και 72 ώρες. Τα φυτά τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες και η μικροσκοπική παρατήρηση έγινε σε μικροσκόπιο φθορισμού Carl Zeiss με τα κατάλληλα φίλτρα (498 nm διέγερση, 516 nm εκπομπή).

2.3.17 Προετοιμασία δειγμάτων για Microarrays και ανάλυση δεδομένων

Για τη μελέτη των γονιδίων που εμπλέκονται στην άμυνα των μεταλλαγμένων φυτών *etr1-1* κατά την αλληλεπίδρασή τους με τον μύκητα *V. dahliae* πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA (παράγραφος 2.3.6) από φυτά αγρίου τύπου και *etr1-1* έξι μέρες μετά την μόλυνσή τους με το μύκητα *V. dahliae* (παράγραφος 2.3.3). Απομόνωση RNA πραγματοποιήθηκε και από φυτά μάρτυρες στα οποία δεν είχε εφαρμοστεί ο μύκητας, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν σαν δείγματα αναφοράς με βάση τα οποία έγινε η σύγκριση της έκφρασης των γονιδίων. Το RNA στάλθηκε στην εταιρεία DNA Vision S. A. (Charleroi, Belgium) για περαιτέρω επεξεργασία. Το RNA

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΤΟ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ ΚΑΙ Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΜΥΝΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

υβριδίστηκε πάνω στο Affymetrix GeneChip Arabidopsis ATH1 Genome Array (Affymetrix, Inc. Santa Clara, CA, U.S.A.) το οποίο περιέχει μια σειρά από περισσότερα από 22.500 ανιχνευτές (probes) οι οποίοι αντιπροσωπεύουν περίπου 24.000 αλληλουχίες γονιδίων. Η προετοιμασία των ανιχνευτών, ο υβριδισμός στο GeneChip, τα πλυσίματα και η ανάγνωση των σημάτων πραγματοποιήθηκαν στην εταιρεία DNA Vision S.A. (Charleroi, Belgium) ακολουθώντας τις πρότυπες διαδικασίες της Affymetrix.

Για τον εντοπισμό γονιδίων από τα αποτελέσματα έκφρασης των μικροσυστοιχιών που θα επιλέγονταν για περαιτέρω επεξεργασία χρησιμοποιήθηκε η μακροεντολή (macro) FiRe (Garcion et al., 2006). Η επιλογή των υποψήφιων γονιδίων βασίστηκε στο βαθμό επαγωγής τους μετά την εφαρμογή του μύκητα *V. dahliae* σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες. Γονίδια που έδειξαν να επάγονται τουλάχιστον 2 φορές στα *etr1-1* και όχι στα αγρίου τύπου φυτά επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση με την χρήση της Real-time PCR.

2.3.18 Εφαρμογή PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR)

Οι αντιδράσεις Real-time PCR πραγματοποιήθηκαν στο θερμοκυκλοποιητή Mx3005P™ (Stratagene) χρησιμοποιώντας τα αντιδραστήρια (QIAGEN). Σε κάθε σωλήνα αντίδρασης προστέθηκαν 100 ng ολικού DNA από τους ιστούς του υπέργειου τμήματος των φυτών *A. thaliana* ή 1 μl cDNA. Οι αντιδράσεις εκτελέστηκαν με τα αντιδραστήρια και τις αναλογίες όπως συνιστά η εταιρεία QIAGEN (QuantiFast™ SYBR® Green PCR kit):

Αντιδραστήρια	Όγκος σε μl	Συγκέντρωση πυκνού δ/τος (stock)
RNase free H ₂ O	Έως τα 25 μl	
Ανοδικός εκκινητής	1	25μM
Καθοδικός εκκινητής	1	25μM
2X QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix	12.5	-
DNA ή cDNA	1	100 ng/μl
Τελικός όγκος αντίδρασης	25	

Τόσο για τη ποσοτικοποίηση των μυκήτων *V. dahliae* και *F. oxysporum* f. sp. *raphani* όσο και για τον προσδιορισμό έκφρασης των γονιδίων, το πρόγραμμα θερμοκρασιών που χρησιμοποιήθηκε στις αντιδράσεις Real-time PCR περιελάμβανε τα εξής στάδια: 1. Αρχικό βήμα ενεργοποίησης της HotStarTaq Plus DNA πολυμεράσης για 5 λεπτά στους 95°C, 2. 40 κύκλοι που στον κάθε ένα πραγματοποιούνταν αποδιάταξη του DNA ή cDNA για 10 δευτερόλεπτα και

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΤΟ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ ΚΑΙ Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΜΥΝΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

ακολουθώς συνδυασμένος υβριδισμός και επέκταση για 30 δευτερόλεπτα στους 60 °C, 3. Στον τελευταίο κύκλο της αντίδρασης μετά από 1 λεπτό στους 95 °C και 30 δευτερόλεπτα στους 60 °C πραγματοποιούνταν σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας κατά 0.5 °C κάθε 30 δευτερόλεπτα μέχρι τους 95 °C προκειμένου να διαχωριστούν τα πιθανά διμερή που σχηματίζουν οι εκκινητές ή άλλα μη εξειδικευμένα προϊόντα. Για τη ποσοτικοποίηση του DNA των μυκήτων στις επιμέρους αντιδράσεις, ως πρότυπα δείγματα (γνωστών συγκεντρώσεων) χρησιμοποιήθηκαν πλασμίδια στα οποία είχε εισαχθεί το γονίδιο ενδιαφέροντος (τμήμα της υπομονάδας 5.8S rRNA του *V. dahliae* και τμήμα του γονιδίου *PG5* του *F. oxysporum* f. sp. *raphani*). Η συγκέντρωση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων προσδιορίστηκε σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους ορατού (Helios Gamma & Delta, Spectronic Unicam, Cambridge, UK) με τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων στα 260 και 280 nm. Δείγματα γνωστών συγκεντρώσεων από τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια (10 ng, 1 ng, 100 pg, ..., 1 fg/25 μl αντίδρασης) χρησιμοποιήθηκαν για τη χάραξη της πρότυπης ευθείας βάσης της οποίας έγινε η ποσοτικοποίηση του DNA των παθογόνων στα άγνωστα δείγματα.

Για να διασφαλιστεί η ακρίβεια των μετρήσεων του φωτομέτρου που χρησιμοποιήθηκε ώστε να προσδιοριστούν οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων ολικού DNA από τους ιστούς σχεδιάστηκε ζεύγος εκκινητών πάνω στο γονίδιο της $\alpha 2$ -τουμπουλίνης του φυτού *A. thaliana*. (Πίνακας 2.3.1) το οποίο ενισχύει προϊόν μήκους 692 ζευγών βάσεων. Η ποσοτικοποίηση της $\alpha 2$ -τουμπουλίνης πραγματοποιούνταν στην ίδια αντίδραση με τα αντίστοιχα δείγματα ποσοτικοποίησης του κάθε μύκητα αντίστοιχα με βάση την τιμή του οριακού κύκλου (threshold cycle, Ct). Πριν την ανάλυση των αποτελεσμάτων ποσοτικοποίησης των μυκήτων γινόταν έλεγχος της τιμής Ct της $\alpha 2$ -τουμπουλίνης ώστε να εξαιρεθούν από την ανάλυση τα δείγματα που διέφεραν περισσότερο από 0.5 ως προς τον μέσο όρο Ct. Με αυτό τον τρόπο διασφαλίστηκε ότι οι αρχικές ποσότητες ολικού DNA οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγείο για το προσδιορισμό των παθογόνων σε όλες τις επιμέρους επεμβάσεις είναι παρόμοιες, και καθιστούν δυνατή τη σύγκριση των αποτελεσμάτων ποσοτικοποίησης των μυκήτων.

Στα πειράματα ελέγχου του επιπέδου έκφρασης γονιδίων στα φυτά *A. thaliana* μετά την εφαρμογή του *V. dahliae*, η αποδοτικότητα (efficiency, E) για το κάθε ενισχυμένο προϊόν υπολογίστηκε με τη μέθοδο της γραμμικής παλινδρόμησης πάνω στα δεδομένα του λογάριθμου φθορισμού ανά κύκλο, με τη χρήση του λογισμικού LinRegPCR (Remakers et al., 2003). Η ενίσχυση της $\alpha 2$ -τουμπουλίνης πραγματοποιήθηκε με τους ίδιους εκκινητές όπως στην περίπτωση της

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΤΟ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ ΚΑΙ Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΜΥΝΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

ποσοτικοποίησης των μυκήτων (Πίνακας 2.3.1) που, λόγω του ότι σε αυτές τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν cDNA, ενίσχυαν 230 ζεύγη βάσεων. Η $\alpha 2$ -τουμπουλίνη χρησιμοποιήθηκε σαν εσωτερική σταθερά για την κανονικοποίηση μικρών διαφορών στις αρχικές ποσότητες cDNA. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε η τιμή του μέσου όρου του οριακού κύκλου (threshold cycle, Ct) για κάθε γονίδιο υπό εξέταση με βάση τρία ανεξάρτητα βιολογικά δείγματα. Ο λόγος του επιπέδου mRNA στην κάθε επέμβαση προς τις τιμές του mRNA στα φυτά μάρτυρες, υπολογίστηκε με τη μέθοδο DCt $[(1+E)^{-DCt}]$ (Pfaffl, 2001) ως εξής: 1. υπολογίστηκε ο μέσος όρος Ct από κάθε τρία βιολογικά δείγματα για κάθε επέμβαση. 2. Οι τιμές Ct της $\alpha 2$ -τουμπουλίνης αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές Ct της επέμβασης (DCt). 3. Τα επίπεδα έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων προέκυψαν από την εξίσωση $(1+E)^{-DCt}$ (όπου E είναι η αποδοτικότητα για το κάθε ενισχυμένο προϊόν).

Οι τιμές των κύκλων (Ct) όπου οι καμπύλες των δειγμάτων προσέγγιζαν τη βασική γραμμή (CI) εκτιμήθηκαν από το φθορισμό της χρωστικής SYBR Green με τη χρήση του λογισμικού MxPro (Stratagene).

2.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.4.1 Η αδυναμία πρόσληψης αιθυλενίου μέσω του υποδοχέα ETR1 μειώνει τα συμπτώματα που προκαλούν οι μύκητες *V. dahliae* και *F. oxysporum* f. sp. *raphani* σε φυτά *A. thaliana*

Για να διερευνηθεί ο ρόλος των γονιδίων *NahG*, *npr1-1*, *pad3-1*, *pad4-1*, *sid2*, *eds5/sid1*, *jar1-1*, *etr1-1*, *ein2-1*, *ein3-1*, *ein4* και *ein5-1* στην άμυνα των φυτών *A. thaliana* εναντίον των μυκήτων *V. dahliae* και *F. oxysporum* f. sp. *raphani* πραγματοποιήθηκαν δοκιμές παθογένειας σε μια σειρά μεταλλαγμένων και διαγονιδιακών φυτών *A. thaliana* με απενεργοποιημένα τα παραπάνω γονίδια, με στελέχη των μυκήτων όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.3.

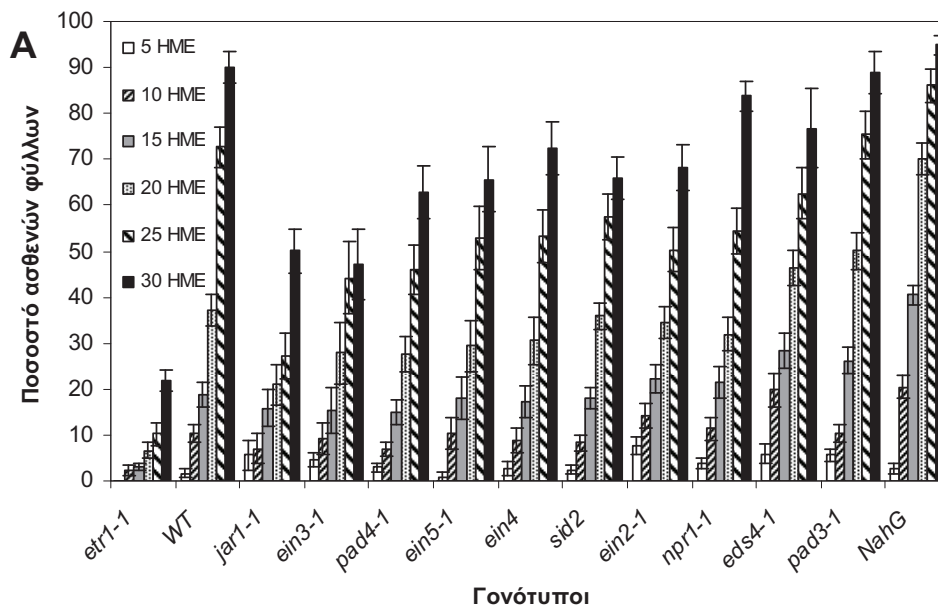
Τα πρώτα συμπτώματα του *V. dahliae* εμφανίστηκαν με τη μορφή της μάρανσης και χλώρωσης ιδιαίτερα στα παλαιότερα φύλλα, 5 ημέρες μετά την εφαρμογή του *V. dahliae* στα φυτά (Εικόνα 2.4.1). Τα συμπτώματα καταγράφηκαν μέχρι τις 30 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα. Η ένταση της ασθένειας εξελίχθηκε ταχέως σε όλους τους γονότυπους εκτός από τα φυτά *etr1-1* τα οποία εκδήλωσαν ηπιότερα συμπτώματα και πιο αργή εξέλιξη της ασθένειας (Εικόνα 2.4.2 Α και Β). Στις 30 ημέρες μετά την εφαρμογή του παθογόνου, η εμφάνιση της ασθένειας (ποσοστό φυτών με τυπικά συμπτώματα) στα *etr1-1* φυτά ήταν 93% και η σοβαρότητα της ασθένειας (ποσοστό ασθενών φύλλων σε σχέση με το συνολικό αριθμό των φύλλων) ήταν 22%, ενώ στους άλλους γονότυπους η εμφάνιση της ασθένειας κυμάνθηκε από 82% έως 100% και η σοβαρότητα της ασθένειας από 50 έως 95% (Εικόνα 2.4.2 Α). Όταν η εξέλιξη της ασθένειας εκφράστηκε σε ποσοστό ασθένειας βάση AUDPC (παράγραφος 2.3.3), βρέθηκε ότι στα *etr1-1* φυτά η ασθένεια ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη από τα αγρίου τύπου και τα υπόλοιπα μεταλλαγμένα φυτά για όλη την διάρκεια του πειράματος. Η σχετική AUDPC στα *etr1-1* φυτά ήταν 5.5% ενώ στους υπόλοιπους γονότυπους κυμάνθηκε από 21 έως 43.5% (Εικόνα 2.4.2 Β).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΤΟ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ ΚΑΙ Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΜΥΝΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

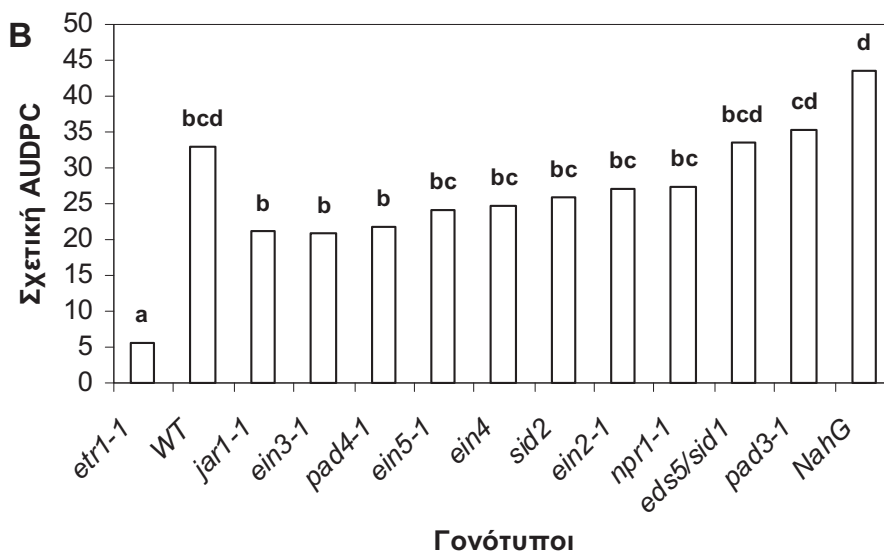


Εικόνα 2.4.1: Πείραμα παθογένειας του μύκητα *V. dahliae* με μεταλλαγμένα φυτά *A. thaliana*. Τα *etr1-1*, *ein2-1*, *ein3-1*, *ein4*, *ein5-1*, *jar1-1*, *pad3-1*, *pad4-1*, *sid2*, *npr1-1*, *NahG*, *eds5/sid1* καθώς και το αντίστοιχο αγρίου τύπου Col-0 μολύνθηκαν με τον *V. dahliae*. Στην εικόνα φαίνονται αντιπροσωπευτικά φυτά μολυσμένα με το μύκητα σε σχέση με τον αμόλυντο μάρτυρα, 20 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα. Τα *etr1-1* φυτά παρουσίασαν μειωμένα συμπτώματα, μικρότερου βαθμού μάρανση, χλώρωση, ανόσχεση της ανάπτυξης και νέκρωση σε σχέση με το Col-0 και όλα τα υπόλοιπα μεταλλαγμένα φυτά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΤΟ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ ΚΑΙ Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΜΥΝΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ



Εικόνα 2.4.2: (Α) Ποσοστό ασθενών φύλλων στα φυτά *Arabidopsis thaliana* μετά την εφαρμογή του μύκητα *Verticillium dahliae*. Η ένταση της ασθένειας υπολογίστηκε για κάθε μέρα καταγραφής των συμπτωμάτων ως ποσοστό (%) του αριθμού των ασθενών φύλλων ως προς τον συνολικό αριθμό των φύλλων για κάθε φυτό. Για τον κάθε γονότυπο χρησιμοποιήθηκαν 15 φυτά και τα πειράματα επαναλήφθηκαν 3 φορές. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 45 φυτών και οι κάθετες ράβδοι αντιπροσωπεύουν την απόκλιση από το μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα. *HME: Ημέρες μετά την εφαρμογή του *V. dahliae*



Εικόνα 2.4.2: (Β) Οι τιμές της ασθένειας αναπαραστάθηκαν γραφικά στην εξέλιξη του χρόνου για τη δημιουργία καμπύλης της εξέλιξης της ασθένειας. Ακολούθως υπολογίστηκε το εμβαδόν κάτω από τη καμπύλη εξέλιξης της ασθένειας (AUDPC) με τη μέθοδο της τραπεζοειδούς ολοκλήρωσης (Campbell και Madden, 1990) και η ασθένεια εκφράστηκε ως το ποσοστό του μέγιστου εμβαδού για όλη τη διάρκεια του πειράματος, που αναφέρεται ως σχετική AUDPC (Korolev et al., 2001). Οι στήλες που συνοδεύονται από διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά σε επίπεδο σημαντικότητας ($P \leq 0.05$). Οι μέσοι όροι διαχωρίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο πολλαπλών δοκιμών κατά Tukey.

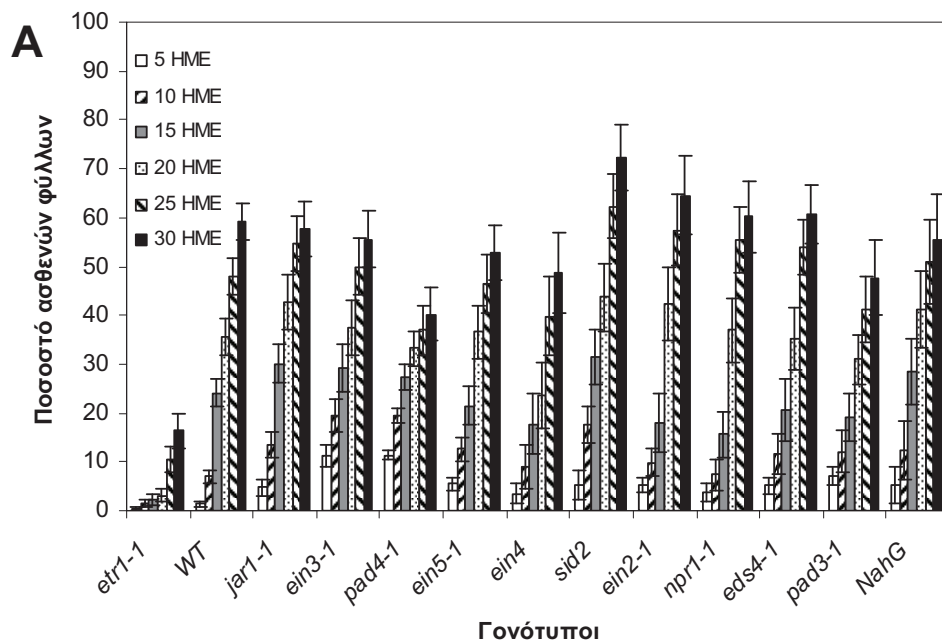
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΤΟ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ ΚΑΙ Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΜΥΝΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με το μύκητα *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* τα πρώτα συμπτώματα εμφανίστηκαν σε όλους τους γονοτύπους φυτών, 5 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα. Τυπικά συμπτώματα χλώρωσης και μάρανσης παρουσιάστηκαν κυρίως στα παλαιότερα φύλλα των φυτών και τα συμπτώματα καταγράφηκαν για 30 ημέρες (Εικόνα 2.4.3). Τα φυτά *etr1-1* επέδειξαν παρόμοια συμπεριφορά όπως και με το μύκητα *V. dahliae*. Την 30^η ημέρα μετά την εφαρμογή του μύκητα η εμφάνιση της ασθένειας στα *etr1-1* φυτά ήταν 52% και η σοβαρότητα της ασθένειας 16.4%, ενώ στους άλλους γονοτύπους η ασθένεια παρουσιάστηκε σε ποσοστό από 67 έως 96% και η ένταση της ασθένειας κυμάνθηκε από 40 έως 72%. (Εικόνα 2.4.4 Α). Η σχετική AUDPC ήταν 4.3% στα *etr1-1* φυτά καθώς στους άλλους γονοτύπους κυμάνθηκε από 19.7 έως 32.7% (Εικόνα 2.4.4 Β), επιδεικνύοντας έτσι ότι τα φυτά *etr1-1* είχαν στατιστικά λιγότερη ασθένεια καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα μεταλλαγμένα φυτά και τα φυτά αγρίου τύπου.

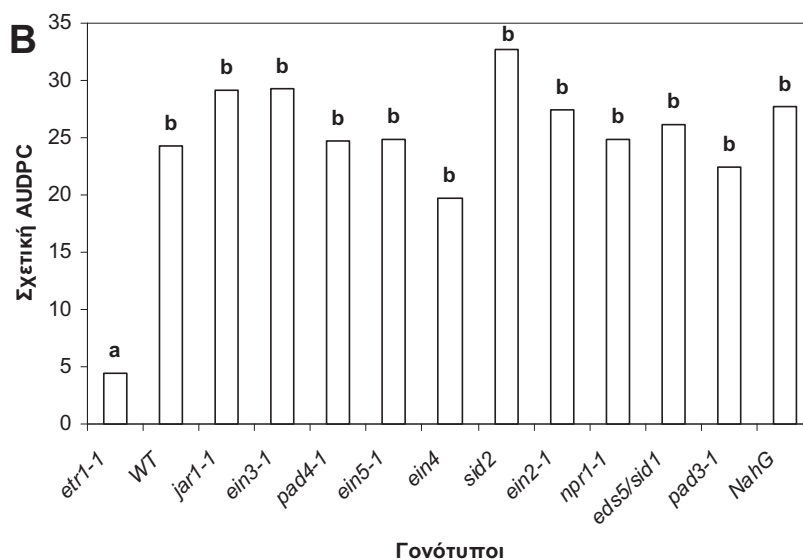


Εικόνα 2.4.3: Πείραμα παθογένειας του μύκητα *F. oxysporum* f. sp. *raphani* με μεταλλαγμένα φυτά *A. thaliana*. Τα *etr1-1*, *ein2-1*, *ein3-1*, *ein4*, *ein5-1*, *jar1-1*, *pad3-1*, *pad4-1*, *sid2*, *npr1-1*, *NahG*, *eds5/sid1* καθώς και το αντίστοιχο αγρίου τύπου Col-0 μολύνθηκαν με τον *F. oxysporum* f. sp. *raphani*. Στην εικόνα φαίνονται αριστερά αντιπροσωπευτικά φυτά μολυσμένα με το μύκητα και δεξιά ο αμόλυντος μάρτυρας, 20 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα. Τα *etr1-1* φυτά παρουσίασαν μειωμένα συμπτώματα, μικρότερου βαθμού μάρανση, χλώρωση, ανάσχεση της ανάπτυξης και νέκρωση σε σχέση με το Col-0 και όλα τα υπόλοιπα μεταλλαγμένα φυτά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΤΟ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ ΚΑΙ Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΜΥΝΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ



Εικόνα 2.4.4: (Α) Ποσοστό ασθενών φύλλων στα φυτά *Arabidopsis thaliana* μετά την εφαρμογή του μύκητα *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*. Η ένταση της ασθένειας υπολογίστηκε για κάθε μέρα καταγραφής των συμπτωμάτων ως ποσοστό (%) του αριθμού των ασθενών φύλλων ως προς τον συνολικό αριθμό των φύλλων για κάθε φυτό. Για τον κάθε γονότυπο χρησιμοποιήθηκαν 15 φυτά και τα πειράματα επαναλήφθηκαν 3 φορές. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 45 φυτών και οι κάθετες ράβδοι αντιπροσωπεύουν την απόκλιση από το μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα. *HME: Ημέρες μετά την εφαρμογή του *V. dahliae*

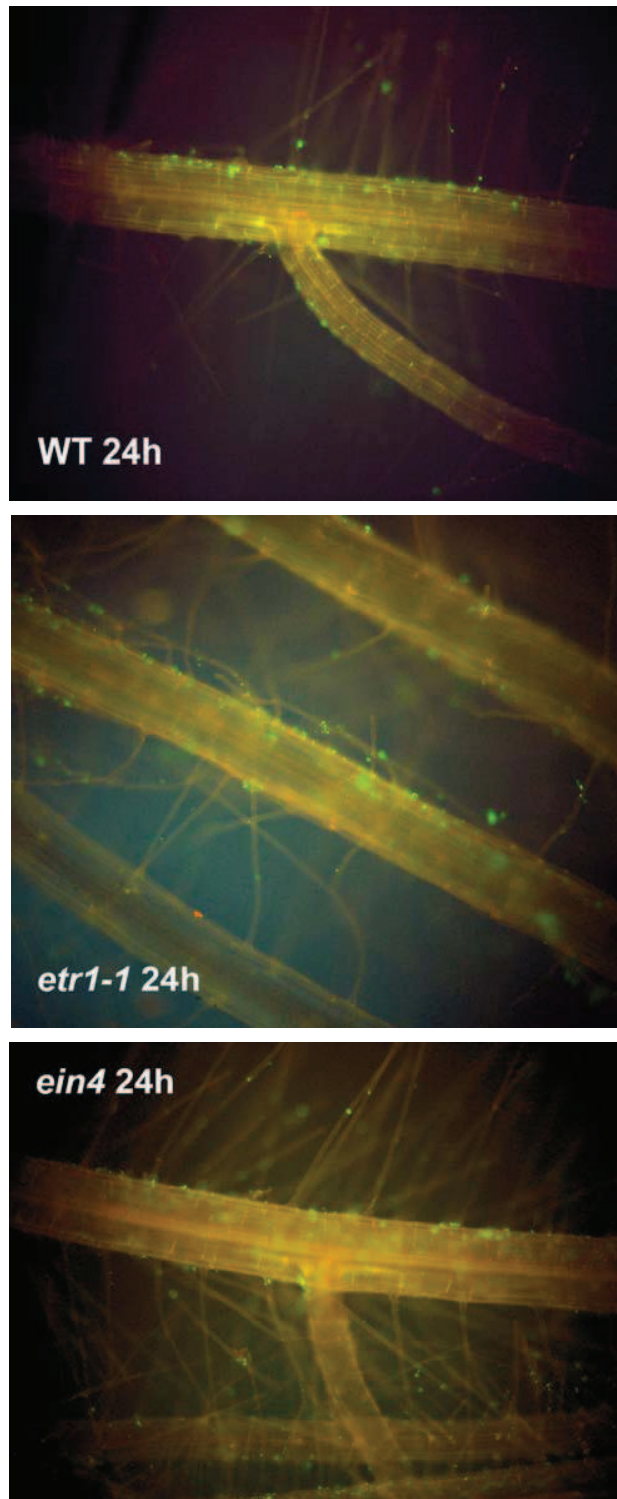


Εικόνα 2.4.4: (Β) Οι τιμές της ασθένειας αναπαραστάθηκαν γραφικά στην εξέλιξη του χρόνου για τη δημιουργία καμπύλης της εξέλιξης της ασθένειας. Ακολούθως υπολογίστηκε το εμβαδόν κάτω από τη καμπύλη εξέλιξης της ασθένειας (AUDPC) με τη μέθοδο της τραπεζοειδούς ολοκλήρωσης (Campbell και Madden, 1990) και η ασθένεια εκφράστηκε ως το ποσοστό του μέγιστου εμβαδού για όλη τη διάρκεια του πειράματος, που αναφέρεται ως σχετική AUDPC (Korolev et al., 2001). Οι στήλες που συνοδεύονται από διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά με επίπεδο σημαντικότητας ($P \leq 0.05$). Οι μέσοι όροι διαχωρίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο πολλαπλών δοκιμών κατά Tukey.

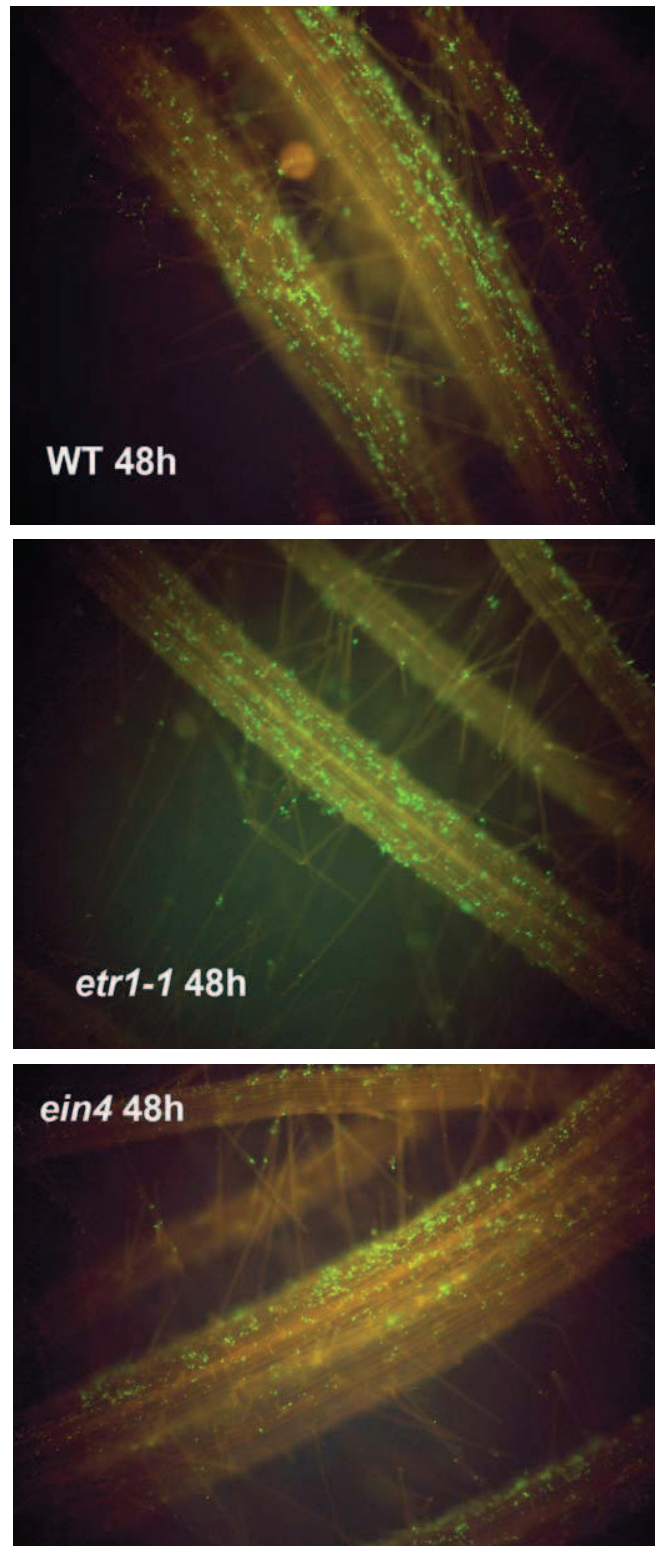
Από τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων φαίνεται ότι το γονίδιο *etr1-1* που κωδικοποιεί έναν από τους υποδοχείς του αιθυλενίου και εμπλέκεται στην πρόσληψη και μετάδοση του σήματος του, παίζει σημαντικό ρόλο στην ασθένεια που προκαλούν οι μύκητες *V. dahliae* και *F. oxysporum* f. sp. *raphani*. Συγκεκριμένα η αδυναμία πρόσληψης αιθυλενίου στα φυτά *A. thaliana* μέσω του υποδοχέα ETR1, λόγω απενεργοποίησης του γονιδίου που τον κωδικοποιεί, είχε σαν αποτέλεσμα τα φυτά να εκδηλώνουν μικρότερα ποσοστά ασθένειας.

2.4.2 Ιστοπαθολογική παρατήρηση της διαδικασίας μόλυνσης σε φυτά *A. thaliana*

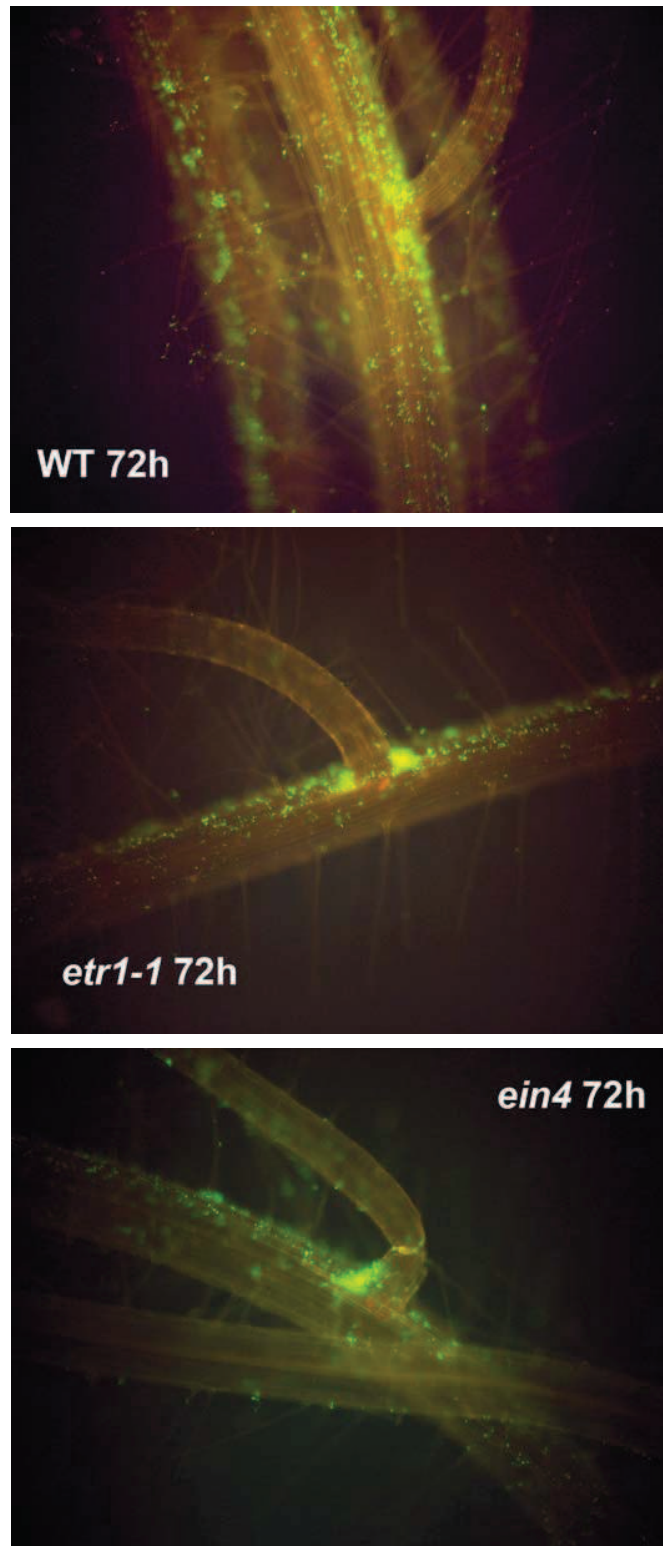
Για την ιστοπαθολογική μελέτη του ρόλου των γονιδίων *etr1-1* και *ein4* στην διαδικασία μόλυνσης, το στέλεχος *V. dahliae* που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα παθογένειας μετασχηματίστηκε με το γονίδιο *gfp* (όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.14) και αιώρημα κονιδίων του μύκητα εφαρμόστηκε μέσα στο θρεπτικό διάλυμα του υδροπονικού συστήματος καλλιέργειας έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 10^7 κονίδια ανά ml. Ακολούθησε μικροσκοπική παρατήρηση της αλληλεπίδρασης του μύκητα με τα μεταλλαγμένα φυτά *etr1-1* και *ein4* καθώς και με φυτά αγρίου τύπου *A. thaliana* με διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.15. Η παρακολούθηση της αλληλεπίδρασης πραγματοποιήθηκε σε αντικειμενοφόρους πλάκες 24, 48 και 72 ώρες μετά την μόλυνση σε μικροσκόπιο UV (Εικόνα 2.4.5 Α, Β και Γ).



Εικόνα 2.4.5 Α: Μικροσκοπική παρατήρηση αποικισμού ριζών του φυτού *Arabidopsis thaliana* από το μύκητα *V. dahliae GFP* 24 ώρες μετά τη μόλυνση. Κονίδια του *V. dahliae GFP* έχουν εγκατασταθεί πάνω στη ρίζα των φυτών Col-0 (WT) (πάνω), *etr1-1* (κέντρο) και *ein4* (κάτω).



Εικόνα 2.4.5 Β: Μικροσκοπική παρατήρηση αποικισμού ριζών του φυτού *Arabidopsis thaliana* από το μύκητα *V. dahliae GFP* 48 ώρες μετά τη μόλυνση. Κονίδια του *V. dahliae GFP* φαίνεται να έχουν εγκατασταθεί σε όλη την επιφάνεια της ρίζας των φυτών Col-0 (WT) (**πάνω**), *etr1-1* (**κέντρο**) και *ein4* (**κάτω**).



Εικόνα 2.4.5 Γ: Μικροσκοπική παρατήρηση αποικισμού ριζών του φυτού *Arabidopsis thaliana* από το μύκητα *V. dahliae GFP* 72 ώρες μετά τη μόλυνση. Μεγάλος αριθμός κονιδίων του *V. dahliae GFP* έχουν συγκεντρωθεί στα σημεία έκπτυξης των δευτερευουσών ριζών των φυτών Col-0 (WT) (**πάνω**), *etr1-1* (**κέντρο**) και *ein4* (**κάτω**).

Πιο αναλυτικά, 24 ώρες μετά την μόλυνση τα σπόρια του μύκητα είχαν αρχίσει να προσκολλούνται στην επιφάνεια των ριζών των φυτών Col-0 (WT), *etr1-1* και *ein4*. Στις 48 ώρες τα σπόρια του μύκητα είχαν προσκολληθεί σε όλη σχεδόν την επιφάνεια του ριζικού συστήματος των φυτών χωρίς να είναι διακριτή μια μεγαλύτερη συγκέντρωση σπορίων σε κάποιο από τους τρεις γονότυπους. Στις 72 ώρες μετά τη μόλυνση διαπιστώθηκε συγκέντρωση των σπορίων στα σημεία έκπτυξης των δευτερευουσών ριζών των φυτών.

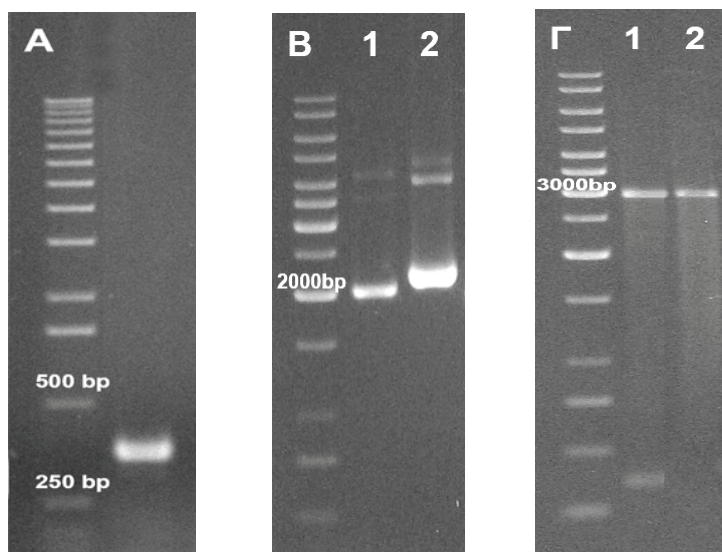
Από το παραπάνω πείραμα φαίνεται ότι δεν υπάρχει μικρότερη πρόσφυση/συγγένεια των σπορίων του μύκητα στα *etr1-1* φυτά, γεγονός που θα μπορούσε να εξηγήσει σε ένα βαθμό το μικρότερο ποσοστό ασθενών φύλλων στα φυτά αυτά. Τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού αποτέλεσαν μια ακόμα ένδειξη ότι στα *etr1-1* φυτά ήταν πιθανόν να επάγονται μηχανισμοί άμυνας που παρεμποδίζουν την είσοδο του μύκητα ή αναστέλλουν την περαιτέρω ανάπτυξη του μετά την είσοδό του σε αυτά.

2.4.3 Ποσοτικοποίηση των μυκήτων *V. dahliae* και *F. oxysporum* f. sp. *raphani* σε φυτά *A. thaliana* με Real-time PCR

Τα δεδομένα από τα πειράματα παθογένειας έδειξαν ότι μόνο τα *etr1-1* φυτά είχαν προσβληθεί λιγότερο από τα παθογόνα ανάμεσα σε όλα τα μεταλλαγμένα φυτά και τα αγρίου τύπου φυτά που χρησιμοποιήθηκαν. Επίσης, μετά τα πειράματα ιστοπαθολογικής παρατήρησης των πρώτων σταδίων μόλυνσης του μύκητα *V. dahliae* σε φυτά *A. thaliana* διαπιστώθηκε ότι δεν υπήρξε μειωμένη πρόσφυση των κονιδίων του μύκητα στις ρίζες των φυτών *etr1-1*. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, οι προσπάθειες εστιάστηκαν στην περαιτέρω εξέταση της αλληλεπίδρασης του *V. dahliae* με τα μεταλλαγμένα φυτά που δεν αντιλαμβάνονται το αιθυλένιο. Για να διαπιστωθεί εάν τα μειωμένα συμπτώματα των φυτών *etr1-1* και η αδυναμία πρόσληψης αιθυλενίου μέσω του υποδοχέα ETR1 επηρεάζουν την ανάπτυξη και την αποίκιση του παθογόνου στους αγγειακούς ιστούς των φυτών, φυτά αγρίου τύπου (Col-0) και μεταλλαγμένα στο μονοπάτι του αιθυλενίου (*etr1-1*, *ein2-1*, *ein3-1*, *ein4* και *ein5-1*) μολύνθηκαν με *V. dahliae* και η βιομάζα του παθογόνου υπολογίστηκε για κάθε γονότυπο με Real-time quantitative PCR (qPCR). Σε αυτά τα πειράματα συμπεριλήφθηκαν όλα τα μεταλλαγμένα φυτά που δεν αντιλαμβάνονται το αιθυλένιο σε μια προσπάθεια να αποκτηθούν πληροφορίες για το κάθε στοιχείο του μονοπατιού αντίληψης του αιθυλενίου και για να διερευνηθεί το κατά πόσο τα συμπτώματα της ασθένειας σχετίζονται με την ποσότητα του παθογόνου στους αγγειακούς ιστούς των φυτών.

2.4.3.1 Ενίσχυση με PCR και κλωνοποίηση των γονιδίων 5.8S rRNA και PG5

Για τη δημιουργία ανασυνδυασμένων πλασμιδίων με τμήματα από τα γονίδια 5.8s rRNA και PG5 των μυκήτων *V. dahliae* και *F. oxysporum f. sp. raphani*, αντίστοιχα που χρησιμοποιήθηκαν για τη ποσοτικοποίηση των μυκήτων στις αντιδράσεις Real-time PCR, αρχικά ενισχύθηκαν με PCR τα εν λόγω τμήματα, κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pGEM-T και η επιτυχία κλωνοποίησης επιβεβαιώθηκε με πέψη των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων με επιλεγμένα ένζυμα. Το τμήμα 347 βάσεων της υπομονάδας 5.8S rRNA γονιδίου ενισχύθηκε με αντίδραση PCR σε γονιδιακό DNA του μύκητα *V. dahliae*, εφαρμόζοντας θερμοκρασία υβριδισμού 60 °C, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές που σχεδιάστηκαν όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.4. Στη συνέχεια το τμήμα αυτό (Εικόνα 2.4.6A) κλωνοποιήθηκε στο φορέα pGEM-T και η παρουσία του αναμενόμενου μεγέθους τμήματος ελέγχθηκε με απομόνωση (Εικόνα 2.4.6B) και στη συνέχεια πέψη του πλασμιδιακού DNA με τα ένζυμα *Pst*I και *Nco*I (Εικόνα 2.4.6Γ) που απελευθερώνουν το ένθετο τμήμα των 347 βάσεων.

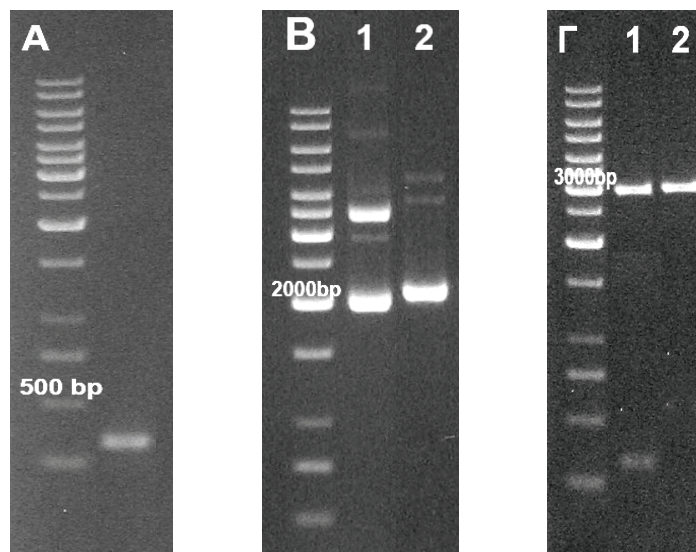


Εικόνα 2.4.6: Ενίσχυση τμήματος της υπομονάδας 5.8S rRNA του *Verticillium dahliae* **A)** Ενίσχυση του τμήματος 347 βάσεων του γονιδίου 5.8S rRNA, εφαρμόζοντας PCR σε γονιδιακό DNA του μύκητα **B)** Ηλεκτροφόρηση του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε από το φορέα pGEM-T (διαδρομή 1) και από τον κλώνο pGEM-T:Vd που φέρει το γονίδιο 5.8S rRNA (διαδρομή 2) **Γ)** Πέψη των φορέων pGEM-T-Vd (διαδρομή 1) και pGEM-T (διαδρομή 2) με τα περιοριστικά ένζυμα *Pst*I/*Nco*I, για τον καθορισμό του μεγέθους του κλωνοποιημένου τμήματος.

Για την ενίσχυση του γονιδίου της ενδοπολυγαλακτουρονάσης (PG5) στο μύκητα *F. oxysporum f. sp. raphani*, πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR με τους

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΤΟ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ ΚΑΙ Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΜΥΝΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

εκκινητές που αναφέρονται στην παράγραφο 2.3.1.1 σε θερμοκρασία υβριδισμού 58 °C. Ενισχύθηκε το αναμενόμενο τμήμα των 331 ζευγών βάσεων (2.4.7A) το οποίο στη συνέχεια κλωνοποιήθηκε στο φορέα pGEM-T και η παρουσία του αναμενόμενου μεγέθους τμήματος ελέγχθηκε με απομόνωση (Εικόνα 2.4.7B) και στη συνέχεια πέψη του πλασμιδιακού DNA με τα ένζυμα *Pst*I και *Nco*I (Εικόνα 2.4.7Γ).



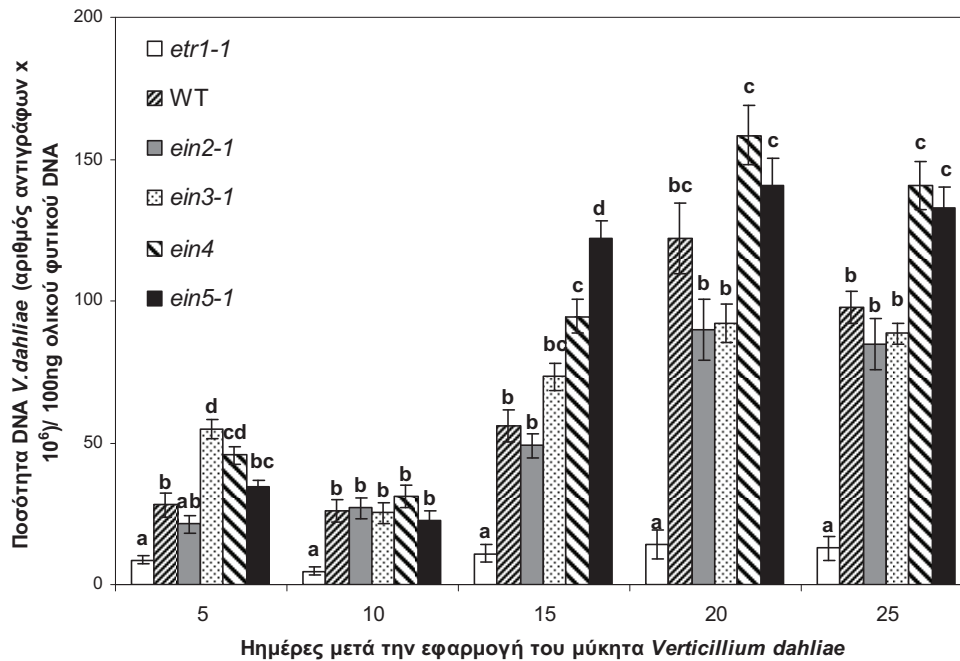
Εικόνα 2.4.7: Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *PG5* του *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* **A)** Ενίσχυση του τμήματος 331 βάσεων του γονιδίου *PG5*, εφαρμόζοντας PCR σε γονιδιακό DNA του μύκητα **B)** Ηλεκτροφόρηση του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε από το φορέα pGEM-T (διαδρομή 1) και από τον κλώνο pGEM-T:Fox που φέρει το γονίδιο *PG5* (διαδρομή 2) **Γ)** Πέψη των φορέων pGEM-T-Fox (διαδρομή 1) και pGEM-T (διαδρομή 2) με τα περιοριστικά ένζυμα *Pst*I/*Nco*I, για τον καθορισμό του μεγέθους του κλωνοποιημένου τμήματος.

2.4.3.2 Εφαρμογή και ανάλυση αποτελεσμάτων *Real-time PCR*

Η *Real-time PCR* εφαρμόστηκε σε DNA από δείγματα φυτών στις 5, 10, 15, 20 και 25 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα *V. dahliae*. Η ανάλυση της *Real-time PCR* έδειξε ότι στις 5 ημέρες μετά την εφαρμογή του *V. dahliae* ο μύκητας είχε ήδη προσβάλει το αγγειακό σύστημα όλων των φυτών (Εικόνα 2.4.8). Η ποσότητα του μύκητα μειώθηκε στις 10 ημέρες εκτός από τα φυτά Col-0 και *ein2-1* και ακολούθως αυξήθηκε σταθερά μέχρι τις 25 ημέρες από την εφαρμογή του (Εικόνα 2.4.8). Το ίδιο μοτίβο αποίκησης παρατηρήθηκε σε όλους τους γονότυπους. Ωστόσο, στα φυτά *etr1-1* η βιομάζα του παθογόνου ήταν στατιστικά μικρότερη σε σχέση με τα υπόλοιπα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε χρονικό σημείο, εκτός τις 5 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα. (Εικόνα 2.4.8). Στις 10 ημέρες μετά την μόλυνση η ποσότητα του *V. dahliae* στα *etr1-1* φυτά ήταν τουλάχιστον 4.9 φορές μικρότερη από ότι στα υπόλοιπα φυτά, ενώ στις 15, 20 και 25 ημε η διαφορά κυμάνθηκε από 4.4 έως 6.6

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΤΟ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ ΚΑΙ Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΜΥΝΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

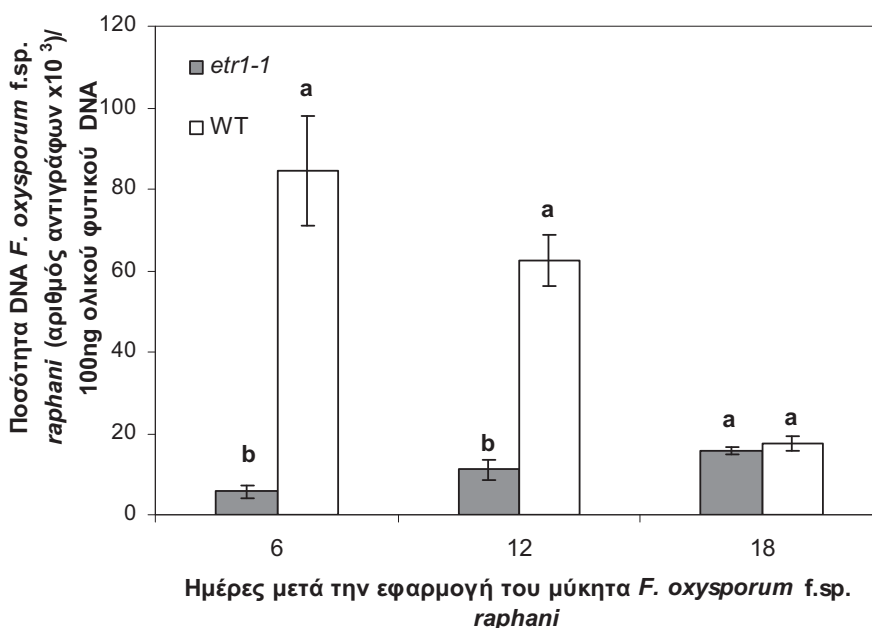
φορές. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η ποσότητα του *V. dahliae* στα *ein4* φυτά, που ήταν η άλλη σειρά μεταλλαγμένων φυτών σε υποδοχέα του αιθυλενίου, ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από ότι στα *etr1-1* φυτά σε κάθε χρονικό σημείο, και κυμάνθηκε από 5.2 στις 5 ημέρες έως 11.3 φορές στις 20 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα.



Εικόνα. 2.4.8: Ποσοτικοποίηση DNA του μύκητα *Verticillium dahliae* στα μεταλλαγμένα φυτά στο μονοπάτι του αιθυλενίου *etr1-1*, *ein2-1*, *ein3-1*, *ein4*, *ein5-1* και στα αγρίου τύπου Col-0 φυτά. Τα επίπεδα του DNA του μύκητα υπολογίστηκαν με Real-time PCR σε ολικό DNA που απομονώθηκε από το υπέργειο μέρος 10 φυτών ανά γονότυπο 5, 10, 15, 20 και 25 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα. Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές. Οι στήλες αναπαριστούν τους μέσους όρους από 30 φυτά και οι κάθετες ράβδοι αντιπροσωπεύουν την απόκλιση από το μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα. Για κάθε χρονικό σημείο δειγματοληψίας, οι στήλες που συνοδεύονται από διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά σύμφωνα με τη μέθοδο πολλαπλών δοκιμών κατά Tukey σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0.05$.

Για την περαιτέρω μελέτη του ρόλου του *ETR1* στην αλληλεπίδραση των φυτών *A. thaliana* με τα παθογόνα των αδρομυκώσεων, φυτά αγρίου τύπου (Col-0) και μεταλλαγμένα *etr1-1* φυτά μολύνθηκαν με *F. oxysporum* f. sp. *raphani* και πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση του παθογόνου με ποσοτική Real-time PCR στις 6, 12 και 18 ημέρες μετά την εφαρμογή του. Η ανάλυση της ποσοτικής PCR έδειξε ότι ο μύκητας είχε αποικήσει τα αγγεία και των δύο γονοτύπων στις 6 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα, αλλά το μοτίβο αποίκησης διέφερε κατά τη διάρκεια του πειράματος. Στις 6 ημέρες, η ποσότητα του παθογόνου έφτασε στη μέγιστη τιμή της στα αγρίου τύπου φυτά και ακολούθως μειώθηκε σταθερά μέχρι τις 18 ημέρες.

Αντιθέτως, η ποσότητα του παθογόνου στα *etr1-1* φυτά αυξήθηκε αργά από τις 6 έως τις 18 ημέρες. Ωστόσο, τα επίπεδα της βιομάζας του *F. oxysporum* f. sp. *raphani* στα *etr1-1* φυτά ήταν σημαντικά μικρότερα από τα αγρίου τύπου φυτά σε κάθε δειγματοληψία εκτός από τις 18 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα. Στις 6 ημέρες η ποσότητα του παθογόνου στα αγρίου τύπου φυτά ήταν 15 φορές περισσότερη από αυτήν στα *etr1-1* φυτά, ενώ στις 12 ημέρες η διαφορά ήταν 5.7 φορές (Εικόνα 2.4.9).



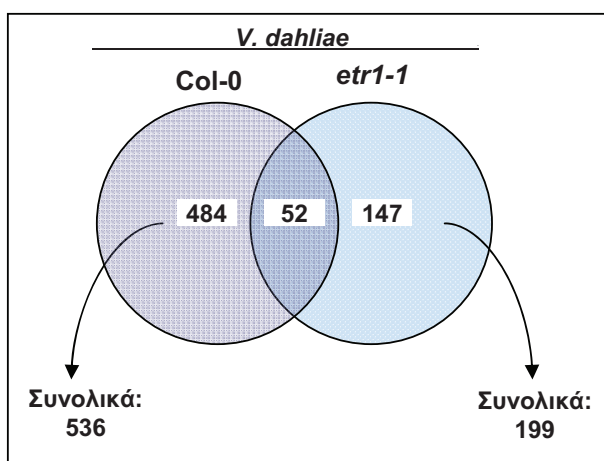
Εικόνα 2.4.9: Ποσοτικοποίηση DNA του μύκητα *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* στα μεταλλαγμένα φυτά στο μονοπάτι του αιθυλενίου *etr1-1* και στα αγρίου τύπου Col-0 φυτά. Τα επίπεδα του DNA του μύκητα υπολογίστηκαν με Real-time PCR σε ολικό DNA που απομονώθηκε από το υπέργειο μέρος 10 φυτών ανά γονότυπο 6, 12 και 18 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα. Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές. Οι στήλες αναπαριστούν τους μέσους όρους από 30 φυτά και οι κάθετες ράβδοι αντιπροσωπεύουν την απόκλιση από το μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα. Για κάθε ημέρα δειγματοληψίας, οι στήλες που συνοδεύονται από διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά σύμφωνα με τη στατιστική δοκιμασία *t-test* σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0.05$.

2.4.4 Μεταγραφικές μεταβολές σε φυτά WT και *etr1-1* *A. thaliana*, μετά από μόλυνση με τον μύκητα *V. dahliae*

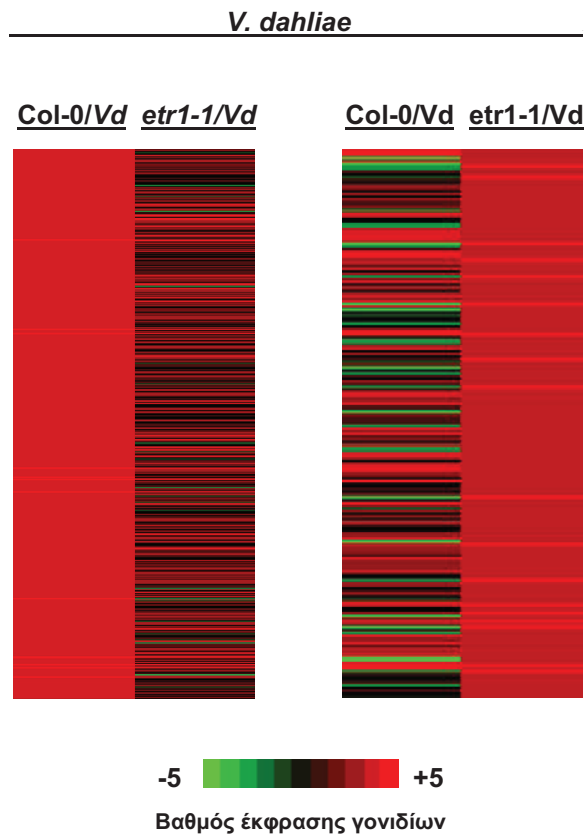
Τα αποτελέσματα των δοκιμών παθογένειας αλλά και τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης της βιομάζας των μυκήτων στους αγγειακούς ιστούς των φυτών έδειξαν ότι τα *etr1-1* φυτά είχαν αυξημένη ανθεκτικότητα στους μύκητες *V. dahliae* και *F. oxysporum* f. sp. *raphani* σε σχέση με τα άλλα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν. Τα λιγότερα συμπτώματα σε συνδυασμό με την μειωμένη βιομάζα των παθογόνων στα *etr1-1* φυτά υποδεικνύουν ότι ο φαινότυπος αυτός οφείλεται σε μηχανισμούς άμυνας που αναπτύσσονται στα φυτά αυτά. Η δυνατότητα αναγνώρισης γονιδίων που

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΤΟ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ ΚΑΙ Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΜΥΝΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

επάγονται στα *etr1-1* σε σχέση με τα αγρίου τύπου φυτά θα επεδείκνυε δυνητικά στοιχεία ανθεκτικότητας που διέπουν αυτό το γονότυπο. Γι αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών για τη διερεύνηση των μεταγραφικών μεταβολών στα αγρίου τύπου Col-0 και *etr1-1* φυτά μετά τη μόλυνση τους με το μύκητα *V. dahliae*. Απομονώθηκε RNA από αμόλυντα φυτά και από μολυσμένα φυτά 6 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα. Το RNA στάλθηκε στην εταιρεία DNA Vision (Charleroi, Belgium) όπου τοποθετήθηκε πάνω στο Arabidopsis ATH1 GeneChip (Affymetrix) το οποίο αντιπροσωπεύει περίπου 24000 γονίδια για να εξεταστεί το μεταγραφικό προφίλ των WT και *etr1-1* φυτών. Από τα αποτελέσματα αυτά και με τη χρήση του macro FiRe (Garcion et al., 2006) αναγνωρίστηκαν γονίδια που επάγονται (2 φορές τουλάχιστον) έξι ημέρες μετά από την εφαρμογή του *V. dahliae*, χρησιμοποιώντας ως αναφορά δείγματα που συλλέχθηκαν την ίδια μέρα αλλά που δεν εφαρμόστηκε ο μύκητας (Πίνακας 2.4.1). Στην αλληλεπίδραση *V. dahliae* - Col-0 ο αριθμός των γονιδίων που υπερεκφράστηκαν ήταν 536 (Εικόνα 2.4.10) ενώ την αλληλεπίδραση *V. dahliae* - *etr1-1* 149 (Εικόνα 2.4.10). Μια υποομάδα από 52 γονίδια βρέθηκε να υπερεκφράζονται και στις 2 αλληλεπιδράσεις (Εικόνα 2.4.10) ενώ 95 γονίδια υπερεκφράστηκαν περισσότερο από δυο φορές μόνο στα *etr1-1* φυτά (Εικόνα 2.4.10, Πίνακας 2.4.1). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι μεταγραφικές μεταβολές που επάχθηκαν από τον *V. dahliae* ήταν κατά πολύ περισσότερες στην αλληλεπίδραση με τα Col-0 φυτά σε σχέση με τα *etr1-1* φυτά αφού ο αριθμός των γονιδίων που υπερεκφράστηκαν στα Col-0 ήταν σχεδόν τριπλάσιος από ότι στα *etr1-1* φυτά (Εικόνα 2.4.11).



Εικόνα 2.4.10: Ο αριθμός των γονιδίων που υπερεκφράστηκαν στα φυτά 6 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα ήταν μεγαλύτερος στα Col-0 φυτά σε σχέση με τα *etr1-1* φυτά. Στην επικάλυψη του Venn διαγράμματος φαίνεται ο αριθμός των γονιδίων που υπερεκφράστηκαν τόσο στα Col-0 όσο και στα *etr1-1* φυτά.



Εικόνα 2.4.11: Σύγκριση των γονιδίων όπου παρατηρήθηκε μεταγραφική αλλαγή στα φυτά Col-0 και *etr1-1* έξι ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα *Verticillium dahliae*. Αριστερά αναπαρίσταιται το προφίλ έκφρασης στα *etr1-1* φυτά για τα γονίδια που υπερεκφράζονται στα Col-0 φυτά. Δεξιά αναπαρίσταιται το προφίλ έκφρασης στα Col-0 φυτά για τα γονίδια που υπερεκφράζονται στα *etr1-1* φυτά.

Στην ομάδα γονιδίων που υπερεκφράστηκαν και στους δύο γονότυπους συμπεριλήφθηκαν 5 heat shock proteins (εκφράζονται γενικότερα σε συνθήκες stress), 2 disease resistance proteins (LRR proteins), 2 cytochrome proteins, 2 oxidoreductases (oxygenease family proteins), 2 protein kinases, 1 chitinase, 1 glycosyltransferase, 1 myb family transcription factor και 1 ethylene responsive transcriptional co-activator. Ενδιαφέρον παρουσίασε το γεγονός ότι στην ομάδα γονιδίων που υπερεκφράστηκαν και στους δύο γονότυπους δεν διαπιστώθηκε η παρουσία γονιδίων PRs, χιτινασών, πρωτεασών κ.α. που είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι ενεργοποιούνται μετά από προσβολή από παθογόνους μικροοργανισμούς. Συνεπώς, οι μεταγραφικές μεταβολές στα φυτά Col-0 και *etr1-1* μετά την προσβολή από το μύκητα *V. dahliae* είναι πολύ ξεχωριστές.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΤΟ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ ΚΑΙ Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΜΥΝΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

Πίνακας 2.4.1: Γονίδια που εκφράζονται τουλάχιστον 2 φορές στα *etr1-1* φυτά όπου εφαρμόστηκε ο μύκητας *V. dahliae* σε σχέση με τα αμόλυντα φυτά στο πείραμα των μικροσυστοιχιών

	UGCluster	Αριθμός ανιχνευτή (probe) Affymetrix	WT/Vd:: WT (-)	<i>etr1-1</i> /Vd:: <i>etr1-1</i> (-)	Περιγραφή γονιδίου (www.arabidopsis.org)
1	At.50337	245624_at	0,52	10,07	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein
2	At.20447	245628_at	0,71	2,37	myb family transcription factor (MYB75)
3	At.46857	245982_at	0,71	8,36	nodulin MtN3 family protein
4	At.31243	246125_at	1,13	2,04	expressed protein
5	At.37001	246403_at	1,72	2,75	pectinacetylesterase, putative
6	At.27563	246468_at	0,98	2,24	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein
7	At.20221	247095_at	0,7	3,54	dehydrin (RAB18)
8	At.22149	247723_at		3,94	protein phosphatase 2C, putative / PP2C, putative
9	At.49795	248185_at	0,38	5,84	glycosyltransferase family protein
10	At.49170	248236_at	0,51	2,17	plastocyanin-like domain-containing protein
11	At.29597	248322_at	5,08	2,43	heavy-metal-associated domain-containing protein
12	At.29617	248333_at	1,7	6,86	photoassimilate-responsive protein, putative
13	At.29679	248434_at		2,69	23,5 kDa mitochondrial small heat shock protein
14	At.23537	249215_at	0,58	10,89	dihydroflavonol 4-reductase (dihydrokaempferol 4-reductase) (DFR)
15	At.24835	250083_at	0,36	6,93	glutathione S-transferase, putative
16	At.297	250207_at	0,38	2,87	chalcone synthase / naringenin-chalcone synthase
17	At.48991	250648_at		3,56	late embryogenesis abundant group 1 domain-containing protein
18	At.27434	250794_at	1,12	2,51	chalcone-flavanone isomerase family protein
19	At.21765	250832_at	0,71	2,09	nicotianamine synthase, putative
20	At.22313	251625_at	6,74	9,36	glycosyl hydrolase family 17 protein
21	At.23201	252123_at	0,7	3,05	naringenin 3-dioxygenase / flavanone 3-hydroxylase (F3H)
22	At.75	252888_at	1,33	4,02	glucose-1-phosphate adenylyltransferase large subunit 3 (APL3)
23	At.22792	253073_at	0,78	3,38	cytochrome P450, putative
24	At.28679	253219_at		2,57	myb family transcription factor (MYB32)
25	At.31575	253344_at	0,43	2,1	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein
26	At.31615	253382_at		2,17	glutaredoxin family protein
27	At.2590	253949_at	1,44	2,12	co-chaperone grpE family protein
28	At.21993	254265_s_at	1,25	2,11	receptor-like protein kinase 5 (RLK5)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΤΟ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ ΚΑΙ Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΜΥΝΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

29	At.2369	254283_s_at	0,51	7,86	leucoanthocyanidin dioxygenase, putative
30	At.32601	254371_at		2,11	glycosyl hydrolase family 1 protein
31	At.25145	254385_s_at		3,15	methionine sulfoxide reductase domain-containing protein
32	At.33324	254741_s_at		2,98	pseudogene, similar to NL0D
33	At.33526	254869_at		2,5	protein kinase family protein
34	At.33632	254996_at		2,19	protein kinase family protein
35	At.3710	255087_at	1,4	2,05	SPIa/Ryanodine receptor (SPRY) domain-containing protein
36	At.43858	255527_at		2,4	expressed protein
37	At.24264	262916_at	1,53	2,6	glutathione S-transferase, putative
38	At.22277	255668_s_at	1,28	2,1	DNA-binding storekeeper protein-related
39	At.25464	255795_at	1,34	2,24	calcium-binding RD20 protein (RD20)
40	At.66886	255891_at	1,41	3,35	expressed protein
41	At.20693	256114_at		2,1	expressed protein
42	At.47608	256245_at	1,93	3,37	heat shock protein 70, putative / HSP70, putative
43	At.39974	256529_at	1,85	2,41	protein kinase family protein
44	At.5794	256601_s_at	1,01	2,17	integrin-related protein 14a
45	At.5792	256603_at	2,03	3,48	expressed protein
46	At.15	256751_at	0,6	2,16	chloride channel protein (CLC-b)
47	At.37979	257262_at	1,07	2,79	zinc finger (B-box type) family protein
48	At.389	257771_at	1,52	2,04	CBL-interacting protein kinase 7 (CIPK7)
49	At.8063	258063_at	1,97	2,32	cytochrome P450, putative
50	At.8069	258119_at	0,86	2,19	mitogen-activated protein kinase, putative / MAPK, putative (MPK19)
51	At.20776	258321_at		3,19	chlorophyll A-B binding family protein / early light-induced protein (ELIP)
52	At.7601	258336_at	1,4	2,94	stress-responsive protein, putative
53	At.68217	258362_at		2,03	expressed protein
54	At.18809	258498_at		3,16	ABA-responsive protein-related
55	At.28401	258895_at	0,93	2,48	epoxide hydrolase, putative
56	At.47576	259009_at	0,76	3,07	glycosyl hydrolase family 1 protein
57	At.68317	259403_at	1,15	2,17	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase / 3-PGDH
58	At.24491	259516_at	1,38	2,02	dehydrin (ERD10)
59	At.25077	259802_at	1,03	2,02	thionin (THI2^1)
60	At.28236	259878_at	0,94	3,37	O-methyltransferase family 2 protein
61	At.322	259925_at	1,62	2,69	pathogenesis-related protein 5 (PR-5)
62	At.43705	260241_at	1,68	2,17	cytochrome P450, putative
63	At.48402	260301_at		2,07	glycosyltransferase family protein 47
64	At.43170	260556_at	0,45	2,33	chitinase, putative
65	At.36876	260568_at	2,43	4,52	chitinase, putative
66	At.50644	260948_at		2,56	fatty acid desaturase family protein
67	At.34777	261112_at	1,24	2,3	glycosyl transferase family 1

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΤΟ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ ΚΑΙ Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΜΥΝΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

					protein
68	At.41737	261138_at		2,39	glycosyl transferase family 1 protein
69	At.25241	261285_at	1,62	2,27	annexin 1 (ANN1)
70	At.16233	261368_at	1,44	2,07	legume lectin family protein
71	At.41777	261407_at	1,9	2,16	phytochrome kinase substrate-related
72	At.25172	261806_at	1,18	2,07	ferredoxin--NADP(+) reductase, putative / adrenodoxin reductase, putative
73	At.23459	262050_at	1,11	2,23	expressed protein
74	At.21275	262128_at		12,06	late embryogenesis abundant protein, putative / LEA protein, putative
75	At.11555	262232_at	1,59	2,85	expressed protein
76	At.24842	262811_at	1,07	2,54	expressed protein
77	At.42302	262911_s_at		2,25	17,8 kDa class I heat shock protein (HSP17,8-CI)
78	At.11109	263150_at	1,03	2,32	17 ⁴ kDa class III heat shock protein (HSP17 ⁴ -CIII)
79	At.57160	263158_at		2,03	CCAAT-binding transcription factor (CBF-B/NF-YA) family protein
80	At.26315	263374_at		4,51	DNAJ heat shock family protein
81	At.14263	263881_at		3,35	expressed protein
82	At.34179	264091_at		2,17	expressed protein
83	At.66059	264217_at	1,76	4,33	armadillo/beta-catenin repeat family protein / U-box domain-containing protein
84	At.10413	264583_at	1,98	2,7	galactosyltransferase family protein
85	At.35878	264635_at	2,63	6,21	expressed protein
86	At.24217	264968_at	1,62	2,53	rubber elongation factor (REF) family protein
87	At.48150	265091_s_at	0,36	8,97	pseudogene, transferase family
88	At.13397	265999_at	1,92	2,51	expressed protein
89	At.26453	266098_at	0,43	2,78	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein
90	At.13248	266142_at	0,21	3,01	GCN5-related N-acetyltransferase (GNAT) family protein
91	At.23206	266462_at		4,01	benzodiazepine receptor-related
92	At.22280	266989_at	0,63	2,81	jacalin lectin family protein
93	At.12553	267080_at	1,32	3,29	amino acid transporter family protein
94	At.12802	267181_at	1,05	2,03	aldo/keto reductase family protein
95	At.39358	267256_s_at	1,01	2,28	serine carboxypeptidase S10 family protein

* Υπομήφια γονίδια που επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση με Real-time PCR.

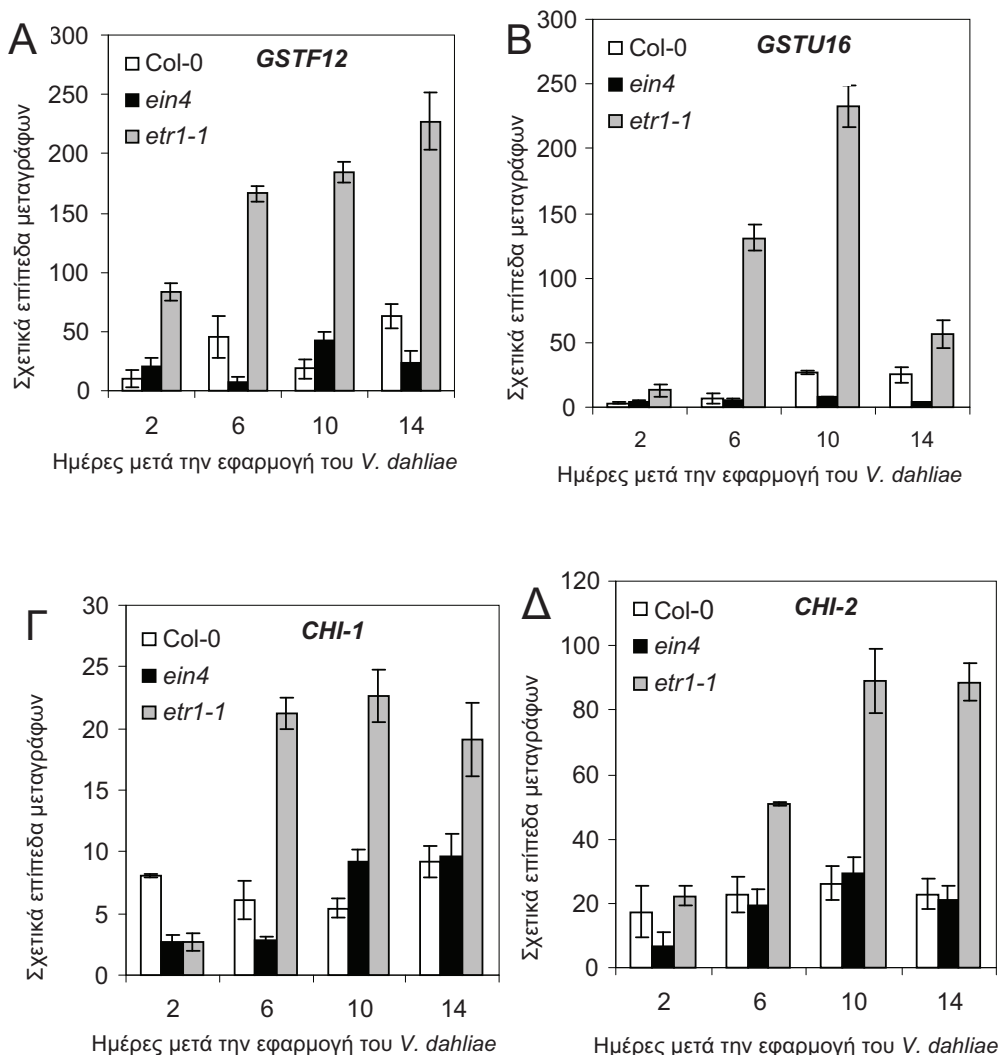
2.4.5 Μελέτη της επαγωγής γονιδίων σχετιζόμενων με τον μηχανισμό αντοχής σε φυτά WT, *etr1-1* και *ein4 A. thaliana*, εναντίον του μύκητα *V. dahliae*

Από τα γονίδια που αναγνωρίστηκαν να επάγονται από τα αποτελέσματα των μικροσυστοιχιών επιλέχθηκε μια ομάδα από εννέα γονίδια (Πίνακας 2.4.1) ως υποψήφια για επιβεβαίωση με Real-time PCR σε διάφορες χρονικές στιγμές. Η επιλογή των γονιδίων βασίστηκε σε βιβλιογραφικές αναφορές όπου εμπλέκονταν σε μηχανισμούς άμυνας των φυτών εναντίον παθογόνων. Ο έλεγχος του επιπέδου έκφρασης των γονιδίων πραγματοποιήθηκε σε διάφορες χρονικές στιγμές μετά την εφαρμογή του μύκητα *V. dahliae*. Σε αυτά τα πειράματα συμπεριλήφθηκαν 23 ακόμα γονίδια που αποτελούν δείκτες επαγωγής αμυντικών μηχανισμών μέσω των μονοπατιών αντίληψης του αιθυλενίου, του σαλικυλικού, του ιασμονικού και του αμπισισικού οξέος (Πίνακας 2.3.1), σε μια προσπάθεια να αποκτηθούν περισσότερες πληροφορίες για τον τρόπο άμυνας των φυτών σε διαφορετικές χρονικές στιγμές μετά τη μόλυνση. Στο σχεδιασμό αυτών των πειραμάτων συμπεριλήφθηκαν τα μεταλλαγμένα φυτά σε υποδοχείς του αιθυλενίου *etr1-1* και *ein4* καθώς και φυτά αγρίου τύπου, Col-0. Τα *ein4* φυτά συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση σε μια αρχική προσπάθεια να διαχωριστεί ο ρόλος της πρόσληψης αιθυλενίου μεταξύ των δύο υποδοχέων στους μηχανισμούς άμυνας των φυτών εναντίον του *V. dahliae* αφού τόσο το γονίδιο *ETR1* όσο και το *EIN4* κωδικοποιούν υποδοχείς αιθυλενίου. Ο υποδοχέας *ETR1* είναι μέλος της υποοικογένειας τύπου-I και ο υποδοχέας *EIN4* είναι μέλος της υποοικογένειας τύπου-II υποδοχέων του αιθυλενίου (Guo και Ecker, 2004) αλλά όπως διαπιστώθηκε σε αυτή την εργασία έδειξαν αντίθετες αντιδράσεις άμυνας κατά του μύκητα *V. dahliae*. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της Real-time PCR επιβεβαίωσαν την υπερέκφραση των γονιδίων *GSTF12*, *GSTU16* (glutathione-S-transferases), *CHI-1*, *CHI-2* (chitinases), *PR-5* (thaumatin-like), *PR-1*, *PR-2* (β -1,2 glucanase) και του μεταγραφικού παράγοντα *Myb75* στα *etr1-1* φυτά σε σχέση με τα WT και *ein4* φυτά καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων (Εικόνα 2.4.12). Το επίπεδο του mRNA αυτής της ομάδας γονιδίων είχε υπερεκφραστεί σε όλους τους γονότυπους στις 2 ημέρες μετά την εφαρμογή του *V. dahliae* σε σχέση με τα αντίστοιχα φυτά μάρτυρες (Εικόνα 2.4.12). Το επίπεδο έκφρασης των *GSTF12* και *PR-5* ήταν μεγαλύτερο στα *etr1-1* φυτά σε σχέση με τα *ein4* και WT φυτά ενώ δεν παρατηρήθηκε διαφορά στο επίπεδο έκφρασης των υπολοίπων γονιδίων στις 2 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα σε όλες τις επεμβάσεις (Εικόνα 2.4.12 A και Z). Ομοίως, αλλά σε μεγαλύτερο βαθμό, το επίπεδο έκφρασης όλων των γονιδίων στις 6, 10 και 14 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα ήταν υψηλότερο στην

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΤΟ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ ΚΑΙ Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΜΥΝΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

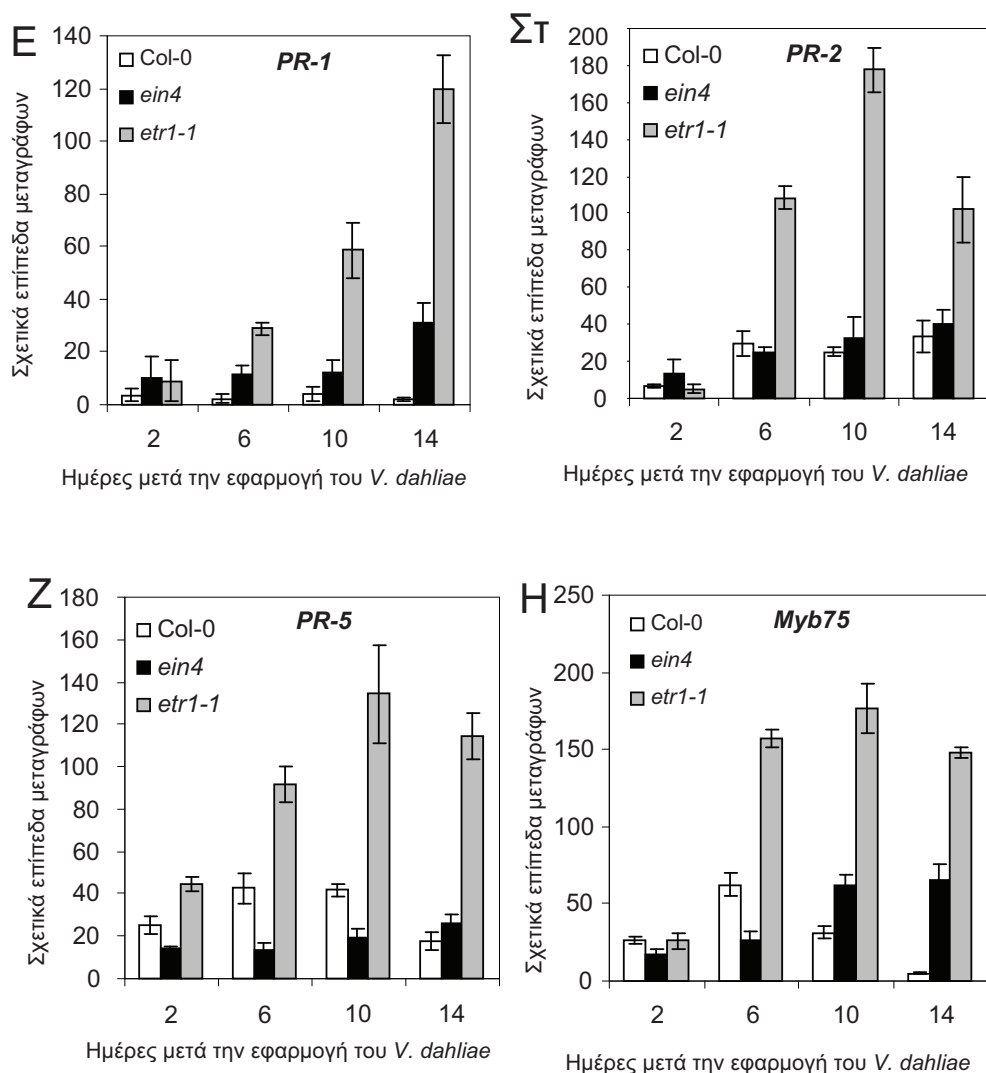
αλληλεπίδραση *V. dahliae* – *etr1-1* σε σχέση με τις άλλες επεμβάσεις. Τα γονίδια *GSTU16* και *PR-2* έδειξαν την μεγαλύτερη υπερέκφραση στα φυτά *etr1-1* στις 10 ημέρες, ενώ τα *GSTF12* και *PR-1* έφτασαν στη μέγιστη τιμή έκφρασης τους στις 14 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα (Εικόνα 2.4.12 Α, Β, Ε, Στ). Τα γονίδια *CHI-2* και *PR-5* είχαν παρόμοια προφίλ έκφρασης σε όλες τις επεμβάσεις και παρουσίασαν την υψηλότερη έκφραση τους στις 10 και 14 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα στα *etr1-1* φυτά (Εικόνα 2.4.12 Δ και Ζ), ενώ τα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων *CHI-1* και *Myb75* εκφράστηκαν σε υψηλά επίπεδα από τις 6 έως τις 14 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα (Εικόνα 2.4.12 Γ και Η). Ενδιαφέρον προκάλεσε το γεγονός ότι παρατηρήθηκε υπερέκφραση του επιπέδου μεταγράφων όλων των υπό εξέταση γονιδίων σε όλους τους γονότυπους κατά την αλληλεπίδραση τους με τον μύκητα *V. dahliae* υποδεικνύοντας την ενεργοποίηση των μηχανισμών άμυνας των φυτών στην μόλυνση από το μύκητα. Αξίζει να σημειωθεί ότι το επίπεδο έκφρασης αυτών των γονιδίων στα αμόλυντα *etr1-1* φυτά ήταν τουλάχιστον στο ίδιο επίπεδο με τα αμόλυντα WT και *ein4* φυτά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΤΟ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ ΚΑΙ Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΜΥΝΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ



Εικόνα 2.4.12: Επίπεδα έκφρασης των γονιδίων (Α) *GSTF12*, (Β) *GSTU16*, (Γ) *CHI-1* και (Δ) *CHI-2* σε φυτά *Arabidopsis thaliana* Col-0, *ein4* και *etr1-1* μετά από την εφαρμογή του μύκητα *Verticillium dahliae*. Απομονώθηκε RNA από το υπέργειο μέρος 10 φυτών ανά γονότυπο στις 2, 6, 10 και 14 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα. Έγινε αντίστροφη μεταγραφή του poly(A)⁺-RNA σε cDNA, που χρησιμοποιήθηκε σε αντιδράσεις Real-time PCR. Τα επίπεδα των μεταγράφων στα διαφορετικά δείγματα κανονικοποιήθηκαν με βάση το γονίδιο αναφοράς *α2-tubulin*. Τα σχετικά επίπεδα mRNA υπολογίστηκαν σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης στα αμόλυντα φυτά. Χρησιμοποιήθηκαν 20 φυτά για κάθε γονότυπο, για κάθε γονίδιο και κάθε μέρα δειγματοληψίας (10 *V. dahliae* και 10 αμόλυντοι μάρτυρες) και το πείραμα επαναλήφθηκε 3 φορές. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 30 φυτών και οι κάθετες ράβδοι αντιπροσωπεύουν την απόκλιση από το μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΤΟ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ ΚΑΙ Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΜΥΝΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ



Εικόνα 2.4.12: Επίπεδα έκφρασης των γονιδίων (Ε) *PR-1*, (ΣΤ) *PR-2*, (Ζ) *PR-5* και (Η) *MYB-75* σε φυτά *Arabidopsis thaliana* Col-0, *ein4* και *etr1-1* μετά από την εφαρμογή του μύκητα *Verticillium dahliae*. Απομονώθηκε RNA από το υπέργειο μέρος 10 φυτών ανά γονότυπο στις 2, 6, 10 και 14 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα. Έγινε αντίστροφη μεταγραφή του poly(A)⁺-RNA σε cDNA, που χρησιμοποιήθηκε σε αντιδράσεις Real-time PCR. Τα επίπεδα των μεταγράφων στα διαφορετικά δείγματα κανονικοποιήθηκαν με βάση το γονίδιο αναφοράς *a2-tubulin*. Τα σχετικά επίπεδα mRNA υπολογίστηκαν σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης στα αμόλυντα φυτά. Χρησιμοποιήθηκαν 20 φυτά για κάθε γονότυπο, για κάθε γονίδιο και κάθε μέρα δειγματοληψίας (10 *V. dahliae* και 10 αμόλυντοι μάρτυρες) και το πείραμα επαναλήφθηκε 3 φορές. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 30 φυτών και οι κάθετες ράβδοι αντιπροσωπεύουν την απόκλιση από το μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα.

2.5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι μύκητες *V. dahliae* και *F. oxysporum* είναι εδαφογενή παθογόνα με παγκόσμια εξάπλωση, που προκαλούν αδρομυκώσεις και οδηγούν σε σημαντικές απώλειες της παραγωγής σε ένα ευρύ φάσμα καλλιεργειών με μεγάλη οικονομική σημασία. Οι αδρομυκώσεις που προκαλούνται από τους μύκητες *V. dahliae* και *F. oxysporum* αποτελούν σοβαρές απειλές για τους ξενιστές τους αφού δεν υπάρχουν χημικά μέτρα για τον επιτυχή έλεγχό τους. Γι αυτό το λόγο, οι στρατηγικές διαχείρισης των ασθενειών βασίζονται κυρίως σε προληπτικά μέτρα, ανάμεσα στα οποία είναι και η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών ή οι πρακτικές βιολογικής καταπολέμησης (Tjamos, 1989β). Παρόλο που σε μεγάλο αριθμό ερευνών έχει εξεταστεί η αλληλεπίδραση των παθογόνων αυτών με αρκετούς ξενιστές, η γενετική βάση και οι μοριακοί μηχανισμοί που ελέγχουν την ανθεκτικότητα των φυτών εναντίον αυτών των μυκήτων παραμένουν ασαφείς.

Το σαλικυλικό οξύ (SA), το ιασμονικό οξύ (JA) και το αιθυλένιο (ET) είναι φυτικές ορμόνες που λειτουργούν ως μόρια του σήματος άμυνας των φυτών και της γόνου προς γόνου επαγόμενης άμυνας (Thomma et al., 2001). Ο ρόλος αυτών των μονοπατιών αντίληψης στις αντιδράσεις άμυνας των φυτών εναντίον των *Verticillium* spp. και *F. oxysporum* αποτέλεσε αντικείμενο έρευνας αρκετών ερευνητών (Veronese et al., 2003; Berrocal-Lobo και Molina, 2004; Tjamos et al., 2005; Johansson et al., 2006) αλλά η επίδρασή τους δεν έχει αποσαφηνιστεί.

Οι Veronese και συνεργάτες (2003) έδειξαν σε *in vitro* πειράματα ότι σε κανένα από τα SA μεταλλαγμένα φυτά δεν παρατηρήθηκε αυξημένη ανθεκτικότητα ή ευπάθεια στο μύκητα *V. dahliae*, ενώ σε μια πιο πρόσφατη εργασία με το *V. longisporum*, τα SA-μεταλλαγμένα *sid2-1* και *pad4-1* φυτά είχαν προσβληθεί λιγότερο από τα αγρίου τύπου φυτά σε *in vitro* πειράματα, υποδεικνύοντας ότι το SA δεν εμπλέκεται στην άμυνα των φυτών εναντίον του *V. longisporum* (Johansson et al., 2006). Επιπροσθέτως, ο ρόλος του SA έχει προταθεί στην προστασία κυττάρων κάλλου βαμβακιού από τοξίνες του *V. dahliae* (Zhen και Li, 2004). Η συμμετοχή του SA έχει επίσης μελετηθεί στην άμυνα των φυτών εναντίον του μύκητα *F. oxysporum*. Οι Berrocal-Lobo και Molina (2004) έδειξαν ότι τα SA-μεταλλαγμένα φυτά *NahG*, *sid2-1*, *eds5-1*, *npr-1-1* και *pad2-1* παρουσίασαν φαινοτύπους μειωμένης ανθεκτικότητας στον μύκητα *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* και *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Berrocal-Lobo και Molina, 2004). Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδειξαν σε πειράματα *in planta* ότι όλα τα SA μεταλλαγμένα φυτά που συμπεριλήφθηκαν στις δοκιμές, είχαν παρόμοια συμπτώματα με τα αγρίου τύπου

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΤΟ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ ΚΑΙ Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΜΥΝΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

(Col-0) φυτά μετά από την εφαρμογή των *V. dahliae* ή *F. oxysporum* f. sp. *raphani* (Εικόνες 2.4.2 και 2.4.4) υποδεικνύοντας ότι το SA δεν εμπλέκεται στην άμυνα των φυτών εναντίον των παθογόνων των αδρομυκώσεων. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με την έρευνα των Veronese και συνεργατών (2003) στην οποία χρησιμοποιήθηκε μια άλλη απομόνωση του *V. dahliae*, ενώ η παρατηρηθείσα απόκλιση των αποτελεσμάτων ως προς το ρόλο του SA μεταξύ της παρούσας εργασίας και της εργασίας από τους Berrocal-Lobo και Molina (2004) είναι πιθανόν να οφείλεται στη χρήση διαφορετικών *formae speciales* του *F. oxysporum*, καθώς η *forma specialis* που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είχε μεγαλύτερη εξειδίκευση στα φυτά *A. thaliana* από ότι τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν από τους Berrocal-Lobo και Molina (2004).

Μεταλλαγμένα φυτά στο μονοπάτι αντίληψης του JA (*jar1-1*, *coi1-16*, και *eds8-1*) δεν έδειξαν να επηρεάζουν την σοβαρότητα της ασθένειας που προκάλεσαν οι μύκητες *V. dahliae* ή *V. longisporum* σε *in vitro* πειράματα (Veronese et al., 2003; Johansson et al., 2006). Επιπρόσθετα, το *jar1-1* μεταλλαγμένο φυτό ήταν πιο ευπαθές σε σχέση με τα αγρίου τύπου φυτά στους μύκητες *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* και *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Berrocal-Lobo και Molina, 2007). Στην παρούσα εργασία τα *jar1-1* φυτά παρουσίασαν όμοια επίπεδα έντασης της ασθένειας με τα αγρίου τύπου φυτά μετά από μόλυνση με τον *V. dahliae* ή *F. oxysporum* f. sp. *raphani* (Εικόνες 2.4.2 και 2.4.4) υποδεικνύοντας ότι το JA δεν επηρεάζει το αποτέλεσμα της ασθένειας που προκαλούν αυτοί οι μύκητες. Είναι προφανές ότι οι διάφορες ειδικές μορφές του *F. oxysporum* αλληλεπιδρούν με διαφορετικό τρόπο με τα φυτά αφού οι Berrocal-Lobo και Molina (2004) πρότειναν τη συμμετοχή τόσο του JA όσο και του SA στην άμυνα των φυτών εναντίον του *F. oxysporum*, ενώ στην παρούσα εργασία δεν έδειξαν να εμπλέκονται στους αμυντικούς μηχανισμούς.

Ο ρόλος του αιθυλενίου είναι ακόμα πιο σύνθετος στη άμυνα των φυτών και φαίνεται να συμμετέχει μόνο σε συγκεκριμένα παθογόνα (Knoester et al., 1998; Hoffman et al., 1999; Thomma et al., 1999). Πρόσφατες εργασίες (Veronese et al., 2003; Tjamos et al., 2005; Johansson et al., 2006) έδειξαν σε *in vitro* πειράματα ότι τα *etr1-1* φυτά ήταν πιο ανθεκτικά στην προσβολή από *Verticillium* spp., καθώς τα *ein3-1* και *eto1-1* φυτά είχαν παρόμοια ποσοστά ασθένειας και τα *ein2-1*, *ein4-1* και *ein6-1* φυτά έδειξαν αυξημένη ευπάθεια σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου (Johansson et al., 2006). Επιπρόσθετα, τα *ein2-5* φυτά ήταν πιο ευπαθή στους μύκητες *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* και *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* σε σχέση με τα αγρίου τύπου φυτά (Berrocal-Lobo και Molina, 2007). Από τα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΤΟ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ ΚΑΙ Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΜΥΝΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

μεταλλαγμένα φυτά του αιθυλενίου που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα εργασία παρατηρήθηκε ότι μόνο τα *etr1-1* ήταν πιο ανθεκτικά από τα αγρίου τύπου φυτά εναντίον των *V. dahliae* και *F. oxysporum* f. sp. *raphani* (Εικόνες 2.4.1, 2.4.2, 2.4.3 και 2.4.4). Ο υποδοχέας ETR1 είναι μέλος της τύπου-I ενώ ο EIN4 είναι μέλος της τύπου-II υποοικογένειας υποδοχέων του αιθυλενίου (Guo και Ecker, 2004) κι αυτό ίσως να εξηγεί και τις διαφορετικές αντιδράσεις των φυτών *etr1-1* και *ein4* μεταλλαγμένων φυτών στους μύκητες *V. dahliae* και *F. oxysporum* f. sp. *raphani*. Η παρατηρηθείσα διαφορά στην ένταση των συμπτωμάτων μεταξύ των *etr1-1* και *ein2-1*, *ein3-1* και *ein5-1* μπορεί να βασίζεται στο γεγονός ότι τα γονίδια *EIN2*, *EIN3* και *EIN5* είναι θετικοί ρυθμιστές του μονοπατιού του αιθυλενίου, που λειτουργούν καθοδικά του *ETR1* το οποίο λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής του μονοπατιού (Guo και Ecker, 2004). Με βάση τα πιο πάνω φαίνεται ότι το αιθυλένιο έχει πιο σημαντικό ρόλο από το σαλικυλικό και το ιασμονικό οξύ στην ανθεκτικότητα των φυτών εναντίον των μυκήτων *V. dahliae* και *F. oxysporum* f. sp. *raphani*.

Επιπρόσθετα, από τα πειράματα ιστοπαθολογικής παρατήρησης που έγιναν με το μετασηματισμένο στέλεχος του *V. dahliae GFP* στις ρίζες φυτών *Arabidopsis* φάνηκε ότι δεν υπάρχει μικρότερη πρόσφυση ή συγγένεια των σπορίων του μύκητα στα *etr1-1* φυτά, γεγονός που θα μπορούσε να εξηγήσει σε ένα βαθμό το μικρότερο ποσοστό ασθενών φύλλων στα φυτά αυτά. Τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού αποτέλεσαν μια ακόμα ένδειξη ότι στα *etr1-1* φυτά ήταν πιθανόν να επάγονται μηχανισμοί άμυνας που παρεμποδίζουν την είσοδο του μύκητα ή αναστέλλουν την περαιτέρω ανάπτυξη του μετά την είσοδο του σε αυτά (Εικόνες 2.4.5.A, B και Γ).

Η έλλειψη θετικής συσχέτισης μεταξύ τη ανάπτυξης της βιομάζας του παθογόνου μέσα στους φυτικούς ιστούς και της έντασης των συμπτωμάτων έχει παρατηρηθεί σε πολλές αλληλεπιδράσεις φυτών με μύκητες (Schnathorst, 1981· Brandt et al., 1984· Corsini et al., 1988· Gold et al., 1996· Lynch et al., 1997· Heinz et al., 1998· Veronese et al., 2003), βακτήρια (Bent et al., 1992· Lund et al., 1998· O'Donnell et al., 2001) και ιούς (Cecchini et al., 2002). Μια πιθανή εξήγηση αυτού του φαινομένου είναι ότι τα συμπτώματα μπορεί να προέρχονται από τα αποτελέσματα σημάτων που επάγονται από τα παθογόνα τα οποία προκαλούν αλλαγές στη φυσιολογική αύξηση και ανάπτυξη των φυτών όπως η επιταχυνόμενη άνθηση, γήρανση και ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (programmed cell death) (Dietrich et al., 1994· Lund et al., 1998· O'Donnell et al., 2001· Cecchini et al., 2002· Piloff et al., 2002). Ωστόσο, σε αυτή την εργασία, η ανάπτυξη του μύκητα *V. dahliae* μέσα στους αγγειακούς ιστούς των φυτών προσδιορίστηκε να έχει θετική συσχέτιση ($r^2=0.744$; $df=28$; $p<0.01$) με την ένταση της ασθένειας. Η εφαρμογή της

Real-time PCR έδειξε ότι τα επίπεδα του DNA του *V. dahliae* στα *etr1-1* φυτά, τα οποία έδειξαν και τον πιο ανθεκτικό φαινότυπο εναντίον του μύκητα, ήταν σημαντικά χαμηλότερα από ότι στα αγρίου τύπου φυτά και τα υπόλοιπα ET-μεταλλαγμένα φυτά σε κάθε ημέρα δειγματοληψίας, εκτός από την 5 ημέρα μετά την εφαρμογή του μύκητα (Εικόνα 2.4.8). Επιπρόσθετα, η ποσοτικοποίηση του μύκητα *F. oxysporum* f. sp. *raphani* στα αγρίου τύπου και στα *etr1-1* έδειξε ότι το επίπεδο του DNA του παθογόνου που υπολογίστηκε στα *etr1-1* φυτά ήταν σημαντικά χαμηλότερο από τα αγρίου τύπου φυτά, εκτός από τη 18 ημέρα μετά την εφαρμογή του μύκητα (Εικόνα 2.4.9). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι υπήρχε σημαντικά θετική συσχέτιση ($r^2=0.918$; $df=7$; $p<0.01$) μεταξύ έντασης της ασθένειας και ποσότητας του μύκητα στους αγγειακούς ιστούς των *etr1-1* φυτών ενώ στα αγρίου τύπου φυτά η συσχέτιση ήταν αρνητική ($r^2=-0.837$; $df=7$; $p<0.01$).

Στις βιοδοκιμές *V. dahliae* – *Arabidopsis* παρατηρήθηκε ότι το DNA του μύκητα έφτασε στο μέγιστη τιμή του στις 20 ημέρες και ακολούθως μειώθηκε (Εικόνα 2.4.8) ενώ η μέγιστη τιμή της έντασης της ασθένειας παρατηρήθηκε στις 30 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα (Εικόνα 2.4.2). Η αδυναμία αυτή του μύκητα να αυξηθεί μετά την 20^η μέρα είναι πιθανόν να αντικατοπτρίζει τη μειωμένη παραγωγή κονιδίων μέσα στο φυτικό στέλεχος που συμπίπτει με τις κυκλικές περιόδους αύξησης που χαρακτηρίζουν τον τρόπο συμπεριφοράς του μύκητα *V. dahliae* μέσα στο αγγειακό σύστημα των φυτών, όπως στην τομάτα και την ελαιοκράμβη (Heinz et al., 1998; Chen et al., 2004; Eynck et al., 2007). Αντίθετα, η μέγιστη τιμή των επιπέδων DNA του *F. oxysporum* f. sp. *raphani* παρατηρήθηκε 6 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα και ακολούθως μειώθηκε (Εικόνα 2.4.9) καθώς η ένταση της ασθένειας αυξανόταν σταδιακά μέχρι την τελευταία ημέρα καταγραφής των συμπτωμάτων στις 30 ημέρες (Εικόνα 2.4.4). Φαίνεται ότι οι δύο μύκητες ακολουθούν διαφορετικό τρόπο συμπεριφοράς μέσα στους αγγειακούς ιστούς των ευπαθών γονοτύπων καθώς το επίπεδο του DNA του *V. dahliae* αυξήθηκε σταδιακά με τη πάροδο του χρόνου ενώ ο *F. oxysporum* f. sp. *raphani* έφτασε στα μέγιστα επίπεδα αποίκησης στις 6 ημέρες μετά την εφαρμογή του και ακολούθως ελαττώθηκε. Συμπερασματικά, τα πειράματα ποσοτικοποίησης των μυκήτων έδειξαν ότι τα επίπεδα των παθογόνων στους αγγειακούς ιστούς των *etr1-1* φυτών παρέμειναν σε σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων σε σχέση με τα υπόλοιπα μεταλλαγμένα φυτά και φυτά αγρίου τύπου που χρησιμοποιήθηκαν. Μετά και από τα πειράματα ποσοτικοποίησης ήταν προφανές ότι ο ανθεκτικός φαινότυπος των *etr1-1* φυτών βασιζόταν στην ενεργοποίηση

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΤΟ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ ΚΑΙ Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΜΥΝΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

μηχανισμών άμυνας. Αυτοί οι μηχανισμοί έχουν μερικώς μελετηθεί στην αλληλεπίδραση *V. dahliae* – άγριος τύπος *A. thaliana* και ποτέ στα *etr1-1* φυτά.

Τα φυτά έχουν αναπτύξει σύμπλοκες στρατηγικές άμυνας και αντιδράσεων για να αντιμετωπίσουν με επιτυχία την επίθεση από τα διάφορα παθογόνα (Dicke και Hilker, 2003· Pieterse και Van Loon, 2004· Jones και Dangl, 2006) που ρυθμίζονται από τα μονοπάτια μεταγωγής του σαλικυλικού οξέος, του ιασμονικού οξέος και του αιθυλενίου (Reymond και Farmer, 1998· Pieterse και Van Loon, 1999· Glazebrook 2001· Thomma et al., 2001). Σαλικυλικό οξύ, ιασμονικό οξύ και αιθυλένιο συσσωρεύονται μετά από προσβολές παθογόνων και οδηγούν σε ενεργοποίηση ξεχωριστών ομάδων γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα (Schenk et al., 2000· Glazebrook et al., 2003). Σε γενικές γραμμές, αυτά τα γονίδια εκφράζονται τόσο σε ασύμβατες όσο και σε συμβατές αλληλεπιδράσεις παθογόνου – ξενιστή, αλλά ο βαθμός και το επίπεδο της συσσώρευσής τους είναι μεγαλύτερος στα ανθεκτικά φυτά. Προηγούμενες έρευνες που έγιναν στην αλληλεπίδραση *Arabidopsis-Verticillium* για την επαγωγή γονιδίων που αποτελούν δείκτες του SA, του JA και ET, έδειξαν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Σε μια περίπτωση δεν παρατηρήθηκε έκφραση των γονιδίων *PR-1* και *PDF1.2* (Veronese et al., 2003), ενώ σε άλλες έρευνες τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *PR-1*, *PR-2*, *PR-4*, *PR-5* και *PDF1.2* είχαν επαχθεί μετά την εφαρμογή του μύκητα *Verticillium* spp. (Tjamos et al., 2005· Johansson et al., 2006). Ωστόσο, δεν υπάρχουν δεδομένα που να αφορούν στην έκφραση γονιδίων δεικτών σε μεταλλαγμένα φυτά στο SA, JA και ET που να παρουσιάζουν είτε ανθεκτικότητα ή ευπάθεια στην προσβολή από τον μύκητα *V. dahliae*. Το συγκεκριμένο κομμάτι της παρούσας εργασίας βασίστηκε σε προκαταρκτικά πειράματα ανάλυσης του γονιδιώματος φυτών *A. thaliana* σε μικροσυστοιχίες (DNA Vision S.A., Charleroi, Belgium) πάνω σε RNA που απομονώθηκε από Col-0 και *etr1-1*, που υπέδειξε την υπερέκφραση μιας ομάδας γονιδίων στα *etr1-1* φυτά 6 ημέρες μετά την εφαρμογή του *V. dahliae*. Το επίπεδο έκφρασης μιας υποομάδας αυτών των γονιδίων, που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών (Πίνακας 2.4.1), υπολογίστηκε με αντιδράσεις Real-time PCR σε διάφορες χρονικές στιγμές μετά την εφαρμογή του *V. dahliae*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι 8 γονίδια (*GSTF12*, *GSTU16*, *CHI-1*, *CHI-2*, *PR-1*, *PR-2*, *PR-5*, *Myb75*) υπερεκφράστηκαν στα *etr1-1* σε σχέση με τα Col-0 και τα *ein4* φυτά (Εικόνες 2.4.12 A-H) υποδεικνύοντας ότι αυτά τα γονίδια θα μπορούσαν να είναι καθοριστικά στον ανθεκτικό φαινότυπο των *etr1-1* φυτών εναντίον του μύκητα. Σε μια προηγούμενη εργασία που βασίστηκε σε πειράματα μικροσυστοιχιών, προσδιορίστηκαν τα μεταγραφικά προφίλ φυτών τομάτας (από ιστούς στελεχών ποικιλίας Craigella) μετά

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΤΟ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ ΚΑΙ Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΜΥΝΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

την εφαρμογή 2 διαφορετικών απομονώσεων *V. dahliae*, Vd1 και E6 που προκάλεσαν ευπαθές και ανεκτικό φαινότυπο, αντίστοιχα (Robb et al., 2007). Σε αυτή την εργασία, όπως και στη παρούσα εργασία, παρατηρήθηκε υπερέκφραση των PR1 (P4, P6), PR2 (β -1,3 glucanase), endo-beta-1-3-glucanase (SGN-U144863), acidic 25-kDa endochitinase (SGN-U144297) και class IV chitinase (SGN-U145299) και στους δύο τύπους αλληλεπίδρασης, ενώ μόνο μια endochitinase 3 και μια glutathione-S-transferase (SGN-U143283) ήταν ανεβασμένες στα φυτά της ανεκτικής αλληλεπίδρασης (Robb et al., 2007). Σε μια πιο πρόσφατη εργασία, παρακολούθησαν οι μεταγραφικές αλλαγές σε φυτά τομάτας, μετά την εφαρμογή του *V. dahliae* (φυλή 1), στις ποικιλίες MoneyMaker (ευπαθής γονότυπος) και Motelle (ανθεκτικός γονότυπος εναντίον της φυλής 1 του *Verticillium*) με τη χρήση μικροσυστοιχιών (van Esse et al., 2009). Οι Van Esse και συνεργάτες (2009) παρατήρησαν επαγωγή των γονιδίων *PR5* και chitinase τόσο στις ρίζες όσο και στο υπέργειο μέρος της ασύμβατης αλληλεπίδρασης (ανθεκτικός φαινότυπος), το οποίο είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας.

Προηγούμενες εργασίες έδειξαν ότι οι PR-1, PR-2 και PR-5 πρωτεΐνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανθεκτικότητα των φυτών κατά της μόλυνσης με μύκητες (Wessels et al., 1981· Alexander et al., 1993· Niderman et al., 1995· Abad et al., 1996· Pressey, 1997· Li et al., 2003· Menu-Bouaouiche et al., 2003). Η PR-1 επάγεται από παθογόνα ή από το SA και χρησιμοποιείται ευρέως ως δείκτης της διασυστηματικής αντοχής των φυτών (SAR). Στη βιβλιογραφία υπάρχουν στοιχεία που προτείνουν το ρόλο των PR-1 πρωτεϊνών στην ανθεκτικότητα των φυτών στις μυκητολογικές προσβολές αλλά ο τρόπος λειτουργίας τους ή η σχέση τους με άλλες πρωτεΐνες παραμένουν άγνωστα (van Loon και van Strien, 1999). Η συνεχής έκφραση του *PR-1* σε γενετικώς τροποποιημένο καπνό έδειξε αυξημένη ανεκτικότητα σε δύο ωμόμηκες (Alexander et al., 1993). Σε μια πιο πρόσφατη έρευνα, PR-1 πρωτεΐνες από καπνό και τομάτα έδειξαν *in vitro* αντιμυκητιακή δράση εναντίον του *Phytophthora infestans* (Niderman et al., 1995). Στην παρούσα εργασία, τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *PR-1* ήταν στο ίδιο επίπεδο σε όλους τους γονότυπους 2 ημέρες μετά την εφαρμογή του *V. dahliae*. Ωστόσο, στις 6, 10 και 14 ημέρες το επίπεδο έκφρασης του *PR-1* ήταν υψηλότερο στα *etr1-1* φυτά σε σχέση με τα Col-0 και *ein4* φυτά. Η μεγαλύτερη διαφορά παρατηρήθηκε στις 14 ημέρες όπου το επίπεδο έκφρασης του *PR-1* στα *etr1-1* φυτά ήταν 63-φορές και 3.8-φορές μεγαλύτερο σε σχέση με τα Col-0 και *ein4* φυτά, αντίστοιχα.

Παρόμοιο μοτίβο έκφρασης παρατηρήθηκε για το *PR-2* γονίδιο. Η επαγωγή ξεκίνησε στις 2 ημέρες και έγινε ισχυρότερη στα *etr1-1* φυτά από τις 6 μέχρι τις 14

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΤΟ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ ΚΑΙ Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΜΥΝΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα. Στις 10 ημέρες το *PR-2* γονίδιο είχε υπερεκφραστεί 7 και 5.5-φορές περισσότερο σε σχέση με τα Col-0 και *ein4* φυτά, αντίστοιχα. Η οικογένεια των *PR-2* πρωτεϊνών αποτελείται από β-1,3-γλουκανάσες οι οποίες υδρολύουν τις β-1,3-γλουκάνες που είναι μείζον δομικό υλικό του κυτταρικού τοιχώματος των μυκήτων (Wessels et al., 1981) με αποτέλεσμα να αδυνατίζει το κυτταρικό τοίχωμα των μυκήτων και να προλαμβάνεται η αποίκηση μέσω των υφών του μύκητα. Επιπρόσθετα, ενδιάμεσοι μεταβολίτες της ενζυμικής τους δράσης μπορούν να λειτουργήσουν ως διεγέρτες (elicitors) των μηχανισμών άμυνας των φυτών (Menu-Bouaouiche et al., 2003). Μια πρόσφατη εργασία έδειξε ότι υπάρχει διαφορετικός χρόνος και επίπεδο δράσης της β-1,3-γλουκανάσης ανάμεσα σε μια ευπαθή και μια ανεκτική ποικιλία στον *V. dahliae* σαν αποτέλεσμα της εφαρμογής μιας τοξίνης του *V. dahliae*. Η δραστηριότητα της β-1,3-γλουκανάσης αυξήθηκε σε υψηλότερα επίπεδα νωρίτερα στην ανεκτική ποικιλία (Li et al., 2003).

Ένας ακόμα δείκτης των μηχανισμών άμυνας των φυτών είναι το *PR-5* γονίδιο. Η οικογένεια των πρωτεϊνών αυτών αποτελείται από πρωτεΐνες που είναι ομόλογες με τη θαυματίνη (thaumatin) με *in vitro* αντιμυκητιακή δράση εναντίον του *V. dahliae* (Abad et al., 1996; Pressey 1997). Στη παρούσα εργασία, το γονίδιο *PR-5* είχε υπερεκφραστεί τουλάχιστον 2 φορές στα *etr1-1* φυτά σε σχέση με τα Col-0 και *ein4* φυτά 2 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα. Στις 6 και 10 ημέρες το επίπεδο έκφρασης του *PR-5* στα *etr1-1* φυτά ήταν 6.7-φορές υψηλότερο σε σχέση με τα *ein4* φυτά και 2.1-φορές και 3.1-φορές μεγαλύτερο από ότι στα Col-0 φυτά, αντίστοιχα. Στη παρούσα εργασία τα γονίδια δείκτες του σαλικυλικού οξέος *PR-1*, *PR-2* και *PR-5* είχαν υπερεκφραστεί στην ανθεκτική αλληλεπίδραση *etr1-1* – *V. dahliae* παρόλο που τα SA-μεταλλαγμένα φυτά δεν είχαν δείξει ανθεκτικό φαινότυπο στα πειράματα παθογένειας (Εικόνες 2.4.1, 2.4.2, 2.4.3 και 2.4.4), υποδεικνύοντας την ύπαρξη αλληλοεπικοινωνίας (cross-talking) μεταξύ των διαφόρων μηχανισμών άμυνας (De Vos et al., 2005; Koornneef et al., 2008; Koornneef και Pieterse, 2008).

Άλλη μια ομάδα πρωτεϊνών που έχουν μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό στην άμυνα των φυτών είναι η οικογένεια των χιτινασών (chitinases) λόγω του δυναμικού τους στην άμυνα εναντίον διαφόρων παθογόνων. Χιτινάσες από όλες τις οικογένειες επέδειξαν *in vitro* αντιμυκητιακές ιδιότητες (Melchers et al., 1994; Ponstein et al., 1994) εναντίον μυκήτων που έχουν χιτίνη στα κυτταρικά τους τοιχώματα. Ωστόσο, μόνο ένας μικρός αριθμός μυκήτων είναι ευπαθείς στις χιτινάσες. Οι περισσότεροι μύκητες είναι ευπαθείς στη συνεργιστική δράση των χιτινασών και των γλουκανασών (β-1,3-glucanases) (Mauch et al., 1988; Sela-Buurlage et al., 1993). Σε *in vivo* πειράματα, γενετικώς τροποποιημένα φυτά σιταριού με σταθερή έκφραση μιας

χιτινάσης έδειξαν αυξημένη ανθεκτικότητα εναντίον του μύκητα *F. graminearum* (Shin et al., 2008). Στη παρούσα εργασία, δύο χιτινάσες βρέθηκαν να υπερεκφράζονται στα *etr1-1* φυτά μετά από εφαρμογή του *V. dahliae*. Η ανάλυση της Real-time PCR έδειξε επαγωγή των χιτινασών 2 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα σε όλους τους γονότυπους. Η μεγαλύτερη διαφορά που παρατηρήθηκε για την *CHI-1* ήταν στις 6 ημέρες όταν το επίπεδο έκφρασης της στα *etr1-1* φυτά ήταν 7.5-φορές και 3.5-φορές μεγαλύτερο σε σχέση με τα *ein4* και Col-0 φυτά, αντίστοιχα, ενώ το γονίδιο *CHI-2* παρουσίασε τη μεγαλύτερη διαφορά με τα Col-0 και *ein4* φυτά στις 14 ημέρες (3.8 και 4.2-φορές αντίστοιχα). Επομένως, τα υψηλά επίπεδα έκφρασης των *PR-2*, *CHI-1* και *CHI-2* στα *etr1-1* φυτά υποδεικνύουν πιθανή συνεργιστική δράση των ενζυματικών τους προϊόντων εναντίον του *V. dahliae* χωρίς να αποκλείεται η συμμετοχή των *PR-1* και *PR-5* (Mauch et al., 1988; Sela-Buurlage et al., 1993).

Πέρα από τις προαναφερθείσες πρωτεΐνες παθογένεσης, αρκετές έρευνες έχουν δείξει ότι τα φυτά ανταποκρίνονται στην μόλυνση από παθογόνα με την αυξημένη έκφραση μεταγραφικών παραγόντων όπως οι glutathione S-transferases (GST) και οι Myb (Mauch και Dudler, 1993; Hahn και Strittmatter, 1994; Wagner et al., 2002). Οι GSTs παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντίδραση των φυτών κατά την αλλαγή περιβαλλοντικών συνθηκών, και η έκφραση τους επάγεται από ένα μεγάλο αριθμό παραγόντων. Οι GSTs έχουν βρεθεί να λειτουργούν σε ένα μεγάλο αριθμό κυτταρικών διαδικασιών (Marra, 1996; Arakawa et al., 2002) και δρουν ως δυνητικοί ρυθμιστές της “απόπτωσης” (Dixon et al., 2002). Σε μια πρόσφατη έρευνα οι GSTs φαίνεται να συμμετέχουν στην μεταγωγή των σημάτων στα φυτικά κύτταρα (Foyer et al., 2005). Σε μια άλλη έρευνα, η έκφραση γονιδίου GST είχε επαχθεί πιο γρήγορα και πιο ισχυρά σε μια ανθεκτική ποικιλία βαμβακιού στο *V. dahliae* σε σχέση με μια ευπαθή ποικιλία (Jia et al., 2007). Στην παρούσα εργασία, 2 GST γονίδια, το *GSTF12* και το *GSTU16*, είχαν υπερεκφραστεί σε όλους τους γονότυπους μετά την εφαρμογή του *V. dahliae*. Το *GSTF12* βρέθηκε να εκφράζεται περισσότερο στα *etr1-1* φυτά σε σχέση με τα Col-0 και *ein4* φυτά σε κάθε ημέρα δειγματοληψίας. Η έκφραση του *GSTF12* ήταν 23.5-φορές υψηλότερη στα *etr1-1* σε σχέση με τα *ein4* φυτά στις 6 ημέρες και 10-φορές υψηλότερη σε σχέση με τα Col-0 φυτά στις 10 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα. Το γονίδιο *GSTU16* είχε υπερεκφραστεί σε μεγάλο βαθμό στις 6, 10 και 14 ημέρες στα *etr1-1* φυτά. Η μεγαλύτερη διαφορά παρατηρήθηκε στις 6 ημέρες όταν το επίπεδο έκφρασης του *GSTU16* στα *etr1-1* φυτά ήταν 20 φορές μεγαλύτερη σε σύγκριση με τα Col-0 φυτά. Ενδιαφέρον προκαλεί η παρατήρηση ότι το γονίδιο *GSTU16* δεν υπερεκφράστηκε στα *ein4* όπου είχε εφαρμοστεί ο μύκητας σε σύγκριση με τα αμόλυντα φυτά. Είναι προφανές ότι

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΤΟ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ ΚΑΙ Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΑΜΥΝΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

πέρα από τις διαφορές που παρατηρήθηκαν στα γονίδια των πρωτεϊνών που σχετίζονται με την παθογένεση (*PR1*, *PR2*, *PR5* και χιτινασών) η ανθεκτικότητα των φυτών *etr1-1* μπορεί να οφείλεται και σε μεταβολές της έκφρασης γονιδίων των μονοπατιών μεταγωγής των σημάτων όπως φαίνεται από την υπερέκφραση των γονιδίων *GSTF12* και *GSTU16* στα *etr1-1* φυτά.

Πρόσφατες γενετικές αναλύσεις έδειξαν ότι αρκετά γονίδια που κωδικοποιούν Myb μεταγραφικούς παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στις αντιδράσεις ανοσοποίησης των φυτών, με μερικούς παράγοντες να προσδένονται σε υποκινητές (promoters) γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών (Rushton και Somssich, 1998). Μετασχηματισμός φυτών με γονίδιο που κωδικοποιεί ένα Myb παράγοντα είχε σαν αποτέλεσμα τα φυτά να παρουσιάσουν αυξημένη ανθεκτικότητα στην μόλυνση από αρκετά βιοτροφικά και νεκροτροφικά παθογόνα (Mengiste et al., 2003). Στη παρούσα εργασία παρατηρήθηκε επαγωγή του γονιδίου *Myb75* σε όλους τους γονότυπους φυτών 2 ημέρες μετά την εφαρμογή του *V. dahliae*. Στα φυτά *etr1-1* υπερεκφράστηκε στις 6, 10 και 14 ημέρες με τη διαφορά να φτάνει στις 29.5-φορές σε σχέση με τα Col-0 φυτά στις 14 ημέρες και στις 5.9-φορές σε σύγκριση με τα *ein4* φυτά στις 10 ημέρες.

Η παρούσα εργασία, και με βάση τα μέχρι σήμερα βιβλιογραφικά δεδομένα, έδειξε για πρώτη φορά ότι η μειωμένη πρόσληψη αιθυλενίου μέσω του υποδοχέα ETR1 επάγει την έκφραση μιας ομάδας γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών *A. thaliana*, υποδεικνύοντας τη μοριακή βάση που ελέγχει την ανθεκτικότητα στους μύκητες *V. dahliae* και *F. oxysporum*. Αυτές οι μεταγραφικές μεταβολές οδήγησαν σε μειωμένη ανάπτυξη του παθογόνου μύκητα *V. dahliae* στους αγγειακούς ιστούς και μειωμένη ένταση της ασθένειας στα *etr1-1* φυτά. Επιπρόσθετα, τα *etr1-1* φυτά έδειξαν σημαντική ανθεκτικότητα στον μύκητα *F. oxysporum* f. sp. *raphani* συνοδευόμενη από μειωμένα συμπτώματα και μικρότερη ποσότητα της βιομάζας του παθογόνου στους ιστούς των φυτών. Οι μύκητες *F. oxysporum* και *V. dahliae* αποτελούν τις πιο σημαντικές απειλές για αρκετές καλλιέργειες αφού η χημική καταπολέμηση τους δεν είναι αποτελεσματική. Σε αυτή την εργασία επιχειρήθηκε να διασαφηνιστεί ο ρόλος του γονιδίου *ETR1* στην άμυνα των φυτών εναντίον των μυκήτων που προκαλούν αδρομυκώσεις, ως ένα βήμα για να κατανοηθούν οι αλληλεπιδράσεις των φυτών με τα παθογόνα αυτά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΟΥ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟΥ ΣΤΗΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ ΚΑΤΑ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *VERTICILLIUM DAHLIAE*

3.1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Προηγούμενα πειραματικά δεδομένα από το πρώτο κεφάλαιο έδειξαν ότι τα μεταλλαγμένα στον υποδοχέα αιθυλενίου ETR1 φυτά *Arabidopsis thaliana* ήταν πιο ανθεκτικά στο μύκητα *V. dahliae* από τα υπόλοιπα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν. Για να διερευνηθεί εάν η ελλιπής πρόσληψη του αιθυλενίου παρουσιάζει αντίστοιχο φαινότυπο σε φυτά τομάτας, μελετήθηκε ο ρόλος των γονιδίων *Never ripe (Nr)* και *ETR4* που κωδικοποιούν υποδοχείς αιθυλενίου στην τομάτα σε πειράματα παθογένειας με το μύκητα *V. dahliae*. Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν η μεταλλαγμένη σειρά τομάτας *Nr* (με απενεργοποιημένο τον υποδοχέα *Nr* που είναι ομόλογος του ETR1 των φυτών *A. thaliana*) ενώ για τον υποδοχέα ETR4, εφαρμόστηκε η τεχνολογία της ιικά επαγόμενης γονιδιακής σίγησης (virus induced gene silencing – VIGS) με βάση πλασμιδιακούς φορείς του ιού *Tobacco rattle virus (TRV)* για την καταστολή του γονιδίου *ETR4*. Με τη σύγκριση των συμπτωμάτων που παρουσίασαν τα φυτά διαπιστώθηκε ότι τα *Nr* καθώς και τα φυτά στα οποία πραγματοποιήθηκε σίγηση του γονιδίου *ETR4* (*ETR4-silenced*) έδειξαν ότι η σοβαρότητα της ασθένειας που προκαλεί ο μύκητας *V. dahliae* είναι σημαντικά μικρότερη από τα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Η εμφάνιση (ποσοστό ασθενών φυτών) και η σοβαρότητα της ασθένειας (ποσοστό ασθενών φύλλων σε σχέση με το συνολικό αριθμό των φύλλων) μειώθηκαν κατά 11% και 20% αντίστοιχα στα *Nr* σε σχέση με τα αγρίου τύπου (WT) φυτά, 33 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα. Παράλληλα, εμφάνιση και σοβαρότητα της ασθένειας στα *ETR4-silenced* φυτά μειώθηκαν κατά 14% και 15% αντίστοιχα, σε σύγκριση με τα φυτά που εμβολιάστηκαν με τον άδειο φορέα TRV, 37 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα. Η ποσοτικοποίηση του μύκητα *V. dahliae* που πραγματοποιήθηκε με αντιδράσεις Real-time PCR στα φυτά, έδειξε ότι η μείωση των συμπτωμάτων που παρατηρήθηκε στα *Nr* φυτά συσχετίζεται με σημαντική μείωση της ανάπτυξης του παθογόνου στους αγγειακούς ιστούς των φυτών αυτών σε σχέση με τα WT φυτά, υποδεικνύοντας ότι η

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΟΥ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟΥ ΣΤΗΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ ΚΑΤΑ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *V. DAHLIAE*

μειωμένη πρόσληψη του αιθυλενίου μέσω του υποδοχέα Nr οδηγεί σε αυξημένη ανθεκτικότητα των φυτών κατά του μύκητα *V. dahliae*. Η μείωση της ποσότητας του μύκητα παρατηρήθηκε σε κάθε ημέρα δειγματοληψίας στα Nr φυτά, και ήταν από 1.5 έως 1.75 φορές λιγότερη από ότι στα WT φυτά. Η ποσοτικοποίηση του μύκητα στα *ETR4*-silenced ήταν στα ίδια επίπεδα με τα φυτά του μάρτυρα παρόλο που η ένταση της ασθένειας ήταν μειωμένη στα *ETR4*-silenced φυτά.

3.2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

3.2.1 Γενικά

Οι πληροφορίες που υπάρχουν για τη ρύθμιση της σύνθεσης του αιθυλενίου στην τομάτα είναι πολλές σε αντίθεση με την πρόσληψή του και την επακόλουθη μεταγωγή του σήματός του στο φυτό. Μια μεταλλαγμένη σειρά με τροποποιημένη ικανότητα να προσλαμβάνει αιθυλένιο έχει αναγνωρισθεί. Η μεταλλαγή *Never ripe* (*Nr*) είναι μια μετάλλαξη σε ένα υποδοχέα αιθυλενίου στην τομάτα που έχει ως αποτέλεσμα την ανικανότητα της ωρίμανσης του καρπού (Wilkinson et al., 1995). Ανάλυση των *Nr* φυτών έδειξε έναν αριθμό πλειοτροπικών συνεπειών που είναι ενδεικτικές της μη αντίληψης του αιθυλενίου από τα φυτά (Lanahan et al., 1994). Η μεταλλαγμένη σειρά παρουσιάζει αδυναμία αποκοπής των ανθέων και σημαντική καθυστέρηση στην ωρίμανση των ανθέων και των πετάλων. Αρκετοί ερευνητές χρησιμοποίησαν την μεταλλαγμένη *Nr* σειρά ως εργαλείο για την αποτίμηση του ρόλου του αιθυλενίου σε ένα μεγάλο φάσμα διαδικασιών που αφορούν την ανάπτυξη (Aloni et al., 1998· Clark et al., 1999· Hansen και Grossmann, 2000· Llop-Tous et al., 2000), τη γονιδιακή έκφραση (Rose et al., 1997· Nakatsuka et al., 1998) και το στρες (Lund et al., 1998· Ciardi et al., 2000· O'Donnell et al., 2001).

3.2.2 Η οικογένεια υποδοχέων αιθυλενίου στη τομάτα

Η αφθονία των φυσιολογικών και μοριακών ερευνών που έχουν γίνει στη τομάτα την καθιστούν ένα άριστο σύστημα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στις έρευνες των αντιδράσεων του αιθυλενίου. Οι καλά χαρακτηρισμένοι ρόλοι του αιθυλενίου στη διαδικασία της ωρίμανσης των καρπών, της μάρανσης των πετάλων και της αποκοπής των ανθέων δείχνουν τα πλεονεκτήματα του φυτού αυτού. Σε μοριακό και βιοχημικό επίπεδο, η ρύθμιση της ανάπτυξης μέσω ενός υποδοχέα του αιθυλενίου αποδείχθηκε αρχικά από την σημαντικά αυξημένη έκφραση του *Nr* κατά την ωρίμανση των καρπών (Wilkinson et al., 1995). Έξι υποδοχείς του αιθυλενίου (*LeETR1-6*) έχουν απομονωθεί και χαρακτηρισθεί (Wilkinson et al., 1995· Zhou et al., 1996α, β· Lashbrook et al., 1998· Tieman και Klee, 1999). Έχει επικρατήσει ο υποδοχέας *LeETR3* να αναφέρεται ως *NR* και αυτή η ονομασία χρησιμοποιείται και στην παρούσα εργασία. Οι αναμενόμενες δομές των υποδοχέων της οικογένειας *LeETR* είναι όμοιες με αυτές των υποδοχέων του φυτού *A. thaliana*. Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν όμως είναι αρκετά διαφορετικές και παρουσιάζουν κάτω από 50%

ομολογία στην αλληλουχία τους με εξαίρεση τους υποδοχείς ETR1 από το *A. thaliana* και Nr της τομάτας. Δύο υποδοχείς έχουν μια επιπλέον N-τελική διαμεμβρανική περιοχή. Αυτή η περιοχή μπορεί να είναι αλληλουχία σήματος ή μπορεί να εξυπηρετεί για να κατευθύνει το N-τελικό άκρο στο κυτόπλασμα. Μόνο ο υποδοχέας NR δεν έχει την C-τελική περιοχή (receiver). Τουλάχιστον ένας και πιθανόν τρεις υποδοχείς (LeETR4-6) δεν έχουν την πλήρη ομάδα των συντηρημένων περιοχών ιστιδινικής κινάσης, όπως συμβαίνει και στους υποδοχείς της υποοικογένειας-II του φυτού *A. thaliana*. Παρ' όλες τις δομικές διαφορές μεταξύ των υποδοχέων της τομάτας έχει πειραματικά αποδειχθεί ότι όλοι είναι υποδοχείς αιθυλενίου ως προς την ικανότητα τους να προσδένουν το αιθυλένιο. Επιπρόσθετα, ο NR μπορεί να λειτουργήσει *in vivo* με τέτοιο τρόπο ώστε να αντισταθμίσει την απώλεια λειτουργίας του υποδοχέα LeETR4, παρόλο που οι δύο υποδοχείς είναι λιγότερο από 50% ομόλογοι (Tiemann et al., 2000).

3.2.2.1 Έκφραση των υποδοχέων της τομάτας

Τα μοτίβα έκφρασης των υποδοχέων αιθυλενίου της τομάτας έχουν χαρακτηριστεί. Το κάθε γονίδιο έχει ένα ξεχωριστό προφίλ έκφρασης κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και στην αντίδραση σε εξωτερικά ερεθίσματα (Lashbrook et al., 1998; Tiemann και Klee, 1999). Τα LeETR1 και LeETR2 εκφράζονται σε σταθερά επίπεδα σε όλους τους ιστούς κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, με το LeETR1 να εκφράζεται περίπου 5 φορές περισσότερο από το LeETR2. Δεν παρουσιάστηκε αλλαγή της έκφρασης αυτών των γονιδίων ως αντίδραση σε κάποιο εξωτερικό ερέθισμα όπως για παράδειγμα στο αιθυλένιο ή στη μόλυνση από κάποιο παθογόνο. Σε αντίθεση, τα προφίλ έκφρασης των άλλων τεσσάρων γονιδίων παρουσίασαν μεγάλη διακύμανση. Για παράδειγμα κατά την άνθηση οι ωοθήκες εξέφρασαν υψηλά επίπεδα mRNA του NR. Ακολούθως τα επίπεδα μειώθηκαν περίπου 10 φορές μέχρι την έναρξη της ωρίμανσης όπου αυξήθηκαν πάλι περίπου 20 φορές. Η αύξηση αυτή είναι ένα παράδειγμα που δείχνει την εξαρτώμενη από το στάδιο ανάπτυξης επαγωγή των γονιδίων του αιθυλενίου, αφού το γονίδιο επάγεται κατά την ωρίμανση αλλά όχι στους ανώριμους καρπούς (Wilkinson et al., 1995). Τα γονίδια LeETR4, LeETR5 και LeETR6 εκφράζονται σε αφθονία σε αναπαραγωγικούς ιστούς (άνθη και καρπούς) και σε μικρότερο βαθμό στους βλαστούς (Tiemann και Klee, 1999). Επίσης, τα επίπεδα των LeETR4 και LeETR5 αυξάνουν σημαντικά κατά την ωρίμανση των καρπών. Η σημασία της υψηλότερης έκφρασης αυτών των υποδοχέων στους αναπαραγωγικούς ιστούς δεν είναι προς το παρόν γνωστή. Τα γονίδια NR και

LeETR4 επάγονται από την προσβολή από παθογόνα ενώ τα άλλα γονίδια δεν επηρεάζονται. Η εξαρτώμενη από παθογόνα επαγωγή του LeETR4 έχει συσχετιστεί με την αυξημένη σύνθεση αιθυλενίου στην περίπτωση μόλυνσης με ένα μη μολυσματικό παθογόνο. Αυτή η επαγωγή αποτελεί σημαντικό στοιχείο του αμυντικού μηχανισμού των φυτών που λειτουργεί για να μειώσει την αντίληψη του αιθυλενίου στο προσβεβλημένο ιστό και να περιορίσει κατ' αυτό το τρόπο τη ζημιά στους ιστούς (Ciardi et al., 2001) (περιγράφεται παρακάτω).

3.2.2.2 Γονιδιακή έκφραση και λειτουργία

Όταν μελετάται η σημαντικότητα της έκφρασης των υποδοχέων στα πλαίσια της συνολικής ρύθμισης των αντιδράσεων του αιθυλενίου, υπάρχουν κάποια σημεία που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη.

Καταρχήν, οι υποδοχείς λειτουργούν ως αρνητικοί ρυθμιστές του αιθυλενίου. Έχει ήδη αναφερθεί στο πρώτο κεφάλαιο ότι απουσία αιθυλενίου καταστέλλεται η έκφραση των επαγόμενων από το αιθυλένιο γονιδίων. Αυτό το μοντέλο προβλέπει ότι θα έπρεπε να υπάρχει αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των υποδοχέων και της αντίληψης του αιθυλενίου στους ιστούς. Θα έπρεπε να προσληφθεί περισσότερο αιθυλένιο για να απενεργοποιηθούν τα υψηλά επίπεδα έκφρασης έτσι ώστε να απελευθερωθεί η καταστολή και των υποδοχέων. Αυτό το μοντέλο εξηγεί γιατί οι πολλαπλές μεταλλαγές σε υποδοχείς αιθυλενίου στα φυτά *A. thaliana* επιδεικνύουν συνεχή αντίδραση αιθυλενίου παρόλο που τα επίπεδα της ορμόνης παραμένουν σταθερά στα φυτά. Τα βασικά επίπεδα αιθυλενίου που παράγονται στα φυτά είναι αρκετά για να απενεργοποιήσουν το σύνολο των υποδοχέων.

Ο δεύτερος παράγοντας που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στις αντιδράσεις αιθυλενίου είναι ότι οι υποδοχείς έχουν πολύ μεγάλο χρόνο ημιζωής για το διαχωρισμό τους από το αιθυλένιο. Ο χρόνος ημιζωής του διαχωρισμού του αιθυλενίου από τον υποδοχέα ETR1 υπολογίστηκε στις ζύμες να είναι περίπου 12 ώρες (Schaller και Bleecker, 1995). Αυτός ο ρυθμός διαχωρισμού είναι μάλλον μικρότερος από τον πραγματικό αφού σε αυτόν δεν υπολογίστηκε η προσαύξηση σε πρωτεΐνη (protein turnover). Έτσι η διάρκεια διαχωρισμού θα μπορούσε να είναι μεγαλύτερη από 12 ώρες. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι από τη στιγμή που ο υποδοχέας έχει δεσμεύσει αιθυλένιο θα είναι αδύνατο να καταστείλει την επαγωγή των ET-εξαρτώμενων αντιδράσεων για πολύ μεγάλο διάστημα. Επομένως, ο μόνος τρόπος με τον οποίο ένας ιστός μπορεί να σταματήσει την αντίδραση αιθυλενίου από

τη στιγμή που έχει ξεκινήσει, είναι μόνο μέσω της σύνθεσης νέου υποδοχέα. Συμπερασματικά, σε μη αναστρέψιμους τύπους αντιδράσεων όπως είναι η αποκοπή, η γήρανση των ανθέων ή η ωρίμανση των καρπών δεν υπάρχει ανάγκη να ανατραπεί η διαδικασία. Ωστόσο, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι το αιθυλένιο παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές περιβαλλοντικές αντιδράσεις. Πολλές από αυτές τις αντιδράσεις, όπως ή έλλειψη νερού ή οι τραυματισμοί εξαφανίζονται μετά από κάποιο χρονικό διάστημα. Τα φυτά πρέπει να είναι ικανά να διακόπτουν την αντίδραση του αιθυλενίου ανάλογα με τις ανάγκες τους. Αυτό απαιτεί τη σύνθεση νέων υποδοχέων.

Για να μελετηθεί αυτό το μοντέλο αναπτύχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν γενετικώς τροποποιημένα φυτά *A. thaliana*. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα περισσότερα δεδομένα αφορούν την ποσότητα του RNA. Ωστόσο, τα επίπεδα της NR πρωτεΐνης έχουν ελεγχθεί με αντισώματα τόσο σε φυτά που υπερεκφράζουν όσο και σε φυτά που υποεκφράζουν το NR, και υπάρχει καλή συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων RNA και πρωτεΐνης. Τα γενετικώς τροποποιημένα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν και υπερέκφραζαν το NR (έφεραν cDNA του γονιδίου κάτω από τον έλεγχο του 35S υποκινητή) (Ciardi et al., 2000) όντως δεν αντιλαμβάνονταν το αιθυλένιο. Επομένως, τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα οδήγησαν σε μειωμένη αντίδραση αιθυλενίου. Αντίθετα, η αντικωδική μείωση της έκφρασης των υποδοχέων δεν είχε μεγάλη επίδραση στην αντίληψη του αιθυλενίου. Αυτά τα αποτελέσματα ήταν τα ίδια με τα δεδομένα από τα φυτά *A. thaliana* και υποδεικνύουν ότι υπάρχει ένας βαθμός επικάλυψης της λειτουργίας των υποδοχέων. Υπάρχει ωστόσο μια εξαίρεση αφού η αντικωδική μείωση του LeETR4 επηρέασε πολύ τα φυτά, που έδειξαν σταθερή αντίδραση αιθυλενίου. Αυτός ήταν ο μόνος υποδοχέας που όταν μειώθηκε η έκφραση του οδήγησε σε έντονο φαινότυπο υπερευαισθησίας στο αιθυλένιο. Οι επιδράσεις συμπεριλάμβαναν επινασσία, ανθόπτωση και γρηγορότερη ωρίμανση των καρπών. Αυτές οι επιδράσεις συνέβησαν χωρίς αύξηση της σύνθεσης του αιθυλενίου. Επομένως, τα φυτά έγιναν πιο ευαίσθητα στο αιθυλένιο δείχνοντας σημαντική μείωση στη δόση του αιθυλενίου που απαιτείται για την έναρξη μιας βιολογικής αντίδρασης. Αυτός ο φαινότυπος προκάλεσε αρχικά έκπληξη αφού το LeETR4, παρόλο που βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα, δεν είναι ο μόνος υψηλά εκφραζόμενος υποδοχέας στους αναπαραγωγικούς ιστούς. Μια πιο ενδελεχής εξέταση της γονιδιακής έκφρασης των υποδοχέων σε γενετικώς τροποποιημένα φυτά έδειξε ότι όταν η έκφραση του NR μειώθηκε με αντικωδικό μετασχηματισμό, η έκφραση του LeETR4 αυξήθηκε ανάλογα. Κατά κάποιο τρόπο τα φυτά αντισταθμίζουν τη μειωμένη έκφραση του NR με την αύξηση της έκφρασης του

LeETR4. Επομένως, το συνολικό περιεχόμενο υποδοχέων των αντικωδικών NR φυτών δεν επηρεάζεται σε αντίθεση με τις αντικωδικές LeETR4 σειρές φυτών (Tiemann et al., 2000). Μέχρι σήμερα αυτός ο μηχανισμός “αντιστάθμισης” δεν έχει παρατηρηθεί στα φυτά *A. thaliana*. Παρ’ όλα αυτά, τα δεδομένα από τα φυτά τομάτας συμφωνούν με το μοντέλο της αύξησης της ευαισθησίας στο αιθυλένιο κατά τη μειωμένη έκφραση των υποδοχέων.

Μέχρι σήμερα, έχει παρατηρηθεί αλλαγή στην έκφραση πολλών υποδοχέων στην τομάτα είτε κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του φυτού ή ως αντίδραση σε εξωτερικά ερεθίσματα. Ωστόσο, σε κάθε περίπτωση η ρύθμιση ήταν πάντα θετική και η έκφραση των γονιδίων αυξήθηκε. Δεν έχει παρατηρηθεί καμία περίπτωση μείωσης της έκφρασης που να σχετίζεται με αύξηση της ευαισθησίας στο αιθυλένιο. Επομένως φαίνεται ότι τα φυτά τομάτας μπορούν να χρησιμοποιούν την έκφραση των υποδοχέων για να μειώνουν την ευαισθησία στο αιθυλένιο ή για να επαναφέρουν την ικανότητα τους να αντιδρούν στο αιθυλένιο. Ο τρόπος που τα φυτά τομάτας ξεκινούν την αντίδραση στο αιθυλένιο στηρίζεται σε ένα καλά ρυθμιζόμενο σύστημα σύνθεσης αιθυλενίου. Όταν αρχίζει μια αντίδραση αιθυλενίου υπάρχει αυξημένη σύνθεση αιθυλενίου που συνήθως ακολουθείται από αυξημένη σύνθεση υποδοχέων. Παρόλο που μπορεί να φαίνεται αντιπαραγωγικό το να μειώνεται η ορμονική ευαισθησία ακριβώς μετά τη σύνθεση, φαίνεται να ακολουθεί ένα μοτίβο που παρουσιάζουν πολλές φυτορμόνες. Όταν το φυτό συνθέτει ή εκτίθεται σε ξαφνική αύξηση σε μια ορμόνη αντιδρά με την αύξηση των μηχανισμών που απενεργοποιούν αυτή την αντίδραση. Συνήθως η αντίδραση αυτή εμπλέκει τη σύνθεση ενζύμων που απενεργοποιούν άμεσα την ορμόνη. Για παράδειγμα, η εφαρμογή αυξίνης σε φυτά *A. thaliana* οδήγησε σε σημαντική αύξηση ενζύμων που δεσμεύουν την αυξίνη (Ostin et al., 1998). Στην περίπτωση του αιθυλενίου, δεν υπάρχουν γνωστά ένζυμα που να το απενεργοποιούν. Λόγω της γρήγορης διάχυσής του πιθανώς δεν υπάρχει ανάγκη απενεργοποίησής του. Επειδή γονίδια υποδοχέων άλλων ορμονών έχουν ανακαλυφθεί πρόσφατα δεν είναι γνωστό εάν τα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων τους αντιδρούν στην αύξηση των ορμονών με παρόμοιο τρόπο. Είναι απολύτως φυσιολογικό για τα φυτά να δράσουν έτσι ώστε να μειώσουν την αντίδραση σε μια ορμόνη ακριβώς μετά την σύνθεση της. Η αυξημένη σύνθεση υποδοχέων αιθυλενίου πιθανώς εξυπηρετεί αυτό το σκοπό.

Τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι η αυξημένη έκφραση του γονιδίου *LeETR4* ως αντίδραση στη μόλυνση από παθογόνα, φαίνεται να παίζει κάποιο ρόλο στην ασθένεια. Το γονίδιο *LeETR4* επάγεται κατά την αντίδραση υπερευαισθησίας που

ενεργοποιείται από τη μόλυνση από το βακτήριο *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Ciardi et al., 2001). Σε αντικωδικές σειρές με μειωμένη έκφραση του *LeETR4*, παρατηρείται επιτάχυνση της αντίδρασης υπερευαισθησίας που συμβαίνει κατά τη μόλυνση με το παθογόνο. Η αύξηση της σύνθεσης αιθυλενίου και έκφρασης γονιδίων παθογένειας ήταν μεγαλύτερη και γρηγορότερη στη μολυσμένη αντικωδική σειρά, υποδεικνύοντας αύξηση των αμυντικών μηχανισμών. Ωστόσο, αυτή η αντίδραση κοστίζει στο φυτό αφού η ζημιά στους ιστούς που περιβάλλουν το σημείο μόλυνσης μπορεί να είναι πολύ μεγαλύτερη. Εάν το επίπεδο του υποδοχέα δεν αυξηθεί ως αντίδραση στην προσβολή, ο ιστός είναι υπερ-ευαίσθητος στο αιθυλένιο. Επομένως, φαίνεται ότι το κανονικό μοτίβο αύξησης των υποδοχέων που επάγεται από τα παθογόνα ή το αιθυλένιο έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή της επακόλουθης αντίδρασης αιθυλενίου για τον περιορισμό της συνολικής ζημιάς στα φυτά.

3.2.3 RNA γονιδιακή σίγηση

Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει μεγάλη πρόοδος στη διαλεύκανση του μηχανισμού της RNA γονιδιακής σίγησης, που είναι μια διαδικασία που οδηγεί στην αποδόμηση ομόλογων mRNA. Η διαδικασία αυτή στα ζώα ονομάζεται RNA παρεμβολή (RNA interference - RNAi), στα φυτά μετα-μεταγραφική γονιδιακή σίγηση (posttranscriptional gene silencing – PTGS) και στους μύκητες καταστολή (quelling) (Kooter et al., 1999· Matzke et al., 2001· Vaucheret et al., 2001· Waterhouse et al., 2001· Hannon 2002). Παρόλο που το φαινόμενο είχε αρχικά περιγραφεί σε φυτά πετούνιας ως συγκαταστολή (cosuppression) (Naroli et al., 1990), πιο εκτεταμένες έρευνες πραγματοποιήθηκαν στη λειτουργική ανάλυση γονιδίων στο νηματώδη *Chaenorhadtis elegans* (Fire et al., 1998). Η ύπαρξη παρόμοιων μηχανισμών για το φαινόμενο αυτό σε διαφορετικά είδη υποδεικνύει μια συντηρημένη βιολογική λειτουργία RNA σίγησης κατά την εξέλιξη των οργανισμών.

Η RNA σίγηση δεν επηρεάζει τη μεταγραφή ολόκληρου του γονιδίου, αλλά προκαλεί αποδόμηση μόνο συγκεκριμένων αλληλουχιών στόχων mRNA. Αντίθετα, η μεταγραφική γονιδιακή σίγηση (transcriptional gene silencing - TGS), παρεμποδίζει τη μεταγραφή μέσω της μεθυλίωσης και ανακατασκευής των χρωματινών στο επίπεδο του DNA (Fagard και Vaucheret 2000). Το κοινό χαρακτηριστικό της RNA σίγησης και της μεταγραφικής γονιδιακής σίγησης είναι ότι και οι δύο ενεργοποιούνται από την παρουσία RNA διπλής έλικας (dsRNA), η οποία ακολούθως τεμαχίζεται σε μικρά RNA (small RNAs) που είναι λειτουργικά σε ένα μεγάλο αριθμό επιγενετικών

(αλλαγές στο φαινότυπο ή στην γονιδιακή έκφραση) διαδικασιών γονιδιακής σίγησης (Waterhouse et al., 2001· Eckardt 2002). Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι τμήματα RNA που λέγονται μικρά πρόσκαιρα RNAs (short temporal, stRNAs), τα οποία είναι μια ομάδα από μικρά RNA που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες (microRNAs - miRNAs) και που αναγνωρίστηκαν αρχικά από τη λειτουργία τους στην καταστολή της βιοσύνθεσης πρωτεϊνών στα ζώα, συμμετέχουν επίσης στο μηχανισμό της dsRNA-επαγόμενης γονιδιακής σίγησης (Cerutti, 2003). Η συμμετοχή των miRNA στο μηχανισμό αυτό υποδεικνύει τον πιθανό σύνδεσμο μεταξύ της RNA σίγησης και της miRNA-εξαρτώμενης γονιδιακής σίγησης.

Στα φυτά, η RNA σίγηση, που αποτελεί ένα τμήμα της γονιδιακής σίγησης, δεν εξυπηρετεί μόνο ως ένα απαραίτητο στοιχείο του αμυντικού μηχανισμού κατά των φυτοπαθογόνων ιών, αλλά παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ενδογενούς γονιδιακής έκφρασης (Voinnet, 2002). Το σήμα της ενδοκυτταρικής RNA σίγησης μπορεί να μεταδοθεί διασυστηματικά από κύτταρο σε κύτταρο σε μεγάλη απόσταση μέσω του ηθμού, όπως αποδείχθηκε από την εξάπλωση της σίγησης σε πειράματα τοπικής μόλυνσης με ιό σε εμβολιασμένα φυτά (Yu και Kumar, 2003). Τα siRNAs και dsRNAs έχουν προταθεί ως τα μόρια που είναι υπεύθυνα για αυτά τα σήματα της σίγησης, ωστόσο η συμμετοχή τους στον μηχανισμό δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί (Palauqui et al., 1997· Voinnet et al., 1998· Ruiz-Medrano et al., 1999· Mlotshwa et al., 2002). Επομένως, η RNA σίγηση μπορεί να συνδέεται τόσο με την άμυνα όσο και με την ανάπτυξη των φυτών. Αξίζει να σημειωθεί ότι ορισμένοι ιοί μπορούν να κωδικοποιούν πρωτεΐνες που αντιδρούν με την RNA σίγηση. Στο γονιδίωμα αυτών των ιών, όπως είναι οι rotavirus και cucumovirus, υπάρχει ένα συγκεκριμένο ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame) που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη TGBp1, που είναι υπεύθυνη τόσο για τη μετακίνηση του ιού από κύτταρο σε κύτταρο αλλά και για την παρεμπόδιση της διασυστηματικής μετάδοσης του σήματος της PTGS (Lough et al., 2000· Voinnet et al., 2000· Vance και Vaucheret 2001). Η ύπαρξη τέτοιων μηχανισμών στους ιούς αποτελεί ένα παράδειγμα που δείχνει την πολυπλοκότητα του μηχανισμού της RNA σίγησης όταν τα φυτά βρίσκονται κάτω από διαφορετικά βιολογικά στρες.

3.2.3.1 Μονοπάτια της RNA σίγησης στα φυτά

Υπάρχουν τρία μονοπάτια μέσω των οποίων μπορεί να πραγματοποιηθεί RNA σίγηση. Το πρώτο μονοπάτι είναι μέσω των siRNA στο κυτόπλασμα. Αυτός ο τρόπος είναι σημαντικός σε φυτά που έχουν μολυνθεί με κάποιο ιό όπου το dsRNA

θα μπορούσε να είναι ένα ενδιάμεσο του ιϊκού πολλαπλασιασμού ή δευτερογενής δομή του ιϊκού RNA απλής έλικας. Στην περίπτωση των DNA ιών, το dsRNA μπορεί να σχηματίζεται από τον υβριδισμό επικαλυπτόμενων συμπληρωματικών μεταγράφων.

Το δεύτερο μονοπάτι είναι η σίγηση ενός ενδογενούς mRNA από miRNA. Αυτά τα miRNA γίνονται αρνητικοί ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης μέσω του υβριδισμού τους σε συγκεκριμένα mRNA, που οδηγεί είτε στον τεμαχισμό τους ή στην ανάρχεση της μετάφρασης των πρωτεϊνών. Όπως τα siRNA, τα miRNA είναι μικρά RNA μήκους 21–26 νουκλεοτιδίων που προέρχονται από τον τεμαχισμό πρόδρομων RNA από τη πρωτεΐνη Dicer.

Το τρίτο μονοπάτι της RNA σίγησης στα φυτά σχετίζεται με την μεθυλίωση του DNA και την καταστολή της μεταγραφής, όπως έχει αναφερθεί πιο πάνω (transcriptional gene silencing – TGS) (Baulcombe, 2004).

3.2.3.2 Ο μηχανισμός της RNA σίγησης στα φυτά

Ο μηχανισμός της RNA σίγησης που επάγεται από dsRNA περιλαμβάνει δύο βήματα, το εναρκτήριο βήμα και το βήμα υλοποίησης (Cerutti 2003). Το εναρκτήριο βήμα περιλαμβάνει τον τεμαχισμό του dsRNA σε siRNA μήκους 21–26 νουκλεοτιδίων που αντιστοιχούν στην κωδική και αντικωδική αλυσίδα του γονιδίου στόχου (Hamilton και Baulcombe 1999· Voinnet 2002). Στο βήμα υλοποίησης, τα siRNA προσελκύονται στο σύμπλοκο πρωτεϊνών που λέγεται RNA-induced silencing complex (RISC), στο οποίο πραγματοποιείται η αποδόμηση του mRNA στόχου (Hammond et al., 2000· Zamore et al., 2000). Το κάθε σύμπλοκο RISC φαίνεται να έχει μια περιοχή αναγνώρισης και πρόσδεσης για τα siRNA, RNase και mRNA. Επίσης, τα siRNA κατατάσσονται σε κλάσεις 2 μεγεθών στα φυτά (Hamilton et al., 2002· Mallory et al., 2002· Tang et al., 2003), που λέγονται 'long siRNA' μήκους 24-26 νουκλεοτιδίων και συμμετέχουν στην ενεργοποίηση της διασυστηματικής γονιδιακής σίγησης και 'short siRNA' (21-22 νουκλεοτίδια) που σχετίζονται με την εξειδικευμένη αποδόμηση των mRNA στόχων. Ο τεμαχισμός αυτός του mRNA στόχου συμβαίνει περίπου στη μέση του siRNA μέσα στο RISC, οδηγώντας σε πάνω από 90% αναστολή της γονιδιακής έκφρασης του γονιδίου στόχου.

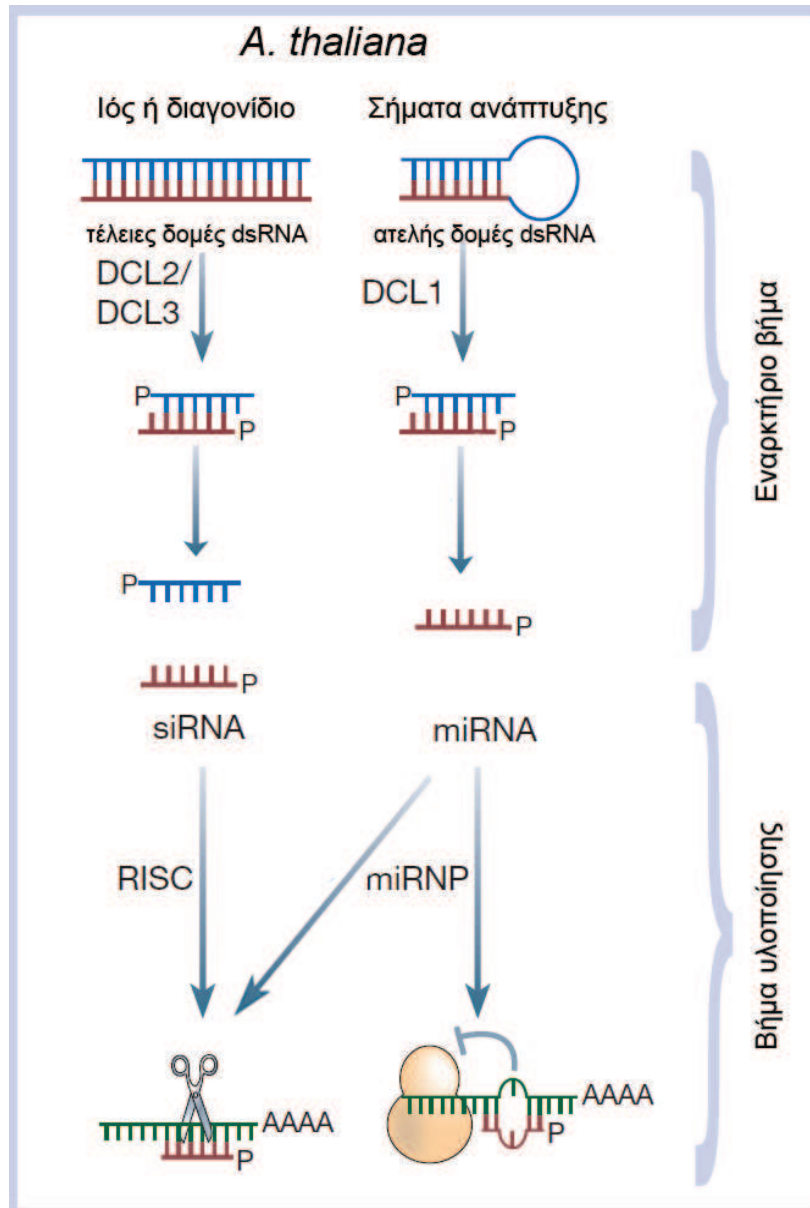
3.2.3.3 Η πρωτεΐνη Dicer συμμετέχει στο σχηματισμό των siRNA και miRNA

Η μετατροπή των dsRNA σε siRNA γίνεται μέσω μιας RNase-III-like dsRNA-εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης, που λέγεται Dicer, που βρέθηκε αρχικά στη

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΟΥ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟΥ ΣΤΗΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ ΚΑΤΑ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *V. DAHLIAE*

Drosophila (Bernstein et al., 2001). Τα μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών Dicer, είναι λειτουργικά συντηρημένα στους μύκητες, τα φυτά και τα ζώα (Tijsterman et al., 2002).

Οι πρωτεΐνες Dicer λειτουργούν σε 2 διαφορετικά μονοπάτια στη γονιδιακή σίγηση μέσω της αναγνώρισης ξεχωριστών τύπων πρόδρομων dsRNA (Εικόνα 3.2.1). Στο πρώτο μονοπάτι, που οδηγεί αποκλειστικά σε RNA σίγηση, η Dicer τεμαχίζει τις τέλειες δομές dsRNA που προέρχονται κυρίως από την περιοχή κωδικοποίησης της πρωτεΐνης για να σχηματίσουν διπλής έλικας siRNAs, που οδηγεί στον παραπέρα ενδονουκλεολυτικό τεμαχισμό των ομόλογων RNA με αλληλεπίδραση απόλυτης ομολογίας βάσεων. Αυτό το μονοπάτι είναι στενά συνδεδεμένο με αμυντικούς μηχανισμούς στα φυτά αφού σχεδόν όλα τα siRNA αναγνωρίστηκαν από ομολογία αλληλουχίας με μεταθετά (transposon) ή ιικά γονίδια (Elbashir et al., 2001a; Lau et al., 2001). Στο δεύτερο μονοπάτι, η Dicer κόβει ατελή RNA που προέρχονται κυρίως από τις περιοχές μεταξύ γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες σε stRNAs, που ακολούθως σχηματίζουν τα συμπλέγματα των microRNA-ριβονουκλεοπρωτεϊνών (ribonucleoprotein complex - miRNP) και που ρυθμίζουν την παρεμπόδιση της μετάφρασης ή άλλων συνεπειών της PTGS, όπως το mRNA splicing, εντοπισμό ή σταθεροποίηση μέσω ατελούς συμπληρωματικότητας με τους στόχους τους (Olsen και Ambros 1999; Hutvagner et al., 2001; Voinnet 2002). Επομένως, η Dicer επεξεργάζεται τα πρόδρομα dsRNA για τη δημιουργία τόσο των siRNA όσο και των miRNA.



Εικόνα 3.2.1: Μονοπάτια της RNA σίγησης στο φυτό *A. thaliana* διαχωρίζονται σε 2 βήματα. Στο εναρκτήριο βήμα, οι τέλειες δομές dsRNA, επαγόμενες από ιούς ή διαγονίδια, επεξεργάζονται από τις Dicer πρωτεΐνες (DCL) σε διπλής έλικας short interfering RNAs (siRNAs). Στο βήμα υλοποίησης τα siRNA προσελκύονται στο σύμπλοκο RISC που ρυθμίζει τον ενδονουκλεϊκό τεμαχισμό του mRNA στόχου με την απόλυτη ή σχεδόν απόλυτη ομολογία βάσεων μεταξύ των siRNA και των αλληλουχιών στόχων. Στο φυτό *A. thaliana* ενδογενή σήματα ανάπτυξης μπορεί να ενεργοποιήσουν το σχηματισμό ορισμένων ατελών δομών dsRNA, που ακολούθως τεμαχίζονται από την DCL1 και/ή άλλες DCL σε διπλής έλικας miRNA. Αυτά τα miRNAs συμμετέχουν σε μια πληθώρα ρυθμιστικών διαδικασιών: ορισμένα λειτουργούν ως siRNA στην RNA σίγηση με απόλυτη ή σχεδόν απόλυτη ομολογία βάσεων με το mRNA στόχο, κάποια άλλα μπορεί να συγκεντρώνονται στο microRNA ριβονουκλεϊκό σύμπλοκο(miRNP) το οποίο ρυθμίζει άλλες μετα-μεταγραφικές διαδικασίες γονιδιακής σίγησης (PTGS), όπως η αναστολή της μετάφρασης, με ατελή ομολογία βάσεων με τις αλληλουχίες στόχους. Η αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών DCL και ARGONAUTE (AGO) μπορεί να οδηγήσει στην αναγνώριση και επεξεργασία διαφορετικών πρόδρομων μορίων dsRNA, και την επακόλουθη παραγωγή διαφορετικών τύπων μικρών RNA που απαιτούνται είτε για την άμυνα ή για την ανάπτυξη των φυτών.

3.2.3.4 Αλληλεπίδραση της Dicer με άλλες πρωτεΐνες μπορεί να καθορίσει την επεξεργασία των siRNA και miRNA

Είναι πιθανόν σε κάποιους οργανισμούς που κωδικοποιούν μόνο μια πρωτεΐνη Dicer, τα miRNA και siRNA μονοπάτια σίγησης να διασταυρώνονται στο βήμα της Dicer, που μπορεί να συμπεριλαμβάνει κι άλλες πρωτεΐνες, όπως η RNA interference (RNAi) DEFECTIVE (RDE)/ARGONAUTE (AGO) πρωτεΐνη (Cerutti 2003). Για παράδειγμα, ο νηματώδης *C. elegans* χρειάζεται την RDE-1 για την δημιουργία λειτουργικών siRNAs στην RNA σίγηση, ενώ οι ARGONAUTE-LIKE-1 (ALG-1) και ALG-2 πρωτεΐνες είναι απαραίτητες μόνο την παραγωγή των stRNA (Tabara et al., 1999; Grishok et al., 2001). Σε αρκετούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς, οι ARGONAUTE πρωτεΐνες έχουν χαρακτηριστεί από το ρόλο τους στην επεξεργασία ξεχωριστών τύπων μικρών RNA μέσω της επιλογής διάφορων πρόδρομων μικρών RNA (Tabara et al., 1999; Vance και Vaucheret 2001; Hannon, 2002; Martinez et al., 2002). Επομένως, η εξειδίκευση στη δημιουργία του κάθε είδους μικρών RNA (π.χ. miRNAs ή siRNAs) πιθανώς να καθορίζεται από την αλληλεπίδραση πρωτεϊνών – πρωτεΐνες μεταξύ συγκεκριμένων ομόλογων AGO και Dicer πρωτεϊνών (Cerutti et al., 2000). Έχουν αναγνωριστεί περισσότερα από 10 AGO γονίδια στο φυτό *Arabidopsis*, και τουλάχιστον τα AGO1 και AGO4 εμπλέκονται τόσο στην RNA σίγηση όσο και στην ανάπτυξη των φυτών, και που μοιάζει με την συνδυασμένη λειτουργία των RDE-1, ALG-1 και ALG-2 στον *C. elegans* (Fagard et al., 2000; Morel et al., 2002; Zilberman et al., 2003).

3.2.3.5 Εφαρμογή της RNA σίγησης στα φυτά

Με την ολοκλήρωση της αλληλουχίας του γονιδιώματος διάφορων φυτών, όπως το *Arabidopsis thaliana*, το ρύζι, το αμπέλι και το καλαμπόκι, αλλά και η συνεχώς αυξανόμενη πληροφορία στις βάσεις δεδομένων των αλληλουχιών πολλών καλλιεργούμενων φυτών, η πρακτική εφαρμογή της RNA σίγησης για τη μείωση της γονιδιακής έκφρασης έχει εξελιχθεί σε μια σημαντική προσέγγιση αντίστροφης γενετικής (reverse genetics). Πολλές αξιόπιστες και ευρείας κλίμακας μέθοδοι RNA σίγησης έχουν αναπτυχθεί από την πρόοδο της κατανόησης του μηχανισμού που την διέπει. Συγκεκριμένα, η ανακάλυψη των dsRNA ως ενεργοποιητών της RNA σίγησης έχει προσφέρει τη δυνατότητα άμεσης και εξειδικευμένης γονιδιακής σίγησης που είναι πιο αποτελεσματική από τις μεθόδους της αντικωδικής καταστολής (antisense suppression) ή της συγκαταστολής μέσω υπερέκφρασης των γονιδίων στόχων (Fire

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΟΥ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟΥ ΣΤΗΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ ΚΑΤΑ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *V. DAHLIAE*

et al., 1998; Kennerdell και Carthew 1998; Waterhouse et al., 1998; Sanchez-Alvarado και Newmark 1999).

Η dsRNA-επαγόμενη σίγηση είχε αρχικά περιγραφεί σε φυτά με την ταυτόχρονη έκφραση κωδικών και αντικωδικών τμημάτων που στόχευαν ένα RNA ιό και ένα διαγονίδιο (Waterhouse et al., 1998). Η μεθοδολογία της εξειδικευμένης αλλά και κληρονομήσιμης μέσω της dsRNA σίγησης επαληθεύτηκε αργότερα και στην μελέτη πολλών γονιδίων που εμπλέκονται στην ανθική ανάπτυξη σε φυτά *A. thaliana* (Chuang και Meyerowitz, 2000). Κατασκευάστηκαν φορείς μετασχηματισμού που έφεραν dsRNA με εξειδικευμένες αλληλουχίες γονιδίων τόσο σε κωδικό όσο και σε αντικωδικό προσανατολισμό κάτω από τον έλεγχο ισχυρού ιϊκού υποκινητή. Αυτοί οι φορείς όταν ενσωματώθηκαν σε φυτά *Arabidopsis* με μετασχηματισμό μέσω του *Agrobacterium tumefaciens*, δημιούργησαν κληρονομήσιμους φαινοτύπους στα μετασχηματισμένα φυτά, που ανταποκρίνονταν σε μεταλλαγμένους αλληλόμορφους διαφορετικής δυναμικότητας. Επομένως, η dsRNA σίγηση μπορεί να δημιουργήσει μετασχηματισμένα φυτά που να δείχνουν μειωμένη ή καθόλου γονιδιακή λειτουργία, με τη βαθμιαία μείωση της έκφρασης ενός συγκεκριμένου γονιδίου. Η τεχνολογία αυτή έχει αποδειχτεί αποτελεσματικό εργαλείο στη μελέτη ορισμένων γονιδίων που είναι απαραίτητα για τη βιωσιμότητα των φυτών και γονιδίων εξαρτώμενων από την ποσότητα της έκφρασης (dosage-dependent) (Levin et al., 2000; Yu et al., 2002). Η επιτάχυνση και η αποτελεσματικότητα των πειραματικών διαδικασιών θα διευκολύνει την εφαρμογή της dsRNA τεχνολογίας σε μελέτες λειτουργίας των γονιδίων σε μεγάλη κλίμακα (Wesley et al., 2001; Brummell et al., 2003). Το λεγόμενο “rHELMSGATE” σύστημα αναπτύχθηκε για τη μετατροπή των προϊόντων της PCR σε dsRNA δομές, που περιλαμβάνει την προσθήκη ενός εσονίου σε ένα μόνο βήμα με τη χρήση ενός *in vitro* συστήματος ανασυνδυασμού (Wesley et al., 2001). Αυτό βασίστηκε στην παρατήρηση ότι η συμμετοχή ενός εσονίου μεταξύ της κωδικής και αντικωδικής περιοχής του dsRNA κατασκευάσματος αυξάνει πάρα πολύ το φαινόμενο της σίγησης (Wesley et al., 2001).

Παρόλο που η dsRNA επαγόμενη RNA σίγηση είναι μια πολύτιμη μέθοδος, η εφαρμογή της τεχνολογίας στα φυτά έδωσε αντιφατικά αποτελέσματα με κάποια γονίδια. Επίσης, αρκετές τεχνικές RNA σίγησης έχουν προταθεί από διάφορους ερευνητές. Ωστόσο, η ταχεία πρόοδος στην κατανόηση των βασικών μηχανισμών της RNA σίγησης θα προσφέρει πολύ στην βελτίωση αυτής της προσέγγισης και άλλων σχετικών μεθόδων ώστε να καταστήσουν την RNA σίγηση ένα αποτελεσματικό και χρήσιμο εργαλείο στη μελέτη της λειτουργίας των γονιδίων στο άμεσο μέλλον.

3.2.4 Ίικά επαγόμενη γονιδιακή σίγηση

Η ιικά επαγόμενη γονιδιακή σίγηση (virus-induced gene silencing – VIGS) είναι μια τεχνολογία που εκμεταλλεύεται τον αμυντικό μηχανισμό της RNA σίγησης των φυτών. Το ενδιάμεσο dsRNA προϊόν που προκύπτει από τον πολλαπλασιασμό των ιών στα φυτά, οδηγεί στη δημιουργία siRNA στα μολυσμένα κύτταρα που αντιστοιχούν σε τμήματα του ιικού γονιδιώματος του φορέα που περιλαμβάνει μη ιικά ένθετα. Επομένως, εάν το ένθετο προέρχεται από ένα γονίδιο του ξενιστή, τα siRNA θα στοχεύσουν το σύμπλοκο των RNAsών στο συγκεκριμένο mRNA του ξενιστή και τα συμπτώματα στο μολυσμένο φυτό θα αντιπροσωπεύουν την έλλειψη της λειτουργίας της αντίστοιχης πρωτεΐνης.

Σήμερα υπάρχουν αρκετά παραδείγματα που πιστοποιούν αυτή τη προσέγγιση καταστολής της γονιδιακής έκφρασης. Έτσι μετά τη μόλυνση φυτών με τους ιούς *Tobacco mosaic virus (TMV)* ή *Potato virus X (PVX)*, οι φορείς των οποίων μετασχηματίστηκαν έτσι ώστε να φέρουν ένθετα από το γονίδιο *δεσατουράση του φυτοενίου (phytoene desaturase - PDS)* των φυτών, τα συμπτώματα “φωτολεύκανσης” που παρουσιάστηκαν στα μολυσμένα φυτά αντιπροσώπευαν την έλλειψη των φωτοπροστατευτικών καροτενοειδών τα οποία χρειάζονται την έκφραση της *δεσατουράσης του φυτοενίου* (Kumagai et al., 1995· Ruiz et al., 1998). Ομοίως, όταν ο ιός έφερε ένθετα ενός ενζύμου της βιοσύνθεσης χλωροφύλλης (Kjemtrup et al., 1998) παρουσιάστηκαν χλωρωτικά συμπτώματα και όταν το ένθετο ήταν το ένζυμο της συνθάσης της κυτταρίνης, το μολυσμένο φυτό είχε τροποποιημένα κυτταρικά τοιχώματα (Burton et al., 2000).

Με την τεχνολογία VIGS μπορούν να στοχευθούν και άλλα γονίδια εκτός από αυτά που κωδικοποιούν μεταβολικά ένζυμα. Για παράδειγμα όταν το ιικό ένθετο αντιστοιχούσε σε γονίδια που απαιτούνται για την άμυνα των φυτών, τα φυτά έδειξαν αυξημένη ευπάθεια στο παθογόνο. Συγκεκριμένα, όταν ο ιός *Tobacco rattle virus (TRV)* του οποίου ο φορέας έφερε ένθετο από το γονίδιο *EDS1* που είναι απαραίτητο για την ανθεκτικότητα με την μεσολάβηση του N γονιδίου στον ιό TMV, το φυτό (N-γονότυπος) έδειξε μειωμένη ανθεκτικότητα στον *TMV* (Peart et al., 2002α). Εκτός από το *EDS1* υπάρχουν αρκετά παραδείγματα εφαρμογής VIGS και σε άλλα γονίδια άμυνας (Liu et al., 2002β· Liu et al., 2002γ· Slaymaker et al., 2002· Jin et al., 2002· Peart et al., 2002β).

Τα συμπτώματα ενός *TRV* φορέα που έφερε ένθετο του γονιδίου *leafy* έδειξαν ότι η VIGS μπορεί να χρησιμοποιηθεί για γονίδια που ρυθμίζουν την ανάπτυξη των φυτών. Το γονίδιο *leafy* είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη των ανθέων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΟΥ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟΥ ΣΤΗΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ ΚΑΤΑ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *V. DAHLIAE*

Μεταλλαγμένα φυτά στο γονίδιο αυτό παράγουν τροποποιημένα άνθη που μοιάζουν με τα άνθη των *TRV-leafy* μολυσμένων φυτών (Ratcliff et al., 2001). Ομοίως, τα αποτελέσματα φορέων του *Tomato golden mosaic virus* που έφεραν τμήμα του γονιδίου ενός συμπαράγοντα της DNA πολυμεράσης δείχνουν πως η VIGS μπορεί να χρησιμοποιηθεί για βασικά γονίδια της βιωσιμότητας των φυτών (Peele et al., 2001). Τα φυτά που είχαν μολυνθεί με αυτόν τον ιικό φορέα είχαν καταστολή της αύξησης μέσα και γύρω από μεριστωματικές ζώνες του βλαστού.

Μέχρι σήμερα οι περισσότερες από τις εφαρμογές VIGS έχουν πραγματοποιηθεί στο φυτό *N. benthamiana*. Για λόγους που δεν είναι πλήρως κατανοητοί αυτό το φυτό είναι ευπαθές σε ένα ασυνήθιστα μεγάλο αριθμό ιών κι τα συμπτώματα των VIGS στα φυτά *N. benthamiana* είναι γενικά πολύ πιο χαρακτηριστικά και πιο επίμονα από ότι σε άλλα φυτά, όπως τα *N. tabacum*. Ωστόσο, η VIGS μπορεί να εφαρμοστεί και σε άλλα φυτικά είδη. Για παράδειγμα ο φορέας του *Barley stripe mosaic virus*, προκάλεσε με VIGS μείωση της έκφρασης του γονιδίου *PDS* στο κριθάρι (Holzberg et al., 2002). Επιπρόσθετα, υπάρχουν *TRV* φορείς που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για VIGS στα φυτά *A. thaliana* (Dalmay et al., 2000), στην τομάτα (Liu et al., 2002α) και στο φυτό *N. benthamiana*.

Παρόλο που η παρουσία των ιών στους μεριστωματικούς ιστούς είναι σπάνια, η σίγηση γονιδίων ήταν εφικτή σε αυτούς τους ιστούς. Σε αυτές τις περιπτώσεις μπορεί ο φαινότυπος της σίγησης να επιτυγχάνεται από ένα ενδοκυτταρικό σήμα το οποίο εξαπλώνεται από το μολυσμένο κύτταρο (Voinnet και Baulcombe, 1997· Palauqui et al., 1997· Peele et al., 2001). Το σήμα αυτό μπορεί να είναι νουκλεϊκό οξύ – είτε διπλής έλικας RNA ή ενός από τα μικρά RNA που έχουν συσχετιστεί με τη σίγηση.

Ο φαινότυπος της VIGS μπορεί να επηρεάζεται από τον ιικό φορέα στο μολυσμένο φυτό. Η προσέγγιση των VIGS δεν είναι κατάλληλη για ανάλυση πολλών κληρονομούμενων χαρακτηριστικών που σχετίζονται με τη βιολογία της αναπαραγωγής. Αξίζει να σημειωθεί ότι η χρήση της τεχνολογίας αυτής δεν οδηγεί στη πλήρη απενεργοποίηση του γονιδίου στόχου αλλά στη σημαντική μείωση της έκφρασης του (Lu et al., 2003). Ωστόσο, παρ' όλες τις πρακτικές δυσκολίες υπάρχουν αρκετά πλεονεκτήματα της VIGS σε σχέση με άλλες τεχνολογίες γονιδιακής σίγησης (Smith et al., 2000). Κατ' αρχήν οι κατάλληλοι φορείς φτιάχνονται με απευθείας κλωνοποίηση στον ιικό φορέα και δεν εμπλέκουν συναρμολόγηση ανεστραμμένων αλληλουχιών που μπορεί να είναι ασταθείς κατά τον πολλαπλασιασμό τους σε βακτηριακούς ξενιστές. Επιπρόσθετα, η διαδικασία είναι

ταχεία, αφού η κατασκευή των φορέων μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσα σε μερικές ημέρες και ο φαινότυπος της VIGS αναπτύσσεται μέσα σε 1 ή 2 εβδομάδες. Επομένως, είναι εφικτό να πραγματοποιηθούν μεγάλης κλίμακας μελέτες πολλών γονιδίων στο γονιδίωμα ενός φυτού. Άλλο ένα πλεονέκτημα της VIGS είναι η φυσική της λειτουργία. Το mRNA στόχος δεν απενεργοποιείται πριν μολυνθεί το φυτό από τον ιικό φορέα. Είναι πιθανόν επομένως να κατασταλούν γονίδια που είναι απαραίτητα για την αύξηση και ανάπτυξη του φυτού ξενιστή. Οι περισσότερες μεταλλάξεις σε τέτοια γονίδια είναι θνησιγόνες και δύσκολα είναι βιώσιμες. Ομοίως, η διαγονιδιακή σίγηση είναι αδύνατον να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη τέτοιων γονιδίων. Ο φαινότυπος της σίγησης θα προκαλούσε το θάνατο των κυττάρων κατά τη διάρκεια της αναγέννησης των μετασχηματισμένων φυτών.

3.2.5 Πρακτικά θέματα της τεχνολογίας VIGS

3.2.5.1 Το ιικό ένθετο

Υπάρχουν αρκετά ζητήματα που αφορούν στο ένθετο στους φορείς που χρησιμοποιούνται στα πειράματα VIGS, όπως για παράδειγμα το μήκος τους. Σε δοκιμαστικά πειράματα ήταν δυνατή η σίγηση του γονιδίου *phytoene desaturase* με ένθετα μήκους 23 νουκλεοτιδίων (Thomas et al., 2001). Ωστόσο, η σίγηση ήταν λιγότερο εκτεταμένη και περισσότερο προσωρινή σε σχέση με μεγαλύτερα ένθετα. Κατά κανόνα χρησιμοποιούνται αλληλουχίες μήκους 150-500 νουκλεοτιδίων. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και μεγαλύτερα ένθετα αλλά είναι γενετικά ασταθή στους ιικούς φορείς και δεν προκαλούν κάποια αύξηση του φαινότυπου σίγησης.

Ένα δεύτερο ζήτημα είναι η θέση της ένθετης αλληλουχίας ως προς το γονίδιο στόχος. Εάν το ένθετο αποτελεί τμήμα περιοχής που είναι μοναδική στο γονίδιο στόχος τότε ο φαινότυπος της σίγησης θα είναι πολύ εξειδικευμένος. Ωστόσο, εάν το ένθετο περιλαμβάνει περιοχές που είναι όμοιες και σε άλλα γονίδια ή άλλα μέλη της ίδιας οικογένειας γονιδίων, η εξειδίκευση μπορεί να περιοριστεί. Σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως για παράδειγμα σε οικογένειες γονιδίων όπου υπάρχει λειτουργική επικάλυψη από περισσότερα του ενός γονίδια, αυτή η εξειδικευμένη αλληλουχία – παρά ο γενετικός τόπος – είναι πλεονέκτημα αφού οι συνηθισμένες γενετικές τεχνικές αδυνατούν να δώσουν τέτοιες πληροφορίες.

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν αναλύσεις που να αφορούν στην ομοιότητα αλληλουχιών που χρειάζεται για διασταυρωμένη σίγηση συγγενών γονιδίων. Ωστόσο, με βάση την ανάλυση μικρών ένθετων του γονιδίου *δεσατουράση του φυτοενίου* (Thomas et al., 2001) και τις πληροφορίες που υπάρχουν για τους μηχανισμούς της

RNA γονιδιακής σίγησης, φαίνεται πιθανόν ότι η VIGS μπορεί να στοχεύσει οποιοδήποτε γονίδιο που έχει λίγο περισσότερο από 20 νουκλεοτίδια απόλυτης ομολογίας με το ένθετο στο φορέα της σίγησης. Προς το παρόν δεν είναι γνωστό αν η VIGS λειτουργεί καλύτερα σε στόχους που κωδικοποιούν ή που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Ωστόσο, στα εσόνια δεν είναι δυνατή η σίγηση μέσω VIGS (Ruiz et al., 1998).

3.2.5.2 Ο ιικός φορέας

Μετά την επιλογή του κατάλληλου ένθετου για τη VIGS σίγηση η επόμενη απόφαση που πρέπει να παρθεί είναι η επιλογή του ιικού φορέα. Μέχρι ενός βαθμού αυτό το ζήτημα προσδιορίζεται ανάλογα με το φυτό που θα εφαρμοστεί η τεχνική. Ο φορέας *TRV* είναι αποτελεσματικός σε φυτά *N. benthamiana*, τομάτας, *A. thaliana*, και άλλα συγγενή είδη (Dalmay et al., 2000; Ratcliff et al., 2001; Liu et al., 2002a). Ο φορέας *PVX* επάγει ισχυρά τη σίγηση σε φυτά *N. benthamiana* και *N. clevelandii* (Ruiz et al., 1998) και ο *Barley stripe mosaic virus* σε φυτά κριθαριού (Holzberg et al., 2002). Φορείς που ανήκουν στους διδυμους ιούς (Geminivirus) έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί σε φυτά *N. benthamiana* (Kjemtrup et al., 1998) και *A. thaliana* (Turnage et al., 2002).

Ο *Tobacco mosaic virus (TMV)* ήταν ο πρώτος RNA ιός που χρησιμοποιήθηκε ως φορέας σίγησης της VIGS. Μετάγραφα του μετασηματισμένου *TMV* που έφεραν αλληλουχία του γονιδίου *phytoene desaturase (PDS)* κατασκευάστηκαν *in vitro* και ο εμβολιασμός τους σε φυτά *N. benthamiana* προκάλεσαν τη σίγηση του *PDS* (Kumagai et al., 1995). Ο επόμενος φορέας που χρησιμοποιήθηκε βασιζόταν στον ιό *Potato virus X (PVX)* (Ruiz et al., 1998). Παρόλο που ο *PVX* φορέας ήταν πιο σταθερός από αυτόν του *TMV*, είχε το μειονέκτημα του περιορισμένου εύρους ξενιστών σε σχέση με τον *TMV*, με φυτά μόνο από 3 οικογένειες να είναι ευπαθή στην προσβολή από τον *PVX* σε σχέση με τις 9 οικογένειες για τον *TMV* (Brunt et al., 1996). Επιπρόσθετα, τόσο ο *TMV* όσο και ο *PVX* φορέας προκαλούν συμπτώματα στα εμβολιασμένα φυτά, κάνοντας έτσι την ερμηνεία κάποιων φαινοτύπων VIGS πολύ δύσκολη (Ratcliff et al., 2001). Επίσης, αυτοί οι ιοί δεν μετακινούνται στα σημεία αύξησης και τους μεριστωματικούς ιστούς των ξενιστών τους, γεγονός που εμποδίζει την αποτελεσματική σίγηση γονιδίων σε αυτούς τους ιστούς (Hull, 2002; Ratcliff et al., 2001). Οι περιορισμοί του μικρού εύρους ξενιστών καθώς και του αποκλεισμού των προαναφερθέντων ιών από τους μεριστωματικούς ιστούς ξεπεράστηκαν με την ανάπτυξη φορέων VIGS που

βασίζονταν στον ιό *Tobacco rattle virus* (TRV, Ratcliff et al., 2001· Liu et al., 2002β). Ο TRV εξαπλώνεται πιο έντονα σε όλο το φυτό, ακόμα και στους μεριστωματικούς ιστούς, και τα συμπτώματα της μόλυνσης είναι πολύ ήπια σε σχέση με άλλους ιούς. Οι βελτιωμένοι TRV VIGS φορείς, pYL156 και pYL279, οδηγούν σε αποτελεσματικότερη σίγηση των ενδογενών γονιδίων (Liu et al., 2002a, b). Αυτοί οι φορείς διαφέρουν από τους πρώτους TRV φορείς ως προς τον 35S υποκινητή που βρίσκεται σε 2 αντίγραφα και στην ύπαρξη ενός ριβοενζύμου (ribozyme, μόριο RNA με καταλυτικές ιδιότητες) στο C-τελικό άκρο για πιο αποτελεσματική παραγωγή του ιϊκού RNA, καθώς και στην αλλαγή ενός αριθμού αμινοξέων στην ιϊκή αλληλουχία (Liu et al., 2002b). Σε αντίθεση με τους άλλους φορείς VIGS, η αποτελεσματικότητα των pYL156 και pYL279 δεν περιορίζεται στα φυτά *N. benthamiana* αλλά έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για τη γονιδιακή σίγηση στην τομάτα και άλλα είδη (Liu et al., 2002a· Ekengren et al., 2003).

3.2.5.3 Φορείς για *in vitro* μεταγραφή και “Agro-εμβολιασμό”

Οι RNA ιϊκοί φορείς αναπτύχθηκαν αρχικά με τέτοιο τρόπο που χρειαζόταν η *in vitro* μεταγραφή του μολυσματικού RNA από ευθυγραμμισμένο εκμαγείο πλασμιδιακού DNA (Janda et al., 1987· Chapman et al., 1992· Donson et al., 1991). Ωστόσο, μια εναλλακτική διαδικασία που αναφέρεται ως “Agro-εμβολιασμός” υιοθετήθηκε λόγω της ευκολίας στη χρήση της σε σχέση με την *in vitro* μεταγραφή. Ο Agro-εμβολιασμός περιλαμβάνει τη χρήση των T_i πλασμιδιακών φορέων του βακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens* στους οποίους μια περιοχή – η λεγόμενη T-DNA – μεταφέρεται στο γονιδίωμα των μολυσμένων φυτικών κυττάρων. Αυτή η διαδικασία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον εμβολιασμό των φυτικών ιών μόνο εάν το πλήρες ιϊκό cDNA βρίσκεται στην T-DNA περιοχή και μεταξύ ενός υποκινητή και ενός μεταγραφικού τερματιστή (terminator) που είναι λειτουργικός στα φυτικά κύτταρα (Turpen et al., 1993).

Ο Agro-εμβολιασμός έχει συγκριτικά πλεονεκτήματα σε σχέση με την *in vitro* μεταγραφή αφού το cDNA του ιϊκού φορέα δεν χρειάζεται απομόνωση, πέψη ή μεταγραφή. Η κλωνοποίηση των ένθετων στους ιϊκούς φορείς απαιτεί κλασσικές μεθόδους ενοποίησης τμημάτων DNA και μετασχηματισμού. Τα κύτταρα του *A. tumefaciens* που φέρουν το ένθετο μπορούν να εμβολιασθούν άμεσα στο φυτό. Πιθανώς υπάρχουν κύτταρα στο σημείο εμβολιασμού που μετασχηματίζονται για να μολυνθούν με τον ιϊκό φορέα που βρίσκεται στο T-DNA. Αυτά τα κύτταρα λειτουργούν ως απόθεμα της μόλυνσης που μεταδίδεται διασυστηματικά μέσα στο

φυτό. Η διαδικασία του Agro-εμβολιασμού είναι χρήσιμη για πολλές VIGS εφαρμογές. Ωστόσο, είναι ιδιαίτερα χρήσιμη σε εφαρμογές μεγάλης κλίμακας όπως για παράδειγμα στις μελέτες cDNA βιβλιοθηκών ή EST συλλογών.

3.2.5.4 Αποτίμηση της VIGS

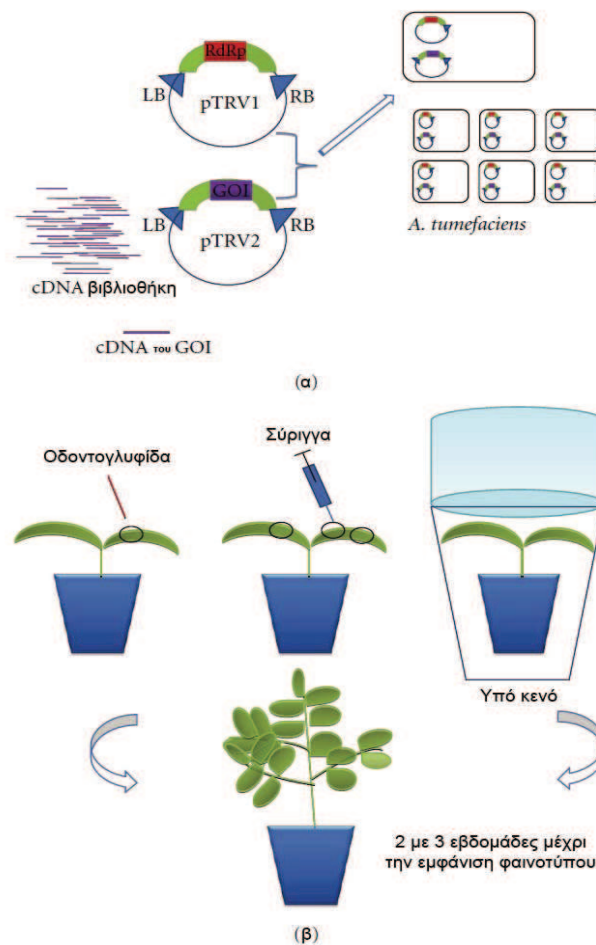
Τα συμπτώματα της VIGS εμφανίζονται αρκετές ημέρες μετά την εφαρμογή του ιϊκού φορέα και επεκτείνονται σε όλο το μολυσμένο φυτό. Τα συμπτώματα μπορεί να φθίνουν μεταγενέστερα. Ο ακριβής χρόνος της μέγιστης έκφρασης της VIGS εξαρτάται πολύ από τις περιβαλλοντικές συνθήκες και είναι απαραίτητο στα πειράματα να συμπεριλαμβάνονται καλά χαρακτηρισμένοι φορείς μάρτυρες με τους οποίους μπορεί να ελέγχεται η πρόοδος της διαδικασίας μόλυνσης. Οι φορείς με τη *δεσατουράση του φυτοενίου* είναι χρήσιμοι για αυτή τη διαδικασία αφού προκαλούν τα χαρακτηριστικά και πολύ ορατά συμπτώματα της “φωτο-λεύκανσης”. Ωστόσο, σε κάποιες περιπτώσεις είναι καταλληλότερο να χρησιμοποιούνται φορείς που στοχεύουν γονίδια που εμπλέκονται στο χαρακτηριστικό που μελετάται. Για παράδειγμα, όταν επιχειρείται η αναγνώριση γονιδίων άμυνας στα φυτά θα ήταν καταλληλότερο να χρησιμοποιηθεί ένας φορέας μάρτυρας που στοχεύει γνωστό γονίδιο άμυνας έτσι ώστε να υπάρχει ένα σταθερό μέτρο σύγκρισης.

Κατά την ερμηνεία του φαινοτύπου της VIGS είναι αρκετά τα σημεία που απαιτούν ιδιαίτερη προσοχή. Το πρώτο είναι ότι η απουσία φαινοτύπου δεν σημαίνει απαραίτητα ότι το υπό μελέτη γονίδιο δεν συμμετέχει στο χαρακτηριστικό που ενδιαφέρει. Η VIGS ποτέ δεν είναι ολοκληρωτική και πάντα υπάρχει το ενδεχόμενο ο φαινότυπος της σίγησης να μην είναι ορατός επειδή η λειτουργία του γονιδίου στόχου να υποστηρίζεται από το εναπομείναν mRNA στα φυτά. Ένα δεύτερο θέμα είναι η ερμηνεία των δεδομένων της VIGS αφού υπάρχει η πιθανότητα τυχαίας ομοιότητας της αλληλουχίας του ένθετου και ενός άγνωστου mRNA, που μπορεί τελικά να είναι υπεύθυνο για το φαινότυπο. Για να αποκλειστεί αυτή η πιθανότητα συνήθως χρησιμοποιείται ένα δεύτερο ένθετο από το ίδιο γονίδιο-στόχο που όμως δεν έχει επικαλυπτόμενες περιοχές με το πρώτο. Εάν το γονίδιο-στόχος έχει αναγνωρισθεί επιτυχώς τότε και το δεύτερο ένθετο θα αναπαράγει το φαινότυπο. Εάν το γονίδιο είναι μέλος πολυγονιδιακής οικογένειας είναι απαραίτητο να στοχευθούν συντηρημένες και μη συντηρημένες περιοχές για να διαπιστωθεί το κατά πόσο ο φαινότυπος επηρεάζεται από ένα ή περισσότερα γονίδια της οικογένειας. Πάντοτε γίνεται αποτίμηση του επιπέδου έκφρασης του RNA στόχου ή της αντίστοιχης πρωτεΐνης για να επιβεβαιωθεί άμεσα η επιτυχία της σίγησης. Ο πλειοτροπισμός (το

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΟΥ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟΥ ΣΤΗΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ ΚΑΤΑ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *V. DAHLIAE*

φαινόμενο κατά το οποίο ένα γονίδιο επηρεάζει περισσότερα από ένα χαρακτηριστικά) αποτελεί επίσης ένα θέμα που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας της VIGS γονιδιακής σίγησης φαίνεται στην Εικόνα 3.2.2.



Προσαρμογή από Unver και Budak, 2009

Εικόνα 3.2.2: Σχηματική αναπαράσταση της VIGS γονιδιακής σίγησης με τη χρήση του ιού *TRV* ως φορέα σε φυτά *N. Benthamiana*. Η δοκιμή περιλαμβάνει τα εξής βήματα: α) επιλέγεται το γονίδιο ενδιαφέροντος (gene of interest – GOI) γνωστής αλληλουχίας που ακολούθως τμήμα του κλωνοποιείται στο φορέα *pTRV2*. Ο φορέας *pTRV1* αποτελείται από μια κασέτα που περιέχει το RNA1 του ιού, το γονίδιο της RNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης, την πρωτεΐνη μετακίνησης, κτλ), και τις περιοχές LB και RB για το μετασχηματισμό στα φυτά. Τα πλασμίδια μετασχηματίζονται ξεχωριστά στο βακτήριο *A. tumefaciens*. β) Οι καλλιέργειες των *A. tumefaciens* που φέρουν τα *pTRV1* και *pTRV2* αναμιγνύονται σε αναλογία 1:1 και ακολούθως εμβολιάζονται στα φυτά. Ο πολλαπλασιασμός του TRV στα φυτικά κύτταρα οδηγεί στη δημιουργία δίκλωνου RNA του τμήματος του γονιδίου προς μελέτη, έναρξη του μηχανισμού σίγησης και καταστολή της έκφρασης του γονιδίου στόχου. Ο Agro-εμβολιασμός στα φυτά γίνεται όπως φαίνεται στην εικόνα με οδοντογλυφίδα, σύριγγα ή εφαρμόζεται υπό κενό και οδηγεί στη διασυστηματική μόλυνση των φυτών. Οι φαινότυποι που αποδίδονται στη σίγηση παρατηρούνται συνήθως μετά από 2-3 εβδομάδες.

3.3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.3.1 Φυτικό υλικό

Τα φυτά τομάτας (*Solanum lycopersicum*) που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραμάτων παθογένειας ήταν η μεταλλαγμένη σειρά *Never ripe (Nr)* με απενεργοποιημένο τον υποδοχέα αιθυλενίου *Never ripe* στην ποικιλία *Ailsa Craig* και φυτά αγρίου τύπου της ποικιλίας *Ailsa Craig*. Σπόροι της μεταλλαγμένης σειράς *Nr* εξασφαλίστηκαν από το Tomato Genetics Resource Center (University of California, Davis) και σπόροι της ποικιλίας *Ailsa Craig* παραγγέλθηκαν από την Thompson & Morgan Ltd (UK). Φυτά της ποικιλίας *Ailsa Craig* χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα γονιδιακής σίγησης. Όλοι οι σπόροι αποθηκεύτηκαν στους 4°C. Για τα πειράματα, σπόροι τοποθετήθηκαν σε γλαστράκια διαμέτρου 15 εκατοστών, τα οποία περιείχαν περίπου 300 cm³ χώμα (Potground; Klasmann, Deilmann, Germany) και ακολούθως μεταφέρθηκαν σε επωαστικό θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών θερμοκρασίας, φωτός και υγρασίας στους 25°C, σχετική υγρασία 65- 70% και με φωτοπερίοδο 14 ωρών (με ένταση φωτός 150 W m⁻²). Τα φυτά ποτίστηκαν και λιπάνθηκαν με θρεπτικό διάλυμα (XL 60, Hortifeeds, Lincoln, UK) όποτε αυτό ήταν απαραίτητο.

3.3.2 Σχεδιασμός εκκινητών

Για τα πειράματα ποσοτικοποίησης της βιομάζας του παθογόνου στα φυτά τομάτας χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν πάνω στις ITS1 και ITS2 περιοχές του γονιδίου 5.8S ριβοσωμικού RNA (Z29511) του μύκητα *Verticillium dahliae* όπως περιγράφεται στη παράγραφο 2.3.4. Για την κατασκευή του *pTRV-ETR4* φορέα σίγησης σχεδιάστηκαν οι εξειδικευμένοι εκκινητές *SiETR4-F* και *SiETR4-R* που ενίσχυαν τμήμα 492 ζευγών βάσεων του γονιδίου *ETR4* (AY600438) από DNA τομάτας ποικιλίας *Ailsa Craig*. Στον κωδικό εκκινητή προστέθηκε αλληλουχία που κόβεται εξειδικευμένα από το περιοριστικό ένζυμο *EcoRI* και στον αντικωδικό αλληλουχία που να κόβεται από το ένζυμο *BamHI* (υπογραμμισμένες θέσεις στους εκκινητές). Τα ένζυμα αυτά δεν κόβουν την αλληλουχία του φορέα σίγησης *pYL156* παρά μόνο στην περιοχή πολλαπλής κλωνοποίησης (multiple cloning site). Προκειμένου να ελεγχθεί η απενεργοποίηση του γονιδίου *ETR4* και σε επίπεδο μεταγραφικού RNA, σχεδιάστηκαν οι εκκινητές *LeETR4-F* και *LeETR4-R* για την ενίσχυση τμήματος 187 ζευγών βάσεων από το γονίδιο *ETR4* (AY600438). Οι εκκινητές αυτοί είχαν σχεδιαστεί να υβριδίζουν σε αλληλουχία έξω από την περιοχή

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΟΥ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟΥ ΣΤΗΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ ΚΑΤΑ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *V. DAHLIAE*

στόχευσης της γονιδιακής σίγησης έτσι ώστε να εξασφαλιστεί ότι θα ενισχυθεί μόνο το ενδογενές μεταγραφικό RNA. Επίσης, σχεδιάστηκαν εκκινητές πάνω στην αλληλουχία του γονιδίου *β-tubulin* (DQ205342) της ποικιλίας Ailsa Craig της τομάτας που χρησιμοποιήθηκαν ως εσωτερική σταθερά για την κανονικοποίηση διαφορών στις αρχικές ποσότητες DNA και cDNA που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις Real-time PCR. Στον Πίνακα 3.1 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα. Τέλος, σχεδιάστηκαν εξειδικευμένοι εκκινητές για τη μελέτη της έκφρασης γονιδίων της τομάτας, που εμπλέκονται στην άμυνα των φυτών, που χρησιμοποιήθηκαν σε cDNA από φυτά που είχαν μολυνθεί με το μύκητα *V. dahliae*. Στο Παράρτημα δίνονται όλες οι αλληλουχίες των υπό μελέτη γονιδίων όπου έχουν επισημανθεί οι περιοχές πάνω στις οποίες σχεδιάστηκαν οι εκκινητές.

Πίνακας 3.3.1: Λίστα με τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις Real-time PCR.

Γονίδιο	GenBank accession no	Εκκινητές	Ζεύγη εκκινητών
5.8S rRNA	Z29511	Vd-F Vd-R	5'-CCGCCGGTCCATCAGTCTCTCTGTTTATAC-3' 5'-CGCCTGCGGGACTCCGATGCGAGCTGTAAC-3'
<i>ETR4</i>	AY600438	SiIETR4-F SiIETR4-R	5'-GGGGGGGCAGCGAATTCCTGTGGA-3' 5'-CACATTACAGGGATCCACGCTGCGC-3'
<i>ETR4</i>	AY600438	LeETR4-F LeETR4-R	5'-GGAAGCCCAATGAGAATAAAACTG-3' 5'-CTACTCCCTCCACTACTCGCAACA-3'
<i>β2-tubulin</i>	DQ205342	LeTUB-F LeTUB-R	5'-GATTTGCCCCACTAACCTCTCGT-3' 5'-ACCTCCTTTGTGCTCATCTTACCC-3'
<i>chitinase</i>	AB110610	LeCHI1-F LeCHI1-R	5'-ACCCGTTGCACTGTCTTGTCTC-3' 5'-TGGAACCGGCATTTTGTG-3'
<i>chitinase</i>	LEU30465	LeCHI2-F LeCHI2-R	5'-ACAATTATGGGGCAGCAGGGAGTG-3' 5'-CCAGCGGCAGAATCAGCAACAGA-3'
<i>chitinase</i>	Z15139	LeCHI3-F LeCHI3-R	5'-CCAGGCTACGGTGTCTATTAC-3' 5'-TAGGCCTCAGCAAAGTTCC-3'
<i>chitinase</i>	Z15140	LeCHI4-F LeCHI4-R	5'-CAGGCCGGAGGAGCACTTTG-3' 5'-CCGGGACCGCCAGGACA-3'
<i>basic chitinase</i>	AY185815	LeCHI5-F LeCHI5-R	5'-TAGGCGCCGTTATCTCAT-3' 5'-CCTTTTTCGGGTAGTGGTAT-3'
<i>PR-5</i>	AY093595	LePR5-F LePR5-R	5'-GGCAAACCCCAAACACC-3' 5'-TTAAATCCGTCAACCAAAGAAATG-3'
<i>beta-1,3-glucanase</i>	M80608	LeGLUB-F LeGLUB-R	5'-GTCGCCACCAACATTCACA-3' 5'-GATCCTCTTAGCGCATTCAA-3'
<i>beta-1,3-glucanase</i>	M80604	LeGLUA-F LeGLUA-R	5'-ATACGCACGATTTGTTGGTC-3' 5'-ATCGCGAAAAATGCTATCTCT-3'

Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα PrimerSelect του λογισμικού πακέτου Lasergene v8.0 (DNASTAR, Inc., Madison, USA).

3.3.3 Κατασκευή του *pTRV-ETR4* φορέα σίγησης

Οι φορείς *pTRV1* και *pTRV2* για την ιϊκά επαγόμενη γονιδιακή σίγηση (Virus Induced Gene Silencing – VIGS) (Liu et al., 2002α) και ο φορέας *pTRV2-PDS* (Liu et al., 2002β) που περιέχει τμήμα του γονιδίου *PDS* (απαραίτητο για τη βιοσύνθεση των φωτοπροστατευτικών καροτενοειδών στα φυτά) από την τομάτα ήταν μια ευγενική χορηγία του Dr Dinesh-Kumar (Yale University, New Heaven, CT, U.S.A.).

Για τη δημιουργία του κατασκευάσματος *pTRV-ETR4* ένα τμήμα 492 ζευγών βάσεων του γονιδίου *ETR4* (AY600438) που κωδικοποιεί υποδοχέα αιθυλενίου, ενισχύθηκε από DNA τομάτας ποικιλίας Ailsa Craig με εκκινήτες που σχεδιάστηκαν ώστε να έχουν περιοχές που να κόβονται με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα, όπως περιγράφεται στη παράγραφο 3.3.4., ούτως ώστε να διευκολυνθεί η κλωνοποίηση του τμήματος στο φορέα *pTRV2*. Μετά από ενίσχυση με PCR (παράγραφος 2.3.9) πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση του προϊόντος στο πλασμιδιακό φορέα pGEM-T, πέψη του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου και του φορέα σίγησης YL156 (*pTRV2*) με τα ένζυμα *EcoRI* / *BamHI* (παράγραφος 2.3.13) και ηλεκτροφόρηση (παράγραφος 2.3.14) των αντιδράσεων των πέψεων για την επιβεβαίωση του επιθυμητού τμήματος DNA και την επιτυχία των πέψεων. Μετά τον καθαρισμό των αντιδράσεων με τη χρήση του MinElute PCR purification kit (Qiagen) ακολούθησε αντίδραση συνένωσης (ligation) των τμημάτων DNA του *ETR4* με τον πλασμιδιακό φορέα σίγησης YL156 (*pTRV2*) (σε αναλογία εισδοχή/φορέα περίπου 6/1) χρησιμοποιώντας το ένζυμο λιγάση (Fermentas) και ακολούθως κλωνοποίηση του ανασυνδυασμένου φορέα *pTRV-ETR4* σε επιδεκτικά κύτταρα DH5α του, όπως περιγράφεται στη παράγραφο 2.3.11. Στη συνέχεια έγινε απομόνωση DNA του πλασμιδιακού φορέα σίγησης από το βακτήριο *E. coli* όπως περιγράφεται στη παράγραφο 2.3.12. Μετά από τον πρώτο έλεγχο της παρουσίας του επιθυμητού τμήματος DNA στον φορέα σίγησης με πέψη και ηλεκτροφόρηση, η αλληλουχία του κατασκευάσματος επιβεβαιώθηκε με αλληλούχιση από τουλάχιστον 2 ανεξάρτητους κλώνους και από τις 2 κατευθύνσεις, που πραγματοποιήθηκε μετά από αποστολή των κλώνων στο John Innes Centre Genome Laboratory (Norwich, United Kingdom).

3.3.4 Εισαγωγή φορέα σίγησης στο βακτήριο *Agrobacterium tumefaciens*

Η εισαγωγή του ανασυνδυασμένου φορέα σίγησης στο βακτήριο *Agrobacterium tumefaciens* έγινε με την εξής διαδικασία. Προκειμένου να σχηματιστούν κύτταρα *Agrobacterium tumefaciens* επιδεκτικά στην εισαγωγή του

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΟΥ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟΥ ΣΤΗΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ ΚΑΤΑ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *V. DAHLIAE*

δυναμικού φορέα (Shawn's Protocol), εμβολιάστηκε μεμονωμένη αποικία (1-2 ημερών) του στελέχους AGL1 σε 4 ml υλικό LB που περιέχει καναμυκίνη και η καλλιέργεια επώαστηκε στους 28°C, με περιστροφή 250 rpm μέχρι την αρχική λογαριθμική φάση (early log phase, $OD_{600} = 0.3 - 0.6$). Στη συνέχεια η καλλιέργεια των 4 ml εμβολιάστηκε σε 500 ml φιάλη με 100 ml LB και ακολούθησε επώαση στους 28°C, με περιστροφή 250 rpm μέχρι η οπτική πυκνότητα να φτάσει 0.5 ($OD_{600} = 0.5$). Μετά από παραμονή της καλλιέργειας για 10 min στον πάγο, ακολούθησε φυγοκέντρηση στους 4°C και στα 3.000 g για 10 min. Μετά από αφαίρεση του υπερκείμενου υλικού το ίζημα επαναιωρηματοποιήθηκε σε 2 ml 20 mM $CaCl_2$, και μεταφέρθηκε σε πλαστικά σωληνάκια 1.5 ml (100-200 μl ανά σωληνάκι). Τα σωληνάκια με τα κύτταρα βυθίστηκαν σε υγρό άζωτο και φυλάχτηκαν σε βαθιά κατάψυξη (-80°C).

Για την εισαγωγή του επιθυμητού πλασμιδίου στα επιδεκτικά κύτταρα, 50 - 100 μl επιδεκτικών κυττάρων τοποθετήθηκαν σε πάγο μέχρι να υγροποιηθούν. Ποσότητα 1 μg (περίπου 5μl) του φορέα ανακατεύτηκε προσεκτικά με τα κύτταρα. Τα σωληνάκια τοποθετήθηκαν για 5 min σε υγρό άζωτο και στη συνέχεια για 25 min στους 37°C. Μετά την προσθήκη 1 ml υλικού LB, ακολούθησε επώαση στους 28°C, με περιστροφή 250 rpm για 3 h. Η καλλιέργεια απλώθηκε στη συνέχεια σε υλικό LB που περιείχε καναμυκίνη σε συγκέντρωση 75 μg/ml. Μετά από δύο μέρες επώαση στους 28°C, παρατηρήθηκαν οι αποικίες του Αγροβακτηρίου μετασχηματισμένες με τον επιθυμητό φορέα.

3.3.5 Εφαρμογή VIGS σε φυτά τομάτας

Τα στελέχη AGL1 του βακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens* που είχαν μετασχηματιστεί με τους φορείς γονιδιακής σίγησης (*pTRV1*, *pTRV2*, *pTRV2-ETR4* και *pTRV2-PDS*) καλλιεργήθηκαν για 8-10 ώρες στους 28°C σε υλικό LB που περιείχε 50 μg ml⁻¹ καναμυκίνη (kanamycin) και 50 μg ml⁻¹ γενταμυκίνη (gentamycin). 2 ml από τις βακτηριακές καλλιέργειες μεταφέρθηκαν σε 50 ml φρέσκου LB που περιείχε τα κατάλληλα αντιβιοτικά και καλλιεργήθηκαν σε περιστρεφόμενο επωαστικό θάλαμο σε θερμοκρασία 28°C για 14-16 ώρες. Τα βακτηριακά κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν, πλύθηκαν και επαναιωρηματοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα διήθησης (10mM $MgCl_2$, 10mM MES [2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid] (pH 5.6), 150 μM acetosyringone) έτσι ώστε να έχουν OD_{600} 0.4 (*pTRV1*) ή 0.2 (*pTRV2*, *pTRV2-ETR4* και *pTRV2-PDS*) και τοποθετήθηκαν σε περιστρεφόμενο επωαστικό θάλαμο για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Πριν την εφαρμογή στα φυτά, το κάθε

στέλεχος *A. tumefaciens* που περιείχε το φορέα *pTRV1* αναμείχθηκε ξεχωριστά με το κάθε στέλεχος *A. tumefaciens* που περιείχε τους *pTRV2* φορείς, σε αναλογία 1:1 κατ' όγκο και το αιώρημα εφαρμόστηκε σε φυτά τομάτας μόλις εμφανίστηκε το πρώτο ζευγάρι πραγματικών φύλλων. Τα φυτά απομακρύνθηκαν προσεκτικά από το χώμα, αναποδογυρίστηκαν και βυθίστηκαν πλήρως στο αιώρημα *A. tumefaciens* σε πλαστικό ποτήρι ζέσεως. Τα φυτά τοποθετήθηκαν μαζί με το ποτήρι ζέσεως που περιείχε το αιώρημα σε αεροστεγές γυάλινο δοχείο όπου εφαρμόστηκε κενό με κατάλληλη αντλία για 1 λεπτό και ακολούθως το κενό εκτονώθηκε γρήγορα. Τα φυτά ξαναφυτεύτηκαν στα γλαστράκια, καλύφθηκαν με μαύρες πλαστικές σακούλες για 24 ώρες και τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο σε θερμοκρασία 20°C και φωτοπερίοδο 16 ωρών μέχρι το τέλος του πειράματος. Τα πειράματα γονιδιακής σίγησης επαναλήφθηκαν τρεις φορές.

3.3.6 Στέλεχος φυτοπαθογόνου μύκητα και προετοιμασία μολύσματος

Η απομόνωση 70V της φυλής 1 του *V. dahliae* στην τομάτα χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα. Το στέλεχος διατηρήθηκε στους -80°C ως αιώρημα κονιδίων 4×10^7 ml⁻¹ σε 25% υδατική γλυκερόλη (Maniatis et al., 1982). Πριν χρησιμοποιηθεί, ο μύκητας μεταφέρθηκε σε θρεπτικό υλικό PDA (Merck) και τοποθετήθηκε σε επωαστικό θάλαμο στους 25°C για πέντε ημέρες. Για την παρασκευή του μολύσματος των πειραμάτων παθογένειας, τμήμα της αναπτυσσόμενης καλλιέργειας μεταφέρθηκε από τρυβλίο σε φιάλη Earlenmayer 250 ml που περιείχε 100 ml υγρού θρεπτικού υποστρώματος SSN για επώαση. Ο μύκητας επώαστηκε σε περιστρεφόμενο επωαστικό στις 120 στροφές ανά λεπτό στους 22°C για πέντε μέρες. Ακολούθησε διήθηση της καλλιέργειας σε τυρόπανο, φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 10000 g, στους 12°C και επαναιωρηματοποίηση σε αποστειρωμένο απιονισμένο νερό. Πριν την εφαρμογή στα φυτά, δημιουργήθηκε αιώρημα συγκέντρωσης 10^7 κονιδίων ανά ml με τη βοήθεια αιματοκυτομέτρου.

3.3.7 Δοκιμές παθογένειας σε φυτά τομάτας

Για την διερεύνηση του ρόλου των υποδοχέων του αιθυλενίου Never ripe και ETR4 στην άμυνα των φυτών τομάτας εναντίον του μύκητα *V. dahliae*, μεταλλαγμένα φυτά *Nr* και φυτά του πειράματος σίγησης του *ETR4*, εμβολιάστηκαν με 10 ml αιωρήματος συγκέντρωσης 10^7 κονιδίων του μύκητα ανά ml με ριζοπότισμα, όταν τα φυτά βρίσκονταν στο στάδιο του 4^{ου} πραγματικού φύλλου (στα φυτά της σίγησης η μόλυνση έγινε 21 ημέρες μετά την εφαρμογή VIGS). Τα φυτά μάρτυρες

εμβολιάστηκαν με 10 ml αποστειρωμένο απιονισμένο νερό. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν τρία πειράματα παθογένειας. Το ποσοστό της ασθένειας σε κάθε μέτρηση υπολογίστηκε από τον αριθμό των φύλλων που παρουσίασαν συμπτώματα σε σχέση με το συνολικό αριθμό φύλλων κάθε φυτού. Η πρόοδος της ασθένειας καταγράφηκε σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα μέχρι τη 33^η ημέρα για τις βιοδοκιμές του *V. dahliae* με τα αγρίου τύπου και *Nr* φυτά και μέχρι την 37^η ημέρα μετά την εφαρμογή του μύκητα στις βιοδοκιμές του *V. dahliae* στα φυτά που είχαν εμβολιαστεί με το *pTRV-00* (κενός φορέας) ή *pTRV-ETR4*. Η πρόοδος της ασθένειας και ο δείκτης AUDPC υπολογίστηκαν όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.3. Τα πειράματα παθογένειας επαναλήφθηκαν 3 φορές με 15 επαναλήψεις ανά πείραμα.

3.3.8 Απομόνωση DNA από φυτά τομάτας

Για να διερευνηθεί εάν τα μειωμένα συμπτώματα των μεταλλαγμένων φυτών *Nr* συσχετίζονταν με μικρότερη ανάπτυξη του μύκητα στα αγγεία τους, απομονώθηκε γονιδιακό DNA από φυτά τομάτας σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Dellaporta et al., (1983) το οποίο χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια σε αντιδράσεις Real-time PCR για την ποσοτικοποίηση του *V. dahliae*. Συγκεκριμένα, 10 φυτά από κάθε επέμβαση (WT και *Nr*) κόπηκαν στο επίπεδο του χύματος, αφαιρέθηκαν τα φύλλα, ξεπλύθηκαν με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό και κονιορτοποιήθηκαν με χρήση υγρού αζώτου σε αποστειρωμένα ιγδία. Οι δειγματοληψίες έγιναν ανά 5 ημέρες από 5 έως 25 ημέρες μετά την εφαρμογή του *V. dahliae*. Περίπου 80-100 mg κονιορτοποιημένου ιστού χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση DNA όπως περιγράφεται στη παράγραφο 2.3.5. Ποσοτικοποίηση του μύκητα πραγματοποιήθηκε και σε ιστούς φυτών τομάτας μετά την γονιδιακή σίγηση του *ETR4*. Έγινε δειγματοληψία σε 30 φυτά από κάθε επέμβαση (*pTRV2-00* και *pTRV2-ETR4*) και απομόνωση DNA όπως περιγράφηκε πιο πάνω για τα WT και *Nr* φυτά.

3.3.9 Απομόνωση RNA από φυτά *A. thaliana*

Η απομόνωση ολικού RNA πραγματοποιήθηκε στα φυτά τομάτας των πειραμάτων της γονιδιακής σίγησης για την επιβεβαίωση της σίγησης του γονιδίου *ETR4*. Για τη διαδικασία αυτή, έγινε δειγματοληψία από τα ανώτερα φύλλα των φυτών, τα οποία ξεπλύθηκαν με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό και κονιορτοποιήθηκαν με χρήση υγρού αζώτου σε αποστειρωμένα ιγδία. 50 mg κονιορτοποιημένου φυτικού ιστού χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση RNA με τη χρήση Trizol (Ambion) όπως περιγράφεται στη παράγραφο 2.3.6.

3.3.10. Μέτρηση νουκλεϊνικών οξέων

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του DNA και RNA πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στη παράγραφο 2.3.7.

3.3.11 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής

Η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής εφαρμόστηκε για τον καθορισμό του επιπέδου μεταγραφής του γονιδίου *ETR4* στα πειράματα γονιδιακής σίγησης καθώς και του γονιδίου της β -τουμπουλίνης της τομάτας, όπως περιγράφεται στη παράγραφο 2.3.8.

3.3.12 Εφαρμογή PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR)

Για τη ποσοτικοποίηση του DNA του μύκητα στις επιμέρους αντιδράσεις, ως πρότυπα δείγματα (γνωστών συγκεντρώσεων) χρησιμοποιήθηκαν πλασμίδια στα οποία είχε κλωνοποιηθεί το γονίδιο ενδιαφέροντος (τμήμα της υπομονάδας 5.8S rRNA του *V. dahliae*). Για να διασφαλιστεί η ακρίβεια των μετρήσεων του φωτομέτρου που χρησιμοποιήθηκε ώστε να προσδιοριστούν οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων ολικού DNA από τους ιστούς σχεδιάστηκε ζεύγος εκκινητών πάνω στο γονίδιο της β -τουμπουλίνης της τομάτας. (Πίνακας 3.3.1) το οποίο ενισχύει προϊόν μήκους 172 ζευγών βάσεων. Με αυτό τον τρόπο διασφαλίστηκε ότι οι αρχικές ποσότητες ολικού DNA οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγείο για το προσδιορισμό του παθογόνου σε όλες τις επιμέρους επεμβάσεις ήταν παρόμοιες, και καθιστούσαν δυνατή τη σύγκριση των αποτελεσμάτων ποσοτικοποίησης των μυκήτων. Η ποσοτικοποίηση της β -τουμπουλίνης πραγματοποιούνταν στην ίδια αντίδραση με τα αντίστοιχα δείγματα ποσοτικοποίησης του μύκητα.

Στα πειράματα ελέγχου του επιπέδου έκφρασης του γονιδίου *ETR4* στα φυτά τομάτας μετά την εφαρμογή της γονιδιακής σίγησης, η αποδοτικότητα (efficiency, E) για το κάθε ενισχυμένο προϊόν υπολογίστηκε με τη μέθοδο της γραμμικής παλινδρόμησης πάνω στα δεδομένα του λογάριθμου φθορισμού ανά κύκλο, με τη χρήση του λογισμικού LinRegPCR (Remakers et al., 2003). Η ενίσχυση της β -τουμπουλίνης πραγματοποιήθηκε με τους ίδιους εκκινητές όπως στην περίπτωση της ποσοτικοποίησης των μυκήτων (Πίνακας 3.3.1). Η β -τουμπουλίνη χρησιμοποιήθηκε σαν εσωτερική σταθερά για την κανονικοποίηση μικρών διαφορών στις αρχικές ποσότητες cDNA. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε η τιμή του μέσου όρου του οριακού κύκλου (threshold cycle, Ct) για τα γονίδια *ETR4* και β -τουμπουλίνης με βάση τρία ανεξάρτητα βιολογικά δείγματα. Ο λόγος του επιπέδου

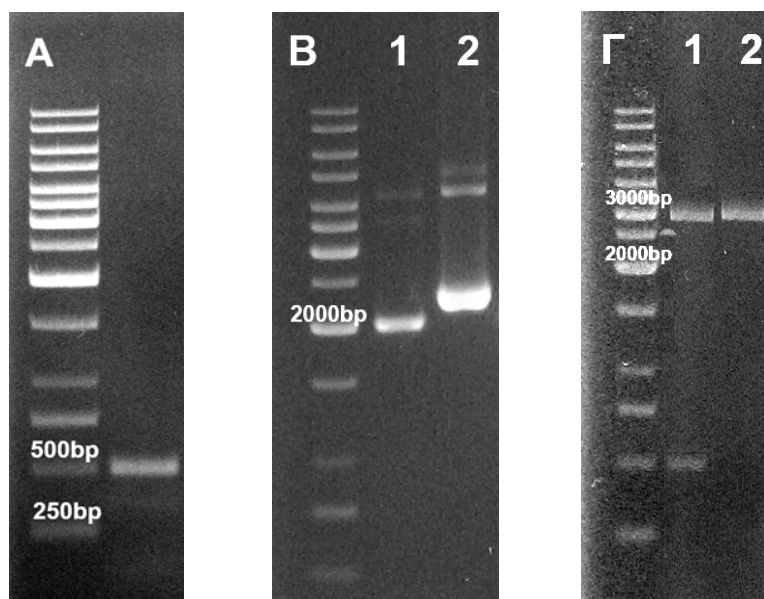
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΟΥ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟΥ ΣΤΗΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ ΚΑΤΑ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *V. DAHLIAE*

mRNA στην κάθε επέμβαση προς τις τιμές του mRNA στα φυτά μάρτυρες, υπολογίστηκε με τη μέθοδο DCt $[(1+E)^{-DCt}]$ (Pfaffl, 2001). Οι αντιδράσεις Real-time PCR πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφεται στη παράγραφο 2.3.9.

3.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.4.1 Ενίσχυση του γονιδίου *ETR4* από τομάτα και κλωνοποίηση σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς

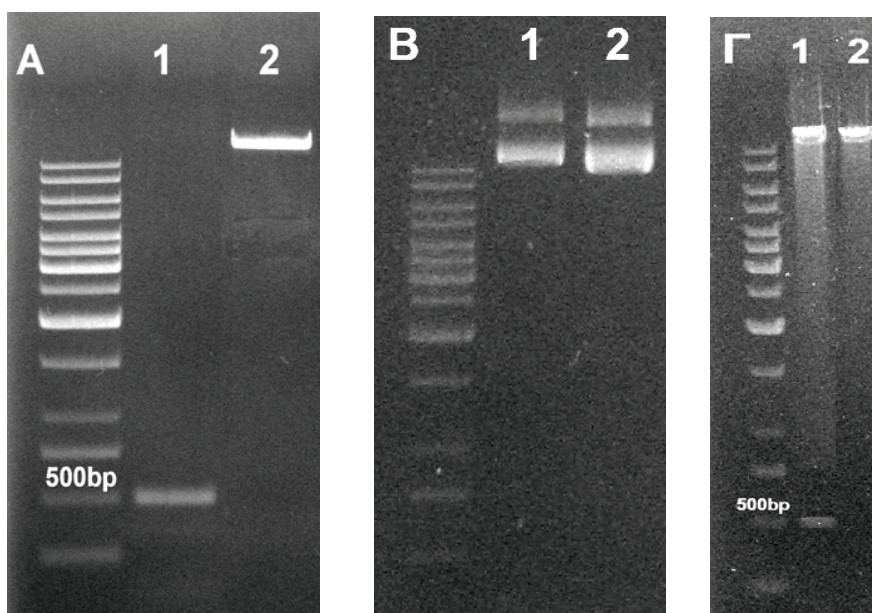
Το αναμενόμενο τμήμα 492 ζευγών βάσεων του γονιδίου *ETR4* ενισχύθηκε μετά από μια τυπική αντίδραση PCR με τους εκκινητές SilETR4-F / SilETR4-R (παράγραφος 3.3.2) σε θερμοκρασία υβριδισμού 58°C σε γονιδιακό DNA της τομάτας Ailsa Craig (Εικόνα 3.4.1 Α). Το τμήμα αυτό κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pGEM-T, με διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 3.3.4 Για τον έλεγχο της παρουσίας του επιθυμητού τμήματος DNA σε αντιπροσωπευτικούς κλώνους του βακτηρίου *E. coli* πραγματοποιήθηκε απομόνωση πλασμιδιακού DNA (παράγραφος 3.3.5) (Εικόνα 3.4.1. Β) και ακολούθησε πέψη του πλασμιδιακού DNA με τα περιοριστικά ένζυμα *Eco*RI και *Bam*HI (Εικόνα 3.4.1. Γ).



Εικόνα 3.4.1: Απομόνωση του γονιδίου *ETR4* της τομάτας **A)** Ενίσχυση του τμήματος 492 βάσεων του γονιδίου *ETR4*, εφαρμόζοντας PCR σε γονιδιακό DNA τομάτας **B)** Ηλεκτροφόρηση του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε από το φορέα pGEM-T (διαδρομή 1) και από τον κλώνο pGEM-T:ETR4 που φέρει τμήμα του γονιδίου (διαδρομή 2) **Γ)** Πέψη των φορέων pGEM-T-ETR4 (διαδρομή 1) και pGEM-T (διαδρομή 2) με τα περιοριστικά ένζυμα *Eco*RI/*Bam*HI, για τον καθορισμό του μεγέθους του κλωνοποιημένου τμήματος.

3.4.2 Δημιουργία του φορέα σίγησης *pTRV-ETR4*

Πραγματοποιήθηκε πέψη του φορέα σίγησης YL156 (*pTRV2*) με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRI* και *BamHI* το προϊόν της οποίας καθαρίστηκε, όπως και τα προϊόντα της πέψης που προέκυψαν από το κλώνο *pGEM-ETR4*, με τη χρήση του MinElute PCR purification kit (Qiagen) (Εικόνα 3.4.2. Α). Ακολούθησε αντίδραση συνένωσης (ligation) των τμημάτων DNA του *ETR4* με τον πλασμιδιακό φορέα σίγησης YL156 και εισαγωγή του ανασυνδυασμένου κλώνου σε κύτταρα βακτηρίου *E. coli*. Μετά την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από τις λευκές αποικίες βακτηριακών κυττάρων (Εικόνα 3.4.2. Β), έγινε πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRI* και *BamHI* που απελευθέρωσαν το αναμενόμενο τμήμα μεγέθους περίπου 500 βάσεων (Εικόνα 3.4.2. Γ), που ήταν η πρώτη επιβεβαίωση της κλωνοποίησης του επιθυμητού τμήματος DNA. Αλληλούχιση του παραπάνω κλώνου (ο οποίος ονομάστηκε *pTRV2-ETR4*) επιβεβαίωσε την απομόνωση τμήματος 492 ζευγών βάσεων του γονιδίου *ETR4*.



Εικόνα 3.4.2: Κατασκευή του φορέα γονιδιακής σίγησης *pTRV2-ETR4* **Α)** Ευθυγράμμιση και ηλεκτροφόρηση μετά τον καθαρισμό των DNA τμημάτων του *ETR4* (διαδρομή 1) και του YL156 (διαδρομή 2) **Β)** Ηλεκτροφόρηση του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε από το φορέα *pTRV2-ETR4* (διαδρομή 1) και *pTRV2-00* (διαδρομή 2, κενός φορέας) **Γ)** Πέψη των φορέων *pTRV2-ETR4* (διαδρομή 1) και *pTRV2-00* (διαδρομή 2) με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRI/BamHI*, για τον καθορισμό του μεγέθους του κλωνοποιημένου τμήματος.

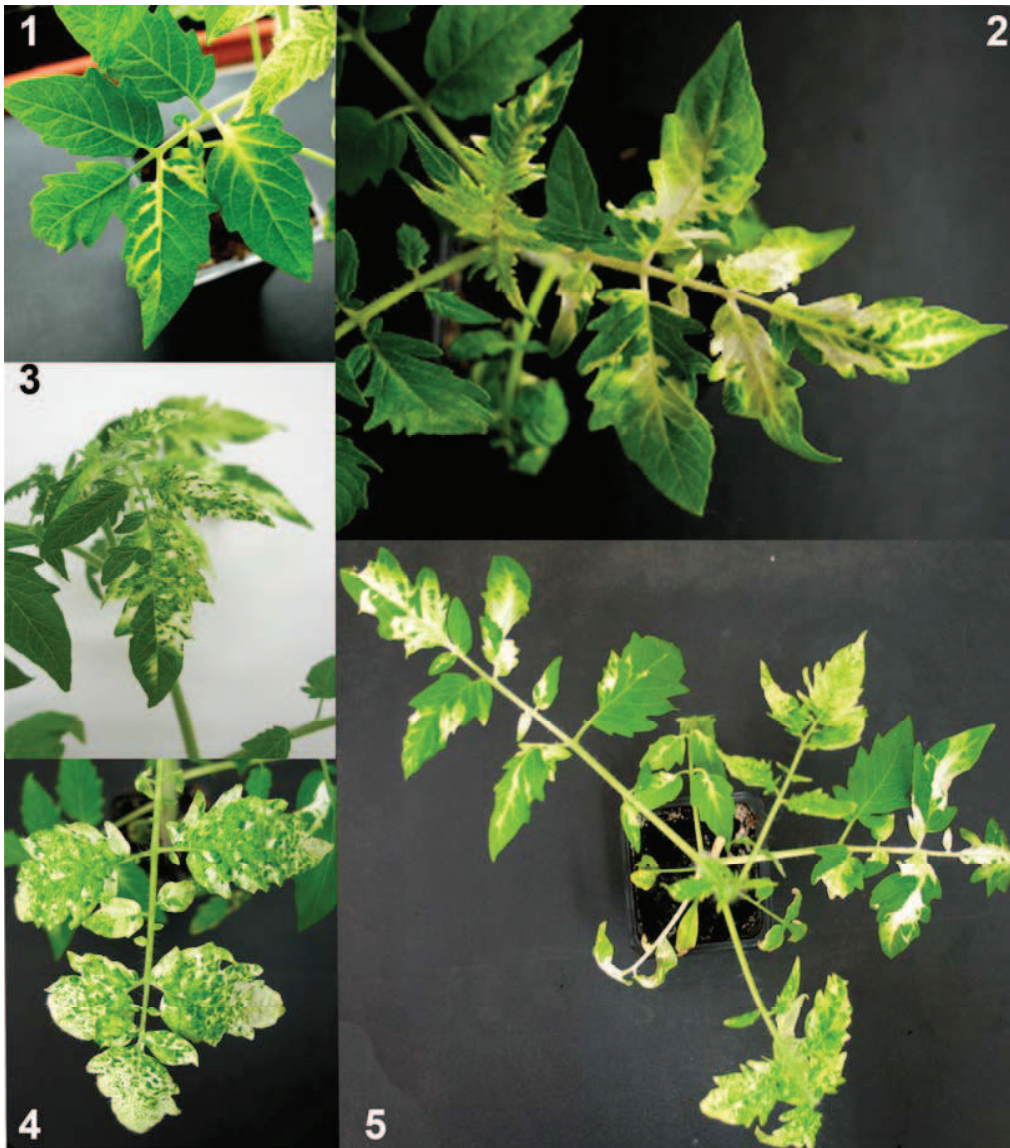
3.4.3 Ίικά επαγόμενη γονιδιακή σίγηση του γονιδίου *ETR4* της τομάτας

Για να διαπιστωθεί εάν το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα αιθυλενίου *ETR4* εμπλέκεται στην ανθεκτικότητα των φυτών ενάντια στο μύκητα *V. dahliae* πραγματοποιήθηκε μείωση (knock-down) της λειτουργίας του με τη χρήση της ιικά επαγόμενης γονιδιακής σίγησης (VIGS). Στα πειράματα της γονιδιακής σίγησης, τα φυτά εμβολιάστηκαν με τους φορείς *pTRV1* και *pTRV-ETR4*. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης ο φορέας *pTRV2-PDS* (στέλεχος του *A. tumefaciens* που έφερε τμήμα του γονιδίου δεσατουράση του φυτοενίου της τομάτας) και ο κενός φορέας *pTRV2* (*pTRV2-00*). Τα φυτά τομάτας που είχαν μολυνθεί με το *pTRV2-PDS* ανέπτυξαν το φαινότυπο της “φωτο-λεύκανσης” (photobleaching) στα ανώτερα φύλλα 10 ημέρες μετά την εφαρμογή του *A. tumefaciens* και παρέμειναν λευκά για τουλάχιστον ένα μήνα (Εικόνα 3.4.3 A και B).



Εικόνα 3.4.3 A: Ο φαινότυπος της φωτολεύκανσης άρχισε να φαίνεται 10 ημέρες μετά την εφαρμογή του *A. tumefaciens pTRV2-PDS*. Στη φωτογραφία 1 φαίνονται τα αρχικά συμπτώματα λεύκανσης που παρατηρήθηκαν αρχικά στα ανώτερα φύλλα. Στη φωτογραφία 2 φαίνεται σε μεγέθυνση το φύλλο που παρουσίασε τον φαινότυπο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΟΥ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟΥ ΣΤΗΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ ΚΑΤΑ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *V. DAHLIAE*



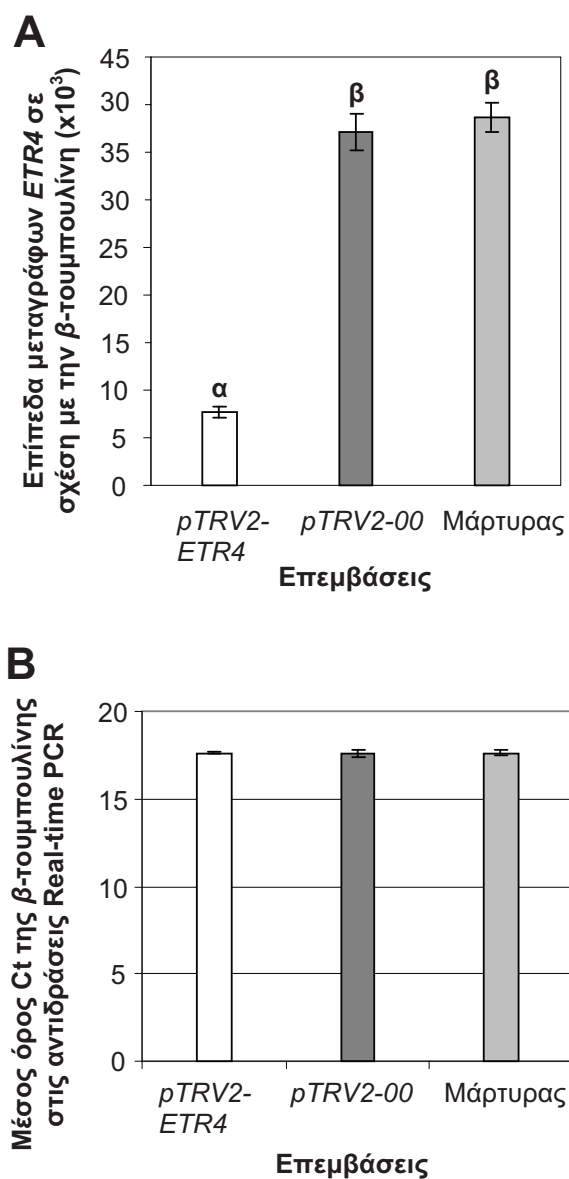
Εικόνα 3.4.3 Β: Ο φαινότυπος της φωτολεύκανσης σε διάφορα στάδια εξέλιξης και σε διάφορες χρονικές στιγμές μετά την εφαρμογή του *A. tumefaciens pTRV2-PDS* **1)** 13 μέρες μετά την εφαρμογή του βακτηρίου η λεύκανση άρχισε να παρατηρείται και στα κατώτερα φύλλα των φυτών **2)** Στις 15 ημέρες η λεύκανση ήταν ορατή σχεδόν στο 50% των σύνθετων φύλλων **3, 4)** Στις 18 ημέρες το 70% της επιφάνειας των φύλλων παρουσίαζε το φαινότυπο **5)** στις 20 ημέρες το μεγαλύτερο μέρος των φυτών παρουσίαζε φωτολεύκανση που ήταν ορατή σε όλα τα φύλλα.

Τρεις εβδομάδες μετά την εφαρμογή του *A. tumefaciens* απομονώθηκε RNA από ιστό των ανώτερων φύλλων τομάτας όπου είχε επιχειρηθεί η γονιδιακή σίγηση του *ETR4* καθώς και από τα φυτά μάρτυρες (φυτά που είχαν εμβολιαστεί με τον κενό φορέα *pTRV2-00* και φυτά στα οποία είχε εμβολιαστεί αποστειρωμένο απιονισμένο νερό). Τα σχετικά επίπεδα μεταγραφικού mRNA υπολογίστηκαν με αντιδράσεις Real-

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΟΥ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟΥ ΣΤΗΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ ΚΑΤΑ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *V. DAHLIAE*

time PCR (Εικόνα 3.4.4 Α). Παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της ποσότητας του mRNA του γονιδίου στόχου *ETR4* στα φυτά όπου επιχειρήθηκε γονιδιακή σίγηση σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες, που εμβολιάστηκαν με *pTRV2-00* και νερό. Η μείωση που παρατηρήθηκε ήταν 76% και 80%, αντίστοιχα (Εικόνα 3.4.4 Α). Τα επίπεδα της β -τουμπουλίνης που χρησιμοποιήθηκαν για την κανονικοποίηση του επιπέδου μεταγράφων του *ETR4* φαίνονται στην Εικόνα 3.4.4 Β και ήταν σταθερά για όλα τα δείγματα, υποδεικνύοντας ότι η έκφραση του γονιδίου αναφοράς δεν επηρεάστηκε από τις διάφορες επεμβάσεις που είχαν υποστεί τα φυτά (εμβολιασμός με το βακτήριο *A. tumefaciens*, διαμόλυνση με τον ιό *TRV*, σίγηση του γονιδίου *ETR4* και μόλυνση με το μύκητα *V. dahliae*).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΟΥ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟΥ ΣΤΗΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ ΚΑΤΑ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *V. DAIHLIAE*

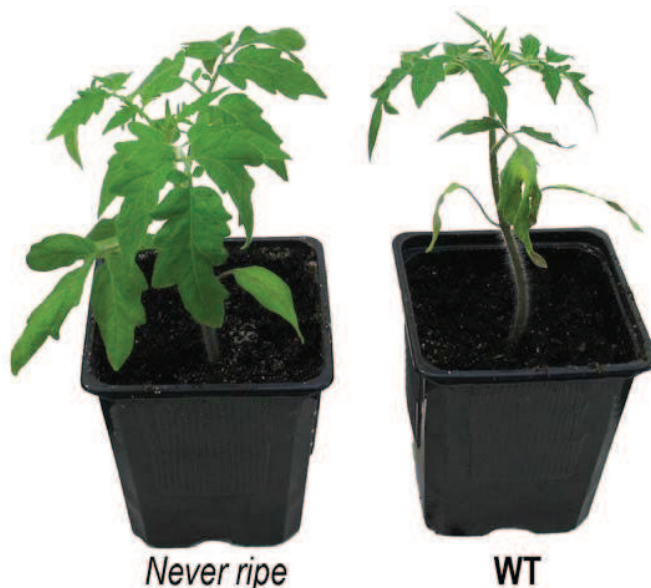


Εικόνα 3.4.4: (A) Γονιδιακή σίγηση του γονιδίου *ETR4* σε φυτά τομάτας. Ολικό RNA απομονώθηκε από τα ανώτερα φύλλα φυτών που εμβολιάστηκαν με *pTRV2-ETR4* και *pTRV2-00* καθώς και από την αντίστοιχη επέμβαση με νερό, που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία cDNA. Το cDNA χρησιμοποιήθηκε σε αντιδράσεις ποσοτικής Real-time PCR με εξειδικευμένους εκκινητές για το γονίδιο *ETR4*. Η ποσότητα της β -τουμπουλίνης υπολογίστηκε για κάθε φυτό ως μάρτυρας και χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των μεταγράφων του *ETR4*. Οι στήλες αναπαριστούν το μέσο όρο από 45 φυτά και οι κάθετες ράβδοι αντιπροσωπεύουν την απόκλιση από το μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα. Οι στήλες που συνοδεύονται από διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά σύμφωνα με μέθοδο πολλαπλών δοκιμών κατά Tukey σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0.05$. **(B)** Μέσος όρος του οριακού κύκλου (threshold cycle, Ct) της β -τουμπουλίνης στα δείγματα cDNA που προέκυψαν από τα φυτά όπου δοκιμάστηκε η γονιδιακή σίγηση. Οι στήλες αναπαριστούν το μέσο όρο από 45 φυτά και οι κάθετες ράβδοι αντιπροσωπεύουν την απόκλιση από το μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα.

3.4.4 Η αδυναμία πρόσληψης αιθυλενίου μέσω των υποδοχέων *Never ripe* και *ETR4* μειώνει τα συμπτώματα που προκαλεί ο μύκητας *V. dahliae* σε φυτά τομάτας

Προηγούμενες ερευνητικές εργασίες έδειξαν ότι το αιθυλένιο έχει σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση των συμπτωμάτων κατά τις συμβατές αλληλεπιδράσεις με φυτοπαθογόνους μύκητες (Lund et al., 1998). Επομένως σε αυτή την εργασία διερευνήθηκε εάν η πρόσληψη του αιθυλενίου μέσω των υποδοχέων *Nr* και *ETR4* επηρεάζει την εκδήλωση των συμπτωμάτων του μύκητα *V. dahliae* σε φυτά τομάτας. Για τα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν τα μεταλλαγμένα φυτά στην πρόσληψη του αιθυλενίου *Never ripe* (*Nr*), τα οποία φέρουν μετάλλαξη σε ένα γονίδιο μέλος της οικογένειας υποδοχέων του αιθυλενίου στην τομάτα (Lanahan et al., 1994) και η αγρίου τύπου (*WT*) ποικιλία *Ailsa Craig* καθώς και τα φυτά που είχαν υποστεί σίγηση στο γονίδιο *ETR4* (συμπεριλήφθηκαν μόνο τα φυτά που είχαν σημαντική μείωση των μεταγραφημάτων του γονιδίου) και τα φυτά που εμβολιάστηκαν με τον άδειο φορέα *pTRV2-00*.

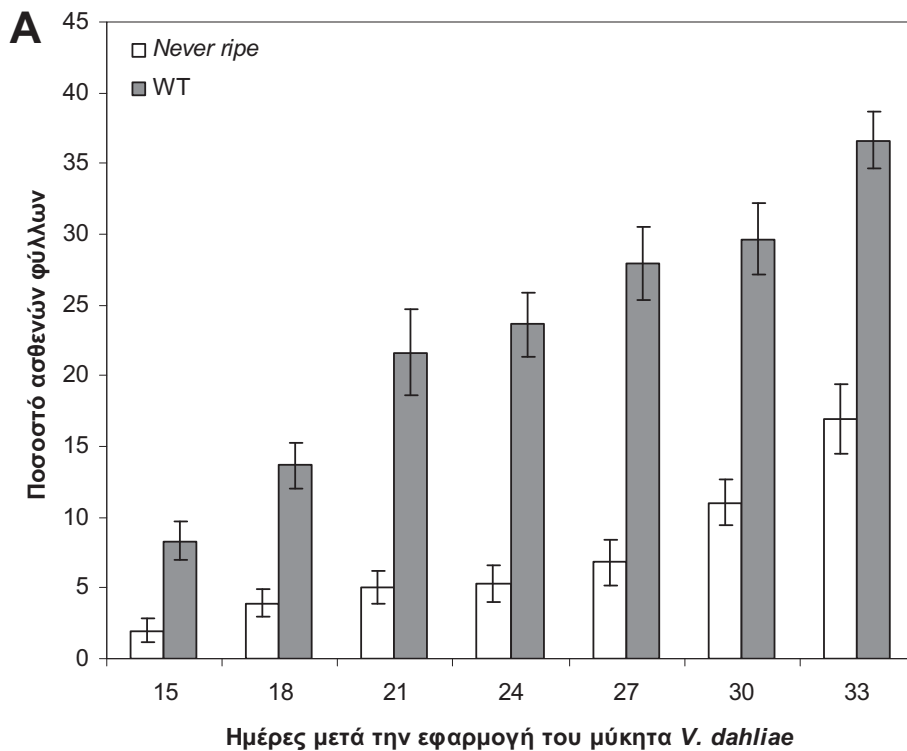
Στις βιοδοκιμές του *V. dahliae* με τα *WT* και *Nr* plants, τα πρώτα συμπτώματα της ασθένειας εμφανίστηκαν με τη μορφή χλωρώσεων και μαράνσεων ιδιαίτερα των παλαιότερων φύλλων στις 15 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα (Εικόνα 3.4.5).



Εικόνα 3.4.5: Συμπτώματα *Verticillium dahliae* σε φυτά τομάτας *Never ripe* (*Nr*) και *WT*, 15 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα. Τα φυτά μολύνθηκαν με 10 ml αιωρήματος συγκέντρωσης 1×10^7 κονιδία *V. dahliae* ανά ml και η εκδήλωση συμπτωμάτων καταγράφηκε μέχρι τις 33 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα. Τα *WT* φυτά εκδήλωσαν αντιπροσωπευτικά συμπτώματα μάρανσης και η σοβαρότητα της ασθένειας εξελίχθηκε γρήγορα, ενώ τα *Nr* μεταλλαγμένα φυτά έδειξαν λιγότερα συμπτώματα και πιο αργή εξέλιξη της ασθένειας.

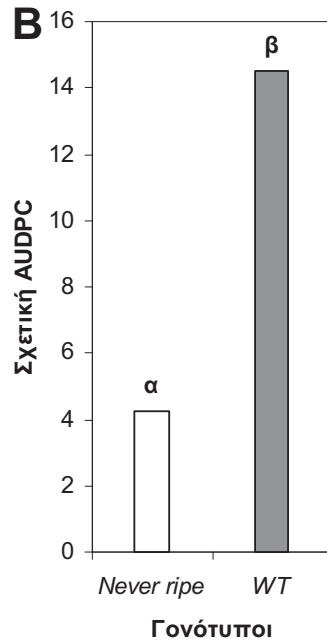
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΟΥ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟΥ ΣΤΗΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ ΚΑΤΑ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *V. DAHLIAE*

Τα συμπτώματα καταγράφηκαν περιοδικά μέχρι τις 33 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα. Η σοβαρότητα της ασθένειας (μάρανση και ακολούθως κιτρίνισμα και νέκρωση των φύλλων) εξελίχθηκε γρήγορα στα WT φυτά, ενώ τα *Nr* μεταλλαγμένα φυτά έδειξαν λιγότερα συμπτώματα και πιο αργή εξέλιξη της ασθένειας (Εικόνα 3.4.6 Α). Την 33^η ημέρα μετά την εφαρμογή του μύκητα η εμφάνιση της ασθένειας (ποσοστό ασθενών φυτών) στα WT φυτά ήταν 93% και η σοβαρότητα της ασθένειας (ποσοστό ασθενών φύλλων σε σχέση με το συνολικό αριθμό των φύλλων) 37%, ενώ στα *Nr* φυτά η εμφάνιση της ασθένειας ήταν 82% και η σοβαρότητα της ασθένειας 17% (Εικόνα 3.4.6 Α). Η σχετική AUDPC στα *Nr* φυτά ήταν 4.2%, ποσοστό που ήταν σημαντικά χαμηλότερο σε σχέση με τα WT φυτά στα οποία το ποσοστό AUDPC ήταν 14.5% (Εικόνα 3.4.6 Β).



Εικόνα 3.4.6: (A) Ποσοστό ασθενών φύλλων φυτών τομάτας WT και *Never ripe* μετά την εφαρμογή του μύκητα *Verticillium dahliae*. Η σοβαρότητα της ασθένειας υπολογίστηκε για κάθε χρονικό σημείο καταγραφής των συμπτωμάτων ως ποσοστό του αριθμού των φύλλων που παρουσίαζαν μάρανση προς το συνολικό αριθμό των φύλλων του κάθε φυτού. Ο κάθε γονότυπος συμπεριλάμβανε 15 φυτά και τα πειράματα επαναλήφθηκαν 3 φορές. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο 45 φυτών και οι κάθετες ράβδοι αντιπροσωπεύουν την απόκλιση από το μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα.

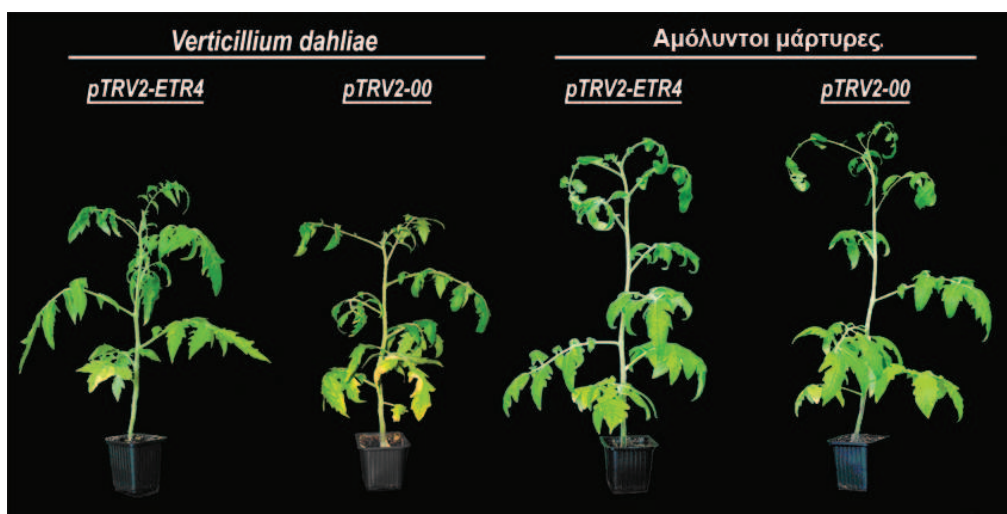
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΟΥ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟΥ ΣΤΗΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ ΚΑΤΑ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *V. DAHLIAE*



Εικόνα 3.4.6: (B) Οι τιμές της ασθένειας αναπαραστάθηκαν γραφικά στην εξέλιξη του χρόνου για τη δημιουργία καμπύλης της εξέλιξης της ασθένειας. Ακολούθως υπολογίστηκε το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη εξέλιξης της ασθένειας (AUDPC) με τη μέθοδο της τραπεζοειδούς ολοκλήρωσης (Campbell και Madden, 1990) και η ασθένεια εκφράστηκε ως το ποσοστό του μέγιστου εμβαδού για όλη τη διάρκεια του πειράματος, που αναφέρεται ως σχετική AUDPC (Korolev et al., 2001). Οι στήλες που συνοδεύονται από διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμή *t test* σε επίπεδο σημαντικότητας ($P \leq 0.05$).

Στα φυτά όπου είχε πραγματοποιηθεί νωρίτερα το πείραμα της γονιδιακής σίγησης του *ETR4*, ο μύκητας *V. dahliae* εφαρμόστηκε 22 ημέρες μετά τον εμβολιασμό των φυτών με τα στελέχη του *A. tumefaciens*. Τα πρώτα συμπτώματα της ασθένειας εμφανίστηκαν 21 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα στα κατώτερα φύλλα των φυτών που είχαν εμβολιαστεί με τον *TRV:00* (Εικόνα 3.4.7), και καταγράφηκαν μέχρι τις 37 ημέρες (Εικόνα 3.4.8 A).

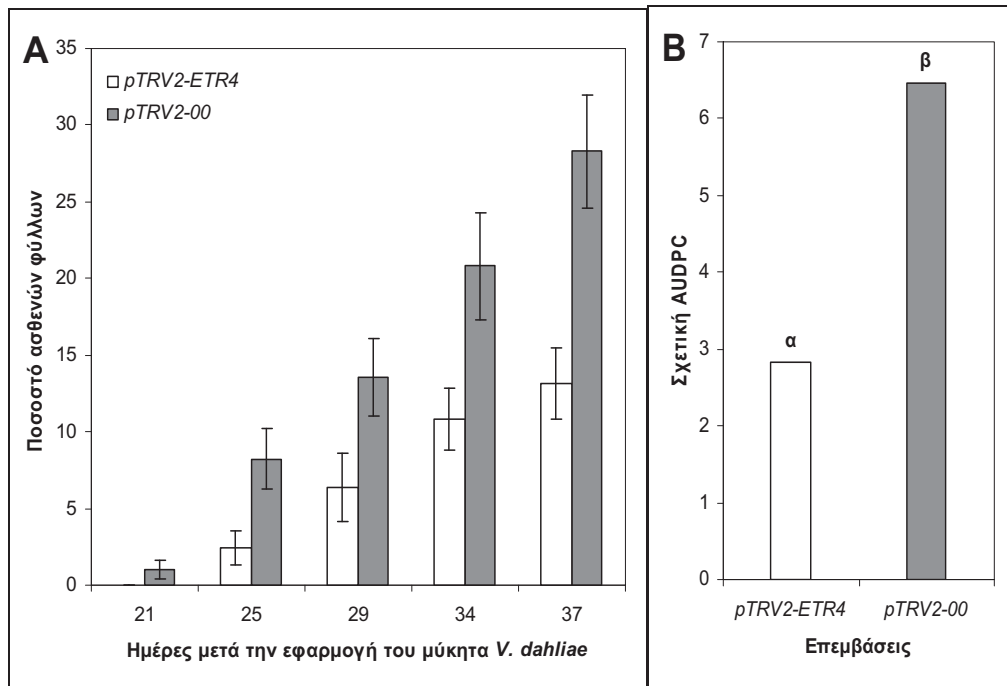
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΟΥ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟΥ ΣΤΗΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ ΚΑΤΑ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *V. DAHLIAE*



Εικόνα 3.4.7: Συμπτώματα του *Verticillium dahliae* στα *pTRV2-ETR4* και *pTRV2-00* φυτά τομάτας 30 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα. Τα φυτά μολύνθηκαν με 10 ml αιωρήματος συγκέντρωσης 1×10^7 κονίδια *V. dahliae* ανά ml και η εξέλιξη της ασθένειας καταγράφηκε μέχρι 37 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα. Τα εμβολιασμένα με το *pTRV2-00* ανέπτυξαν αντιπροσωπευτικά συμπτώματα μάρανσης των φύλλων και η σοβαρότητα της ασθένειας εξελίχθηκε γρήγορα, ενώ τα φυτά στα οποία είχε προηγηθεί η σίγηση του *ETR4* έδειξαν λιγότερα συμπτώματα και πιο αργή εξέλιξη της ασθένειας.

Την 37^η ημέρα, η εμφάνιση της ασθένειας στα *pTRV-ETR4* φυτά ήταν 86% και η σοβαρότητα της ασθένειας ήταν 13 %, ενώ στα *pTRV-00* φυτά η εμφάνιση της ασθένειας ήταν 100% και η σοβαρότητα της ασθένειας ήταν 28% (Εικόνα 3.4.8 Α). Η σχετική AUDPC στα *pTRV-ETR4* φυτά ήταν 2.8% που ήταν σημαντικά μικρότερη από την AUDPC στα *pTRV-00* φυτά που ήταν 6.5% (Εικόνα 3.4.8 Β), δείχνοντας ότι στα φυτά που είχε πραγματοποιηθεί σίγηση του *ETR4* τα συμπτώματα της ασθένειας από το μύκητα *V. dahliae* ήταν σημαντικά λιγότερο έντονα σε σχέση με τα φυτά στα οποία το γονίδιο *ETR4* ήταν ενεργό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΟΥ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟΥ ΣΤΗΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ ΚΑΤΑ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *V. DAHLIAE*



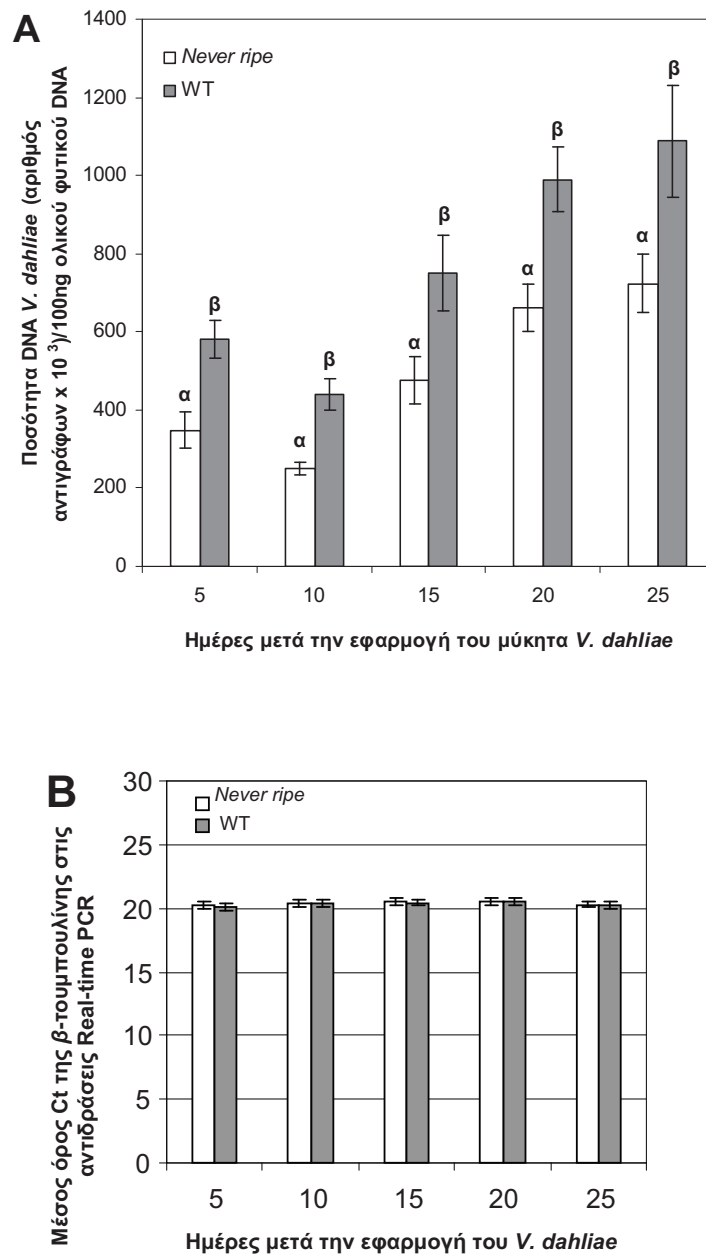
Εικόνα 3.4.8: (A) Ποσοστό ασθενών φύλλων φυτών τομάτας όπου είχε πραγματοποιηθεί σίγηση του γονιδίου *ETR4* (*pTRV2-ETR4*) ή εμβολιασμός με τον κενό φορέα *pTRV2* (*pTRV2-00*), μετά την εφαρμογή του μύκητα *Verticillium dahliae*. Η σοβαρότητα της ασθένειας υπολογίστηκε για κάθε χρονικό σημείο καταγραφής των συμπτωμάτων ως ποσοστό του αριθμού των φύλλων που παρουσίαζαν μάρανση προς το συνολικό αριθμό των φύλλων του κάθε φυτού. Ο κάθε γονότυπος συμπεριλάμβανε 15 φυτά και τα πειράματα επαναλήφθηκαν 3 φορές. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο 45 φυτών και οι κάθετες ράβδοι αντιπροσωπεύουν την απόκλιση από το μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα. **(B)** Οι τιμές της ασθένειας αναπαραστάθηκαν γραφικά στην εξέλιξη του χρόνου για τη δημιουργία καμπύλης της εξέλιξης της ασθένειας. Ακολούθως υπολογίστηκε το εμβαδόν κάτω από τη καμπύλη εξέλιξης της ασθένειας (AUDPC) με τη μέθοδο της τραπεζοειδούς ολοκλήρωσης (Campbell και Madden, 1990) και η ασθένεια εκφράστηκε ως το ποσοστό του μέγιστου εμβαδού για όλη τη διάρκεια του πειράματος, που αναφέρεται ως σχετική AUDPC (Korolev et al., 2001). Οι στήλες που συνοδεύονται από διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά σύμφωνα με τη στατιστική δοκιμασία του *t test* σε επίπεδο σημαντικότητας ($P \leq 0.05$).

3.4.5 Ποσοτικοποίηση του μύκητα *V. dahliae* σε φυτά τομάτας με Real-time PCR

Για να διαπιστωθεί εάν η αδυναμία πρόσληψης του αιθυλενίου μέσω του υποδοχέα Nr, επηρεάζει την αποίκηση και την ανάπτυξη του μύκητα στους αγγειακούς ιστούς των φυτών τομάτας, φυτά αγρίου τύπου (WT) της ποικιλίας Ailsa Craig και μεταλλαγμένα φυτά Nr μολύνθηκαν με το μύκητα *V. dahliae* και η ποσοτικοποίηση της βιομάζας του πραγματοποιήθηκε για κάθε γονότυπο με ποσοτική Real-time PCR σε πέντε χρονικές στιγμές, 5, 10, 15, 20 και 25 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα (Εικόνα 3.4.9 Α).

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της Real-time PCR έδειξε ότι ο μύκητας είχε ήδη αποικήσει το αγγειακό σύστημα τόσο των WT όσο και των Nr των φυτών στις 5 ημέρες μετά την εφαρμογή του (Εικόνα 3.4.9 Α). Η ποσότητα του μύκητα μειώθηκε στις 10 ημέρες μετά την εφαρμογή του και ακολούθως αυξήθηκε σταθερά μέχρι τις 25 ημέρες (Εικόνα 3.4.9 Α). Το ίδιο μοτίβο αποίκησης παρατηρήθηκε και στους δύο γονοτύπους, ωστόσο στα Nr μεταλλαγμένα φυτά τα επίπεδα του *V. dahliae* ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε σχέση με τα WT φυτά, σε κάθε χρονικό σημείο που πραγματοποιήθηκε η ποσοτικοποίηση (Εικόνα 3.4.9 Α). Το γονίδιο της β -τουμπουλίνης της τομάτας χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερική σταθερά για την κανονικοποίηση μικρών διαφορών στις αρχικές ποσότητες DNA που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις Real-time PCR. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες συγκεντρώσεις DNA για όλα τα δείγματα, γεγονός που καθιστούσε δυνατή τη σύγκριση των ποσοτήτων του DNA του μύκητα στους 2 γονοτύπους τόσο στην κάθε μέρα ξεχωριστά αλλά και συγκριτικά για όλες τις ημέρες (Εικόνα 3.4.9 Β).

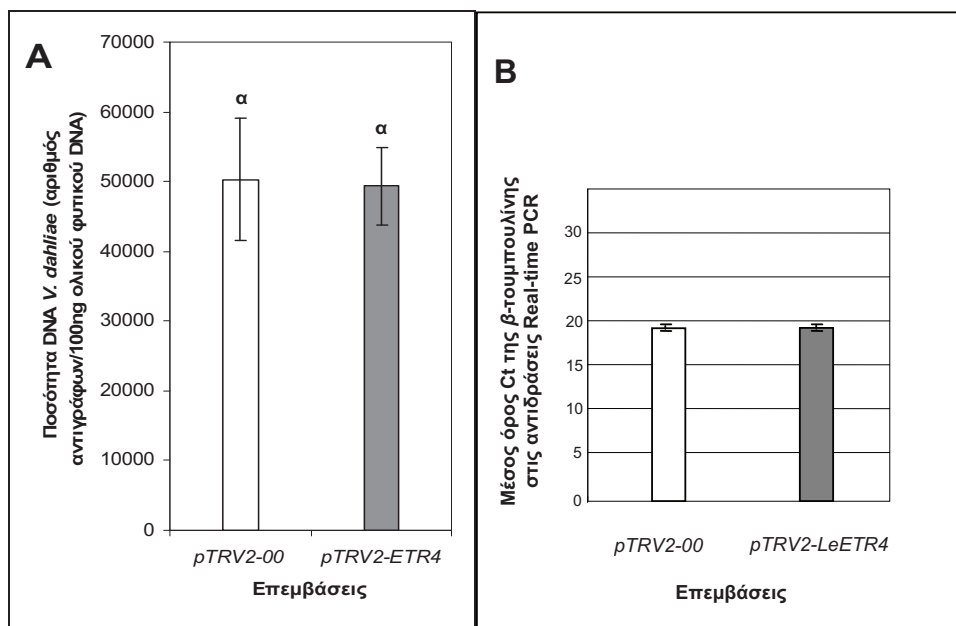
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΟΥ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟΥ ΣΤΗΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ ΚΑΤΑ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *V. DAHLIAE*



Εικόνα 3.4.9: (A) Ποσοτικοποίηση DNA του μύκητα *Verticillium dahliae* στα μεταλλαγμένα φυτά στο μονοπάτι του αιθυλενίου *Never ripe* (Nr) και στα αγρίου τύπου Col-0 φυτά. Τα επίπεδα του DNA του μύκητα υπολογίστηκαν με Real-time PCR σε ολικό DNA που απομονώθηκε από τα στελέχη 10 φυτών ανά γονότυπο 5, 10, 15, 20 και 25 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα. Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές. Οι στήλες αναπαριστούν τους μέσους όρους από 30 φυτά και οι κάθετες ράβδοι αντιπροσωπεύουν την απόκλιση από το μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα. Για κάθε ημέρα δειγματοληψίας, οι στήλες που συνοδεύονται από διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά σύμφωνα με τη στατιστική δοκιμασία *t-test* σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0.05$. (B) Μέσος όρος του οριακού κύκλου (threshold cycle, Ct) της β-τουμπουλίνης στα δείγματα DNA που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε χρονικό σημείο των πειραμάτων ποσοτικοποίησης του μύκητα. Οι στήλες αναπαριστούν το μέσο όρο από 30 δείγματα DNA και οι κάθετες ράβδοι αντιπροσωπεύουν την απόκλιση από το μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΟΥ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟΥ ΣΤΗΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ ΚΑΤΑ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *V. DAHLIAE*

Για τη διερεύνηση του ρόλου του γονιδίου *ETR4* στην αλληλεπίδραση φυτών τομάτας με το μύκητα *V. dahliae* και την πιθανή συσχέτιση του φαινοτύπου των φυτών που είχαν υποστεί σίγηση στο *ETR4* (λιγότερα συμπτώματα προσβολής από τον *V. dahliae*) και της ποσότητας του μύκητα στους αγγειακούς τους ιστούς, απομονώθηκε DNA από τα εμβολιασμένα με *pTRV2-ETR4* και *pTRV2-00* φυτά και χρησιμοποιήθηκε σε αντιδράσεις ποσοτικής Real-time PCR, 37 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι η ποσότητα του παθογόνου ήταν η ίδια στα φυτά και των 2 επεμβάσεων (Εικόνα 3.4.10 Α). Η ποσότητα της β -τουμπουλίνης που χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς ήταν σταθερή για όλα τα δείγματα οπότε τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης του μύκητα ήταν αξιόπιστα (Εικόνα 3.4.10 Β).



Εικόνα 3.4.10: (A) Ποσοτικοποίηση DNA του μύκητα *Verticillium dahliae* στα φυτά όπου είχε πραγματοποιηθεί σίγηση του γονιδίου *ETR4* (*pTRV2-ETR4*) ή εμβολιασμός με τον κενό φορέα *pTRV2* (*pTRV2-00*). Τα επίπεδα του DNA του μύκητα υπολογίστηκαν με Real-time PCR σε ολικό DNA που απομονώθηκε από τα στελέχη 10 φυτών στις 37 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα *V. dahliae*. Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές. Οι στήλες αναπαριστούν τους μέσους όρους από 30 φυτά και οι κάθετες ράβδοι αντιπροσωπεύουν την απόκλιση από το μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα. Οι στήλες που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμή *t-test* σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0.05$. (B) Μέσος όρος του οριακού κύκλου (threshold cycle, Ct) της β -τουμπουλίνης στα δείγματα DNA που χρησιμοποιήθηκαν την ημέρα των πειραμάτων ποσοτικοποίησης του μύκητα. Οι στήλες αναπαριστούν το μέσο όρο από 30 δείγματα DNA και οι κάθετες ράβδοι αντιπροσωπεύουν την απόκλιση από το μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα.

3.4.6 Έλεγχος της επαγωγής γονιδίων που σχετίζονται με το μηχανισμό αντοχής σε φυτά τομάτας WT και *Never ripe* κατά την μόλυνση με το μύκητα *V. dahliae*

Τα αποτελέσματα των δοκιμών παθογένειας αλλά και τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης της βιομάζας του μύκητα στους αγγειακούς ιστούς των φυτών τομάτας έδειξαν ότι τα *Nr* φυτά είχαν αυξημένη ανθεκτικότητα στον *V. dahliae* σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου. Τα λιγότερα συμπτώματα σε συνδυασμό με την μειωμένη βιομάζα των παθογόνων στα *Nr* φυτά υποδεικνυαν ότι ο φαινότυπος αυτός οφείλεται σε μηχανισμούς άμυνας που αναπτύσσονται στα φυτά αυτά. Η δυνατότητα αναγνώρισης γονιδίων που επάγονται στα *Nr* σε σχέση με τα αγρίου τύπου φυτά θα επεδείκνυε δυνητικά στοιχεία ανθεκτικότητας που διέπουν αυτό το γονότυπο. Γι αυτό το λόγο επιλέχθηκε μια ομάδα από οκτώ γονίδια που συμπεριλάμβανε 5 χιτινάσες, 2 γλουκανάσες και μια PR-5 πρωτεΐνη σχετιζόμενη με την παθογένεση για τα οποία σχεδιάστηκαν εξειδικευμένοι εκκινητές (Πίνακας 3.3.1) και πραγματοποιήθηκε έλεγχος του επιπέδου έκφρασης τους σε διάφορες χρονικές στιγμές μετά την εφαρμογή του μύκητα *V. dahliae* σε φυτά WT και *Nr*, με αντιδράσεις με Real-time PCR. Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων δεν παρατηρήθηκε η επαγωγή κάποιου γονιδίου στα *Nr* φυτά αφού η έκφραση των γονιδίων δεν διέφερε σημαντικά στους 2 γονότυπους καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων.

3.5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το αιθυλένιο έχει προταθεί από διάφορους ερευνητές να παίζει σημαντικό ρόλο στην ανθεκτικότητα των φυτών εναντίον διάφορων φυτοπαθογόνων (Feys και Parker, 2000; Kunkel και Brooks, 2002). Ωστόσο ο ρόλος του φαίνεται να εξαρτάται από την αλληλεπίδραση παθογόνου – ξενιστή αφού σε ορισμένες περιπτώσεις η παραγωγή του ή η αντίληψή του προάγουν την ασθένεια ενώ σε άλλες περιπτώσεις την παρεμποδίζουν. Ο στόχος αυτού του κεφαλαίου ήταν να διευκρινιστεί εάν η πρόσληψη του ενδογενούς αιθυλενίου εμπλέκεται στην ανθεκτικότητα φυτών τομάτας εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *V. dahliae*.

Η σύγκριση των συμπτωμάτων της ασθένειας που προκάλεσε ο μύκητας σε φυτά αγρίου τύπου (WT) και σε μεταλλαγμένα φυτά *Never ripe (Nr)* με μειωμένη πρόσληψη αιθυλενίου, έδειξαν ότι στα *Nr* φυτά η σοβαρότητα της ασθένειας και τα συμπτώματα που προκάλεσε σε αυτά τα φυτά ήταν σημαντικά λιγότερα σε σχέση με τα WT φυτά (Εικόνες 3.4.5, 3.4.6). Τα αποτελέσματα αυτά είναι αντίστοιχα με την εικόνα που παρουσίασαν τα *etr1-1* μεταλλαγμένα φυτά *A. thaliana* στα αποτελέσματα του πρώτου κεφαλαίου, μετά τη μόλυνση από το μύκητα *V. dahliae*, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι δύο αυτοί υποδοχείς αιθυλενίου επηρεάζουν με αντίστοιχο τρόπο τις αντιδράσεις των φυτών στην προσβολή από το μύκητα. Γενικά, οι αναμενόμενες (predicted) δομές των υποδοχέων του αιθυλενίου της τομάτας είναι όμοιες με αυτές των υποδοχέων του φυτού *A. thaliana* (Klee, 2002). Η ευθυγράμμιση (alignment) των προβλεπόμενων πρωτεϊνών του υποδοχέα ETR1 των φυτών *A. thaliana* και του *Never ripe* της τομάτας έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες είναι κατά 69% ταυτόσημες (identical) και κατά 81% όμοιες (positive) γεγονός που υποδεικνύει παρόμοια λειτουργία των 2 πρωτεϊνών (Εικόνα 3.4.11) Οι Wilkinson και συνεργάτες (1995) έδειξαν ότι η μετάλλαξη *Never ripe* απενεργοποιεί στην τομάτα ένα γονίδιο που κωδικοποιεί υποδοχέα αιθυλενίου, που είναι ομόλογο του *ETR1* του φυτού *A. thaliana*.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΟΥ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟΥ ΣΤΗΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ ΚΑΤΑ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *V. DAHLIAE*

Score = 829 bits (2141), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 421/607 (69%), Positives = 493/607 (81%), Gaps = 10/607 (1%)

Query	1	MEVCNCIEPQWPADELLMKYQYISDFFIAIAYFSIPLELIYFVKKSAVFPYRWVVLVQFGA	60
Sbjct	1	ME C+CIE P +LL+KYQY+SDFPIA+AYFSIPLELIYFV KSA FPYRWVL+QFGA	60
Query	61	FIVLCGATHLINLWTFTHSRTVALVMTTAKVLTAVVSCATALMLVHIIIPDLLSVKTREL	120
Sbjct	61	FIVLCGATH I+LWTF HS+TVA+VMT +K+LTA VSC TALMLVHIIIPDLLSVKTREL	120
Query	121	FLKNKAAELDREMGLIRTQEETGRHVRMLTHEIRSTLDRHTILKTTLVELGRTLALAECA	180
Sbjct	121	FLKTRAEELDKEMGLIRQEETGRHVRMLTHEIRSTLDRHTILKTTLVELGRTL L ECA	180
Query	181	LWMPTRTGLELQLSYTLRHQHPVEYTVPIQLPVINQVFGTSRAVKISPNSPVARLRPVSG	240
Sbjct	181	LWMP + GL LQLS+ L + P+ TVPI LP+IN++F + A++I +P+AR+R G	240
Query	241	KYMLGEVAVRVPLHLNSNFQINDWPELSTKRYALMVLMLPSDSARQWHVHELELVVVA	300
Sbjct	241	+Y+ EVVAVRVPLHLNSNF NDW ELST+ YA+MVL+LP + R+W HELELV+VVA	299
Query	301	DQVAVALSHAAILEESMRARDLLMEQNVALDLARREAETAIRARNDFLAVMNHMRTPMH	360
Sbjct	300	DQVAVALSHAAILE+SMRA D LMEQN+ALD+AR+EAE AIRARNDFLAVMNHMRTPMH	359
Query	361	AIIALSLLQETELTPEQRLMVETILKSSNLLATLMDVLDLSRLEDGSLQLELGTFFNLH	420
Sbjct	360	A+IAL SLL ET+LTPEQR+M+ETILKSSNLLATL+MDVLDLSRLEDG L+LE GTFFNLH	419
Query	421	TLFREVLNLIKPIAVVKKLPITLNLAPDLPEFVVGDEKRLMQIILNIVGMAVKFKSQGSI	480
Sbjct	420	+ RE +MLIKPIA +KKL ITL LA DLP VGD KRL+Q +LN+ GNAVKF+K+G I	479
Query	481	SVTALVTKS----DTRAADFFVVPTGSHFYLRVVKVDSGAGINPQDIPKIFTKFAQTQSL	536
Sbjct	480	S+ A V K D + F +P+ FYLRV+V+D+G GI+PQDIP +FTKFA+++	539
Query	537	ATRSSGGSGGLGLAISKRFDVNLMEGNIWIESDGLGKGTCTAIFDVKLGISERSMNSKQSGIP	596
Sbjct	540	+ RS+GG GLGLAI +RF+ LM+GNIWIES+G GKG T F VKLGI N +P	594
Query	597	KVPAIPR 603	
Sbjct	595	+P PR LLPMPPR 601	

Εικόνα 3.4.11: Ευθυγράμμιση των προβλεπομένων πρωτεϊνών ETR1 του φυτού *A. thaliana* και Never ripe της τομάτας με τη βοήθεια του προγράμματος BLAST (blastp) της ιστοσελίδας <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Οι 2 πρωτεΐνες έχουν ομολογία 69% και είναι όμοιες λειτουργικά κατά 81%.

Προηγούμενες εργασίες έδειξαν ότι τα μεταλλαγμένα *Nr* φυτά τομάτας (Lund et al., 1998; Ciardi et al., 2000; Balaji et al., 2008) και *etr1* φυτά *A. thaliana* (Veronese et al., 2003; Love et al., 2007) εκδήλωσαν μειωμένη ευπάθεια σε συγκεκριμένα παθογόνα (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* και *Verticillium dahliae*, *Cauliflower mosaic virus*, αντίστοιχα) υποδεικνύοντας το σημαντικό ρόλο του αιθυλενίου στο τελικό αποτέλεσμα της αντίδρασης των φυτών σε αυτά τα παθογόνα. Ο Lund και συνεργάτες (1998) πρότειναν ότι τα φυτά που δεν αντιλαμβάνονται το αιθυλένιο και που παρουσιάζουν

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΟΥ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟΥ ΣΤΗΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ ΚΑΤΑ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *V. DAHLIAE*

μειωμένα συμπτώματα είναι μάλλον ανεκτικά παρά ανθεκτικά στην ασθένεια. Τα ανθεκτικά φυτά προλαμβάνουν ή περιορίζουν την εξάπλωση των παθογόνων ενώ τα ανεκτικά φυτά δεν μειώνουν ή αποτρέπουν τη μόλυνση, αλλά παρουσιάζουν λιγότερα συμπτώματα (Clarke, 1986). Ωστόσο σε αυτό το κεφάλαιο η ποσοτικοποίηση που πραγματοποιήθηκε με αντιδράσεις Real-time PCR σε φυτά *Nr* και *WT* μετά από μόλυνση με το μύκητα *V. dahliae* έδειξε ότι το επίπεδο του DNA του μύκητα που ανιχνεύθηκε στα *Nr* μεταλλαγμένα φυτά ήταν σημαντικά μικρότερο σε σχέση με τα *WT* φυτά σε όλες τις μέρες όπου πραγματοποιήθηκε η ποσοτικοποίηση (Εικόνα 3.4.9 Α). Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η ποσότητα του παθογόνου που ανιχνεύθηκε στα αγγεία του ξύλου 5 ημέρες μετά την εφαρμογή του στα φυτά ήταν μεγαλύτερη από αυτήν που ανιχνεύθηκε στις 10 ημέρες, τόσο στα *Nr* όσο και στα *WT* φυτά. Από τις 10 ημέρες και μετά, η ποσότητα του μύκητα αυξήθηκε βαθμιαία με την πάροδο του χρόνου και έφτασε τη μέγιστη τιμή της στις 25 ημέρες μετά τη μόλυνση (Εικόνα 3.4.9 Α). Αυτή η αδυναμία της αύξησης του μύκητα από τις 5 στις 10 ημέρες πιθανώς να υποδεικνύει μειωμένη παραγωγή κονιδίων μέσα στους ιστούς του στελέχους των φυτών τομάτας η οποία συμπίπτει με τις κυκλικές περιόδους αυξομείωσης του μύκητα στους αγγειακούς ιστούς των φυτών που είναι χαρακτηριστικές για τον *V. dahliae* στην τομάτα, τη μελιτζάνα και την ελαιοκράμβη (Heinz et al., 1998; Chen et al., 2004; Eynck et al., 2007; Pantelides et al., 2009).

Η ιϊκά επαγόμενη γονιδιακή σίγηση (VIGS) είναι μια καλά χαρακτηρισμένη μέθοδος για την ανάλυση της λειτουργίας γονιδίων σε αλληλεπιδράσεις των φυτών με διάφορα παθογόνα. Ωστόσο, η τεχνολογία αυτή δεν έχει χρησιμοποιηθεί μέχρι πρόσφατα για τη μελέτη αλληλεπιδράσεων των φυτών με παθογόνα που προκαλούν αδρομυκώσεις. Μια πολύ πρόσφατη εργασία έδειξε ότι η τεχνολογία VIGS μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για τη διερεύνηση της λειτουργίας γονιδίων που εμπλέκονται στα μονοπάτια επαγωγής της άμυνας των φυτών εναντίον του μύκητα *Verticillium* spp. (Fradin et al., 2009)

Σε αυτό το κεφάλαιο για να διερευνηθεί περαιτέρω ο ρόλος της πρόσληψης του αιθυλενίου εφαρμόστηκε η τεχνική της ιϊκά επαγόμενης γονιδιακής σίγησης, με πλασμιδιακούς φορείς που είχαν ως βάση τον ιό *Tobacco Rattle Virus – TRV* (Liu et al., 2002a) για να πραγματοποιηθεί γονιδιακή σίγηση του γονιδίου *ETR4* (AY600438) της τομάτας. Το γονίδιο *ETR4* όπως και το *Nr* είναι μέλη μιας οικογένειας γονιδίων που κωδικοποιούν υποδοχείς αιθυλενίου στην τομάτα. Σε μια προηγούμενη εργασία ο Tieman και συνεργάτες (2000) έδειξαν ότι η απενεργοποίηση του υποδοχέα *ETR4* οδήγησε σε αυξημένη ευαισθησία αιθυλενίου ενώ τέτοιες επιδράσεις ανάπτυξης που

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΟΥ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟΥ ΣΤΗΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ ΚΑΤΑ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *V. DAHLIAE*

σχετίζονται με το αιθυλένιο, δεν ήταν ορατές σε μεταλλαγμένες σειρές τομάτας με μειωμένη έκφραση του Nr. Στην παρούσα εργασία, παρατηρήθηκε μείωση στη σοβαρότητα της ασθένειας που προκάλεσε ο *V. dahliae* μετά την εφαρμογή του σε φυτά τομάτας στα οποία είχε πραγματοποιηθεί γονιδιακή σίγηση του *ETR4*, σε σχέση με τα φυτά όπου είχε εφαρμοστεί ο άδειος φορέας της σίγησης (*TRV2-00*) (Εικόνες 3.4.7, 3.4.8). Ωστόσο, η ποσοτικοποίηση του παθογόνου που έγινε την τελευταία ημέρα των πειραμάτων, έδειξε ότι τα επίπεδα DNA του μύκητα ήταν παρόμοια και δεν διέφεραν στατιστικά στα φυτά που είχε πραγματοποιηθεί η σίγηση και στα φυτά μάρτυρες (*TRV2-00*) (Εικόνα 3.4.10 A). Το παθογόνο είχε εισβάλει επιτυχώς και αυξήθηκε στον ίδιο βαθμό μέσα στα αγγεία του ξύλου των φυτών, τουλάχιστον στο συγκεκριμένο χρονικό σημείο, αλλά δεν προκάλεσε το ίδιο επίπεδο συμπτωμάτων. Η έλλειψη πάντως συσχέτισης μεταξύ της ποσότητας του παθογόνου στους ιστούς των φυτών και της σοβαρότητας της ασθένειας, έχει διαπιστωθεί σε αρκετές αλληλεπιδράσεις τόσο του *V. dahliae* όσο και άλλων φυτοπαθογόνων μυκήτων με διάφορους ξενιστές (Schnathorst, 1981· Brandt et al., 1984· Corsini et al., 1988· Gold et al., 1996· Lynch et al., 1997· Heinz et al., 1998· Veronese et al., 2003), αλλά και σε αλληλεπιδράσεις διάφορων ξενιστών με βακτήρια (Bent et al., 1992· Lund et al., 1998· O'Donnell et al., 2001) και ιούς (Cecchini et al., 2002). Μια πιθανή εξήγηση αυτού του φαινομένου είναι ότι τα συμπτώματα μπορεί να προκαλούνται ως αποτέλεσμα γεγονότων μετάδοσης σημάτων που επάγονται από τα παθογόνα και που προκαλούν αλλαγές στη φυσιολογική ανάπτυξη των φυτών όπως η γρηγορότερη άνθηση, γήρανση και ο προγραμματισμένος θάνατος των κυττάρων (Dietrich et al., 1994· Lund et al., 1998· O'Donnell et al., 2001· Cecchini et al., 2002· Piloff et al., 2002). Δεν αποκλείεται πάντως λόγω του ότι η ποσοτικοποίηση του *V. dahliae* στην παρούσα εργασία έγινε σε μια μόνο χρονική στιγμή, την τελευταία ημέρα των πειραμάτων, να έχουν παραβλεφθεί σημαντικές πληροφορίες που αφορούν τη ποσότητα του μύκητα σε προγενέστερα στάδια κατά την εξέλιξη της προσβολής που θα μπορούσαν να διαφοροποιούν τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης. Επιπρόσθετα, το γεγονός ότι η ποσότητα του παθογόνου που υπολογίστηκε την 37^η ημέρα μετά την προσβολή από το μύκητα στα φυτά που είχε πραγματοποιηθεί η γονιδιακή σίγηση, ήταν κατά πολύ χαμηλότερη από την ποσότητα που υπολογίστηκε στις 25 στα WT και Nr φυτά, 21.4 και 15.2 φορές αντίστοιχα (Εικόνες 3.4.9 A και 3.4.10 A) υποδεικνύει ότι είναι πιθανόν στα φυτά αυτά να έχουν αναπτυχθεί διαφορετικοί μηχανισμοί άμυνας λόγω των πολλών και διαφορετικών αβιοτικών και βιοτικών καταπονήσεων που εφαρμόστηκαν κατά τη

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΟΥ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟΥ ΣΤΗΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ ΚΑΤΑ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *V. DAHLIAE*

διάρκεια των πειραμάτων. Τα φυτά αυτά εμβολιάστηκαν αρχικά υπό κενό με τα στελέχη του βακτηρίου *A. tumefaciens* που έφεραν το γονιδίωμα του ιού *TRV*. Ο ιός πολλαπλασιάστηκε στα φυτά και ενεργοποίησε το μηχανισμό της σίγησης και ακολούθως μολύνθηκαν με το μύκητα *V. dahliae*. Είναι προφανές λοιπόν ότι είναι πολύ δύσκολο να προβλέψει κανείς τον αντίκτυπο που θα είχαν όλες αυτές οι επεμβάσεις στους μηχανισμούς άμυνας των φυτών, κάτι που καθιστά αδύνατη τη σύγκριση των αποτελεσμάτων ποσοτικοποίησης του μύκητα στα πειράματα με τη μεταλλαγμένη σειρά *Nr* και αυτά όπου είχε πραγματοποιηθεί η γονιδιακή σίγηση του γονιδίου *ETR4*. Επομένως, η σύγκριση της επίδρασης των 2 γονιδίων όσον αφορά την ποσότητα του μύκητα δεν είναι δόκιμη. Επιπρόσθετα, η γονιδιακή σίγηση δεν παρέχει τη δυνατότητα της πλήρους απενεργοποίησης του γονιδίου στόχου όπως συμβαίνει στους μόνιμους μετασχηματισμούς γονιδίων, όπως για παράδειγμα στα μεταλλαγμένα ή γενετικώς τροποποιημένα φυτά, αφού το γονίδιο στόχος συνεχίζει να έχει ένα μικρό ποσοστό έκφρασης.

Παρόλο που η πρόσληψη αιθυλενίου είναι απαραίτητη για αρκετές αντιδράσεις άμυνας των φυτών κατά την επίθεση από παθογόνα, όπως για παράδειγμα η ενίσχυση των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών, η συσσώρευση φαινολικών ενώσεων (π.χ. φυτοαλεξίνες) και η παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών (π.χ. PR πρωτεΐνες) (ανασκόπηση από τους Broekaert et al., 2006), είναι πιθανόν η παρατηρηθείσα ανθεκτικότητα των *Nr* μεταλλαγμένων φυτών να βασίζεται στην ενεργοποίηση κάποιων μηχανισμών άμυνας. Ο Lund και συνεργάτες (1998) έδειξαν ότι η έκφραση της πρωτεΐνης PR-1B1 δεν περιορίστηκε στα *Nr* φυτά κατά την αντίδραση τους στη μόλυνση από το βακτήριο *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Σε μια πρώτη προσπάθεια να διαπιστωθεί εάν η μειωμένη ποσότητα του μύκητα στα *Nr* φυτά οφείλεται στην ενεργοποίηση και υπερέκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στην άμυνα των φυτών, πραγματοποιήθηκαν πειράματα έκφρασης όλων των γνωστών γονιδίων που κωδικοποιούν χιτινάσες στην τομάτα καθώς και 2 γλουκανασών και μιας PR-5 πρωτεΐνης, σε αγρίου τύπου και σε *Nr* φυτά. Από τα πειράματα αυτά δεν προέκυψε διαφοροποιημένη έκφραση σε κάποιο/α από τα γονίδια που δοκιμάστηκαν στα *Nr* φυτά. Για να εξακριβωθεί εάν και ποιοι αμυντικοί μηχανισμοί εμπλέκονται στα *Nr* φυτά πρέπει να εξεταστούν κι άλλα γονίδια δείκτες της επαγωγής της άμυνας των φυτών.

Η παρούσα εργασία έδειξε ότι η πρόσληψη του αιθυλενίου εμπλέκεται στην εκδήλωση των συμπτωμάτων του μύκητα *V. dahliae* σε φυτά τομάτας. Τα αποτελέσματα της έρευνας υποδεικνύουν ότι η μειωμένη πρόσληψη αιθυλενίου μέσω

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΟΥ ΑΙΘΥΛΕΝΙΟΥ ΣΤΗΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ ΚΑΤΑ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *V. DAHLIAE*

του υποδοχέα *Nr* οδηγεί σε μειωμένη ανάπτυξη του παθογόνου μύκητα στο αγγειακό σύστημα της τομάτας, φαινόμενο που δεν έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα στη βιβλιογραφία. Επίσης, η γονιδιακή σίγηση του γονιδίου *ETR4* που κωδικοποιεί υποδοχέα αιθυλενίου στη τομάτα, οδήγησε στην εκδήλωση μειωμένων συμπτωμάτων του *V. dahliae* στα φυτά, ενισχύοντας την υπόθεση ότι η μειωμένη πρόσληψη του αιθυλενίου έχει θετικό αντίκτυπο στο αποτέλεσμα της ασθένειας που προκαλεί ο μύκητας. Ωστόσο, τα αποτελέσματα της εργασίας δείχνουν ότι η αντίδραση των φυτών, ως προς την ενεργοποίηση μηχανισμών άμυνας και τον περιορισμό του παθογόνου στους ιστούς των φυτών τομάτας, εξαρτάται από τον υποδοχέα του αιθυλενίου που επηρεάζεται η λειτουργία του αφού τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αποίκηση του μύκητα περιορίζεται στα *Nr* σε σχέση με τα αγρίου τύπου φυτά ενώ στα φυτά όπου έγινε σίγηση του *ETR4* η ποσότητα του παθογόνου ήταν στα ίδια επίπεδα με τα φυτά του μάρτυρα. Τα πιο πάνω στοιχεία υποδεικνύουν ότι πιθανώς κάποιοι μηχανισμοί άμυνας ενεργοποιούνται στα *Nr* φυτά αλλά όχι στα φυτά με περιορισμένη πρόσληψη του αιθυλενίου μέσω του υποδοχέα *ETR4*. Η υπόθεση ότι η μειωμένη βιομάζα του παθογόνου στα *Nr* φυτά οφείλεται στην επαγωγή μηχανισμών άμυνας ή/και δομικών διαφορών μεταξύ των υποδοχέων *Nr* και *ETR4* χρειάζεται περισσότερη μελέτη. Η εμπλοκή πάντως του αιθυλενίου στην αλληλεπίδραση των φυτών τομάτας με το μύκητα *V. dahliae* αποτελεί ένα βήμα προς την κατανόηση της αλληλεπίδρασης αυτής.

ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η άμυνα των φυτών έχει αποτελέσει αντικείμενο πολυετούς έρευνας και υπάρχει μεγάλος όγκος πληροφοριών για τους διάφορους τύπους μηχανισμών που εμπλέκονται στις αντιδράσεις άμυνας των φυτών. Η αλληλούχιση και ανάλυση των γονιδιωμάτων φυτών όπως το μοντέλο *Arabidopsis thaliana* αλλά και καλλιεργούμενων φυτών όπως το ρύζι και το καλαμπόκι, οι τεχνολογίες απενεργοποίησης και σίγησης γονιδίων σε φυτά και παθογόνα και γενικά οι εξειδικευμένες και ευαίσθητες μοριακές τεχνικές που έχουν αναπτυχθεί, έχουν διευκολύνει την ταυτοποίηση γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών εναντίον των φυτοπαθογόνων οργανισμών. Ωστόσο, ενώ οι προηγμένες αυτές μοριακές τεχνικές έχουν εφαρμοστεί για τη διερεύνηση του ρόλου γονιδίων άμυνας των φυτών σε ένα μεγάλο αριθμό παθογόνων μυκήτων, δεν έχει δοθεί ιδιαίτερη βαρύτητα για τη διεκρίνιση της μοριακής βάσης της άμυνας των φυτών εναντίον των παθογόνων που προκαλούν αδρομυκώσεις.

Η πρωτοτυπία της παρούσας εργασίας έγκειται στη μελέτη των μηχανισμών άμυνας των φυτών που δεν έχουν μελετηθεί διεξοδικά στους μύκητες *Verticillium dahliae* και *Fusarium oxysporum* καθώς και στην εφαρμογή της τεχνολογίας της ιϊκά επαγόμενης γονιδιακής σίγησης για τη μελέτη του ρόλου γονιδίων άμυνας σε φυτά τομάτας που δεν έχει χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα στην αλληλεπίδραση τους με τον μύκητα *Verticillium dahliae*. Από τους μηχανισμούς άμυνας μελετήθηκαν συστατικά της πρόσληψης, αντίληψης και μεταγωγής των σημάτων του σαλικυλικού οξέος (SA), του ιασμονικού οξέος (JA) και του αιθυλενίου (ET) κατά τη μόλυνση φυτών *A. thaliana* με τα παθογόνα *V. dahliae* και *F. oxysporum* (1). Επίσης, διερευνήθηκε ο ρόλος της πρόσληψης του αιθυλενίου στην τομάτα μέσω του υποδοχέα *Never ripe* στην αλληλεπίδραση των φυτών με τον μύκητα *V. dahliae* (2). Τέλος, εφαρμόστηκε και πραγματοποιήθηκε με επιτυχία η τεχνολογία της ιϊκά επαγόμενης γονιδιακής σίγησης για τη μελέτη του ρόλου του γονιδίου *ETR4*, που κωδικοποιεί έναν άλλο υποδοχέα αιθυλενίου στην τομάτα, στην άμυνα των φυτών εναντίον του μύκητα *V. dahliae* (3).

Πιο αναλυτικά:

1. Από τα μονοπάτια μεταγωγής των SA, JA και ET που εμπλέκονται στην άμυνα των φυτών, μελετήθηκε ο ρόλος των γονιδίων *NahG*, *SID2*, *SID1/EDS5*, *ETR1*, *EIN2-1*, *EIN3-1*, *EIN4*, *EIN5-1*, *PAD3*, *PAD4* και *NPR1* με τη χρήση μεταλλαγμένων και γενετικώς τροποποιημένων φυτών *A. thaliana* στα γονίδια αυτά σε πειράματα παθογένειας με τους μύκητες *V. dahliae* και *F. oxysporum*.

Διαπιστώθηκε ότι τα *etr1-1* ήταν τα μόνα φυτά που είχαν μικρότερο ποσοστό ασθένειας από τα WT φυτά. Αυτή η παρατήρηση είναι σύμφωνη με τα αποτελέσματα προηγούμενων ερευνών που έδειξαν σε *in vitro* πειράματα ότι τα *etr1-1* φυτά ήταν πιο ανθεκτικά στην προσβολή από *Verticillium* spp. (Veronese et al., 2003; Johansson et al., 2006). Αντίθετα, οι Berrocal-Lobo και Molina (2004) έδειξαν ότι τα *ein2-5* φυτά ήταν πιο ευπαθή στους μύκητες *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* και *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* σε σχέση με τα αγρίου τύπου φυτά και οι Johansson και συνεργάτες (2006) έδειξαν ότι τα *ein2-1*, *ein4-1* και *ein6-1* φυτά έδειξαν αυξημένη ευπάθεια σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου, κάτι που δείχνει ότι ο ρόλος του αιθυλενίου είναι ιδιαίτερα σύνθετος στη άμυνα των φυτών. Η ποσοτικοποίηση των μυκήτων στα μεταλλαγμένα φυτά στο μονοπάτι του αιθυλενίου, έδειξε ότι τα επίπεδα των παθογόνων στους αγγειακούς ιστούς των *etr1-1* φυτών παρέμειναν σε σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων σε σχέση με τα υπόλοιπα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν. Αυτό το στοιχείο αποτελεί και ένα από τα πιο πρωτότυπα ευρήματα της παρούσας εργασίας αφού οι μέχρι σήμερα αναφορές δεν συσχετίζουν την ανάπτυξη της βιομάζας των παθογόνων με την ένταση των συμπτωμάτων (Schnathorst, 1981; Brandt et al., 1984; Corsini et al., 1988; Gold et al., 1996; Lynch et al., 1997; Heinz et al., 1998; Veronese et al., 2003). Αυτές οι παρατηρήσεις υπέδειξαν ότι ο ανθεκτικός φαινότυπος των *etr1-1* φυτών βασίζεται στην ενεργοποίηση μηχανισμών άμυνας. Αυτοί οι μηχανισμοί έχουν μερικώς μελετηθεί στην αλληλεπίδραση *V. dahliae* – *A. thaliana* αλλά ποτέ στα *etr1-1* φυτά. Η μελέτη των μεταγραφικών μεταβολών στα *etr1-1* φυτά μετά τη μόλυνση τους με τον μύκητα *V. dahliae* αποτελεί ακόμα μια πρωτοτυπία της παρούσας εργασίας. Η χρήση της τεχνολογίας των μικροσυστοιχιών έγινε για πρώτη φορά για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης των φυτών *etr1-1* με το μύκητα *V. dahliae* και υπέδειξε μια ομάδα γονιδίων άμυνας που ενεργοποιούνται στα φυτά αυτά σε αντίθεση με τα φυτά αγρίου τύπου. Η έκφραση των γονιδίων αυτών μελετήθηκε περαιτέρω και σε περισσότερα χρονικά σημεία μετά την εφαρμογή του μύκητα, με αντιδράσεις Real-time PCR. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων διαπιστώθηκε ότι τα γονίδια *GSTF12*, *GSTU16* (glutathione-S-transferases), *CHI-1*, *CHI-2* (chitinases), *PR-1*, *PR-2* (β -1,3 glucanase), *PR-5* (thaumatin-like) και *Myb75*) υπερεκφράστηκαν στα *etr1-1* σε σχέση με τα αγρίου τύπου και τα *ein4* φυτά υποδεικνύοντας το ρόλο τους στον ανθεκτικό φαινότυπο των *etr1-1* φυτών εναντίον του μύκητα. Σε μια πρόσφατη εργασία μικροσυστοιχιών όπου είχαν μελετηθεί τα μεταγραφικά προφίλ φυτών τομάτας μετά την εφαρμογή 2 διαφορετικών απομονώσεων *V. dahliae*, Vd1 και E6 που προκάλεσαν ευπαθές και ανεκτικό φαινότυπο αντίστοιχα, παρατηρήθηκε ότι τα

γονίδια που κωδικοποιούν μια ενδοχιτινάση (endochitinase) και μια S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (glutathione-S-transferase) είχαν υπερεκφραστεί στην ανθεκτική αλληλεπίδραση (Robb et al., 2007). Σε μια πιο πρόσφατη εργασία, στην οποία μελετήθηκαν οι μεταγραφικές αλλαγές σε φυτά τομάτας, μετά την εφαρμογή του *V. dahliae* (φυλή 1), στις ποικιλίες MoneyMaker (ευπαθής γονότυπος) και Motelle (ανθεκτικός γονότυπος εναντίον της φυλής 1 του *Verticillium*) με τη χρήση μικροσυστοιχιών, παρατηρήθηκε η επαγωγή των γονιδίων *PR5* και χιτινάση τόσο στις ρίζες όσο και στο υπέργειο μέρος της ασύμβατης αλληλεπίδρασης (ανθεκτικός φαινότυπος) (van Esse et al., 2009). Τα αποτελέσματα αυτών των εργασιών είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, γεγονός που υποδεικνύει ότι στις ανθεκτικές αλληλεπιδράσεις των φυτών με τον *V. dahliae* ενεργοποιούνται ομόλογα γονίδια άμυνας. Επιπρόσθετα, προηγούμενες εργασίες έδειξαν ότι οι PR πρωτεΐνες PR-1, PR-2 και PR-5 παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανθεκτικότητα των φυτών κατά της μόλυνσης με μύκητες (Wessels et al., 1981· Alexander et al., 1993· Niderman et al., 1995· Abad et al., 1996· Pressey, 1997· Li et al., 2003· Menu-Bouaouiche et al., 2003). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η οικογένεια των PR-5 πρωτεϊνών που παρουσίασαν *in vitro* αντιμυκητιακή δράση εναντίον του *V. dahliae* (Abad et al., 1996· Pressey 1997). Οι χιτινάσες από όλες τις οικογένειες έχουν *in vitro* αντιμυκητιακές ιδιότητες (Melchers et al., 1994· Ponstein et al., 1994) εναντίον μυκήτων που έχουν χιτίνη στα κυτταρικά τους τοιχώματα. Ωστόσο, μόνο ένας μικρός αριθμός μυκήτων είναι ευπαθείς στις χιτινάσες. Οι περισσότεροι μύκητες είναι ευπαθείς στη συνεργιστική δράση των χιτινασών και των γλουκανασών (β -1,3-glucanases) (Mauch et al., 1988· Sela-Buurlage et al., 1993). Στην παρούσα εργασία πάντως τα επίπεδα 2 χιτινασών και μιας β -1,3 γλουκανάσης ήταν αυξημένα στα *etr1-1* φυτά. Πέρα από τις προαναφερθείσες PR πρωτεΐνες, αρκετές έρευνες έχουν δείξει ότι τα φυτά ανταποκρίνονται στη μόλυνση από παθογόνα με την αυξημένη έκφραση μεταγραφικών παραγόντων όπως οι glutathione S-transferases (GST) και οι Myb (Mauch και Dudler, 1993· Hahn και Strittmatter, 1994· Wagner et al., 2002). Η έκφραση ενός γονιδίου *GST* είχε υπερεκφραστεί πιο γρήγορα και πιο ισχυρά σε μια ανθεκτική ποικιλία βαμβακιού στον *V. dahliae* σε σχέση με μια ευπαθή ποικιλία (Jia et al., 2007). Πρόσφατες γενετικές αναλύσεις έδειξαν ότι αρκετά γονίδια που κωδικοποιούν Myb μεταγραφικούς παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στις αντιδράσεις ανοσοποίησης των φυτών, με μερικούς παράγοντες να προσδένονται σε υποκινητές (promoters) γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών (Rushton και Somssich, 1998). Μετασηματισμός φυτών με γονίδιο που κωδικοποιεί ένα Myb παράγοντα είχε σαν αποτέλεσμα τα φυτά να παρουσιάσουν αυξημένη ανθεκτικότητα

στη μόλυνση από αρκετά βιοτροφικά και νεκροτροφικά παθογόνα (Mengiste et al., 2003). Συμπερασματικά, η παρούσα εργασία έδειξε για πρώτη φορά ότι η μειωμένη πρόσληψη αιθυλενίου μέσω του υποδοχέα ETR1 επάγει την έκφραση μιας ομάδας γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών *A. thaliana*, υποδεικνύοντας τη μοριακή βάση που ελέγχει την ανθεκτικότητα στους μύκητες *V. dahliae* και *F. oxysporum*. Τα αποτελέσματα αυτού του κεφαλαίου που αφορούν το μύκητα *V. dahliae* υποβλήθηκαν, έγιναν αποδεκτά και είναι υπό δημοσίευση στο διεθνές επιστημονικό περιοδικό Molecular Plant Pathology.

2. Ο 2^{ος} στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να διευκρινιστεί εάν η πρόσληψη του ενδογενούς αιθυλενίου εμπλέκεται στην ανθεκτικότητα φυτών τομάτας εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *V. dahliae*. Η σύγκριση των συμπτωμάτων της ασθένειας που προκάλεσε ο μύκητας σε φυτά αγρίου τύπου (WT) και σε μεταλλαγμένα φυτά *Never ripe* (*Nr*) με μειωμένη πρόσληψη αιθυλενίου, έδειξε ότι στα *Nr* φυτά η σοβαρότητα της ασθένειας και τα συμπτώματα που προκάλεσε σε αυτά τα φυτά ήταν σημαντικά λιγότερα σε σχέση με τα WT φυτά. Τα αποτελέσματα αυτά είναι αντίστοιχα με την εικόνα που παρουσίασαν τα *etr1-1* μεταλλαγμένα φυτά *A. thaliana* μετά τη μόλυνση από το μύκητα *V. dahliae*, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι δύο αυτοί υποδοχείς αιθυλενίου επηρεάζουν με αντίστοιχο τρόπο τις αντιδράσεις των φυτών στην προσβολή από το μύκητα. Είναι ενδιαφέρον πάντως ότι η μετάλλαξη *Never ripe* απενεργοποιεί στην τομάτα ένα γονίδιο που κωδικοποιεί υποδοχέα αιθυλενίου, που είναι ομόλογο του *ETR1* του φυτού *Arabidopsis thaliana* (Wilkinson et al., 1995). Προηγούμενες εργασίες έδειξαν ότι τα μεταλλαγμένα *Nr* φυτά τομάτας (Lund et al., 1998· Ciardi et al., 2000· Balaji et al., 2008) παρουσίασαν λιγότερα συμπτώματα μετά τη μόλυνσή τους από διάφορα παθογόνα (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) υποδεικνύοντας το σημαντικό ρόλο του αιθυλενίου στην αντίδραση των φυτών στα παθογόνα. Ωστόσο, ο Lund και συνεργάτες (1998) πρότειναν ότι τα φυτά που δεν αντιλαμβάνονται το αιθυλένιο και που παρουσιάζουν μειωμένα συμπτώματα είναι μάλλον ανεκτικά παρά ανθεκτικά στην ασθένεια και ότι τα επίπεδα των παθογόνων δεν διαφέρουν μεταξύ των ανεκτικών και ευαίσθητων φυτών. Τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας όμως έδειξαν ότι η ποσότητα του μύκητα που ανιχνεύθηκε στα *Nr* μεταλλαγμένα φυτά ήταν σημαντικά μικρότερη σε σχέση με τα WT φυτά σε όλες τις χρονολογικές στιγμές όπου πραγματοποιήθηκε η ποσοτικοποίηση, υποδεικνύοντας ότι κάποιοι μηχανισμοί άμυνας αναπτύσσονται στα φυτά αυτά που περιορίζουν την ανάπτυξη του μύκητα στους αγγειακούς τους ιστούς. Σε μια πρώτη προσπάθεια να διευκρινιστούν αυτοί οι

μηχανισμοί, πραγματοποιήθηκαν πειράματα έκφρασης όλων των γνωστών γονιδίων που κωδικοποιούν χιτινάσες στην τομάτα καθώς και 2 γλουκανασών και μιας PR-5 PR πρωτεΐνης (γονίδια που από προηγούμενες εργασίες έχουν εμπλακεί στην άμυνα των φυτών τομάτας), σε αγρίου τύπου και σε *Nr* φυτά. Από τα πειράματα αυτά δεν προέκυψε διαφοροποιημένη έκφραση σε κάποιο/α από τα γονίδια που δοκιμάστηκαν στα *Nr* φυτά. Για να εξακριβωθεί εάν και ποιοι αμυντικοί μηχανισμοί εμπλέκονται στα *Nr* φυτά πρέπει να εξεταστούν κι άλλα γονίδια δείκτες της επαγωγής της άμυνας των φυτών. Τα αποτελέσματα αυτά υποβλήθηκαν, έγιναν αποδεκτά και είναι υπό δημοσίευση στο διεθνές επιστημονικό περιοδικό *Plant Pathology*.

3. Ως 3^{ος} στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνηθεί περαιτέρω ο ρόλος της πρόσληψης του αιθυλενίου χρησιμοποιώντας την τεχνολογία της ιϊκά επαγόμενης γονιδιακής σίγησης, με πλασμιδιακούς φορείς που είχαν ως βάση τον ιό *Tobacco Rattle Virus – TRV* (Liu et al., 2002a) για να πραγματοποιηθεί γονιδιακή σίγηση του γονιδίου *ETR4* της τομάτας. Άλλη μια πρωτοτυπία της εργασίας ήταν ότι η τεχνολογία αυτή δεν έχει χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα για τη μελέτη αλληλεπιδράσεων των φυτών με παθογόνα που προκαλούν αδρομυκώσεις. Το γονίδιο *ETR4* όπως και το *Nr* κωδικοποιεί υποδοχέα αιθυλενίου στην τομάτα. Μετά την επιτυχή γονιδιακή σίγηση του *ETR4*, πραγματοποιήθηκαν πειράματα παθογένειας με το μύκητα *V. dahliae* στα οποία παρατηρήθηκε μείωση στη σοβαρότητα της ασθένειας που προκάλεσε ο μύκητας στα φυτά που είχε πραγματοποιηθεί η γονιδιακή σίγηση, σε σχέση με τα φυτά όπου είχε εφαρμοστεί ο κενός φορέας της σίγησης. Ωστόσο, η ποσοτικοποίηση του παθογόνου που έγινε την τελευταία ημέρα των πειραμάτων, 37 ημέρες μετά την μόλυνση με τον *V. dahliae*, έδειξε ότι τα επίπεδα DNA του μύκητα ήταν παρόμοια και δεν διέφεραν στατιστικά στα φυτά που είχε πραγματοποιηθεί η σίγηση και στα φυτά μάρτυρες (*TRV2-00*). Η έλλειψη συσχέτισης μεταξύ της ποσότητας του παθογόνου στους ιστούς των φυτών και της σοβαρότητας της ασθένειας, έχει διαπιστωθεί σε αρκετές αλληλεπιδράσεις τόσο του *V. dahliae* όσο και άλλων φυτοπαθογόνων μυκήτων με διάφορους ξενιστές (Schnathorst, 1981· Brandt et al., 1984· Corsini et al., 1988· Gold et al., 1996· Lynch et al., 1997· Heinz et al., 1998· Veronese et al., 2003) που έχουν αποδοθεί σε διάφορους παράγοντες που έχουν να κάνουν κυρίως με τη φυσιολογική ανάπτυξη των φυτών (Dietrich et al., 1994· Lund et al., 1998· O'Donnell et al., 2001· Cecchini et al., 2002· Piloff et al., 2002). Ωστόσο υπάρχουν ορισμένα σημεία που χρειάζονται περισσότερη μελέτη έτσι ώστε να εξαχθούν πιο ασφαλή συμπεράσματα. Για παράδειγμα, η ποσοτικοποίηση του *V. dahliae* πρέπει να πραγματοποιηθεί σε διάφορα χρονικά διαστήματα εξέλιξης της ασθένειας αφού στην παρούσα εργασία

έγινε μόνο την τελευταία ημέρα των πειραμάτων, και πιθανώς να έχουν παραβλεφθεί σημαντικές πληροφορίες που αφορούν στην ποσότητα του μύκητα σε προγενέστερα στάδια κατά την εξέλιξη της προσβολής. Επίσης, τα φυτά που συμμετείχαν στα πειράματα της γονιδιακής σίγησης είχαν υποστεί μια σειρά αβιοτικών και βιοτικών καταπονήσεων που πιθανώς να οδήγησαν και στην επαγωγή διαφορετικών μηχανισμών άμυνας αφού εμβολιάστηκαν αρχικά υπό κενό με τα στελέχη του βακτηρίου *A. tumefaciens* που έφεραν το γονιδίωμα του ιού *TRV*, ακολούθως ο ιός πολλαπλασιάστηκε και ενεργοποίησε το μηχανισμό της σίγησης στα φυτά που τελικά μολύνθηκαν με το μύκητα *V. dahliae*. Αυτό ίσως να εξηγεί γιατί η ποσότητα του παθογόνου που υπολογίστηκε την 37^η ημέρα μετά την προσβολή από το μύκητα στα φυτά που είχε πραγματοποιηθεί η γονιδιακή σίγηση, ήταν κατά πολύ χαμηλότερη από την ποσότητα που υπολογίστηκε στις 25 ημέρες στα WT και Nr φυτά. Ακόμα ένα σημείο που πρέπει να ληφθεί υπόψη είναι ότι η γονιδιακή σίγηση δεν απενεργοποιεί πλήρως το γονίδιο-στόχο όπως συμβαίνει στους μόνιμους μετασχηματισμούς γονιδίων, όπως για παράδειγμα στα μεταλλαγμένα ή γενετικώς τροποποιημένα φυτά, αφού το γονίδιο-στόχος συνεχίζει να έχει ένα μικρό ποσοστό έκφρασης. Τα αποτελέσματα αυτά υποβλήθηκαν, έγιναν αποδεκτά και είναι υπό δημοσίευση στο διεθνές επιστημονικό περιοδικό *Plant Pathology*.

Συνοψίζοντας, στα πλαίσια της παρούσας εργασίας διερευνήθηκαν οι μηχανισμοί άμυνας που εμπλέκονται στα φυτά κατά την αλληλεπίδραση τους με τους μύκητες που προκαλούν αδρομυκώσεις, όπου διαπιστώθηκε ο σημαντικός ρόλος του αιθυλενίου μέσω της πρόσληψης του από τους υποδοχείς του στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η προσέγγιση που ακολουθήθηκε στην εργασία έδωσε μια ολοκληρωμένη εικόνα για τη μοριακή βάση της άμυνας των φυτών εναντίον των μυκήτων *F. oxysporum* και *V. dahliae*. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της εργασίας συμβάλλουν στη γνώση για τη λειτουργία των μηχανισμών στα φυτά που καθορίζουν την άμυνα τους εναντίον των παθογόνων των αδρομυκώσεων που αποτελούν σημαντικά προβλήματα της ελληνικής και της παγκόσμιας γεωργίας αφού η καταπολέμησή τους είναι ιδιαίτερα δύσκολη.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abad LR, D'Urzo MP, Liu D, Narasimhan ML, Reuveni M, Zhu JK, Niu X, Singh NK, Hasegawa PM, Bressan R**, 1996. Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. *Plant Sci.* **118**, 11-23.
- Abeles FB, Morgan PW, Saltveit ME Jr**, 1992. Ethylene in Plant Biology. San Diego, Academic. 2nd edition.
- Abramovitch RB, Anderson JC, Martin GB**, 2006. Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 601–611.
- Agrios GN**, 2005. Plant Pathology. Elsevier, CA, Academic Press.
- Alexander D, Goodman R M, Gut-Rella M, Glascock C, Weymann K, Friedrich L, Maddox D, Ahl-Goy P, Luntz T, Ward E, Ryals J**, 1993. Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 7327-7331.
- Aloni R, Wolf A, Feigenbaum P, Avni A, Klee HJ**, 1998. The Never ripe mutant provides evidence that tumor-induced ethylene controls the morphogenesis of *Agrobacterium tumefaciens* induced crown galls on tomato stems. *Plant Physiol.* **117**, 841-849.
- Alonso JM, Hirayama T, Roman G, Nourizadeh S, Ecker JR**, 1999. EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis. *Science* **284**, 2148– 52.
- Alonso JM, Stepanova AN, Solano R, Wisman E, Ferrari S, Ausubel FM, Ecker JR**, 2003. Five components of the ethylene-response pathway identified in a screen for weak ethyleneinsensitive mutants in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 2992–97.
- Alonso JM, Stepanova AN**. 2004. The ethylene signaling pathway. *Science* **306**, 1513–15
- Anderson JP, Badruzaufari E, Schenk PM, Manners JM, Desmond OJ, Ehler C, Maclean DJ, Ebert PR, Kazan K**, 2004. Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**, 3460–79.
- Arakawa Y, Masaoka Y, Sakai J, Higo H, Higo K**, 2002. An alfalfa gene similar to glutathione S-transferase is induced in root by iron deficiency. *Soil. Sci. Plant Nutr.* **48**, 111-116.
- Armstrong GM, Armstrong JK**, 1981. Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt disease. Pages 391-399 in, *Fusarium, Diseases, Biology, and Taxonomy*. **PE Nelson, TA Toussoun and RJ Cook, eds.** Pennsylvania State University Press, University Park, U.S.A.
- Arshad M, Frankenberger WT**, 1992. Ethylene, Agricultural Sources and Applications, Kluwer/Plenum
- Balaji V, Mayrose M, Sherf O, Jacob-Hirsch J, Eichenlaub R, Iraki N, Manulis-Sasson S, Rechavi G, Barash I, Sessa G**, 2008. Tomato transcriptional changes in response to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* reveal a role for ethylene in disease development. *Plant Physiol.* **146**, 1797-1809.
- Barry CS, Llop-Tous MI, Grierson D**, 2000. The regulation of 1-aminocyclopropane-1- carboxylic acid synthase gene expression during the transition from system-1 to system-2 ethylene synthesis in tomato. *Plant Physiol.* **123**, 979-86.
- Bashan Y**, 1994. Symptom expression and ethylene production in leaf blight of cotton caused by *Alternaria macrospora* and *Alternaria alternata* alone and combined. *Canadian Journal of Botany* **72**, 1574-1579.
- Baulcombe DC**, 1996. Mechanism of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *Plant Cell* **8**, 1833–1844.
- Baulcombe D**, 2004. RNA silencing in plants. *Nature* **431**, 356-363.
- Beckman CH**, 1987. The Nature of Wilt Diseases of Plants. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, U.S.A.
- Beckman CH, Talboys PW**, 1981. Anatomy of resistance. In, Fungal wilt disease of plants **Mace ME, Bell AA, Beckman CH, eds.** New York, Academic Press, pp. 431-486.
- Bendahmane A, Kanyuka K, Baulcombe DC**, 1999. The Rx gene from potato controls separate virus resistance and death responses. *Plant Cell* **11**, 781–791.
- Ben-David A, Bashan Y, Okon Y**, 1986. Ethylene production in pepper *Capsicum annum*. leaves infected with *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Physiol. Mol. Plant Pathology* **29**, 305-316.

- Bent AF, Innes RW, Ecker JR, Staskawicz BJ**, 1992. Disease development in ethylene-insensitive *Arabidopsis thaliana* infected with virulent and avirulent *Pseudomonas* and *Xanthomonas* pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **5**, 372-378.
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ**, 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363–366.
- Berrocal-Lobo M, Molina A**, 2004. Ethylene Response Factor 1 Mediates *Arabidopsis* Resistance to the Soilborne Fungus *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **17**, 763–770.
- Berrocal-Lobo M, Molina A**, 2007. *Arabidopsis* defense response against *Fusarium oxysporum*. *Trends Plant Sci.* **13**, 145-150.
- Berrocal-Lobo M, Molina A, Solano R**, 2002. Constitutive expression of ETHYLENERESPONSE-FACTOR1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant J.* **29**, 23–32.
- Bhat RG, Subbarao KV**, 1999. Host range specificity in *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* **89**, 1218–1225.
- Biles CL, Abeles FB, Wilson CL**, 1990. The role of ethylene in anthracnose of cucumber, *Cucumis sativus*, caused by *Colletotrichum lagenarium*. *Phytopathology* **80**, 732-736.
- Bishop CD, Cooper RM**, 1983α. An ultrastructural study of vascular colonization in three vascular wilt diseases I. Colonization of susceptible cultivars. *Physiol. Plant Pathol.* **23**, 323–343.
- Bishop CD, Cooper RM**, 1983β. An ultrastructural study of root invasion in three vascular wilt diseases. *Physiol. Mol. Plant Path.* **22**, 15–27.
- Bleecker AB, Estelle MA, Somerville C, Kende H**, 1988. Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana*. *Science* **241**, 1086-1089.
- Bleecker AB, Estelle MA, Somerville C, Kende H**, 1988. Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana*. *Science* **241**, 1086–89.
- Bleecker AB, Kende H**, 2000. Ethylene, a gaseous signal molecule in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **16**, 1-18.
- Bol JF, Buchel AS, Knoester M, Baladin T, Loon LC, Linthorst HJM**, 1996. Regulation of the expression of plant defense genes *Plant Growth Regul.* **18**, 87–91
- Boller T**, 1991. Ethylene in pathogenesis and disease resistance. In: Matoo AK, Suttle JC, eds. *The Plant Hormone Ethylene*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 293-314.
- Boller T**, 1995. Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol.* **46**, 189-214.
- Bonas U, Lahaye T**, 2002. Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**, 44–50.
- Bonnes MS, Bonness MS, Ready MP, Irvin JD, Mabry TJ**, 1994. Pokeweed antiviral protein inactivates pokeweed ribosomes; implications for the antiviral mechanism, *Plant J.* **5**, 173–183.
- Bowling SA, Clarke JD, Liu Y, Klessig DF, Dong X**, 1997. The *cpr5* mutant of *Arabidopsis* expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance, *Plant Cell* **9**, 1573–1584.
- Brandt WH, Lacy ML, Horner CE**, 1984. Distribution of *Verticillium* in stems of resistant and susceptible species of mint. *Phytopathology* **74**, 587-591.
- Brederode FT, Linthorst HJM, Bol JF**, 1991. Differential induction of acquired resistance and PR gene expression in tobacco by virus infection, ethephon treatment, UV light and wounding, *Plant Mol. Biol.* **17**, 1117–1125.
- Brisson LF, Tenhaken R, Lamb C**, 1994. Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell* **6**, 1703–712.
- 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.
- Broekaert WF, Terras FRG, Cammue BPA**, 2000. Induced and preformed antimicrobial proteins. In *Mechanisms of Resistance to Plant Disease*, ed. AJ Slusarenko, RSS Fraser, LC van Loon, pp. 371–478. Berlin/Heidelberg/New York, Springer.
- Brogliè KE, Biddle P, Cressman R, Brogliè R**, 1989. Functional analysis of DNA sequences responsible for ethylene regulation of a bean chitinase gene in transgenic tobacco. *Plant Cell* **1**, 599–607.

- Brouwer M, Lievens B, Van Hemelrijck W, Van den Ackerveken G, Cammue BP, Thomma BPHJ**, 2003. Quantification of disease progression of several microbial pathogens on *Arabidopsis thaliana* using real-time fluorescence PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* **228**, 241–48.
- Brown GE, Burns JK**, 1998. Enhanced activity of abscission enzymes predisposes oranges to invasion by *Diplodia natalensis* during ethylene degreening. *Postharvest Biology and Technology* **14**, 217–227.
- Brown GE, Lee HS**, 1993. Interaction of ethylene with citrus stem-end rot caused by *Diplodia natalensis*. *Phytopathology*. **83**, 1204–8.
- Brown RL, Kazan K, McGrath KC, Maclean DJ, Manners JM**, 2003. A role for the GCC-box in jasmonate-mediated activation of the PDF1.2 gene of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **132**, 1020–32.
- Brummell DA, Balint-Kurti PJ, Harpster MH, Palys JM, Oeller PW, Gutterson N**, 2003. Inverted repeat of a heterologous 30- untranslated region for high-efficiency, high-throughput gene silencing. *Plant J.* **33**, 793–800.
- Brunt AA, Crabtree K, Dallwitz MJ, Gibbs AJ, Watson L, Zurcher EJE**, 1996. Plant viruses online, descriptions and lists from the VIDE data base. Version, 20th August 1996.
- Burton RA, Gibeaut DM, Bacic A, Findlay K, Roberts K, Hamilton A, Baulcombe DC, Fincher GB**, 2000. Virus-induced silencing of a plant cellulose synthase gene. *Plant Cell* **12**, 691–705.
- Buschges R, Hollricher K, Panstruga R, Simons G, Wolter M, Frijters A, van Daelen R, van der Lee T, Diergaarde P, Groenendijk J, Töpsch S, Vos P, Salamini F, Schulze-Lefert, P.**, 1997. The barley Mlo gene, a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell* **88**, 695–705.
- Campbell CL, Madden LV**, 1990. Introduction to Plant Disease Epidemiology. *John Wiley & Sons Inc., New York*.
- Cancel JD, Larsen PB**, 2002. Loss-of-function mutations in the ethylene receptor ETR1 cause enhanced sensitivity and exaggerated response to ethylene in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **129**, 1557–67.
- Cao H, Glazebrook J, Clarke JD, Volko S, Dong XN**, 1997. The *Arabidopsis NPR-1* gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* **88**, 57–63.
- Cecchini E, Geri C, Love AJ, Coupland G, Covey SN, Milner JJ**, 2002. Mutations that delay flowering in *Arabidopsis* de-couple symptom response from cauliflower mosaic virus accumulation during infection. *Mol. Plant Pathol.* **3**, 81–90.
- Cerutti H**, 2003. RNA interference, traveling in the cell and gaining functions? *Trends Genet* **19**, 39–46
- Cerutti L, Mian N, Bateman A**, 2000. Domains in gene silencing and cell differentiation proteins, the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends Biochem Sci* **25**, 481–482.
- Chae HS, Kieber JJ**, 2005. Eto Brute? Role of ACS turnover in regulation ethylene biosynthesis. *Trends Plant Sci.* **10**, 291–96.
- Chakravarthy S, Tuori RP, D'Ascenzo MD, Fobert PR, Despres C, Martin GB**, 2003. The tomato transcription factor Pti4 regulates defense related gene expression via GCC-box and non-GCC box cis elements. *Plant Cell* **15**, 3033–50.
- Chang C, Kwok SF, Bleecker AB, Meyerowitz EM**, 1993. *Arabidopsis* response gene ETR1, similarity of product to two-component regulators. *Science* **262**, 39–45.
- Chang C, Shockey JA**, 1999. The ethylene-response pathway, signal perception to gene regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 352–58.
- Chao Q, Rothenberg M, Solano R, Roman G, Terzaghi W, Ecker JR**, 1997. Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ETHYLENE INSENSITIVE 3 and related proteins. *Cell* **89**, 1133–44.
- Chapman SN, Kavanagh TA, Baulcombe DC**, 1992. Potato virus X as a vector for gene expression in plants. *Plant J.* **2**, 549–557.
- Chen G, Alexander L, Grierson D**, 2004. Constitutive expression of EIL-like transcription factor partially restores ripening in the ethylene-insensitive Nr tomato mutant. *J. Exp. Bot.* **55**, 1491–97.
- Chen P, Lee B, Robb J**, 2004. Tolerance to a non-host isolate of *Verticillium dahliae* in tomato. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **64**, 283–291.
- Chen P, Lee B, Robb J**, 2004. Tolerance to a non-host isolate of *Verticillium dahliae* in tomato. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **64**, 283–291.

- Chen WQ, Provart NJ, Glazebrook J, Katagiri F, Chang HS, Eulgem T, Mauch F**, 2002. Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell* **14**, 559–74.
- Chen YF, Etheridge N, Schaller GE**, 2005. Ethylene signal transduction. *Ann. Bot.* **95**, 901–15.
- Chen YF, Randlett MD, Findell JL, Schaller GE**, 2002. Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **277**, 19861–66.
- Chinchilla D, Bauer Z, Regenass M, Boller T, Felix G**, 2006. The *Arabidopsis* receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell* **18**, 465–476.
- Chuang CF, Meyerowitz** 2000. Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 4985–4990.
- Ciardi JA, Tieman DM, Jones JB, Klee HJ**, 2001. Reduced expression of the tomato ethylene receptor gene *LeEtr4* enhances the hypersensitive response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**, 487–495.
- Ciardi JA, Tieman DM, Lund ST, Jones JB, Stall RE, Klee HJ**, 2000. Response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato involves regulation of ethylene receptor gene expression. *Plant Physiology* **123**, 81–92.
- Clark DG, Gubrium EK, Barrett JE, Nell TA, Klee HJ**, 1999. Root formation in ethylene-insensitive plants. *Plant Physiology* **121**, 53–59.
- Clark KL, Larsen PB, Wang X, Chang C**, 1998. Association of the Arabidopsis CTR1/Raf-like kinase with the ETR1 and ERS1 ethylene receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 5401–6.
- Clarke DD**, 1986. Tolerance of parasites and disease in plants and its significance in host-parasite interactions. *Advances in Plant Pathology* **5**, 161–197.
- Clarke JD, Liu Y, Klessig DF, Dong X**, 1998. Uncoupling PR gene expression from NPR1 and bacterial resistance, characterization of the dominant *Arabidopsis cpr6-1* mutant, *Plant Cell* **10**, 557–569.
- Cohn JR, Martin GB**, 2005. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* type III effectors AvrPto and AvrPtoB promote ethylene-dependent cell death in tomato. *Plant Journal* **44**, 139–154.
- Cole AB, Kiraly L, Ross K, Schoelz JE**, 2001. Uncoupling resistance from cell death in the hypersensitive response of *Nicotiana* species to cauliflower mosaic virus infection. *Mol Plant Microbe Interact* **14**, 31–41.
- Consonni C, Humphry ME, Hartmann HA, Livaja M, Durner J, Westphal L, Vogel J, Lipka V, Kemmerling B, Schulze-Lefert P, Somerville SC, Panstruga R**, 2006. Conserved requirement for a plant host cell protein in powdery mildew pathogenesis. *Nat Genet* **38**, 716–720.
- Cooper W, Bouzayen M, Hamilton A, Barry C, Rossall S, Grierson D**, 1998. Use of transgenic plants to study the role of ethylene and polygalacturonase during infection of tomato fruit by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Pathology* **47**, 308–316.
- Corsini DL, Pavek JJ, Davis JR**, 1988. *Verticillium* wilt resistance in non-cultivated tuber-bearing *Solanum* species. *Plant Disease* **72**, 148–151.
- Covey SN, Al-Kaff NS, Langare A, Turner DS**, 1997. Plants combat infection by gene silencing. *Nature* **85**, 780–781.
- Cristescu SM, De Martinis D, te Lintel Hekkert S, Parker DH, Harren FJM**, 2002. Ethylene production by *Botrytis cinerea* in vitro and in tomatoes. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 5342–50.
- Cronshaw DK, Pegg GF**, 1976. Ethylene as a Toxin Synergist in *Verticillium* Wilt of Tomato. *Physiological Plant Pathology*, **9**, 33–44.
- Dangl JL, Jones JDG**, 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**, 826–833.
- Dalmay T, Hamilton AJ, Rudd S, Angell S, Baulcombe DC**, 2000. An RNA-dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* **101**, 543–553.
- De Vos M, Van Oosten VR, Van Poecke RMP, Van Pelt JA, Pozo MJ, Mueller MJ, Buchala AJ, Métraux JP, Van Loon LC, Dicke M, Pieterse CMJ**, 2005. Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **18**, 923–937.
- De Wit PJGM**, 1997. Pathogen avirulence and plant resistance, a key role for recognition, *Trends Plant Sci.* **2**, 452–458.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Deikman J**, 1997. Molecular mechanisms of ethylene regulation of gene transcription. *Physiologia Plantarum* **100**, 561-566.
- Delaney T, Uknes S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K, Negrotto D, Gaffney T, Gut-Rella M, Kessmann H, Ward E, Ryals J**, 1994. A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* **266**, 1247-1250.
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB**, 1983. A plant DNA miniprep, version 2. *Plant Molecular Biology Reporter* **1**, 19-21.
- DeVay JE**, 1989 Selection, characterization, pathogenicity and virulence of pectinase –deficient mutants of *Verticillium albo-atrum* In, *Tjamos E.C., and Beckman C.H. Eds., Vascular wilt diseases of plants. Springer-Verlag, Berlin, p197 – 217.*
- Di Pietro A, Garcia-Maceira FI, Meglecic E, Roncero MIG**, 2001. A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Mol. Microbiol.* **39**, 1140–1152.
- Di Pietro A, Madrid MP, Caracuel Z, Delgado-Jarana J, Roncero MIG**, 2003. *Fusarium oxysporum*, exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Mol. Plant Pathol.* **4**, 315–325
- Diaz J, ten Have A, van Kan JA**, 2002. The role of ethylene and wound signaling in resistance of tomato to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* **129**, 1341–51.
- Dicke M, Hilker M**, 2003. Induced plant defences, From molecular biology to evolutionary ecology. *Basic Appl. Ecol.* **4**, 3-14.
- Dietrich RA, Delaney TP, Uknes SJ, Ward ER, Ryals JA, Dangi JL** 1994. *Arabidopsis* mutants simulating disease resistance response. *Cell* **77**, 565-577.
- Dixon DP, Laphorn A, Edwards R**, 2002. Plant glutathione transferases. *Genome Biol.* **3**, 3004.1–3004.10.
- Doares SH, Narvaez-Vasquez J, Conconi A, Ryan CA**, 1995. Salicylic acid inhibits synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid. *Plant Physiol.* **108**, 1741–1746.
- Dong X**, 1998. SA JA ethylene and disease resistance in plants. *Curr Opin Plant Biol.* **1**, 316–323.
- Donson J, Kearney CM, Hilf ME, Dawson WO**, 1991. Systemic expression of a bacterial gene by a tobacco mosaic virus-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7204–7208.
- Ebel J, Cosio EG**, 1994. Elicitors of plant defense responses. *Int. Rev. Cytol.* **148**, 1-36.
- Eckardt NA**, 2002. RNA goes mobile. *Plant Cell* **14**, 1433–1436.
- Ecker JR**, 2004. Reentry of the ethylene MPK6 module. *Plant Cell* **16**, 3169–73.
- Ecker JR, Davis RW**. 1987. Plant defense genes are regulated by ethylene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 5202–6.
- Eichmann R, Schultheiss H, Kogel K-H, Huckelhoven R**, 2004. The barley apoptosis suppressor Bax inhibitor-1 compromises nonhost penetration resistance of barley to the inappropriate pathogen *Blumeria graminis f.sp. tritici*. *Mol Plant Microbe Interact* **17**, 484– 490.
- Ekengren SK, Liu Y, Schiff M, Dinesh-Kumar SP, Martin GB**, 2003. Two MAPK cascades, NPR1, and TGA transcription factors play a role in Pto-mediated disease resistance in tomato. *Plant Journal* **36**, 905-917.
- Elad Y**, 1988. Involvement of ethylene in the disease caused by *Botrytis cinerea* on rose and carnation flowers and the possibility of control. *Annals of Applied Biology* **113**, 589-598.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T**, 2001a. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in mammalian cell culture. *Nature* **411**, 494–498.
- EI-Kazzaz MK, Chordas A, Kader AA**, 1983. Physiological and compositional changes in orange fruit in relation to modification of their susceptibility to *Penicillium italicum* by ethylene treatments. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **108**, 618–22.
- Ellis C, Turner JG**, 2001. The *Arabidopsis* mutant *cev1* has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to pathogens. *Plant Cell* **13**, 1025–33.
- Ellis J, Catanzariti AM, Dodds P**, 2006. The problem of how fungal and oomycete avirulence proteins enter plant cells. *Trends Plant Sci.* **11**, 61–63.
- Epple P, Apel K, Bohlmann H**, 1995. An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins, *Plant Physiol.* **109**, 813–820

- Epple P, Apel K, Bohlmann H**, 1997. Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*, *Plant Cell* **9**, 509–520.
- Esquerre-Tugaye MT, Lafitte C, Mazau D, Toppan A, Touze A**, 1979. Cell surfaces in plant-microorganism interactions. II. Evidence for the accumulation of hydroxyproline rich glycoproteins in the cell wall of diseased plants as a defense mechanism. *Plant Physiol.* **64**, 320–26.
- Eyal Y, Meller Y, Levy S, Fluhr R**, 1993. A basic-type PR-1 promoter directs ethylene responsiveness, vascular and abscission zone-specific expression. *Plant J.* **4**, 225–34.
- Eynck C, Koopmann B, Grunewaldt-Stoecker G, Karlovsky P, Von Tiedemann A**, 2007. Differential interactions of *Verticillium longisporum* and *V. dahliae* with *Brassica napus* detected with molecular and histological techniques. *European Journal of Plant Pathology* **118**, 259-274.
- Eynck C, Koopmann B, Grunewaldt-Stoecker G, Karlovsky P, Von Tiedemann A**, 2007. Differential interactions of *Verticillium longisporum* and *V.dahliae* with *Brassica napus* detected with molecular and histological techniques. *Eur. J. Plant Pathol.* **118**, 259-274.
- Fagard M, Boutet S, Morel JB, Bellini C, Vaucheret H**, 2000. AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 11650–11654.
- Fagard M, Vaucheret H**, 2000. Trans.gene silencing in plants, how many mechanisms? *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **51**, 167–194,
- Ferrari S, Plotnikova JM, Lorenzo G, Ausubel FM**, 2003. Arabidopsis local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires EDS4 and PAD2, butnot SID2, EDS5 or PAD4. *Plant J.* **35**, 193–205.
- Feys BJ, Parker JE**, 2000. Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends in Genetics* **16**, 449-455.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC**, 1998. Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806–811.
- Fischer U, Droge-Laser W**, 2004. Overexpression of NtERF5, a new member of the tobacco ethylene response transcription factor family enhances resistance to tobacco mosaic virus. *Mol. Plant Microbe Interact.* **17**, 1162–71.
- Flor HH**, 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu Rev Phytopathol* **9**, 275–296.
- Fodor J, Gullner G, Adam AL, Barna B, Komives T, Kiraly Z**, 1997. Local and systemic responses of antioxidants to tobacco mosaic virus infection and to salicylic acid in tobacco. *Plant Physiol* **114**, 1443–1451.
- Fontecave M, Atta M, Mulliez E**, 2004. S-adenosylmethionine, Nothing goes to waste. *Trends Biochem.* **5**, 243–49.
- Forouhar F, Yang Y, Kumar D, Chen Y, Fridman E, Park SW, Chiang Y, Acton TB, Montelione GT, Pichersky E, Kllessig DF, Tong L**, 2005. Structural and biochemical studies identify tobacco SABP2 as a methyl salicylate esterase and implicate it in plant innate immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 1773–1778.
- Foyer CH, Noctor G**, 2005. Oxidant and antioxidant signaling in plants, A re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ.* **28**, 1056-1071.
- Fradin EF, Thomma BPHJ** 2006. Physiology and molecular aspects of Verticillium wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum* *Molecular Plant Pathology* **7**, 71-86.
- Fradin EF, Zhang Z, Juarez Ayala JC, Castroverde CDM, Nazar RN, Robb J, Liu C-M, Thomma BPHJ**, 2009. Genetic Dissection of Verticillium Wilt Resistance Mediated by Tomato Ve1. *Plant Physiology* **150**, 320–332.
- Frederick RD, Thilmoney RL, Sessa G, Martin GB**, 1998. Recognition specificity for the bacterial avirulence protein AvrPto is determined by Thr-204 in the activation loop of the tomato Pto kinase. *Mol. Cell* **2**, 241–45.
- Friedrich L, Vernooij B, Gaffney T, Morse A, Ryals J**, 1995. Characterization of tobacco plants expressing a bacterial salicylate hydroxylase gene. *Plant Mol. Biol.* **29**, 959–68.
- Fujimoto SY, Ohta M, Usui A, Shinshi H, Ohme-Takagi M**, 2000. Arabidopsis ethylene responsive element binding factor act as transcriptional activators or repressors of GCCbox-mediated gene expression. *Plant Cell* **12**, 393–404.
- Fukuda H., Ogawa T. and Tanase S**, 1993. Ethylene production by micro-organisms. *Adv. Microbiol. Physiol.* **35**, 275–306.

- Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessmann H, Ryals J**, 1993. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* **261**, 754–756.
- Gagne JM, Smalle J, Gingerich DJ, Walker JM, Yoo S-D, Yanagisawa S, Vierstra RD**, 2004. Arabidopsis EIN3-binding F-box 1 and 2 form ubiquitin-protein ligases that repress ethylene action and promote growth by directing EIN3 degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 6803–8.
- Gamble RL, Coonfield ML, Schaller GE**, 1998. Histidine kinase activity of the ETR1 ethylene receptor from Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 7825–29.
- Gamble RL, Qu X, Schaller GE**, 2002. Mutational analysis of the ethylene receptor ETR1. Role of the histidine kinase domain in dominant ethylene sensitivity. *Plant Physiol.* **128**, 1428–38.
- Gao Z, Chen YF, Randlett MD, Zhao XC, Findell JL, Kieber JJ, Schaller GE**, 2003. Localization of the Raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of Arabidopsis through participation in ethylene receptor signalling complexes. *J. Biol. Chem.* **278**, 34725–32.
- Garcion C, Applimath FRI and Metraux J-P**, 2006. FiRe and microarrays, a fast answer to burning questions. *Trends in Plants Science*. **11**, 320–322.
- Gassmann, W.** 2005. Natural variation in the Arabidopsis response to the avirulence gene hopPsyA uncouples the hypersensitive response from disease resistance. *Mol Plant Microbe Interact* **18**, 1054–1060.
- Geraats BPJ, Bakker PAHM, Lawrence CB, Achuo EA, Hofte M, van Loon LC**, 2003. Ethylene-insensitive tobacco shows differentially altered susceptibility to different pathogens. *Phytopathology* **93**, 813–821.
- Geraats BPJ, Bakker PAHM, van Loon LC**, 2002. Ethylene insensitivity impairs resistance to soilborne pathogens in Tobacco and *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**, 1078–1085.
- Glazebrook J**, 2001. Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 301–308.
- Glazebrook J**, 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**, 205–27.
- Glazebrook J, Ausubel FM**, 1994. Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interactions with bacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8955–59.
- Glazebrook J, Chen WJ, Estes B, Chang H-S, Nawrath C, Métraux J-P, Zhu T, Katagiri F**, 2003. Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *Plant J.* **34**, 217–228.
- Glazebrook J, Rogers EE, Ausubel FM**, 1996. Isolation of *Arabidopsis* mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening. *Genetics* **143**, 973–982.
- Gold J, Lee B, Robb J**, 1996. Colonization of tomatoes by *Verticillium dahliae*, determinative phase II. *Canadian Journal of Botany* **74**, 1279–1288.
- Green RJ**, 1981. An Overview. In: *Mace, M.E., Bell, A.A., Beckman, C.H. Eds., Fungal Wilt Diseases of Plants. Academic Press, New York, pp. 1 – 20.*
- Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, Baillie DL, Fire A, Ruvkun G, Mello CC**, 2001. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* **106**, 23–24.
- Gu YQ, Wildermuth MC, Chakravarthy S, Loh YT, Yang C, He X, Han Y, Martin GB**, 2002. Tomato transcription factors pti4, pti5, and pti6 activate defense responses when expressed in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**, 817–31.
- Gu YQ, Yang C, Thara VK, Zhou J, Martin GB**, 2000. Pti4 is induced by ethylene and salicylic acid, and its product is phosphorylated by the Pto kinase. *Plant Cell* **12**, 771–86.
- Guo H, Ecker JR**, 2003. Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF EBF1/EBF2.-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. *Cell* **115**, 667–77.
- Guo H, Ecker JR**, 2004. The ethylene signaling pathway, new insights. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**, 40–49.
- Gutterson N, Reuber TN**, 2004. Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**, 465–73.
- Guzman P, Ecker JR**. 1990. Exploiting the triple response of Arabidopsis to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell* **2**, 513–23.

- Hahn C, Strittmatter G**, 1994. Pathogen-defense gene *prp1-1* from potato encodes an auxin responsive glutathione S-transferase. *Eur. J. Biochem.* **226**, 619–626.
- Hall AE, Findell JL, Schaller GE, Sisler EC, Bleecker AB**, 2000. Ethylene perception by the ERS1 protein in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **123**, 1449–58.
- Hamilton A, Voinnet O, Chappel I, Baulcombe D**, 2002. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J* **21**, 4671–4679.
- Hamilton AJ, Baulcombe DC**, 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **286**, 950–952.
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ**, 2000. An RNA directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**, 293–296.
- Hammond-Kosack KE, Harrison K, Jones JDG**, 1994. Developmentally regulated cell death on expression of the fungal avirulence gene *Avr9* in tomato seedlings carrying the disease resistance gene *Cf-9*. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 10445–10449.
- Hammond-Kosack KE, Jones JDG**, 1997. Plant disease resistance genes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 575–607.
- Hammond-Kosack K, Jones JDG**, 2000. Responses to Plant Pathogens in “Biochemistry & Molecular Biology of Plants” by B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones, eds. American Society of Plant Physiologists.
- Hannon GJ**, 2002. RNA interference. *Nature* **418**, 244–251.
- Hansen H, Grossmann K**, 2000. Auxin-induced ethylene triggers abscisic acid biosynthesis and growth inhibition. *Plant Physiology* **124**, 1437–1448.
- Hara-Nishimura I, Matsushima R**, 2003. A wound-inducible organelle derived from endoplasmic reticulum, a plant strategy against environmental stresses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 583–88.
- He P, Warren RF, Zhao TH, Shan LB, Zhu LH, Tang X, Zhou JM**, 2001. Overexpression of *Pti5in* tomato potentiates pathogen-induced defense gene expression and enhances disease resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14**, 1453–57.
- Heidecker G, Huleihel M, Cleveland JL, Kolch W, Beck TW, Lloyd P, Pawson T, Rapp UR**, 1990. Mutational activation of *c-raf-1* and definition of the minimal transforming sequence. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 2503–12.
- Heinz R, Lee SW, Saparno A, Nazar RN, Robb J**, 1998. Cyclical systemic colonization in *Verticillium*-infected tomato. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **52**, 385–396.
- Hirayama T, Kieber JJ, Hirayama N, Kogan M, Guzman P, Nourizadeh S, Alonso JM, Dailey WP, Dancis A, Ecker JR**, 1999. *RESPONSIVE TO-ANTAGONIST1*, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in Arabidopsis. *Cell* **97**, 383–93.
- Hofius DI, Tsitsigiannis DI, Jones JDG, Mundy J**, 2007. Inducible cell death in plant immunity. *Seminars in Cancer Biology* **17**, 166–187.
- Hoffman T, Schmidt JS, Zheng XY, Bent AF**, 1999. Isolation of ethylene-insensitive soybean mutants that are altered in pathogen susceptibility and gene-for-gene disease resistance. *Plant Physiology* **119**, 935–949.
- Holzberg S, Brosio P, Gross C, Pogue GP**, 2002. Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in a monocot plant. *Plant J.* **30**, 315–327.
- Hua J, Chang C, Sun Q, Meyerowitz EM**, 1995. Ethylene insensitivity conferred by Arabidopsis ERS gene. *Science* **269**, 1712–14.
- Hua J, Meyerowitz EM**, 1998. Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in Arabidopsis thaliana. *Cell* **94**, 261–71.
- Hua J, Sakai H, Nourizadeh S, Chen QG, Bleecker AB, Ecker JR, Meyerowitz EM**, 1998. *EIN4* and *ERS2* are members of the putative ethylene receptor gene family in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**, 1321–32.
- Huang Y, Li H, Hutchinson CE, Laskey J, Kieber JJ**, 2003. Biochemical and functional analysis of *CTR1*, a protein kinase that negatively regulates ethylene signalling in Arabidopsis. *Plant J.* **33**, 221–33.
- Huckelhoven R, Dechert C, Kogel K-H**, 2003. Overexpression of barley BAX inhibitor 1 induces breakdown of mlo-mediated penetration resistance to *Blumeria graminis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 555–5560.

- Huckelhoven R, Fodor J, Preis C, Kogel K-H**, 1999. Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with H₂O₂ but not with salicylic acid accumulation. *Plant Physiol* **119**, 1251–1260.
- Huisman OC, Gerik JS**, 1989. Dynamics of colonization of plantroots by *Verticillium dahliae* and other fungi. In: Tjamos, E.C., and Beckman, C.H. Eds., *Vascular wilt diseases of plants*. Springer-Verlag, Berlin, p1 – 18.
- Hull R**, 2002. *Matthews' plant virology*, 4th edn. Academic, New York.
- Hutvagner G, Zamore PD**, 2002. RNAi, nature abhors a doublestrand. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 225–232
- Iavicoli A, Boutet E, Bucala A, Metraux JP**, 2003. Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol. Plant Microbe Interact.* **10**, 851–58.
- Iordachescu M, Verlinden S**, 2005. Transcriptional regulation of three EIN3-like genes of carnation *Dianthus caryophyllus* L. cv. Improved White Sim. during flower development and upon wounding, pollination, and ethylene exposure. *J. Exp. Bot.* **56**, 2011–18.
- Ishigaki E, Asamizu T, Arisawa M, Kurosaki F**, 2004. Cloning and expression of calmodulin genes regulating phytoalexin production in carrot cells. *Biol. Pharm. Bull.* **27**, 1308–11.
- Janda M, French R, Ahlquist P**, 1987. High efficiency T7 polymerase synthesis of infectious RNA from cloned brome mosaic virus cDNA and effects of 5' extensions on transcript infectivity. *Virology* **158**, 259–262.
- Jia ZQ, Yuan HY, Li YZ**, 2007. NO and H₂O₂ induced by *Verticillium dahliae* toxins and its influence on the expression of GST gene in cotton suspension cells. *Chin. Sci. Bull.* **52**, 1347-1354.
- Jin HL, Axtell MJ, Dahlbeck D, Ekwenna O, Zhang SQ, Staskawicz B, Baker B**, 2002. NPK1, and MEKK1-like mitogen-activated protein kinase kinase kinase, regulates innate immunity and development in plants. *Dev. Cell* **3**, 291–297.
- Johansson A, Staal, J Dixelius C**, 2006. Early responses in the *Arabidopsis-Verticillium longisporum* Pathosystem are dependent on *NDR1*, JA- and ET-Associated signals via cytosolic *NPR-1* and *RFO1*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**, 958–969.
- Johnson PR, Ecker JR**, 1998. The ethylene gas signal transduction pathway, a molecular perspective. *Annual Review of Genetics* **32**, 227-254.
- Jones JDG, Dangl JL**, 2006. The plant immune system. *Nature* **444**, 323-329.
- Joosten MHAJ, deWit PJGM**, 1999. The tomato–*Cladosporium fulvum* interaction, a versatile experimental system to study plant– pathogen interaction. *Annu Rev Phytopathol.* **37**, 335–367.
- Kamo T, Hirai N, Tsuda M, Fujioka D, Ohigashi H**, 2000. Changes in the content and biosynthesis of phytoalexins in banana fruit. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 2089–98.
- Kehres DG, Zaharik ML, Finlay BB, Maguire ME**, 2000. The NRAMP proteins of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* are selective manganese transporters involved in the response to reactive oxygen. *Mol. Microbiol.* **36**, 1085–100.
- Kende H**, 1993. Ethylene biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**, 283–307.
- Kennerdell JR, Carthew RW**, 1998. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* **95**, 1017–1026.
- Kieber JJ, Rothenberg M, Roman G, Feldmann KA, Ecker JR**, 1993. CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the Raf family of protein kinases. *Cell* **72**, 427–41.
- Kiraly L, Kiraly Z**, 2006. To die or not to die – is cell death dispensable for resistance during the plant hypersensitive response? *Acta Phytopathol Entomol Hung* **41**, 11–21.
- Kiraly Z, Barna B, Ersek T**, 1972. Hypersensitivity as a consequence, not the cause, of plant disease resistance to infection. *Nature* **239**, 215–219.
- Kiraly Z, 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 Rad Res* **36**, 981–991.
- Kiraly L, Barna B, Kiraly Z**, 2007. Plant Resistance to Pathogen Infection: Forms and Mechanisms of Innate and Acquired Resistance. *J. Phytopathology* **155**, 385-396.
- Kjemtrup S, Sampson KS, Peele CG, Nguyen LV, Conkling MA, Thompson WF, Robertson D**, 1998. Gene silencing from plant DNA carried by a Geminivirus. *Plant J* **14**, 91–100.

- Klee HJ**, 2002. Control of ethylene-mediated processes in tomato at the level of receptors *Journal of Experimental Botany* **53**, 2057-2063.
- Klee HJ, Hayford MB, Kretzmer KA, Barry GF, Kishore GM**, 1991. Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants. *Plant Cell* **3**, 1187-1193.
- Klement Z, Farkas GL, Lovrekovich L**, 1964. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopathology* **54**, 474-477.
- Knoester M, Van Loon LC, Van Den Heuvel J, Hennig J, Bol JF, Linthorst HJM**, 1998. Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 1933-1937.
- Koornneef A, Pieterse CMJ** 2008. Cross talk in defense signalling. *Plant Physiol.* **146**, 839-844.
- Koornneef A, Verhage A, Leon-Reyes A, Snetselaar R, Van Loon LC, Pieterse CMJ**, 2008. Towards a reporter system to identify regulators of cross-talk between salicylate and jasmonate signaling pathways in Arabidopsis. *Plant Signal. Behav.* **3**, 543-546.
- Kooter JM, Matzke MA, Meyer P**, 1999. Listening to the silent genes, transgene silencing, gene regulation and pathogen control. *Trends Plant Sci* **4**, 340-347.
- Korolev 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.
- Krikun J, Bernier CC**, 1987. Infection of several crop species by two isolates of *Verticillium dahliae*. *Can. J. Plant Pathol.* **9**, 241-245.
- Kumagai MH, Donson J, Della-Cioppa G, Harvey D, Hanley K, Grill LK**, 1995. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 1679-1683.
- Kunkel BN, Brooks DM**, 2002. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 325-331.
- Lanahan MB, Yen H-C, Giovannoni JJ, Klee HJ**, 1994. The *Never ripe* mutation blocks ethylene perception in tomato. *Plant Cell* **6**, 521-530.
- Lashbrook C, Tieman D, Klee H**, 1998. Differential regulation of the tomato ETR gene family throughout plant development. *The Plant Journal* **15**, 243-252.
- Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP**, 2001. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **294**, 858-862.
- Lawton K, Weymann K, Friedrich L, Vernooij B, Uknes S, Ryals J**, 1995. Systemic acquired resistance in Arabidopsis requires salicylic acid but not ethylene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **8**, 863-870.
- Lawton KA, Potter SL, Uknes S, Ryals J**, 1994. Acquired resistance signal transduction in Arabidopsis is ethylene independent. *Plant Cell* **6**, 581-88.
- Lawton KA, Weymann K, Friedrich L, Vernooij B, Uknes S, Ryals J**, 1995. Systemic acquired resistance in Arabidopsis requires salicylic acid but not ethylene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**, 863-70.
- Lawton, KA, Potter, SL, Uknes, S, Ryals, J** 1994. Acquired resistance signal transduction in Arabidopsis is ethylene independent. *Plant Cell* **6**, 581- 588.
- Leon-Kloosterziel KM, Verhagen BW, Keurentjes JJ, VanPelt JA, Rep M, VanLoon LC, Pieterse CM**, 2005. Colonization of the *Arabidopsis* rhizosphere by fluorescent *Pseudomonas* spp. activates a root-specific, ethylene-responsive PR-5 gene in the vascular bundle. *Plant Mol. Biol.* **57**, 731-48.
- Levin JZ, de Framond AJ, Tuttle A, Bauer MW, Heifetz PB**, 2000. Methods of double-stranded RNA-mediated gene inactivation in Arabidopsis and their use to define an essential gene in methionine biosynthesis. *Plant Mol Biol.* **44**, 759-775.
- Li Y, Zheng X, Tang H, Zhu J, Yang J**, 2003. Increase of b-1,3-glucanase and chitinase activities in cotton callus cells treated by salicylic acid and toxin of *Verticillium dahliae* Kleb. *Acta Bot. Sin.* **45**, 802-808.
- Liu Y, Schiff M, Dinesh-Kumar SP**, 2002α. Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant Journal* **31**, 777-786.
- Liu Y, Schiff M, Marathe R, Dinesh-Kumar SP**, 2002β. Tobacco *Rar1*, *EDS1* and *NPR1/NIM1* like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J* **30**,415-429.

- Liu Y, Schiff M, Serino G, Deng XW, Dinesh-Kumar SP**, 2002γ. Role of SCF ubiquitin-ligase and the COP9 signalosome in the N gene-mediated resistance response to Tobacco mosaic virus. *Plant Cell* **14**, 1483–1496.
- Liu Y, Zhang S**, 2004. Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 3386–99.
- Llop-Tous I, Barry CS, Grierson D**, 2000. Regulation of ethylene biosynthesis in response to pollination in tomato flowers. *Plant Physiology* **123**, 971-978.
- Lorenzo O, Piqueras R, Sanchez-Serrano JJ, Solano R**, 2003. ETHYLENE RESPONSEFACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* **15**, 165–78.
- Lough TJ, Netzler NE, Emerson SJ, Sutherland P, Carr F, Beck DL, Lucas WJ, Forster RL**, 2000. Cell-to-cell movement of potexviruses, evidence for a ribonucleoprotein complex involving the coat protein and first triple gene block protein. *Mol Plant Microbe Interact.* **13**, 962–974.
- Love AJ, Laval V, Geri C, Laird J, Tomos AD, Hooks MA, Milner JJ**, 2007. Components of Arabidopsis defense- and ethylene-signaling pathways regulate susceptibility to *Cauliflower mosaic virus* by restricting long-distance movement. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**, 659–670.
- Lu R, Martin-Hernandez AM, Peart JR, Malcuit I, Baulcombe DC**, 2003. Virus-induced gene silencing in plants. *Methods* **30**, 296-303.
- Lund ST, Stall RE, Klee HJ**, 1998. Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. *Plant Cell* **10**, 371-382.
- Lynch DR, Kawchuk ML, Hachey J, Bains PS, Howard RJ**, 1997. Identification of a gene conferring high levels of resistance to *Verticillium* wilt in *Solanum chacoense*. *Plant Dis.* **81**, 1011-1014.
- Malamy J, Carr JP, Klessig DF, Raskin I**, 1990. A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* **250**, 1002–1004.
- Malamy J, Sanchez-Casas P, Hennig J, Guo A, Klessig DF**, 1996. Dissection of the salicylic acid signaling pathway in tobacco. *Mol. Plant–Microbe Interact.* **9**, 474–482.
- Maldonado AM, Doerner P, Dixon RA, Lamb CH, Cameron RK**, 2002. A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in Arabidopsis. *Nature* **419**, 399–403.
- Mallory AC, Reinhart BJ, Bartel D, Vance VB, Bowman LH**, 2002. A viral suppressor of RNA silencing differentially regulates the accumulation of short interfering RNAs and micro-RNAs in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 15228– 15233.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J**, 1982. Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbour, New York.
- Marra KA**, 1996. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 127-158.
- Martin GB, Bogdanove AJ, Sessa G**, 2003. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annu Rev Plant Biol.* **54**, 23–61.
- Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Lahrmann R, Tuschl T**, 2002. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* **110**, 563–574.
- Matzke MA, Matzke AJ, Pruss GJ, Vance VB**, 2001. RNA-based silencing strategies in plants. *Curr Opin Genet Dev.* **11**, 221–227.
- Mauch F, Dudler R**, 1993. Differential induction of distinct glutathione S-transferases of wheat by xenobiotics and by pathogen attack. *Plant Physiol.* **102**, 1193-1201.
- Mauch F, Hadwiger LA, Boller T**, 1984. Ethylene, symptom, not signal for the induction of chitinase and β-1,3-glucanase in pea pods by pathogens and elicitor. *Plant Physiol.* **76**, 607–11.
- Mauch F, Mauch-Mani B, Boller T**, 1988. Antifungal hydrolases in pea tissue. 2. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β-1,3-glucanase. *Plant Physiol.* **88**, 936-942.
- Mauch-Mani B, Slusarenko AJ**, 1994. Systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana* induced by a predisposing infection with a pathogenic isolate of *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **7**, 378-383.
- McConn M, Creelman RA, Bell E, Mullet JE, Browse J**, 1997. Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 5473–5477.
- McGrath KC, Dombrecht B, Manners JM, Schenk PM, Edgar CI, DJ Maclean, Scheible W-R, Udvardi MK, Kazan K**, 2005. Repressor- and activator-type ethylene response factors functioning in

- jasmonate signaling and disease resistance identified via a genome-wide screen of Arabidopsis transcription factor gene expression. *Plant Physiol.* **139**, 949–59.
- Melchers LS, Apotheker-de Groot M, van der Knaap J, Ponstein AS, Sela-Burlage MB, Bol JF, Cornelissen BJZ, van den Elzen PJM, Linthorst HJM**, 1994. A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinases displays antifungal activity. *Plant J.* **5**, 469–480.
- Mellersh DG, Foulds IV, Higgins VJ, Heath MC**, 2002. H₂O₂ plays different roles in determining penetration failure in three diverse plant-fungal interactions. *Plant J.* **29**, 257–268.
- Mengiste T, Chen X, Salmeron J, Dietrich R**, 2003. The *BOTRYTIS SUSCEPTIBLE1* gene encodes an R2R3MYB transcription factor protein that is required for biotic and abiotic stress responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**, 2551–2565.
- Menu-Bouaouiche L, Vriet C, Peumans WJ, Barre A, Van Damme EJM, Rouge P**, 2003. A molecular basis for the endo-β-1,3-glucanase activity of the thaumatin-like proteins from edible fruits. *Biochimie* **85**, 123–131.
- Metraux J-P, Singer H, Ryals J, Ward E, Wyss-Benz M, Gaudin J, Raschdorf K, Schmid E, Blum W, Inverardi B**, 1990. Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* **250**, 1004–1006.
- Meyers BC, Kozik A, Griego A, Kuang H, Michelmore RW**, 2003. Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**, 809–834.
- Mlotshwa S, Voinnet O, Mette MF, Matzke M, Vaucheret H, Ding SW, Pruss G, Vance VB**, 2002. RNA silencing and the mobile silencing signal. *Plant Cell* **14**[Suppl], 289–301.
- Moeder W, Barry SC, Tauriainen AA, Betz C, Tuomainen J, Utriainen M, Grierson D, Sandermann H, Langebartels C, Kangasjärvi J**, 2002. Ethylene synthesis regulated by biphasic induction of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase genes is required for hydrogen peroxide accumulation and cell death in ozone-exposed tomato. *Plant Physiol.* **130**, 1918–26.
- Montesano M, Brader G, Palva ET**, 2003. Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants *Molecular Plant Pathology* **4**, 73–79.
- Morel JB, Gordon C, Mourrain P, Beclin C, Boutet S, Feuerbach F, Proux F, Vaucheret H**, 2002. Fertile hypomorphic ARGONAUTE ago1. mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *Plant Cell* **14**, 629–639.
- Moussatche P, Klee HJ**, 2004. Autophosphorylation activity of the Arabidopsis ethylene receptor multigene family. *J. Biol. Chem.* **279**, 48734–41.
- Mudgett MB**, 2005. New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. *Annu Rev Plant Biol.* **56**, 509–531.
- Mullins ED, Chen X, Romaine P, Raina R, Geiser DM, Kang S**, 2001. Agrobacterium-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*, an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *Phytopathology* **91**, 173–180.
- Mysore KS, Crasta OR, Tuori RP, Folkerts O, Swirsky PB, Martin GB**, 2002. Comprehensive transcript profiling of Pto and Prf-mediated host defense responses to infection by *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Plant J.* **32**, 299–315.
- Mysore KS, Ryu C-M**, 2004. Nonhost resistance, how much do we know? *Trends Plant Sci* **9**, 97–104.
- Nagahama K, Ogawa T, Fujii T, Tazaki M, Tanase S, Morino Y, Fukuda H**, 1991. Purification and properties of an ethylene-forming enzyme from *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola PK2. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 2281–86.
- Nakatsuka A, Murachi S, Okunishi H, Shiomi S, Nakano R, Kubo Y, Inaba A**, 1998. Differential expression and internal feedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening. *Plant Physiol.* **118**, 1295–305.
- Nakazato Y, Tamogami S, Kawai H, Hasegawa M, Kodama O**, 2000. Methionine-induced phytoalexin production in rice leaves. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 577–83.
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R**, 1990. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible cosuppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* **2**, 279–289.
- Navarro L, Zipfel C, Rowland O, Keller I, Robatzek S, Boller T, Jones JDG**, 2004. The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiol* **135**, 1113–1128.

- Nawrath C, Métraux JP**, 1999. Salicylic acid induction deficient mutants of *Arabidopsis* express *PR-2* and *PR-5* and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell* **11**, 1393-1404.
- Neill S, Desikan R, Hancock J**, 2002. Hydrogen peroxide signaling in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 388–95.
- Niderman T, Genetet I, Bruyère T, Gees R, Stinzi A, Legrand M, Fritig B, Mösinger E**, 1995. Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal, Isolation and characterization of three 14 kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol.* **108**, 17-27.
- Nie X, Singh RP, Tai GC**, 2002. Molecular characterization and expression analysis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homologs from potato under abiotic and biotic stresses. *Genome* **45**, 905–13.
- Niki T, Niki T, Mitsuhashi I, Seo S, Ohtsubo N, Ohashi Y**, 1998. Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related PR. protein genes in wounded mature tobacco leaves, *Plant Cell Physiol.* **39**, 500–507.
- Norman-Setterblad C, Vidal S, Palva ET**, 2000. Interacting signal pathways control defense gene expression in *Arabidopsis* in response to cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**, 430-438.
- Novikova GV, Moshkov IE, Smith AR, Hall MA**. 2000. The effect of ethylene on MAPKinase-like activity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **474**, 29–32.
- Nürnberger T**, 1999. Signal perception in plant pathogen defense. *Cell. Mol. Life Sci.* **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. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 318–324.
- O'Donnell PJ, Calvert C, Atzorn R, Wasternack C, Leyser HMO, Bowles DJ**, 1996. Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants, *Science* **274**, 1914–1917.
- O'Donnell, P.J. Schmelz E, Moussatche P, Lund S, Jones J, Klee H**, 2003. Susceptible to intolerance – a range of hormonal actions in a susceptible *Arabidopsis* pathogen response. *Plant J.* **33**, 245–257.
- O'Donnell PJ, Jones JB, Antoine FR, Ciardi J, Klee HJ**, 2001. Ethylene-dependent salicylic acid regulates an expanded cell death response to a plant pathogen. *Plant Journal* **25**, 315-323.
- Oh IS, Park AR, Bae MS, Kwon SJ, Lee JE, Kang NY, Lee S, Cheong H, Park OK**, 2005. Secretome analysis reveals an *Arabidopsis* lipase involved in defense against *Alternaria brassicicola*. *Plant Cell* **17**, 2832–47.
- Ohme-Takagi M, Shinshi H**, 1990. Structure and expression of a tobacco beta-1,3- glucanase gene. *Plant Mol. Biol.* **15**, 941–46.
- Ohme-Takagi M, Shinshi H**, 1995. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell* **7**, 173–82.
- Ohta M, Matsui K, Hiratsu K, Shinshi H, Ohme-Takagi M**, 2001. Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. *Plant Cell* **13**, 1959–68.
- Ohta M, Ohme-Takagi M, Shinshi H**, 2000. Three ethylene-responsive transcriptional factors in tobacco with distinct transactivation functions. *Plant Cell* **12**, 393–404.
- Okubara P, Paulitz T**, 2005. Root defense responses to fungal pathogens, A molecular perspective. *Plant Soil* **274**, 215–226.
- Olsen PH, Ambros V**, 1999. The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking Lin-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol* **216**, 671-680.
- Onate-Sanchez L, Singh KB**, 2002. Identification of *Arabidopsis* ethylene-responsive element binding factors with distinct induction kinetics after pathogen infection. *Plant Physiol.* **128**, 1313–22.
- Ostin A, Kowalczyk M, Bhalerao RP, Sandberg G**, 1998. Metabolism of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **118**, 285-296.
- Ouaked F, Rozhon W, Lecourieux D, Hirt H**. 2003. A MAPK pathway mediates ethylene signalling in plants. *EMBO J.* **22**, 1282–88.
- Palauqui J-C, Elmayan T, Pollien J-M, Vaucheret H**, 1997. Systemic acquired silencing, Transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J.* **16**, 4738–4745.

- Pantelides IS, Tjamos SE, Striglis IA, Chatzipavlidis I, Paplomatas EJ**, 2009. Mode of action of a non-pathogenic *Fusarium oxysporum* strain against *Verticillium dahliae* using Real Time QPCR analysis and biomarker transformation. *Biological Control* **50**, 30-36.
- Panter SN, Jones DA**, 2002. Age-related resistance to plant pathogens. *Adv. Bot. Res.* **38**, 251–280.
- Peart JR, Cook G, Feys BJ, Parker JE, Baulcombe DC**, 2002α. An EDS1 orthologue is required for N-mediated resistance against tobacco mosaic virus. *Plant J.* **29**, 569–579.
- Peart JR, Lu R, Sadanandom A, Malcuit I, Moffett P, Brice DC, Schauser L, Jaggard DAW, Xiao S, Coleman M, Dow JM, Jones JDG, Shirasu K, Baulcombe DC**, 2002β. Ubiquitin ligase-associated protein SGT1 is required for host and nonhost disease resistance in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 10865–10869.
- Peck SC, Kende H**, 1998. Differential regulation of genes encoding 1- aminocyclopropane-1-carboxylate ACC. synthase in etiolated pea seedlings, effects of indole-3-acetic acid, wounding, and ethylene. *Plant Mol. Biol.* **38**, 977–82.
- Pedras MSC, Okanga FI, Zaharia IL, Khan AQ**, 2000. Phytoalexins from crucifers, synthesis, biosynthesis, and biotransformation. *Phytochemistry* **53**, 161–76.
- Peele C, Jordan CV, Muangsan N, Turnage M, Egelkroust E, Eagle P, Hanley-Bowdoin L, Robertson D**, 2001. Silencing of a meristematic gene using geminivirus-derived vectors. *Plant J.* **27**, 357–366.
- Pegg GF**, 1976α. The involvement of ethylene in plant pathogenesis. In, Heitfuss R, Williams PH, eds. *Encyclopedia of Plant Pathology New Series*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, pp 582-591.
- Pegg GF**, 1976β. The response of ethylene-treated tomato plants to infection by *Verticillium albo-atrum*. *Physiological Plant Pathology* **9**, 215-226.
- Pegg GF**, 1981. Biochemistry and physiology of pathogenesis. In, Mace, M.E., Bell, A.A., Beckman, C.H. Eds., *Fungal Wilt Diseases of Plants*. Academic Press, New York, p. 193 – 253.
- Pegg GF**, 1989 Pathogenesis in vascular diseases of plants. In, Tjamos, E.C., and Beckman, C.H. Eds., *Vascular wilt diseases of plants*. Springer-Verlag, Berlin, p51 – 94.
- Pegg GF, Brady BL**, 2002. *Verticillium Wilts*. Wallingford, UK, CABI Publishing.
- Pegg GF, Cronshaw DK**, 1976 Ethylene production in tomato plants infected with *Verticillium albo-atrum*. *Physiological Plant Pathology* **8**, 279-295.
- Peleg S, Sanghera JS**, 1992. Mitogen-activated protein kinases, versatile transducers for cell signaling. *Trends Biochem. Sci.* **17**, 233–38.
- Peña-Cortés H, Albrecht T, Prat S, Weiler EW, Willmitzer L**, 1993. Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis, *Planta* **191**, 123–128.
- Penninckx IA, Eggermont K, Terras FR, Thomma BP, De Samblanx GW, Buchala A, Mettraux JP, Manners JM, Broekaert WF**, 1996. Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in Arabidopsis follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* **8**, 2309–23.
- Penninckx IA, Thomma BP, Buchala A, Mettraux 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* **10**, 2103–13.
- Pfaffl MW**, 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, 2002-2007.
- Pieterse CM, Van Loon LC**, 1999. Salicylic-acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Sci.* **4**, 52–58.
- Pieterse CM, van Wees SC, van Pelt JA, Knoester M, Laan R, Gerrits H, Weisbeek PJ, van Loon LC**, 1998. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**, 1571–80.
- Pieterse CMJ, Van Loon LC**, 1999. Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Sci.* **4**, 52-58.
- Pieterse CMJ, Van Loon LC**, 2004. *NPR-1*, The spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**, 456-464.
- Pieterse CMJ, van Pelt JTJ, Parchmann S, Mueller MJ, Buchala AJ, J-P Métraux, LC Van Loon**, 2000. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance ISR. in Arabidopsis requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **57**, 123–34.

- Pieterse CMJ, van Wees SCM, Hoffland E, van Pelt JA, van Loon LC**, 1996. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell* **8**, 1225-1237.
- Piloff RK, Devadas SK, Enyedi A, Raina R**, 2002. The *Arabidopsis* gain-of-function mutant dill spontaneously develops lesions mimicking cell death associated with disease. *Plant J.* **30**, 61-70.
- Pintard L, Willems A, Peter M**. 2004. Cullin-based ubiquitin ligases, Cul3-BTB complexes join the family. *EMBO J.* **23**, 1681-87.
- Pirrung MC**, 1999. Histidine kinases and two-component signal transduction systems. *Chem. Biol.* **6**, R167-75.
- Porstein AS, Bles-Vloemans SA, Sela-Burlage MB, van den Elzen PJM, Melchers LS, Cornelissen BJC** 1994. A novel pathogen- and wound-inducible tobacco protein with antifungal activity. *Plant Physiol.* **104**, 109-118.
- Potuschak T, Lechner E, Parmentier Y, Yanagisawa S, Grava S, Koncz C, Genschik P**, 2003. EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two *Arabidopsis* F box proteins, EBF1 and EBF2. *Cell* **115**, 679-89.
- Pressey, R** 1997. Two isoforms of NP24, A thaumatin-like protein in tomato fruit. *Phytochemistry* **44**, 1241-1245.
- Ratcliff F, Martin-Hernandez AM, Baulcombe DC**, 2001. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J* **25**, 237-245.
- Ratcliff FG, Harrison BD, Baulcombe DC**, 1997. A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* **276**, 1558-1560.
- Ravanel S, Gakiere B, Job D, Douce R**, 1998. The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 7805-12.
- Remakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF**, 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction PCR. data. *Neuroscience Letters* **339**, 62-66.
- Reymond P, Farmer EE**, 1998. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 404-411.
- Rieu I, Mariani C, Weterings K**, 2003. Expression analysis of five tobacco EIN3 family members in relation to tissue-specific ethylene responses. *J. Exp. Bot.* **54**, 2239-44.
- Robison MM, Griffith M, Pauls KP, Glick BR**, 2001α. Dual role for ethylene in susceptibility of tomato to *Verticillium* wilt. *Journal of Phytopathology* **149**, 385-388.
- Robison MM, Shah S, Tamot B, Pauls KP, Moffatt BA, Glick BR**, 2001β. Reduced symptoms of *Verticillium* wilt in transgenic tomato expressing a bacterial ACC deaminase. *Molecular Plant Pathology* **2**, 135-145.
- Rodriguez FI, Esch JJ, Hall AE, Binder BM, Schaller GE, AB Bleecker**, 1999. A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. *Science* **283**, 996-98.
- Rodriguez-Gálvez, E and Mendgen, K**, 1995. The infection process of *Fusarium oxysporum* in cotton root tips. *Protoplasma*, **189**, 61-72.
- Roman G, Lubarsky B, Kieber JJ, Rothenberg M, Ecker JR** 1995. Genetic analysis of ethylene signal transduction in *Arabidopsis thaliana*, Five novel mutant loci integrated into a stress response pathway. *Genetics* **139**, 1393-1409.
- Roncero MIG, Hera C, Ruiz-Rubio M, Maceira FIG, Madrid MP, Caracuel Z, Calero F, Delgado-Jarana J, Roldán-Rodríguez R, Martínez-Rocha AL, Velasco C, Roa J, Martín-Urdiroz M, Córdoba D, Di Pietro A**, 2003. *Fusarium* as a model for studying virulence in soilborne plant pathogens. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **62**, 87-98.
- Rose JKC, Lee HH, Bennett AB**, 1997. Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **94**, 5955-5960.
- Ross AF**, 1961a. Localized acquired resistance to plant virus infection in hypersensitive hosts. *Virology* **14**, 329-339.
- Ross AF**, 1961b. Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology* **14**, 340-358.
- Ruiz MT, Voinnet O, Baulcombe DC** 1998. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* **10**, 937-946.
- Ruiz-Medrano R, Xoconostle-Cazares B, Lucas WJ**, 1999. Phloem long-distance transport of CmNACP mRNA, implications for supracellular regulation in plants. *Development* **126**, 4405-4419.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Rushton PJ, Somssich IE**, 1998. Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 311-315.
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner H-Y, Hunt MD**, 1996. Systemic acquired resistance *Plant Cell* **8** 1809–1819.
- Ryan CA**, 1992. The search for the proteinase-inhibitor inducing factor PIIF *Plant Mol. Biol.* **19**, 123–133.
- Sakai H, Hua J, Chen QG, Chang C, Medrano LJ, AB Bleecker, EM Meyerowitz**, 1998. ETR2 is an ETR1-like gene involved in ethylene signalling in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 5812–17.
- Samac DA, Hironaka CM, Yallaly PE, Shah DM**, 1990. Isolation and characterization of the genes encoding basic and acidic chitinase in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol.* **93**, 907–14.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T**, 1989. *Molecular Cloning, "A Laboratory Manual"*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanchez-Alvarado A, Newmark PA**, 1999. Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 5049–5054.
- Schaffrath U, Freydl E, Dudler R**, 1997. Evidence for different signaling pathways activated by inducers of acquired resistance in wheat, *Mol. Plant–Microbe Interact.* **10**, 779–783.
- Schaller GE, Bleecker AB**, 1995. Ethylene-binding sites generated in yeast expressing the Arabidopsis ETR1 gene. *Science* **270**, 1809–11.
- Schaller GE, Ladd AN, Lanahan MB, Spanbauer JM, Bleecker AB**, 1995. The ethylene response mediator ETR1 from Arabidopsis forms a disulfide-linked dimer. *J. Biol. Chem.* **270**, 12526–30.
- Schenk PM, Kazan K, Wilson L, Anderson JP, Richmond T, Somerville SC, Manners JM**, 2000. Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 11655–60.
- Schnathorst, WC** 1981. Life cycle and epidemiology of *Verticillium*. In Fungal Wilt Diseases of Plants **Mace, M.A., Bell, A.A. and Beckman, C.H., eds.**. New York, USA, Academic Press, pp. 81-111.
- Schoelz JE, Palanichelvam K, Cole AB, Kiraly L, Cawly J**. 2003. Dissecting the avirulence and resistance components that comprise the hypersensitive response to *Cauliflower mosaic virus* in Nicotiana. In, **Stacey G and Keen NT eds.**, *Plant–Microbe Interactions* Vol 6, St Paul, MN, APS Press, pp. 259–283.
- Schweizer P, Buchala A, Métraux J-P**, 1997. Gene-expression patterns and levels of jasmonic acid in rice treated with the resistance inducer 2,6-dichloroisonicotinic acid, *Plant Physiol.* **115**, 61–70.
- Schweizer P, Buchala A, Dudler R, Métraux J-P**, 1998. Induced systemic resistance in wounded rice plants *Plant J.* **14**, 475–481.
- Scofield SR, Tobias CM, Rathjen JP, Chang JH, Lavelle DT, RW Michelmore, BJ Staskawicz**, 1996. Molecular basis of gene-for-gene specificity in bacterial speck disease of tomato. *Science* **274**, 2063–65.
- Sela-Buurlage MB, Ponstein AS, Bres-Vloemans SA, Melchers LS, van den Elzen PJM, Cornelissen BJC**, 1993. Only specific tobacco *Nicotiana tabacum*. chitinases and β -1,3-glucanases exhibit antifungal activity. *Plant Physiol.* **101**, 857-863.
- Shin S, Mackintosh CA, Lewis J, Heinen SJ, Radmer L, Dill-Macky R, Baldrige GD, Zeyen RJ, Muehlbauer GJ**, 2008. Transgenic wheat expressing a barley class II chitinase gene has enhanced resistance against *Fusarium graminearum*. *J. Exp. Bot.* **59**, 2371-2378.
- Silverstein KA, Graham MA, Paape TD, Vandenbosch KA**, 2005. Genome organization of more than 300 defensin-like genes in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **138**, 600–10.
- Sinha AK, Wood RKS**, 1968. Studies on the nature of resistance in tomato plants to *Verticillium albo-atrum*. *Annals of Applied Biology* **62**, 319-327.
- Sisler EC, Serek M**, 2003. Compounds interacting with the ethylene receptor in plants. *Plant Biol.* **5**, 1–8.
- Slaymaker DH, Navarre DA, Clark D, del Pozo O, Martin GB, Klessig DF**, 2002. The tobacco salicylic acid-binding protein 3 SABP3. is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 11640–11645.

- Smirnov S, Shulaev V, Tumer NE**, 1997. Expression of pokeweed antiviral protein in transgenic plants induces virus resistance in grafted wildtype plants independently of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related protein synthesis. *Plant Physiol.* **114**, 1113–1121.
- Smith NA, Singh SP, Wang MB, Stoutjesdijk PA, Green AG, Waterhouse PM**, 2000. Total silencing by intronsplined hairpin RNAs. *Nature* **407**, 319–320.
- Solano R, Stepanova A, Chao Q, Ecker JR**, 1998. Nuclear events in ethylene signaling, a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENERESPONSE FACTOR1. *Genes Dev.* **12**, 3703–14.
- Song J, Bradeen JM, Naess SK, Raasch JA, Wielgus SM, Haberlach GT, Liu J, Kuang H, Austin-Phillips S, Buell CR, Helgeson JP, Jiang J**, 2003. Gene RB cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 9128–9133.
- Staskawicz BJ, Ausubel FF, Baker BJ, Ellis JG, Jones JDG**, 1995. Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* **268**, 661–667.
- Staswick PE, Su WP, Howell SH**, 1992. Methyl jasmonate inhibition of root-growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6837–6840.
- Staswick PE, Yuen GY, Lehman CC**, 1998. Jasmonate signalling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. *Plant J.* **15**, 747–745.
- Stepanova AN, Alonso JM**, 2005. Ethylene signaling pathway. *Sci. STKE Issue 276* p. cm3.
- Subbarao KV, Chassot A, Gordon TR, Hubbard JC, Bonello P, Mullin R, Okamoto D, Davis RM, Koike ST**, 1995. Genetic relationship and cross pathogenicities of *Verticillium dahliae* isolates from cauliflower and other crops. *Phytopathology* **85**, 1105–1112.
- Supek F, Supekova L, Nelson H, Nelson N**, 1997. Function of metal-ion homeostasis in the cell division cycle, mitochondrial protein processing, sensitivity to mycobacterial infection and brain function. *J. Exp. Biol.* **200**, 321–30.
- Tabara H, Sarkissian M, Kelly WG, Fleenor J, Grishok A, Timmons L, Fire A, Mello CC**, 1999. The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* **99**, 123–132.
- Tagu D, Walker N, Ruiz-Avila L, Burgess S, Martinez-Izquierdo JA, Leguay JJ, Netter P, Puigdomènech P**, 1992. Regulation of the maize HRGP gene expression by ethylene and wounding mRNA accumulation and qualitative expression analysis of the promoter by microprojectile bombardment. *Plant Mol. Biol.* **20**, 529–38.
- Tang G, Reinhart BJ, Bartel DP, Zamore PD**, 2003. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev* **17**, 49–63.
- Tao Y, Xie Z, Chen W, Glazebrook J, Chang H-S, Han B, Zhu T, Zou G, Katagiri F.,** 2003. Quantitative nature of *Arabidopsis* responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell* **15**, 317–330.
- Terras FRG, Eggermont K, Kovaleva V, Raikhel NV, Osborn RW, Kester A, Rees SB, Torrekens S, Leuven FV, Vanderleyden J, Cammue BPA, Broekaert WF**, 1995. Small cysteine-rich antifungal proteins from radish, their role in host defense. *Plant Cell* **7**, 573–588.
- Thaler JS, Owen B, Higgins VJ**, 2004. The role of the jasmonate response in plant susceptibility to diverse pathogens with a range of lifestyles. *Plant Physiol.* **135**, 530–538.
- Thatcher LF, Anderson JP, Singh KB**, 2005. Plant defence responses, What have we learnt from *Arabidopsis*. *Funct. Plant Biol.* **32**, 1–19.
- Thevissen K, Warnecke DC, Francois IE, Leipelt M, Heinz E, Ott C, Zähringer U, Thomma BPHJ, Ferket KKA, Cammue BPA**, 2004. Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. *J. Biol. Chem.* **279**, 3900–5.
- Thomas CL, Jones L, Baulcombe DC, Maule AJ**, 2001. Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *Nicotiana benthamiana* using a potato virus X vector. *Plant J.* **25**, 417–425.
- Thomma BP, Cammue BP, Thevissen K**, 2002. Plant defensins. *Planta* **216**, 193–202.
- Thomma BP, Cammue BP, Thevissen K**, 2003. Mode of action of plant defensins suggests therapeutic potential. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* **3**, 1–8.
- Thomma BP, Eggermont K, Penninckx IAMA, Mauch-Mani B, Cammue BPA, WF Broekaert**, 1998. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 15107–11.

- Thomma BP, Eggermont K, Tierens KF, Broekaert WF**, 1999. Requirement of functional ethylene-insensitive2 gene for efficient resistance of Arabidopsis to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* **121**, 1093–102.
- Thomma BP, Nelissen I, Eggermont K, Broekaert WF**, 1999. Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. *Plant J.* **19**, 163–71.
- Thomma BP, Penninckx IAMA, Cammue BPA, Broekaert WF**, 2001. The complexity of disease signaling pathways in Arabidopsis. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 63–68.
- Thordal-Christensen H**, 2003. Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 351–357.
- Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei Y, Collinge DB**, 1997. Subcellular localization of H₂O₂ in plants, H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley–powdery mildew interaction. *Plant J.* **11**, 1187–1194.
- Tieman D, Klee H**, 1999. Differential expression of two novel members of the tomato ethylene-receptor family. *Plant Physiology* **120**, 165-172.
- Tieman DM, Ciardi JA, Taylor MG, Klee HJ**, 2001. Members of the tomato LeEIL EIN3- like. gene family are functionally redundant and regulate ethylene responses throughout plant development. *Plant J.* **26**, 47–58.
- Tieman DM, Taylor MG, Ciardi JA, Klee HJ**, 2000. The tomato ethylene receptors NR and LeETR4 are negative regulators of ethylene response and exhibit functional compensation within a multigene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **97**, 5663-5668.
- Tijsterman M, Ketting RF, Plasterk RHA** 2002. The genetics of RNA silencing. *Annu Rev Genet.* **36**, 489–519.
- Tjamos EC**, 1989α. *Problems and prospects in controlling Verticillium wilt*. In **Tjamos EC, Beckman C**, Eds., *Vascular Wilt Diseases of Plants*. Springer, Berlin, p. 51 – 94.
- Tjamos EC**, 1989β. *Problems and prospects in controlling Verticillium wilt*. In *Vascular Wilt Diseases of Plants* **Tjamos EC and Beckman C**, eds., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 441-478.
- Tjamos EC, Paplomatias EJ**, 1988. Long term effect of soil solarization in controlling Verticillium wilt of globe artichokes in Greece. *Plant Pathology* **37**, 507-515.
- Tjamos SE, Fliemetakis E, Paplomatias EJ, Katinakis P**, 2005. Induction of resistance to *Verticillium dahliae* in *Arabidopsis thaliana* by biocontrol agent K-165 and pathogenesis-related proteins gene expression. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **18**, 555-561.
- Ton J, Davison S, vanWees SC, Van Loon L, Pieterse CM**, 2001. The Arabidopsis isr1 locus controlling rhizobacteria-mediated induced systemic resistance is involved in ethylene signaling. *Plant Physiol.* **125**, 652–61.
- Ton J, Mauch-Mani B**, 2004. Beta-amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *Plant J.* **38**, 119– 30.
- Ton J, Van Pelt JA, Van Loon LC, Pieterse CMJ**, 2002. Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**, 27-34.
- Trujillo M, Kogel K-H, Huckelhoven R**, 2004. Superoxide and hydrogen peroxide play different roles in the nonhost interaction of barley and wheat with inappropriate formae speciales of *Blumeria graminis*. *Mol Plant Microbe Interact* **17**, 304–312.
- Tsuchisaka A, Theologis A**, 2004. Unique and overlapping expression patterns among the Arabidopsis 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase gene family members. *Plant Physiol.* **136**, 2982–3000.
- Turnage MA, Muangsan N, Peele CG, Robertson D**, 2002. Geminivirus-based vectors for gene silencing in Arabidopsis. *Plant J.* **30**, 107–114.
- Turpen TH, Turpen AM, Weinzettl N, Kumagai MH, Dawson WO**, 1993. Transfection of whole plants from wounds inoculated with Agrobacterium tumefaciens containing cDNA of tobacco mosaic virus. *J. Virol. Methods* **42**, 227–240.
- Tuzun S, Bent E**, 2005. *Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants*. Stuttgart, Germany, Springer Verlag.
- Tzeng DD, De Vay JE**, 1984. Ethylene production and toxicity of methionine and its derivatives with riboflavin in cultures of *Verticillium*, *Fusarium* and *colletotrichum* species exposed to light. *Plant Physiol.* **62**, 545–552.

- Uknes S, Mauch-Mani B, Moyer M, Potter S, Williams S, Dincher S, Chandler D, Slusarenko A, Ward E, Ryals J**, 1992. Acquired resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* **4**, 645–56.
- Unver T, Budak H**, 2009. Virus-Induced Gene Silencing, a Post Transcriptional Gene Silencing Method. *International Journal of Plant Genomics* **2009**, 1-8.
- Vallélian-Bindschedler L, Métraux J-P, Schweizer P**, 1998. Salicylic acid accumulation in barley is pathogen specific but not required for defense gene activation, *Mol. Plant–Microbe Interact.* **11**, 702–705.
- van Alfen NK**, 1989. Molecular bases for virulence and avirulence of fungal wilt pathogens. In, **Tjamos EC, Beckman C**, eds., *Vascular Wilt Diseases of Plants*. Springer, Berlin, p276–289.
- van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol J, Stuitje AR**, 1990. Flavonoid genes in petunia, addition of a limited number of copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* **2**, 291–299.
- van Loon LC**, 1997. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins, *Eur. J. Plant Pathol.* **103**, 753–765.
- van Loon LC, Bakker PAHM, Pieterse CMJ**, 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Phytopathol.* **36**, 453–483.
- van Loon LC, Geraats BPJ, and Linthorst HJM**, 2006 Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *TRENDS in Plant Science* **11**, 184-191.
- van Loon LC, Pennings GGH**, 1993. Involvement of ethylene in the induction of systemic acquired resistance in tobacco. In *Mechanisms of Plant Defense Responses*, **Fritig B, Legrand M**, eds., pp. 156–59. Dordrecht, Neth., Kluwer.
- van Loon LC, Rep M, Pieterse CM**, 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol* **44**, 135–162.
- van Loon LC, Van Strein EA**, 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **55**, 85-97.
- Vance V, Vaucheret H**, 2001. RNA silencing in plants—defense and counter defense. *Science* **292**, 2277–2280.
- Vander Molen GE, Labavitch JM, Strand LL and DeVay JE**, 1983 Pathogen- induced vascular gels, Ethylene as a host intermediate. *Physiologia Plantarum* **59**, 573-580.
- Vaucheret H, Beclin C, Fagard M**, 2001. Post-transcriptional gene silencing in plants. *J Cell Sci* **114**, 3083–3091.
- Verhagen BW, Glazebrook J, Zhu T, Chang HS, van Loon LC, Pieterse CM**, 2004. The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in Arabidopsis. *Mol. Plant Microbe Interact.* **17**, 895–908.
- Veronese P, Narasimhan ML, Stevenson RA, Zhu J-K, Weller SC, Subbarao KV, Bressan RA**, 2003. Identification of a locus controlling *Verticillium* disease symptom response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **35**, 574-587.
- Vidal S, León IP, Denecke JP, Tapio E**, 1997. Salicylic acid and the plant pathogen *Erwinia carotovora* induce defense genes via antagonistic pathways, *Plant J.* **11**, 115–123.
- Vidal S, Eriksson ARB, Montesano M, Denecke J, Palva ET**, 1998. Cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora* cooperate in the salicylic acid-independent induction of a plant defense response, *Mol. Plant–Microbe Interact.* **11**, 23–32.
- Vignutelli A, Wasternack C, Apel K, Bohlmann H**, 1998. Systemic and local induction of an *Arabidopsis* thionin gene by wounding and pathogens, *Plant J.* **14**, 285–295.
- Vijayan P, Shockey J, Lévesque CA, Cook RJ, Browse J**, 1998. A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis* *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 7209–7214.
- Voinnet O**, 2002. RNA silencing, small RNAs as ubiquitous regulators of gene expression. *Curr Opin Plant Biol* **5**, 444–451.
- Voinnet O, Baulcombe DC**, 1997. Systemic signalling in gene silencing. *Nature* **389**, 553.
- Voinnet O, Lederer C, Baulcombe DC**, 2000. A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* **103**, 157–167.
- Voinnet O, Vain P, Angell S, Baulcombe DC**, 1998. Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* **95**, 177–187.

- Wagner U, Edwards R, Dixon DP, Mauch F**, 2002. Probing the diversity of the *Arabidopsis* glutathione S-transferase family. *Plant Mol. Biol.* **49**, 515-532.
- Wang KLC, Li H, Ecker JR**, 2002. Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell* **14**, S131-51.
- Wang KLC, Yoshida H, Lurin C, Ecker JR**, 2004. Regulation of ethylene gas biosynthesis by the *Arabidopsis* ETO1 protein. *Nature* **428**, 945-50.
- Wang W, Hall AE, O'Malley R, Bleecker AB**, 2003. Canonical histidine kinase activity of the transmitter domain of the ETR1 ethylene receptor from *Arabidopsis* is not required for signal transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 352-57.
- Ward ER, Uknes SJ, Williams SC, Dincher SS, Wiederhold DL, Alexander DC, Ahi-Goy P, Metraux JP, Ryals JA**, 1991. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* **3**, 1085-1094.
- Wasternack C, Parthier B**, 1997. Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends Plant Sci.* **2**, 302-307.
- Waterhouse PM, Wang MB, Lough T**, 2001. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* **411**, 834-842.
- Weingart H, Voelksch B**, 1997. Ethylene production by *Pseudomonas syringae* pathovars in vitro and in planta. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 156-61.
- Wendehenne D, Durner J, Klessig DF**, 2004. Nitric oxide, a new player in plant signalling and defence responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**, 449-55.
- Wesley SV, Helliwell CA, Smith NA, Wang MB, Rouse DT, Liu Q, Gooding PS, Singh SP, Abbott D, Stoutjesdijk PA, Robinson SP, Gleave AP, Green AG, Waterhouse PM**, 2001. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J* **27**, 581-590.
- Wessels JGH, Sietsma JH**, 1981. Fungal cell walls, a survey, in Encyclopedia of Plant Physiology. Plant Carbohydrates II, Vol. 13B, **Tanner W, Loewus FA, eds.**, Springer Verlag, Berlin, 352.
- Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausebel FM**, 2001. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* **414**, 562-565.
- Wilkinson JQ, Lanahan MB, Yen H-C, Giovannoni JJ, Klee HJ**, 1995. An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by *Never ripe*. *Science* **270**, 1807-1809.
- Woeste K, Ye C, Kieber JJ**, 1999. Two *Arabidopsis* mutants that overproduce ethylene are affected in the posttranscriptional regulation of ACC synthase. *Plant Physiol.* **119**, 521-30.
- Woeste KE, Kieber JJ**, 2000. A strong loss-of-function mutation in RAN1 results in constitutive activation of the ethylene response pathway as well as a rosette-lethal phenotype. *Plant Cell* **12**, 443-55.
- Woltering EJ, Balk PA, Nijenhuis-Devries MA, Faivre M, Ruys G, Somhorst D, Philosoph-Hadas S, Friedman H**, 2005. An auxin-responsive 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase is responsible for differential ethylene production in gravistimulated *Antirrhinum majus* L. flower stems. *Planta* **220**, 403-13.
- Wu K, Tian L, Hollingworth J, Brown DC, Miki B**, 2002. Functional analysis of tomato Pti4 in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **128**, 30-37.
- Xu Y, Chang P, Liu D, Narasimhan ML, Raghothama KG, Hasegawa PM, Bressan RA**, 1994. Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell* **6**, 1077-1085.
- Yanagisawa S, Yoo SD, Sheen J**, 2003. Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signalling in plants. *Nature* **425**, 521-25.
- Yang Z, Tian L, Latoszek-Green M, Brown D, Wu K**, 2005. *Arabidopsis* ERF4 is a transcriptional repressor capable of modulating ethylene and abscisic acid responses. *Plant Mol. Biol.* **58**, 585-96.
- Yarwood CE**, 1960. Localized acquired resistance to tobacco mosaic virus. *Phytopathology* **50**, 741-744.
- Yokotani N, Tamura S, Nakano R, Inaba A, Kubo Y**, 2003. Characterization of a novel tomato EIN3-like gene LeEIL4. *J. Exp. Bot.* **54**, 2775-76.
- Yu H, Kumar PP**, 2003. Post-transcriptional gene silencing in plants by RNA. *Plant Cell Rep* **22**, 167-174.
- Yu H, Xu Y, Tan EL, Kumar PP**, 2002. AGAMOUS-LIKE 24, a dosage-dependent mediator of the flowering signals. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 16336-16341.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Yu IC, Parker J, Bent AF**, 1998. Gene-for-gene resistance without the hypersensitive response in *Arabidopsis dndl* mutant. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 7819–7824.
- Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP**, 2000. RNAi, doublestranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **101**, 25–33.
- Zhen XH, Li YZ**, 2004. Ultrastructural changes and location of beta-1,3-glucanase in resistant and susceptible cotton callus cells in response to treatment with toxin of *Verticillium dahliae* and salicylic acid. *J. Plant Physiol.* **161**, 1367-1377.
- Zhou D, Kalaitzis P, Mattoo A, Tucker M**, 1996α. The mRNA for an ETR1 homologue in tomato is constitutively expressed in vegetative and reproductive tissues. *Plant Molecular Biology* **30**, 1331-1338.
- Zhou D, Mattoo A, Tucker M**, 1996β. Molecular cloning of a tomato cDNA encoding an ethylene receptor. *Plant Physiology* **110**, 1435-1436.
- Zhou J, Tang X, Martin GB**, 1997. The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a cis-element of pathogenesis-related genes. *EMBO J.* **16**, 3207–18.
- Zilberman D, Cao X, Jacobsen SE**, 2003. ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science* **299**, 716–719.
- Zimmerman P, Hirsch-Hoffman M, Hennig L, Gruissem W**, 2004. GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol.* **136**, 2621–32.
- Zipfel C, Robatzek S, Navarro L, Oakeley EJ, Jones JDG, Felix G, Boller T**, 2004. Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature* **428**, 764–767.
- Zoubenko O, Uckun F, Hur Y, Chet I, Tumer N**, 1997. Plant resistance to fungal infection induced by nontoxic pokeweed antiviral protein mutants. *Nat. Biotechnol.* **15**, 992–996.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

cttgacagttgacccccaggcttgctctataaattagggcgttaaatggaatgattaaaacatatcattttcacagaatcatagaaaaatcaaga
aaATGTCCTGAATCAAGGAGCTTAGCCTCACCACCAATGTTGATGATTCTTCTCAGCCTTGTAATAGCT
TCCTTCTCAACCACACAGgttcagtcacatcttaagctatgtaacatcttaacatctccatctccacaaattattcaatgattctt
attinggaaaatgaagCTGGACAAATCGGAGTATGCTACGGGATGCTAGGCGATACCTTGCCAAGTCCATC
GGACGTTGTGGCTCTTACAAACAACAAAACATCCAGCGAATGCGGCTCTACGGCCCTGACCCAG
GCGCTCTTGCCCTCTCTCCGTGGCTCTGACATCGAGCTCATCCTCGACGTTCCAGTTCCAGATCTTG
AACGTCTCGCCTCCAGTCAAACGGAGGCCGACAAGTGGGTTCAAGAAAACGTTCCAGAGCTACAGA
GATGGTGTGAGATTCGGGTACATCAACGTTGGAAATGAGGTGAAACCTCAGTTGGGGGGTTTCTC
TTACAAGCAATGCAGAACATCGAGAACGCGGTTTCTGGAGCAGGGCTTGAAGTCAAGGTCTCAACA
GCTATAGCCACTGACACCACCTGATAGCTCTCCTCCGTCTCAAGGAAGTTTCCAGGGATGAGTAT
AAGAGCTTTCGAAACAGTATAGGTTTCTTGCAAGCAAGCAATCCTCCCTGCTCGTGAATCTCT
ACCCTTACTTCAGCTACATGGGAGACACGGCCAACATCCATCTAGACTACGCTCTGTTACCGGCC
AGTCCACTGTTGATAACGATCCAGGGTACTCATACAAAACCTATTCGACGCAATCTCGACTCGGT
TTATGCAGCATTGGAGAAATCAGGGGGCGGATCGTTGGAAATCGTGGTGTCCGAGACCGGTTGGC
CCACAGAGGGAGCAGTCGGGACGAGTGTGAAAACGCAAGACTTATGTTAAACAATTTGATACAAC
ATGTGAAGAATGGATCACCCGAGAAGGCCAGGGAAGCTATAGAGACTTATATATTCGCTATGTTCCG
ATGAGAATAAGAAGGAACCAACGATGAGAAGTTTTGGGACTGTTTCATCCAGATCGACAGTCTA
AGTATGAAGTTAATTTCAACTAActcttagagactgtgggctttatgtaagcgtatataaaatgggaactgtgtgtagtaataagga
ataatgagcgttcagcgtgtagtatgtttatgtaaggtataaatgagctgcaagcataaataaggaaaaaaatagcatgggctatag
ccaataataaacaagctgctt

Primers

PR2 up: GCTCTCCGTGGCTCTGACATC

PR2 dn: TACCGGAATCTGACACCATCTCTG

***A. thaliana* PR3 (AT3G12500)**

ccatagaacattgaacaaaATGAAGACTAATCTTTTTCTCTTTCTCATCTTTTCACTTCTCCTATCATTATCCT
CGGCCGAGCAATGTGGTCGCCAAGCTGGAGGAGCACTCTGCCCAACGGTCTATGCTGCAGCGA
GTTCCGGCTGGTGCAGTAACACCGAACCTACTGTAAGCAGCCTGGCTGCCAAAGCCAGTGCACCTC
CCGGTGGTACTCCTCCTGGACCCACCGGCGATCTTTCCGGGCATCATTCAAGTTCTCAGTTCGATG
ATATGCTTAAGCATAGGAATGATGCCGCTGTCTGCTAGAGTTTCTACACTTACAACGCTTTAT
CACCGCTGCAAAGTCCCTCCCGGTTTTGGCACCACCGGAGACACCGCCACGAGGAAGAAGGAG
GTCGCGCCTTCTTCGGCCAGACTTCCCATGAAACTACAGgtaccacaaactcattaacaattgacggagattgttc
aaaacacaattgcaaatgttggtttattataaaacatcagaattggaagtctttttctctgtaagagtttgatccaagtgtcatatatacaaa
gaactatactatataatataatataatataatgtttattgaaaaatataagcttcatataggaaacgaagaaaaaaatcaaaacaaa
aacgcaaacgcaagaaaaatgttgcttagatgttgctttacaataaaaaactatataaaatgaaatcttgatatacctaaaccgaa
ataaccaatcaaggaaactacGAATATCCAGTTTCCAAATTATACACTTTTGAATaatgtcaagtttgagttgactata
tatatagctataactaattaagtgacggttacgtcgtcagGTGGATGGGCTACAGCACCGACGGACCATATTCA
TGGGGCTACTGTTTCAAGCAAGAACAGAATCCTGCTTCAGACACTGTGAAACCGAGCGCCCGCTGG
CCATGCGCATCTGGCAAACGCTACTACGGAAGAGGACCAATGCAACTGTCTGGAACCTACAATTAC
GGTCTATGCCGTAGAGCAATAGGAGTTGACTTACTCAACAACCCTGACCTTGTGGCCAAACGACGCA
GTGATCGCTTCAAAGCCGCGATTTGGTTCTGGATGACTGCTCAGCCTCCCAAACCGTCTTGCCAT
GCCGTGATAGCCGGCCAGTGGCAGCCTTACAGCAGCCGACCGTCCCGCCGGGAGATTACCGGGTT
ATGGAGTGATTACGAACATCATTAACGGTGGATTGGAGTGTGGACGTGGCCAAGACGGGAGAGTC
GCCGATCGTATAGGTTTATCAGAGGTATTGTAACATATTTGGTGAATCCTGGTGGTAACTCTTG
ATTGTTACAACCAAGATCCTCTGTTAACGCGCTCCTCGAAGCTGCTATTAGtaacgagagttattattata
atataatcgcagcctgtattatacaaaacataatcagactaataaaactcttccaatgatgttccactgtttatgttgcgattttattccc

Primers

PR3 F: 5'-TTATCACCGCTGCAAAGTCCT-3'

PR3 R: 5'-TGGCGCTCGGTTACAGTA-3'

***A. thaliana* PR4 (AT3G04720)**

agaccaccaagaaaacaaagactatcagatcATGAAGATCAGACTTAGCATAACCATCATACTTTTATCATAACACA
GTGGCTACGGTGGCCGGACAACAATGCGGTCGTCAAGGCGGTGGTCAACTTTGCCCGGTAACAT
CTGCTGCAGTACGTTACTGTGGTACCACCGCGGACTACTGTTCTCCGACCAACAACCTGTCA
GAGCAATTTGGGGAAAGTGGCCCTAGCGGACCAGGGGAGAGCGCGTCAACGCTACGCGCCACC
TACCATTCTATAATCCGGGCGCAGAATAATGGGATTTGAGAGCCGTGAGTGTCTATTGCTCCACGT
GGGATGCTGATAAGCCGTACGCATGGCGGAGCAASTATGGCTGGACGGCTTCTGCGGGCCGGC
AGGACCTCGTGGTCAAGCTCTTTCGGCAAGTGTAAAGGtaagtaataatcttttccaatcttatataagat
gtttgtgcaaaaggagatcatatagaaagtgtggaattaagcgaatacaagataaaattgtaccattaccaacgcaacggttagtgaata
ttcaaaagatgatagcggtaaaaaattgtgattaaccggtgggtataaatggattcagGTGAAGAACAACAAGAAACAAATGCTGC
AGTAACTGTGAGAATAGTGGACCAATGCAGCAACCGGAGGCTTGGATTTGGATGTAGCAATGTTCAA
TCAAATAGACACCGATGTTTTGGCTATCAACAAGGCCATCTCATTGTTGACTACCAATTTGTCGAC
TGTGGCAATGAGCTCATTGGGCAGCCTGATTCCAGAAACATGCTTGTTCGGCCATTGATCGCGTT
TGAattatgtaaatgttgaggtcaatcagatcgtctacataaaataaaagaccgctatataatgttgcgagggatataatgttctgatca
ataaggaaaatttaaatattatcatt

Primers

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

tcagcgtctctttgtctctctgctttttctctctctcagagattcgaagctttttgtctcccctgagtaaccaaatcaATGCGCGACGATT
GGGATCTCCACGCCGTAGTCAGAGGCTGCTCAGCCGTAAGCTCATCAGCTACTACCACCGTATATT
CCCCCGGCGTTTCATCTCACACAAACCCTATATCCACCGTCGGACGACAAAGTAATGCCGTCTCCT
TCGGAGAGATTCCGAGATCTCTACACACCGTTCACACAGAATCTGTCTGCTCTCTCGTTTTCTGTAT
AAACTACCCAGAAGAACCTAGAAAGCCACAGAACCAGAAACGTCTCTTTCTCTCTCTGCTTCTCC
GGTAGCGTCACTAGCAAAACCCAGTGGCTCCAATACCTCTAGATCTAAAAGAAGgtctgtttctcaccatcttcc
gataaagttaaaccctttgtcaaacccatcaacaagttacgaaatctgtgaattaatcaaaattccgaatttctgtatagaaatggttaaagctc
caattttgtcgaaccatcaaatgattgaatcaagaaggctaaaataaaagctctgttttatttgggtgttctacagAAAGATACAGCA
TAAGAAAAGTGTGCCATGTAGCAGCAGAAGCTTTAACTCCGATGTCTGGGCATGGCGAAAAGTACGG
ACAGAAAACCCATCAAAGGTTACCATATCCAAGgtaaaaccccccaaaattaccagaaaaaaagtcaattattgagtta
taaatgtgtattcttcaagcaaaaagaacctgtctgttttggattctgtctgatttgggtgttaaattattctgcgtacattttgttaaaggattct
aattaattctcattttatgaaaacagAGGATACTACAGATGTAGTACATCAAAGGTTGTTTAGCCCGTAAACAA
GTGGAGCGAAATA GATCCGACCCGAAGATGTTTATCGTCACTTACACGGCGGAGCATAATCATCCA
GCTCCGACACACCGTAATTCTCTCGCCGGAAGCACACGTCAGAAACCATCCGATCAACAGACGAGT
AAATCTCCGACGACCACTATTCTACTATTCTATCTCTCCGGTCACTTACAGCCGACGAATTTGTT
TGCTGTGTGAGGATCATCTAGCGGTGGGAGATCTTGACGGAGAAGAAGATCTGTTATCTTTGTCCG
ATACGGTGGTTAGCGATGATTTCTTCGATGGGTTAGAGGAATTCGCAGCCGGAGATAGCTTTTCCG
GGAATCGGCTCCGGCGAGTTTTGATCTCTTTGGGTTGTGAACAGTGCCGCCACTACCACCGGA
GGAATA TGAattgattacgacggcttagaataactctattaggacagatttataggattaaggaattattctcgggacatgtaaaaataggat
aaagaaaaatgtctttgactttttcgggtttctctattgtttctaaacatctagaaaaaattaatgtattcttaagctcgcatacatctgtttaa
ctcagatcagattactatggagttatggtctct

Primers

WRKY22 F.: CCCGTAAACAAGTGGAGCGAAATA
WRKY22 R.: CACCGGAGACGATGAATAAGTAGC

***A. thaliana* WRKY33 (AT2G38470)**

aaacttcattttctgATGCTGCTCTTTTCTTACAATGGACAATAGCAGAACCAGACAAAACATGAATGGT
TCTGCTAATTGGTCACAACAATCCGGAAGAACATCTACTTCTCTTTGGAAGATCTTGAGATACCAA
AGTTCAGATCTTTTGTCTCTTCTTCAATCTCTATCTCTCCTTCTTGTCTCTCCTTCCACTTGTTTCA
GTCCCTCTCTTTTCTCGATTCCCCTGCTTTTGTCTCCTCTGCTAACgtaagcctctctgtttttctctgtttctt
tgaaatgaatccaattagtgatgataatctgtttgtatcattgatttaacatctgacaatgaaatgctgacggaagtgaatgattgggtcaa
cggttcaagagagagagaagacttttagatcactctcgcactcttcttaattatgtattgtctattgtctctttctgaagctgacaactctgggatt
gtttgagGTTCTAGCTTCTCCAACCACAGGAGCTTTAATCAAAAACGTAACCTAACCAGAAAAGGTATAA
ATGAAGGAGACAAGAGCAACAACAACAACCTTTAATCTTTCGATTTCTCATTCCACACACAATCATCA
GGAGTTTCTGCTCCGACCAACTACAACCTACAACCTACAACCTACAACAACAACAACCAAGTTCTATCT
TTCAATCTCAGgtatgtactcatcaacagctcaaatcctctgttatgagttttctataactgtttgagttcagGAACAACAGAAGA
AGAACCAGTCAGAACAATGGAGCCAAACCGAGACTCGTCCAACAATCAAGCTGTATCTTACAATG
GAAGAGAGCAAAGGAAAGGAGAGGATGGTTACAATGGAGAAAGTACGGACAAAAACAGGTGAAA
GGAAGTGAGAATCCTCGGAGTTACTATAAGTGTACTTTCCCTAATTTGCAAGCAAGAAGAAAGT
GAGAGATCTTTGGAAAGGTCAGATCACAGAGATTGTGTATAAAGGAAGCCACAACCCTCAAACT
CAGTCTACTAGAAGATCTTCTTCTGCTTCTTCTGACTTTTCACTCAGCTGTGTACAATGCCAGTTTGG
TCATAATCGTCAAGCTTCTTCTGATCAGCCTAATCCAATAATAGCTTTCATCAGTCTGATTCCTTTG
GGATGCAACAAGAGGATAAATACTACTTCTGATTCTGTTGGTGACGATGAGTTCGAACAAGGCTCAT
CGATTGTGACGAGACGAAGAAGATTGTGGGAGTGAACCTGAAGCAAAGAGATGgtacagatcatcatc
accctcaaatgtctactcttgaacaactctgaaatgaaagttcaaatgtatgtttttgtgtttcagGAAAGGGACAATGAAACA
AATGGTGGGAATGGTGGTGAAGCAAGACAGTGAGAGAGCCGAGAATCGTAGTGCAGACAACGAG
TGATATTGACATTCTTGACGACGGTTACAGATGGAGAAAATACGGCCAGAAAAGTCGTTAAGGGAAA
CCCAATCCAAgtaataacataaacaattgtgcatctcaataactcagaataaggtcttgagaatctgacctttgtttctttcattgtctga
atcctaacagAAGCTACTACAAGTGCACAACCATCGGTTGTCCAGTGAGGAAACATGTGGAGAGAGCAT
CACACGACATGAGAGCAGTAATCACAACTACGAAGGGAAACACAACCACGATGTTCTGCGACTC
GTGGTAGCGGTTACGCCACAACAGAGCACCACAGGATTCTGCTTTCAGTCCCGATTAGACCAGCT
GCTATTGCTGGTCACTCCAACCTACACTACTTCTTCTCAAGCACCATATACACTTCAGATGCTGCACA
ACAACAACACTAATACCGGGCCTTTTGGTTACGCCATGAACAACAATAACAACAACAGCAACCTTCA
AACGCAACAAAACCTTTGTTGGTGGTGGATTCTCTAGAGCAAAGGAAGAACCACCAACGAGGAGACCTC
ATTTTTCGATTCGTTTATGCCG TGAagaaaaaggaaccagttgtctttttatgtctctttgtacattctgccaccaagattta
ctactactagttatctcgcagatagtaagtgcagactctatagctatagagaaattttctattgtttttcacacgcctgtaatatgttaattgttact
ttgtaccatagaactagaacacggaataaaaccaatcaattttcagtttctc

WRKY33 F.: AGTACGGACAAAAACAGGTGAAA
WRKY33 R.: TCGTTGGACAATTAGGGAAAGT

***A. thaliana* WRKY40 (AT1G80840)**

aacaatcccaccattaaaaagaagaaccaagatcgactcttacttgaatctctctcaactttctctcagcttaccggaactccacacatata
catccacaagaaccatcatggaagattcatcctcatatattacATGGATCAGTACTCATCCTCTTTGGTCCGATACTTCA
TAGATCTCACTATTGGCGTTACTGTGCGGATGGAAGAAGATCCACCGgtacgcttctcagattctcattct
ccacatgttcagaaatctcaattatcatgagccttttaactagatctcattatgtattatacacttacattttcaatcgggtgtttgaaatatata
aactaaccaactatccatagacatcttttcagatgtataactataaacatagatattttctatactcacaatatatttatataattgcatataacttt

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

aacaacaagaaaaattcgtagtaattcatgtggtggtcttgaatatagatgtaacgtagatcataaaatcatataaacttagatgaagaa
aataatagtggtactaactctcatgcaatatatatatatatatataatgataaattgcagACAAGTGCTTTGGTGGGAAGAA
TTAAACCGAGTTAGTGCTGAGAACAAGAAGCTCTCGGAGATGCTAACTTTGATGTGTGACAACCTACA
ACGCTTTGAGGAAGCAACTTATGGAATATGTTAAACAAGAGCAACATAACCGAGAGGGATCAAAATCA
GCCCTCCCAAGAAACGCAAATCCCCGGCGAGAGAGGACGCATTGACTGCGCGGTTATTGGCGGA
GTGTCGGAGAGTAGCTCAACGGATCAAGATGAGTATTTGTGTAAGAAGCAGAGAAAAGAGACTGTC
GTGAAGGAGAAAGTCTCAAGGGTCTATTACAAGACCGAAGCTTCTGACACTACCCTCgtaagcattcatga
aaatgatcaaacctggtatctatctcttagaaactttatgtggttactgattgtagaagtggttcttagGTTGTGAAAGATGGGTA
TCAATGGAGGAAATATGGACAGAAAGTGACTAGAGACAATCCATCTCCAAGAGCTTACTTCAAATGT
GCTTGTGCTCCAAGCTGTTCTGTCAAAAAGAAgtaattgataaagaaaaaaactgactctgcttaaaatgaattggc
ataatacaaaattgatagacttaaatcgatttgatcctgtgttcttattcagGTTTCAGAGAAGTGTGGAGGATCAGTCCGT
GTTAGTTGCAACTTATGAGGGTGAACACAACCATCCAATGCCATCGCAGATCGATTCAAACAATG
CTTAAACCGCCACATCTCTCATGGTGGTTCAGCTTCAACACCCGTTGCAGCAAACAGAAGAAGTAG
CTTCACTCTGCGGCTGACTACCGTAGATATGATTGAATCGAAGAAAGTGACGAGCCCAACGTCGAAG
AATCGATTTCCCAAGTTCAGAACTTTGGTGGAGCAAATGGCTTCTTCTTAACCAAAGATCCT
AACTTTACAGCAGCTTTAGCAGCAGCTGTACCAGAAAATTGTATCAACAGAATCATACCGAGAAA
AGtttagctcaaatccgtagagtttagattggaattgcatgagtaagagaaagagtagattataatccattgtagactgaaaatgaacat
gtaatcgtttcatacaatcctaatacattcggcttagaaa

Primers

WRKY40 F.: GCTTAAACCGCCACATCTCT

WRKY40 R.: GTAGTACCGGCACAGTCAAG

A. thaliana WRKY53 (AT4G23810)

aatctataacactctcaattctcatcatatcattctcaatctataaccattcttaataactcaacacacattataatttctgatcatatcattttcagt
ccatctataaacaattctgattataacttaaaacacacattatacatcttctcatatagttgtatcaatttctagagtaaacctacctaagga
aaaaaatctattttgggaatcatataactaaaATCGAAGGAAGAGATATGTTAAGTTGGGAGCAAAAAGACATTGCTA
AGCGAGCTTATCAATGGATTTGATGCGGCCAAAAAGCTTCAGGCACGACTTAGAGAAGCTCCGTCG
CCGTCGTCATCTTTTATCACCGGCGACGGCTGTTGCTGAGACTAACGAGATTCTGGTGAAGCAG
ATAGTTTCTTCTACGAGAGATCTCTTCTTCTGCTAAACTGGTCATCCTCACCGAGCGTACAACCTA
TTCCGACCGCGTTACTGTAGTCCCGGTGGCAAATCCCGGCAGTGTCCAGAATCTCCGGCATCG
ATAAACGGAAAGCCGAGAAAGTGAAGAGTTTCCGATGGAGGAGTTCTAGCCGAGATCATCATCG
CCAAGATTACATTTTCAATTCAAAGAAAAGgtaacaattgtgatctttttcacaattcaccaaatgaatttaaaatctcatt
ttctagaactaattgaaattgggtaatttgcagAAAGATGTTACCAAAGTGGTCAGAAAAAGTGAGAATAAGCCC
AGAGAGAGGCTTAGAAGGACCTCAAGATGATGTCTTACGCTGGAGAAAAATATGGTCAAAAAGACAT
TTTAGGCCCAAATTTCCCAAGGAGTTATTACAGATGCACACATCGTAGCACACAAAAGTGTGGGC
AACGAAACAAGTCCAGAGATCAGACGGGGATGCTACGGTTTTGGAAGTGACGTACAGAGGAACAC
ACACTTGTTCGACGGCGATCACAAGAACACCACTTACAGTTCAGGCTGCGGAGAGAAGCGACAAGACACC
AGAGTCAAACCGCCATTACCCAAAAGCCAAAGGATATTCTCGAGAGTCTTAAATCCAACCTAACCG
TTCGAACCGATGGGCTTATGATGGTAAAGACGTTTTCTCGTTCCCTGATACGCCCGGCTTTTACAA
TTACGGAACCTCAACGCGAGTTCGCCCACGTGAGAGTTCTCCGATCTTCCGACTTTCGACTG
GTTCAATCCAACGGTCGAGATTGACACAACCTTCCCGCGTTTTTACACGAGTCGATTTATTATTAAT
aaaattgtaacagagaaatagatagtaactagtaagtaagatgacgagagtaaaacataaaagtacttagaatacactacagatcataat
aagggaattgtaacaggactgaaatgatttcaactaagagagattat

Primers

WRKY53 F.: CAGACGGGGATGCTACGGTTTTTC

WRKY53 R.: CGGCGAGGCTAATGGTGGTGT

A. thaliana WRKY60 (AT2G25000)

tccttagcaattatgaattggtcttgcgtataatctcaggttacataaattggtcctgtgaacctaaattATGGACTATGATCCCAACA
CCAATCCGTTCCGACCTTCAATTTCTCCGGTAAACTTCCGgtgagtttcaatttctcgaaaatttcaactcaatttgcagggtg
tggtgattatcggtggtcatatataatttgcctgatttagAAAAGAGAAGTCTCGGCTTCACTTAAAGTTGTAGAG
AAGAAATGGTTAGTGAAAGATGAGgttagtcttcatcgaacacttgggtgcaatacttggactcaaaatlttgactatgagtaa
tggattaggtgatcaagttctcatatctgatttagacattgaatggtttagatcggtgatgctcaaaagtgaaacaatcaagcttgtcttacag
ctagttggtaattggtgatttctatttacagAAGAGAAATATGCTACAAGATGAAATAAACCGGGTTAATTCCGGAG
AACAAAGAGCTAACCGAAATGTTAGCAAGAGTCTGTGAGAAGTACTATGCTCTTAAATATCTTATGC
AGGAGTTGCAGAGTCGAAAGAGTCTGAAAGTGTTAAGTTTCAAGCAAAACAGCTAACCGGGGAAAC
GAAAACAAGAACTTATGAGTTTGTAGCTCCCAATTGGACTCAGTCTCGGACCAATCGAGAACAT
CACCACCGATAAAGCGACCGTTCAACCGCTTACTTTGCTGCTGAGAAGTCTGACACAAGCTTGgta
aggagatttctactacaagatcgttcttggatgattgattgtaacgaatggttggatatacgttactgtagACTGTGAAAGATGGAT
ATCAATGGAGGAAATACGGGCAAAAAGATTACGAGAGATAATCCATCTCCTAGAGCTTACTTACAGATG
CTCGTTTTACCGTCTTGTCTAGTCAAGAAGAAGgtacttggtttaaaacttggtaagagttcttgatcatcttgcgtctg
ataaattccctagttgtgtgctgctttagGTGCAACGAAGTGCAGAAGATCCATCTTTCTTGGTAGCCACTTAC
GAAGGGACACATAACCACACCGGACCACATGCAAGTGTGTCCAGGACAGTGAACCTTGTATGT
CAAGGTGGCTTGAACCGATTGAGGAAAAGAAAGAGAGAGGGACGATTCAAGAGTTTTGTGCA
ACAAATGGCTTCTTCTGTTGACCAAAGATCCTAAGTTCACTGCAGCTCTTGCAGTCTTATTTCCGGG
AGATTGATAGACATTCAAGAACATGAaagttctcagaacatgatatatttctgttttctatttctcattcctagtaaaaaggt

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

aaagattgttgatctgtaggaggcatagatgcaatttaatgtgtgtatataattacatcaaatcaagatccaaaagggtcacccccatt
tatctatgtgaaagattttgtatagctcgggtgaagatggtagattgacgctctcgacagttatgtatctccaatgtaictgtcagttgtgat
taactccattagagaagaatgtatgccattacagacataaa

Primers

WRKY 60 F: 5-'TAATCTTATGGAGGAGTTGC-3'

WRKY 60 R: 5-'ACCGTCGCTTTATCGTT-3'

A. thaliana VSP1 (AT5G24780)

atataataccacccttgtgtcacacaaataaacaccataaaactaacataaacaccatacaaaaaaatATGAAAATCCTCTCACTTT
CACTACTCTTGGCTCTTGGCCGCTACGGTCTCCCACGTCCAGTCTTCCGGCATCCGTTCCAGGGCTCA
TCGAACTCCTCGAATCGAACACCATCTTTGGGAACGAAGCCGAACCTTTAGAGAAAGAGGGACTGT
CCATCAACTACCCCAACTGCAGAAGCTGGCACCTTGGTGTGAGACCTCTAACATCATAAACTTCG
ACACGGTGCCCGCAAATTGCAAAGCCTATGTTGAAGACTACTTGATCACTTCCAAACAGTACCAATA
CGACTCCAAAAGTAAACAAAGAGGCATATTTTACGGCCAAAGSACTTGCCTAAAGAAGGATACC
GTCAATGTTGGATCTTTGACCTAGACGACACTCTCCTCTCTAGTATTCCCTACTACGCTAAATATG
GATATGGgtatatacatattatgtacctatcatgaattaataatattatgcctatagtttttgaagaatgttagctgcatatgtgaaagac
acgttcatttgacaacttaaatatttaactaacccatcaactgttttttgggtccatctactttgtgattcattcaatgtagattttttgttgaitct
agGACCGAGAACACAGCCCCGGGGCGTACTGGTCGTGGTTAGAGTCCGGAGAATCAACTCCAGG
ACTCCCGGAGACCTTGCATCTATACGAAAACCTCTTGGAACTCCGGATTGAACCCATCATAATCTCT
GACAGATGGAAAAAATTGTCAGAAGTCACTGTGAGAATCTCAAGGCTGTTGGTGTAAACAAAATGG
AAGCTCTCACTCAAGtaagaatcaagtagcttagttatataatagcaataatgcatatgtgattgaatcgaggactatata
ggaaacgcagGCCAAACGGATCGAAGTTGACGCAAGTGGTGTACAAGTCAAAGTTAGGAATAGCCTT
GTGAAGAAAGGGTACAACATCGTTGGGAATATTGGAGACCAATGGGCTGATTTGGTTGAGGATACT
CCTGGAAGGGTTTTAAGCTCCCAAATCCACTCTACTACGTACCTTCTTAAtaagcatctatctcatggcattgt
cccctgtatccattcatatctatgtcgtttcgtttatcttttagccgtttggcaccactgtctaaataaaatgccaatcctatcataactcaataagata
acgactctgtaactaaattgttttctgtaagggatcattaatcaagttccatgaaatg

Primers

VSP1 F: 5'-TTTTACGCCAAAGGACTTGC-3'

VSP1 R: 5'-AATCCCGAGTTCCAAGAGGT-3'

A. thaliana VSP2 (AT5G24770)

actcacatcaacatattcaatcatctttctagtaagttagacaactttacagtattctccaaaacgaaactcaattcaaaattacaagcagataag
ccaaagataatagaacaacaaaacgccaattctagtaagcacacaatctcaactgcaactaaaaacgagtggtgtaagtgaataatcgt
cgattataaacattatgggaccagtagcattgtgtcaccaatcgaaacagacaagcacacatctcctcattctcatctgcttcaatcattct
cataaccacacattataaataaccaccccttgcgtcacacataaaacatcacaacaaacataaaaccatacaaaaaaacATGAAA
ATCCTCTCACTTTCACTTCTTTGCTCTTGGCCGCTACGGTCTCGGCATCCGTTCCAGGGCTCATC
GAACTCGTCGATTGAAAACCATCTTTGGGAACGTAGCCGAACTCTTAGAGAAAGAGAAACTTTCC
ATCAACTACGCCAACTGCAGAAGCTGGCACCTTGGTGTGAGACCTCTAACATCATAGACTTCGAC
ACGGTGCCCGCAAATTGCAAAGACTATGTTGAAGACTACTTGATCACTTCCAAACAGTACCAATACG
ACTCCAAAACCGTGTGCAAAGAGGCTTATTTCTATGCCAAAGGACTTGCCTAAAGAACGACACCG
TCAATGTTTGGATCTTTGACCTAGATGATACCCTCTCTAGTATTCCCTACTACGCAAAATATGGA
TACGGgtatataatcagcataatcattatagttctaccacaccacccattgcattaacaatattatctcatatcttttttaatggttagatata
ctatagcagttccggtttttatataatattgcaactcaaatagttcagtagcactaaatgttttttcatatatactctctgtgattcatttga
actcctttttttgtgattctagAACAGAGAAGACCGACCCGGGGCGTACTGGTTGTGGTTAGGGACCGGA
GCATCAACCCCTGGACTCCCGGAGGCCTTGATCTTTACCAAAACATCATAGACTCGGGATTGAA
CCCATCATACCTCAGTGACCGTTGGAAGTTGCGAAGAATGTCACTCTCGACAATCTCGAAGCTGCT
GGCGTGACCTACTGGAAGCATCTCATATTGAAtaagaatcaagtagttagttatagtaattaataaataatagatc
atatagtgattgaatcaaggactaaatggaatgtagGCCTAATGGTTCGAAGTTGAGGCAAGTGGTGTACAAGTC
AAAGGTGAGGAAGAGTCTCGTGAAGAAAGGATACAACATCGTTGGCAATATCGGAGATCAATGGGC
TGATTTGGTTGAGGATACCCTGGGAGGTTTTTAAGCTCCCAAATCCACTCTACTACGTACCTTCT
TAAgaatctatctcatcgcattgtcccctgtatacctcatatctatgtcgtttcgtttatcttttagccgtttggcaccgctgcataaataaagtct
atcctatcgtactaataaagtaacaagactcgtactaaatgtttttcttaaggggtcattaatagtgccatgaaatgatattcaccatgtaa
atcaatacaatgaaaagtataaattgaaactg

Primers

VSP2 F: 5'-TCAGTGACCGTTGGAAGTTGTG-3'

VSP2 R: 5'-GTTCAACCATTAGGCTTCAATATG-3'

A. thaliana ERF1 (AT5G50080)

gacaacttattccatataaaactagtcaagcctcaagagagaccacattccgaaaagactgtttatgtgttattcatcgtcgtcaaggtg
caaaccaaggagaacaagaagagtcaggcccaatgagcctgagggtatcaaatcagtgattgatgacatctacattttgaaagacgacctgt
ggttgataggttcaataggtttggcagcagATGTCTGCCATGGTCTCGGCCCTTGACACAGGTGGTTTCTGCTCGC
TCTCAGACTGAGGCTGAAGgtgctcactctcagactgaggctgaagGTGCTCACTCTTCTCTCTCGGCTGG
ACATAAAAGAGGATGGCTTGAATCGATTCTGCTCCTATTCCCTCATCATTTGCTCGTGTAGACTCT
TCACATAATCCGATCGgtgagctagatgttacattcgtgaaccgtctctatagcttttattttgatagtgctgtctctgaaatattgtctaa
acatggactcaacatcacaagacaagaataaattgttaattgttctgtctgattaaaacaaaaaataacacgcaaatcataaaagaa

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

CTTCTTGGCCCTCA TAGGCTTCTAGGGAATAGgtattaattgttacctcgataacttaactcgagagtcgcataagtaaat
actaataacatagtatatttctacaattgtagGTGGTCTTTAATTGCTGGAAGATTACCTGGTCCGACCGCAAATG
ACGTCAAGAATTACTGGAACACTCATCTGAGTAAGAAACATGAACCCCTCTTGTAAAGATAAAGATGAA
AAAGAGAGACATTACGCCATTCTACAACACCGGCACTAAAAACAATGTTTATAAGCCTCGACCT
CGATCCTTCACAGTTAAACAAGACTGCAACCATCTCAATGCCCCACCAAAAGTTGACGTTAATCCTC
CATGCCCTGGACTTAACATCAATAATGTTTGTGACAATAGTATCATATACAACAAAGATAAGAAGAAA
GACCAACTAGTGAATAATTTGATTGATGGAGATAATATGTGGTTAGAGAAAATCCTAGAGGAAAGCC
AAGAGGTAGATATTTTGGTTCCTGAAGCGACGACAAACGAAAAGGGGGACACCTTGGCTTTTGACG
TTGATCAACTTTGGAGTCTTTTCGATGGAGAGACTGTGAAATTTGATTAGgtttcgaacattgtttgctgttgtagt
aggtttgcttccacttttaattgtgtgtttgataataagctaataatgttttagcatttaataatgaaatattcaagttccggtttaca

Primers

MYB75 F: GATCTTCTTCTTCGCTTCA

MYB 75 F: CACGGTTCATGTTTCTTACTCA

A. thaliana RAB - ABA-responsive protein (AT3G02480)

tttccatcatcaaacacaaaacaatcaatacaaaaacataaaattcaaagtgaagcaaacacagagagaaaATGGACAACAA
GCAAAACGCGAGCTACCAAGCCGGTCAAGCCACTGGCCAGACTAAGgtctctctctctctctctttgttacacatttc
gtatcaattgttgaatatatgtaaagatctctacatttcaaatcatatagttttccgcaataactacggattacgataggggtgtcttttagacaa
ggttgatcctaataatgtataatgttaacttatgtaatatagGAGAAGGCCGGTGGAAATGATGGACAAGGCCAAGGATC
CTGCTGCTTCA GCTCAAGACTCCTTGCAACAGgttcagtttgattcttctcattttgctccctgtagtaaaaccataatattg
aacftttaaatacaattgtgaattgtagACTGGACAACAAATGAAGGAGAAGGCCAAGGAGCTGATGTCGT
CAAGGACAAGACCGGCAATGAACAAAAGCCACTAAgcaagcacctggactcttttaataatccctctcgactgtgttt
aataaattgggttttaattctcattctgacttctgactgtgtttcttgcgctcattgtagctttatgtaacttatctatctagtaataaaagtatgcttt
taatatcatgaa

Primers

RAB F: AGGATGCTGCTGCTTCA

RAB R: TTAGTGGCTTTTGTTCAT

A. thaliana RAB18 - dehydrin – (responsive to ABA 18) (AT5G66400)

ttcatgatcaaacatcaaaagctaaatcacaaagaagagtttttaactagcttagctcaaaagtgtttgcttaagacaagaagaacATGG
CGTCTTACCAGAACCGTCCAGGAGTCCAGGCCACTGACGAGTACGGAAACCCGATCCAGCAGCAG
TATGACGAGTACGGAAATCCGATGGGAGGAGGATACGGAACTGGTGGTGGTGGAGGAGCTA
CAGGTGGCCAAGGATACGGAACAGGTGGCCAAGGGTACGGATCAGGTGGCCAAGGGTACGGAAC
CGGTGGCCAAGGATACGGAACCGGGACCGGGACTGAAGGCTTTGGAAGTGGCGGAGGAGCTAGG
CACCACGGCCAAGGCAACTCCACAAGGAAAGTGGTGGTGGCTTGGGAGGAAAGTCTCACCCTC
CGGACTGGATCGACTCTAGCTCGgtacgtatcaagtgatataaagaagattatgatgttttagtttagtatgtaagcgttaattc
aatgttatgtataacagGAGGATGATGGACAAGGAGGGAGGAGGAAGAAGGGAATAACACAAAAGATCAA
GGAGAAGTTGCCAGGTATCATGATCAGTCTGGTCAAGCTCAAGCGATGGGCGCATGGGATCCG
GATATGATGCTGCTGCTACCGGTGCTGAGCACCACGAGAAGAAGGGGATGATGGACAAGATCAAG
GAAAAGCTTCCCGGTGGTGGCCGTAAgcttgaacaatcgtgtatataataataaaataatgaggggttgaacgcagtc
gcattcggtgtgtattgtgtctttatgtatgtagctcctgcgatgtgtgtttactcatgagtgtaatgagcactcgcctctttatgtctgagatg
ttgtttatgtaattcacatctatataaactacttctctgcttagtt

Primers

RAB18 F: AGTGGTGGTGGCTTGGGAGGAAT

RAB18 R: ACCACCGTAGCCACCAGCATCAT

A. thaliana CHIT1 - chitinase (AT2G43620)

aaagtggcattgacttgactcagaaaaagccaatcaataatcgtgaagatgtctaacactgatcaatattcaattgaaatagaccaaatlacac
tataaatacatcaacacaccttctcatttctcacacaacacctccatacacaacATGGCTACCCTAAGAGCAATGTTGAAAA
ACGCTTTTCATCCTTTTTCTTTCACCTTAACCATCATGGCAAAAACCGTGTTCGCAACAGTGCAG
TACAACCGGATGTGCAGCCAACCTTATGTTGCAAGTATGATGATATTGTGGCAACACAGATGCCTA
CTGTGGTACCGGGTGCAGGAGTGGACCTTGCAGCTCCTCAACCACACCTATCCCACCAACTCCTA
GCGGTGGTGCAGGCGGTCTAAACGCTGATCCTCGTATACAATTGAAAATGTTGTACACACCAGCAT
TTTTTGATGGTATCATGAGCAAAGTCCGAAATGGCTGTCCAGCGAAAAGGGTCTACACTCGCCAGG
CTTTCAATTG GGGTGGCCCAATCGTTCCACGCATAAAGGAACCGTCCGTAAGCGTGAGATTGCCG
CTATGTTGGCTCAGTTTTCTCATGAATCTGAAAgtaagttctttataaaccttctagttctactacatgaaatgcatgtataactaa
tatttaaatgaaatgaattattattatacaagaatattatacaactaataagcaccataatgtttctgggtaagtaacaaatcatttctttatcat
taaaatcacaatattcattctctattataaataacgatcttctttacgttatgcaagGTTTTTGTACAAAGAAGAAATAGCTAGA
GGGAAATACTGCTCACCGAGCACTGCGTACCCTGTACACCGG GAAAAGACTACTACCGCCCGCGG
TCCAATCCAAATCATGGAACATAATACGGTGCAGCTGGAAGTTTCTCGACTCCCTCTCTTG
ACTGATCCAGACATGGTGGCTCGTAGCCCCAAAGTTGCCTTTCAGTGTGCCATGTGGTCTGGAAC
CTAAATGTTTGTCCAGTCTTGACCAAGGCTTTGGAGCCACCCTAGGAAGATCAATGGTGGTGAA
TGCAACGGTAGGCGTCTGCAGCCGTGCAGAGCAGAGTAAACTATTACTTGGAGTTCTGCAGGAC
GCTTGGGATCACTCCTGGAGCAAATCTTAGTTGCTAAAgatgttaaaatgtgttgcgatgacacggtttcatagtaataag

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

gtggctgctcacgtgtgagttataactaaagggtcgaataaaaaagattatcggtgtatcctaattaccaatgtgtgtgaaatcggtgtcacag
aatgaagtatatcaggctatcagccaatccataataaacgcat

Primers

CHIT1 F: CGGCTGCCAATCGTTCC

CHIT1 R: ACCGCGGCCGTAGTAGCTTTTC

***A. thaliana* CHIT2 - chitinase (AT2G43570)**

tctctgcagctgcatcacagacacaaaaacaATCGCTAAACCCACATCACGAAATGACCGATTTGCCCTTTTCTT
CATAACCCTAATTTTCTGATCCTAACCGTTTCCAAACCGGTGCGCTCTCAAACTGTGGCTGCGCC
TCTGACTTCTGTTGCAGCAAATATGGCTACTGTGGTACGACCGATGAGTTCTGCGGCGAGGGCTGC
CAGGCAGGACCTTCCGGAGCAGTGGAGGCGGTGGAGATCCTGCTGTTCTACTAGAAGGAACGG
TGACACCTGACTTCTTTAACTCTATACTAAACCAAGAGGTGATTGCTCTGGCAAAGGATTCTACAC
TCACGACACCTTCATGGCCGAGCTAATTCTTACCCTAGCTTCGGTCTCCATCTCCAAACGCGA
AATCGCGGGCTTTTTCGCTCAGTAGCCCAAGAAACAGGGTgtaagtaaatttctcatataatttgaatgaataaaga
tactataacataaatttctagttacgactatattggtcaattgactaaattaaattcagcataagataaaaaatcagtaattgtgtatacaatt
tggtaactgtatatgcccaccactatagtttctgtttgtaccatattgctacattgtgtcagTCATGTGTACATTGAGGAAATTG
ATGGACCGCCAAGGCCGATCCGGAGAGTACTCCGACACAGAGAAACCAAGATTCCCATGTGCA
CAAGGAAAGGGCTACTATGGCGTGGTGAATCCAGCTCTCTTGGAACTACAACCTACGGTCTCTGT
GGCAAAGCCTTGGACGAGAATATTGGCTTACCAGAGAAAGTTGCTCAAGACCAGGTTCTTGCC
TTCAAGACCGCTTTCTGGTTCTGGACCACTAATGTTCCGACGAGTTTAAATCGGGCTTTGGCGCAA
CAATCAGGCGAGTGAATAGTAGGGAGTGTAGCGGAGGATTCTACAGCCAAAGCCGCAACAGG
ATTAAGTATTTCCAAGACTATTGTGGCAAGCTTGGAGTTGCACCTGGAGATAACCTCACTTGTAAAg
tttctgtctatccatccgaaacacaactagtttgaaaaacttagagatcacataagagaagatcatattagataataatgttgaataacttcac
atttaccaaaaataataataatgttgaatagctaggtcaataaacgatttctatgcatagg

Primers

CHIT2 F: GCTTCGGTGTCTCCATCTCC

CHIT2 R: GCCATAGTAGCCCTTCCCTGTG

***A. thaliana* ATGSTF8 – glutathione-S-transferase (AT2G47730)**

atggataacaatgcaataataaaggggaccacaataaaaaaaaggaaagagagacgtgctgtgggtagtggtggtgagagaagattc
ggaaaaATCGGAGCAATTCAAGCTCGTCTTCCCTGTTCCTTTCTCCCTTCTATAAAACACCATAC
CTTCTTCAATTTCTTCAATCCAATTTCAAAATCAGATCCAACAAATCTTCTTCTTCTTCT
TTCTTCGATCATCATGGCCAGTATCAAGGTTACGGAGTTCCTCATGTCCACCGCCACAATGCGCGT
CCTCGTACTCTTTACGAGAAAGATCTCCAGTTCCGAGTCCATCCCGTCCGATATGAGAGCCGGTGC
CCACAAGCAAGAGGCCACCTTGCCCTCAACgtaaccctttctccctctctctttacgaacaacaaaactgaaaacact
tatgttggttttccaattatcgaatgatcttggttgttgcagCCCTTCGGTCAAATTCCTGCTCTCGAGGACGGTGAATT
GACGCTTTTCGgtcagtttacttcttgatcaatgattgacttttagattacagaacatcattacgcttagtcaattgtattggaatcag
atttactgaaatgacagactgtgatgattttgtgctgaaagtttgggtgtaataattgacagAGTCAAGAGCCATCACACAGTA
CCTAGCAGAGGAATACAGTGAAGAAAGGTGAAAAGCTTATCTCCAAGACTGCAAGAAAGTCAAGGC
AACCCTAACGTATGGCTTCAAGTTGAAGTCAACAGTTTACCCTAACGCCTTAAGCTTGCCTT
GAGCGTGTCTTTAAAGGCATGTTCCGATGACCCTGACCCTGACCCTGCCGCTGTCCAAGAGCTCGAAGG
TAAGCTCCAGAAGCTCTTGGATGTCTACGAGGCTAGGCTCGCCAATCTGAGTCTTGGCTGCTGA
TTCTTCACTCTTGCTGATCTTACCACCTCCAGCCATCCATTACTTGTGGGTACTGACTCCAAG
GTGCTCTTTGACTCTCGCCCTAAGGTTAGCGAGTGGATTAAGAAGATCTCTGCCAGGCCTGCTTG
GCTAAGGTTATTGACCTCCAGAAGCAGTAGtaccctctctcttcttcttcttcttcttcttcccaataaacgagtcacag
gatttcttcttggcttactgtgtttcagatattatgcatcatcatctctcttcttcttcttcttcttcttcccaataaacgagtcacag
gattttaaaccgcaaatgtgcaaaa

Primers

ATGSTF8 F: 5'-CTCGAAGGTAAGCTCCAGAAAG-3'

ATGSTF8 R: 5'-TCACCAGCCAAGAACTCAGATT-3'

***A. thaliana* ATGSTF12 (glutathione S-transferase) (AT5G17220)**

agacaagataataaagtgcatatagtaaaatcttctattcgaacaagttattgtaacttatagaATCGTTGTGAAACTATATGG
ACAGGTAACAGCAGCTTGTCCACAAAGAGTCTTGCTTTGTTTTCTCGAGAAAGGAATTGAATTTGAG
ATTATTCATATCGATCTTGATACATTTGAGCAAAAAACCAGAACATCTTCTTCGTCAGgtaaaaaaac
aaattcttaaaccttaaaaacataaataatattgatttcatgtagCCATTGGTCAAGTCCAGCCATAGAGATGGA
GATTTCAAGCTTTTTGtaaacatcctaataacaacatttataaacattctctatcttcttattagtttgaattggctctttatctctaa
gAATCAGGAGCCATCGCGAGATACTACGCTACCAAGTTCGCGGACCAAGGCACGAACCTTTTGGGGC
AGTCTCTAGAGCACCAGCCATCGTGAACACAGTGGGCTGACGTGGAGACCTATTACTTCAACGTT
CTGGCCCAACCCCTCGTGATTAACCTAATCATCAAGCCTAGGTTAGGCGAGAAATGTGACGTCGT
TTGGTCCAGGATCTCAAAGTGAAGCTAGGAGTGGTCTTGGACATATAAATAAACCGGCTTCTTCG
AACCGGTTTTTGGCTGGTGAAGAATTCATATGGCTGATTTGACGCACATGCCGGCGATGGGGTAC
TTGATGAGTATAACCAGATAAACAGATGGTTAAGGCTCGGGGTAGTTTTAACCGGTGGTGGGAA
GAGATTTCCGATAGACCGTCTTGAAGAAGCTTATGGTGTGGCTGGTCACTGAattagctccaatttatgat
gatctgaagaaccaataaagcttattatgttctgtttatgttgtgtg

Primers

GSTF12 F: GGTCAAGTTCAGCCATAGA

GSTF12 R: TTGCCCAAAGGTTTCGT

***A. thaliana* ATGSTU16 - glutathione S-transferase (AT1G59700)**

taalattgtgggacaagcaacacatgatatgcccgttagaacaacagacaaaaaagaagaagaagaagagctgaggattctcattct
cctcatcctctccaccgattcattagaaccaatfacaataaaacgctatacacaataaaacaaATCGGAGAGAAAGAGGA
AGTGAAACTATTAGGAGTATGGTACAGTCCATACGCCATAAGACCTAAGAATCGCTCTTCGTCTCAA
TCAGTGCATTATGATTACGTTGAGGAAAATCTGTTTGGATCCAAGAGTGAGCTTCTTCTCAAATCAA
ACCCGGTTCACAAGAAAGTCCCTGTTCTCCTCCACAACAACAAACCCGATTGTCGAGTCTCTCAACAT
CGTTGAATACATTGATGAGACGTGGAATCATCTGCACCGTCCATTCTTCTTACATCCTTATGAT
CGTCTCTTGGCTCGCTTTTGGTCTGACTTCGTTGATAACAAGgtttggttcttcttcttccatcaacaattcaattctt
attattcttcagtttcttggatggaattttggaactttttattattgttacattccaatgaattatcttctgcatgagattctggggatataactta
gatcgtctattgagtgatttatatgacaaaaataaagagtaatgtgtattacataaatcgtggatataaactcggatgaagacacattacca
tactatcacaaagctagcaactcaggtctaatacagtaataactcttctagtagtagcatataagttgttctggtatacattatagcttagat
aatcatacattttcaacataaaatgtcctaattctatccataaattaaataagaatcatcaggctacaagagaacgacattgttggattact
gacatagaccacattgttgggtcgtcctcgttgggttctctatgctacggtgaataggtttatgatalagggacgcaattcaacataaataaac
aattgtagcttatattatcaaaaactaaaatgcagTGGTTTCCGGCGTTGAGAATGGCGGCGATCACTAAATCGG
AAGACGCAAAAGCGAAAGCCATGGAAGAAGTGAAGAAGGGTTGTTGCAACTCGAGGATGCGTTT
GTTTCTATAAGCAAAAGGAAACCCCTTTTCCGGCGGTGAAGCAATCGGGTTTATGGATATTTGCTTTG
GAAGCTTTTGGTCTCTTTGAAAGCTAGAGAAAAGTTTAAAGCAGAAAAGCTTTTAGACGAATCAAAA
AACTCCTTCTCTTTGTAATGGGCCGACCGGTTCTTGTCCGATGAAACGGTGAAGAATGTGGCACC
GGAGATCGAAAAGTAGCTGAGTTTCTACAAGAACTTGAAGTTAGAGCTCAATCCGCAGCTTCAAG
ATCTTCGAgatcatcttagaaatgattgcaatgcaattgtttgtgcatgtaaaacgaaaataagtgaaagtttaaaggtgtgctcagctat
gctaggattatgacgcggtgtagggctacggacttttcagttatgttatcgaaaataaagggcagcccaagattatggggctgctcccc
ttaacat

Primers

GSTU16 F: TCGCTCTTCGTCTCAAATCAGTGG

GSTU16 R: AATCGGTTTGTGTTGTGGAGGAG

***A. thaliana* ATGSL05 (callose synthase) (AT4G03550)**

agaaactgaaacgcggaagaggcaaaatctctcgtcgtcgttgcgcccgtctcagagctacaacgaaaaactcgttccgttccgattct
ccattgtattgttctcaggaagcttttctcagaaattctaatagactaccacatgctactATCAGCCTCCGCCACCGCACCGTC
CCGCCGCAACCCGGACGGCCGTTGGCGGGCGGAAGCTGTCGGAATCGAAGAGGAGCCGTACAATA
TCATTCCTGTTAAACAATCTCCTCGCCGACCATCCTTCACTCCGTTTTCCCGAGGTTTCGTGCCGCCG
CTGCTGCTCTTAAAACCCGTTGGAGACCTTCGTCTCGCCCGTATGTTCAATGGCGTTCTCACTACG
ATCTCCTCGACTGGCTCGCCTTGTCTTCCGGTTCCAGAAAAGATAACGTTTCGTAACCAGCGTGAGC
ATATGGTGCTCATCTCGCAAATGCTCAGATGCGTCTCTCTCCGCCCGCGGATAATATTGATTCTCT
CGATTCCGCGGTTTTCGTCTCGTTTCGTCTCGGAACTTCTCGCTAACTACTCTAGCTGGTGTTCGAT
TTGGGAAAAAATCAAATATCTGGATCTCAGATCGGAACCCTGATTCGAGACGAGAGCTTCTCTAT
GTTGGACTCTATCTTCTCATTGGGGAGAGGCTGCGAATCTTCGTTTCATGCGCTGAATGTATCTGTT
ACATCTCCATAACATGGCCTCTGAGCTCAACAAAATCTTAGAGGATTGCCTCGATGAGAACACCG
GCCAACCTTACTTGCCTTCTCTCAGGCGAAAACGCTTTCTTAACCGCGTCGTTAAACCTATTTA
CGATACTATCCAAGCTGAGATTGATGAGAGCAAGAACGGTACAGTTGCGCATTGTAAGTGGAGGAA
CTACGACGATATCAATGAGTACTTCTGGACTGATCGGTGTTTCAGCAAATGAAATGGCCGCTGAT
TTGGGAAGCAATTTCTTAAAGAGTAGAGGCAAAAGTGTAGGAAAACGTTTTCGTGGAGCGCAGG
ACGTTCTTCTACCTTTACAGGAGTTTGTATCGACTTTGGGTGATGCTAGCTTTGTTCTTCAAGCCG
CCATTATAGTAGCTTGGGAGGAAAAGCCAGATACCTCGTCCGTAACAAGGCAGCTGTGGAATGCTC
TGAAGGCAAGAGATGTTCAAGTGAGACTATTGACCGTGTCTTACATGGAGTGGTATGCGACTCT
TGCAGGCTGTGCTGGACGCGGCTTACAATATCCCTCGTTTCCAGAGAGACCAAAAAGGCATTTTT
TCAGAATGCTGATGAAGGTTATAGCTGCCGAGTTTGGATTGTAGCTTTCACTGTCTCTACACTAA
CATCTGGAAGCAGAAGAGGCAAGACAGGCAGTGGTCCAATGCCGCGAGACTAAGATATACCAAT
TCCTTACGCTGTGGGGCCCTTCTTGGTGCCGAAATCCTGGCTTTGGCTTTGTTTATTATCCCATG
GATGAGAACTTCTGGAAGAGACCAATTGGAATAATCTTTGCTCTAACTTGGTGGTTTCAAGGC
AAAAGCTTTGTGGGTCGAGGTTTGAAGAGGTTTGTAGGAGGTTTGTAGGACAACATCAAGTACTCGACTTCTG
ATCTTTGCTCCTAGCTACAAAGTTTACATTTAGTTACTTCTGCGAGTTAAGCCAATGATTAACCCCTC
AAAGCTGCTATGGAACCTAAAGGATGTGATGATTGAGTGGCATCAGTTTTATGGAGACAGCAATAG
GTTTTCTGTGCGATTGTTATGGTTGCCAGTTGTGTTGATATATCTGATGGATATCCAAATTTGGTACG
CAATCTATTCTTCGATTGTTGGTGTCTGTTGGGCTGTTGATCATCTGGGGAGATCAGGGACAT
GGGACAGCTAGGCTAAGGTTTCAATCTTGTAGTGTGCTATTCAATCAACCTAATGCCTGAGGAA
CAACTCCTGAATGCTAGAGGCTTTGTAACAAGTTCAAGGACGGCATTATAGtagtccgtggaagcatgct
actaatattcctaataaatttctgtaacacgctgactgactgtacaagctgtgaaatttactttgttaacgagatgctgcatataaattttcaa
tattgtaataactgaggtgtgactgtatgcagATTGAAGCTAAGGTATGGATTTGGGAGGCCGTTTAAAGAACTTG
AGTCAATCAGGTCGAGGCCAACAGTTTGCCTGTGATCTGGAACGAAATCATCTTACTTTCAGAG
AAGAGGATATAGTTTCTGATCGTGAAGTAGAGCTACTGGAGCTGCCAAAAGAACTTCTGGGATGTGA
CGGTTATTCGCTGGCCGTTTCTTGTGTGCAATGAGCTTTGCTTGCCTGAGCCAGGCCAGAG

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

GAATCAGCAGCTGCTGATATAGTCGTCGTTGATATCTCCGCCGAGATGAGATCAACGGCTCAGAT
ATTACTAGCGAGAAGAAGATGATCAGCAGAACAGAGAGTAGGAGTTTGTGTTGAATCAAGAGTGTG
CCTTTGTATGGTTTACTTCGATTTGTGGAAGAAGACCTGAGATGGAAGATGCTGTTCCGACTATAC
CAAGATTCCTCAATCTTCCTCTGTTTCGATGTTAGATGGTCGGTTTGATCCTCAATCCGCCGCTCA
TTTCTTCGGTGTACGACGGCCATGGCGTTCTCAGgtaaagattggatctttgattgggtgtttacagttgca
tctgatttgggtgtgtgtgtagGTAGCGAATATTGTAGAGAGAGGATGCATTTGGCTTTGGCGGAGGAGATAG
CTAAGGAGAAACCGATGCTCTGCGATGGTATACGTGGCTGGAGAAGTGAAGAAAGCTCTTTTCA
ACTCGTTCCTGAGAGTTGACTCGGAGATTGAGTCAGTTGCGCCGGAGACGGTTGGGTCAACGTCG
GTGGTTGCCGTTGTTTTCCCGTCTCACATCTTCGTCGTAACGCGGTGACTCTAGAGCCGTTCTTT
GCCGCGGCAAACTGCACTTCCAATATCCGTTGACCATAAAgtaagcatatagactcaagatctatagttggattg
ttgtgaactgtgatagtttttagtttcaagatgtgagtagagagtttgaaccatttctgatgtgctgtgtgtgtag
AGAAGATGAAGCTGCGAGGATTGAAGCCGAGGAGGGAAAGTGAATTCAGTGGAAATGGAGCTCGT
TTTTCGGTGTTCTCGCCATGTCGAGATCCATTGtaagctttcattatatttccataaagcttcaatggttctgaaataga
agaacctttcttcaacaacattatcattgtgacagGCGATAGATACTTGAACCATCCATCATTCTGATCCGGAA
GTGACGGCTGTGAAGAGAGTAAAAGAAGATGATTGTCTGATTTTGGCGAGTGACGGGGTTTGGGAT
GTAATGACCGGATGAAGAAGCGTGTGAGATGGCAAGGAAGCGGATTCTCTTGTGGCACAAGAAAA
CGCGGTGGCTGGGATGCATCGTTGCTCGCGGATGAGCGGAGAAAGGAAGGAAAGATCCTGCG
GCGATGTCCGCGGCTGAGTATTTGTCAAAGCTGGCGATACAGAGAGGAAGCAAAGACAACATAAG
TGTGTGGTGGTGTGATTGAAGCCTCGGAGGAACTCAAGAGCAAACCCTTGAAGTGAaggcagagagg
gtccttttctaattttaaagtgaatgtgggtctccaagaaaagattactatttgaatttctgctatttttctaacaagattataacatagga
gataatgaagcttaagtgttaagctctttgtctgactcaattcaaaaagccctgtattttctcccggtcaattgtaaatgtggtacaacatacatt
aagatgtatatttattgtatgaacttcaaaactttacatac

Primers

ABI1 F: 5'-CGGCAAACTGCACTTCCAT-3'

ABI1 R: 5'-CACGAGCTCCATTCCAAGTAA-3'

A. thaliana KIN1 (ABA, dehydration inducible) (AT5G15960)

ataaatataaacattaagcccacatcttctcatcatcactaaccaaacacactcaaaaacgatttcaagaataaatatcgaaaaaAT
GTCAGAGACCAACAAGAATGCCTTCCAAGCCGGTCAGACCgctggcAAAGCTGAGgactactcttctctct
ttgacagaactctaaactggaaaaaaattgtgaagctataactcttgaacaacagttgaactgtactactagaaattcagttactgttaattt
agttgtcgttaattatgaattgatgttttggtaacaatggtgtcatgtagGAGAGGAGCAATGTTCTGCTGGACAAGGCCAA
GGATGCTGCAGCTGGTGTGGAGCTGAGCACAACAgtaaacaatccatacacagacacataataatgtga
acgaaataaacgtctttgaagcttcatgtacgcagatttctgatgtgtatgtatgtatagGCGGGAAGAGTGTATCGGATG
CGGCAGCGGGAGGTGTTAACTTCGTGAAGGACAAGACCGGCCCTGAACAAGTAGcgattccgggtcaaatgtg
ggagtataatttcccttctaactgttggatttcaataaacgactttgtcaagaattgcattatataataaataatgcaaaattatgag
acgagccaaactatattcaataatgtttatctattttaaataatctttatgcaagaatcaaacccccaaacgatgttaaatggatcacgata
cataagtcgatccgaattgtgaagtttct

Primers

KIN1 F: 5'-GCTGGCAAGCTGAGGAGAA-3'

KIN1 R: 5'-TTCCCGCCTGTTGTGCTC-3'

Fusarium oxysporum f. sp. *raphani* PG5 gene (endopolygalacturonase) (AB256876)

cgtaaacacgggcccactatcacggctgaacggcatctatgcccagacatctatgattcagctcaaatgcccgttcagatagggagtgca
cttagtataagagagccgcatgctctggcattgtctatctgttctgcatcagcattccattcaacagatactcaattcgtatatacacitttcta
aactccattctttaacaatccattcattaacATGTTCTTTCAACTGTCCTTCTCAGTGGCCTGGTCCGCTCCGTAC
TTGCGGCCCCAGCTCTTGAGCCTCGTGCCGGCAGCTGCACTTTACCCGATGCTGCTACTGCTATTA
AGAACAAGGCTGGCTGCTCTACTATCACCCCTCAACAACATTGCCGTTCTGCTAAGACCACTCTCG
ACTTGACCAAGCTCAATGATGGCACTCACgtgagctaaactatctatccatgcaaatcaaaaaactgcagGTCAT
CTTCCAGGGCAAGACTACTTTCCGGCTATGCTGAATGGGAGGGCCCTCTCATCTCCTTCACTGGTAA
CAATCTTCTCATCGAGGGAGCTGCTGGACACTCCATCGACTCGAGGGTAAGAGATGGTGGGATG
GCAAGGGCAGCAACGGCGGCAAGAAGAAGCCCAAGTTCTTCAAGCCCACTCTCTCAAGAACTCC
AACATCAAGAACTTGAACGTTCTCAACACCCTGTCCAGGCTTCCAGCATCAACAGCGTCAACCAAC
TTGGGCGTCTATGGCGTTCACATGGACAACCTCTCTCGGCGACTCTCTCGGCGGACACAACACCGA
TGCTTTCCGAGTGGCTCCTCTACCGGCGTGTATATCTCTGGAGCTGTTGTCAAGAACCAGGACGA
TTGTCTCGCCATCAACTCTGGTACCAACATCAGGTTCACTGGGCAACTGCAAGTGGCGGACG
GTCTCTCCATTGGATCCGTTGGTGGACGCTCTGACAACACCCTCAAGACTGTCCGCATCCTCAACT
CTTCCATCTCCAACCTCCGACAACGGTGTCCGCATCAAGACCGTTTCTGGCGCTACCGGTTCCGTTT
CCGA'TGTCAAGTACGACACCATCACTCTCTCAACATCGCCAAGTACGGTATCGTCAATTGAGCAGG
ATTACGAGAACGGTCTCTACTGGAACCTCCCACTGCTGGTGTCCCATCACCAGCTCACCATCA
ACAAGGTACCCGGAACGTCAAGTCCAGCGGAAGTGTCTACATCCTTTGCGCCAACGCAAGA
ACTGGACCTGGACCAACAACAAGGTCACTGGTGGAAAGACCTCTACCAAGTGCAATAGggaattccctctg
gtcttctgctaagttgtgctg

Primers

Fox_r-F: CGAGGGTAAGAGATGGTGGGATGG

Fox_r-R: GCCGCCGGTGAAGGTGATGT

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

taggcattcctgaatattgggaatctctgatcattcgatccacactcactcctccaagggtgtaaagtctgttagcagattatgatgcgtaagatag
agcggtaacaagtaagctactgaaaaatgggatgcagtgttctgcagtttcatctggacgtgactgtatgggttcttagccctgctgatccctatt
ccaaatcgtcccttggactcaccctgctgattggatggctcgaagtaacatgagaaltcggaaagttggtagccacaactggccattgatagtt
ggttaacgctgactgctgatgaaatgtactggaagatgctgcagattggaatgaatggactattcgtaaaccagtgctatgcccaggtatcctg
tagagctcaaaagggtctgctacggggaagtagaatgatTAA

Primers

SiIETR4-F: 5'-GGGGGGGCAGCGAATTCCTGTGGA-3'

SiIETR4-R: 5'-CACATTACAGGGATCCACGCTGCGC-3'

LeETR4-F: 5-'GGAAGCCCAATGAGAATAAAACTG-3'

LeETR4-R: 5'-CTACTCCCTCCACTACTCGCAACA-3'

Tobacco rattle virus RNA2-based VIGS vector pTRV2 (pYL156) (AF406991)

ataaaacattgcacatggtgtgctccctggctggggtatgctagtgatgcagtagaattgactaattgacaagttggagaatcggtagaacgtc
ctatccaacacagccttattccctcctccgacgaggttttgcagtgtaatttctttgaaactatccagcttagtaccgtacgggaaagtgactggt
gtgcttattcttgaatgttacttgggttccgttctttaggttagtaagaagcactgttctctacaaaggaaaaacctgagacgtatccttacga
aagtagcaatgaagaagggtgggttlaatcgtaccgcaaaacgatggggtcgttlaatcttccctacgcaagcgttaaacggcag
gttgggtttgtagtctttagagaaaaactagtaagctttaaagttaattatcttagatagatggcataaataaacttgtgctgctgataagatcattta
atttggacgattagactgtgaaactacaggttactgaatcactgcgctaacaactgggagatgtacgatgaatcattgacaagctgggctg
cctgctgactgtgagcattctgggtggaatcagttctgggaaagatctgtgaagaagttacacagcataaaattgactacagctcgtgtaga
gatgagatcactgggtactagcggcactgaatagacagtgctcttaccatgatgagcattccagataagaagggtatttctttagactcac
gggtaaacagtgctctggtgtagcagaacgctcagcgttaacagagacgagctgatgagaagaatgcagtggtgggtttacaaatattctg
cgaatccaacaacaacggttacgacgaaccaaggagtagtactactactcaaggcgaacactggctgacttggaaagaagactgtacact
attacaaatcagatgctcctacagcttccacaaatcttaactcgttagagaaacatggagttgaagagttattaccaaggaactttgagaaa
gtattcgggattaagtttgggtgagcagctgctagttcatctgcaccgctccagcagtgagggtccgatacgtcctaatccctagggattaa
cgtgaaactctgtgagatcctgtgaaatcagaggggtgggtgatacattcactgatgccattagcgaatcaatagggttaattgtgactaatt
tgagggaaatttcccttaccatgacgtcagtgctggttagcattgagttcgaatgcacgaatcacttaggaagtggtgacgacactaatgtgt
attgttagataatgggttgggtcaaggtagctgtagagttccacatctgcacgtatgaagtaattggaagttgacgtttttagataatcactgg
gagatgatacgtgttgggggaaagtagagaacgtattgttttagttagcgggttctgtgtgcaaaaagatggacattgttactcaaggaa
gcacgatgagcttattattacggacgagtggaacttagattctgtgagtaaggttaccgaattcttagaaggcctcatggggtacccgtacggagc
tcacggtctcagggccgggcatgtcccgaagacattaaactacggttctttagtagatccgtgctgaagtttaggttcaatttaaacctacgag
attgacattcgcagctgatctgattgatcggtaagctttagaatttatttctttagatttattttaaattgttctgttctgtatagactgtttgagatcg
cgtttggccgactcaattgtcttaccataggggaacggacttgggtttagttagtatttattttaaattctcaacgatctgaaaaagcctcgcg
gtaagagatgttgggggtgagtaagctttaaagtgatgattgtaaaaagggcaaaaggggtaaaaccctcgcctacgtaagcgttatta
cgcctgcttactatcagctacactgacgagtcctaaaggacgaaacgggagaaacgctagccaccaccaccaccacagctgtgaattac
aggtgaccagctcgaattcccagatcgtcaaacatttggcaataaagtttctaagatgaaatcctgttcccggtctgcatgatattacataaattct
gtgaaattcgttaagcaatgtaataaactagtaatgcagctgattatttagatagaggttttagatagatgcccgaattatacatttaaacgctg
atagaaaaacaaaatagcgcgcaactaggataaattcgcgctgggtgctactatgtagatcgggaataaactatcaggtttagcag
gatatttgggggtaaacctaagagaaaaagcgttattagataaacggatatttaaaagggcgtgaaaaggttatccgtctccattgtatgt
gcatgcaaacacaggggtccctcgggatcaaaactttagtcaaacctccgctgctatagtgacgtcggcttctgacgttcatgctcagccgt
cttctgaaaacgacatgtcgcacaagtcttaagttacgcgacaggtcgcgctcccttctgctggttctgtcgtgtttagtgcataaa
gtgaaatctgctgactagaacgggagacattacgcatgaacaagagcgcgcccgtgctggtggtatgcccggcgtcagcaccgctcagcaccgagc
accaggttaccacaacgggccaactgcacgcccggctgcaccaagctgtttccgagaagatcaccggcaccagggcgcgaccg
cccggagctggccaggatgctgaccactacgcccctggcagctgtgacagtgaccagcctgacccgcccagcaccggcagcct
actggacatgcccagcgcacagggcggcggcggcctgctgacgagcgggtggccgacaccaccacgcccggcggcggc
catgggttgaccgttctgcccgttccgagttcagcgttccctaatcatgacccgacccggagcgggcccggagggcggcggcggcggc
ggcgtgaaagtgtgcccggcctaccctaccccggcacaagatcgcgcaacggcggagctgacaccaggaaggcggcaccctgtgaaag
aggcggctgactgctggctgcatgctcagccctgtaacgacactgagcgcagcaggaagtgacgcccaccaggccagggcggcggc
ggtgcttccgtgaggacgattgaccagggccgacgcccctggcggcggcggagaaatgaaacgcaagaggaacaagcatgaaacggcacc
aggacggccaggacgaaccglttctatccgaagagatcagggcggagatgacggcggggtacgtgttcgagcccggcgcagct
caaccgtgcccgtcatgaaatcctggcgggttctgctgatgcaagctggcggcctgcccggcagcttggcggctgaaagaacggcggcggc
ccgtcaaaaagggtgatgtattgagtaaaacagcttgcgtatcgtcgtcgttatatgatgcatgagtaataaacaatacgcgaagg
gaacgcatgaggttatcgtgacttaaccagaaaggcgggtcaggcaagacgaccatgcaaccatctagcccgcctctgcaactcggc
ggggccgatgttctgttagctgattccgatcccaggcagtgcccgcgattggcggcggcgtgcccgaagatcaaccgctaaccgttgcggcat
cgacggcccgaagatgaccgacgtgaaggccatcggcggcggcactcgtatgtagcagggagcggcccaggcggcggcacttggctg
tgtccgcgataaggcagcggacttctgctgattccgtgcaagccttaccgacatattggccaccggcggcggcggcggcggcggcggcggc
cagcgtttagggtcagggatggaaggctacaagcggccttctgctgctgcccggatcaaaaggcagcggcgtcggcgggtgagggtgcccgag
gcgctggccgggtacgagctgccattctgagctccgtatcagcagcggctgagctaccaggcactgcccggcggcggcacaaccgttctga
atcagaaccggagggcagcgtcccgcgaggccagcgtggcgtgaaataaataaaaactcattgagttaatgaggtaagagaaaa
atgagcaaaagcacaacacgtaagtcggcggctccgagcgcagcagcagcaaggctgcaacgttggccagcctggcagacagcca
gcatgaaagcggctcaacttctcagttgcccggcggagatcaccaagctgaaagatgacgctgacgcaagcgaagcaagcattaccgagctg
ctatctgaatacatcgcgactaccagagtaaatgagcaaatgaaataatgagtagatgaaatttagcggctaaaggaggcggcgtgaaat
caagaaacaccaggcaccgacgcccgtggaatgcccctggtggagaaacggcgggttggcaggcgtaaagcgggtgctgctgcccggc
ctgcaatggcactggaaccccaagcccagggaatcggcgtgacggctgcaaacctcggcccggtaaaaatcggcggcggcgtgggtgat

gatgacatcgggtgcaatggctggttggtaactagagggtagagaaaggattcattcctgtgtccaactatagatattcgggatgatcagagaga
aatcttcgacagatattctactgctattggtgatcaagctagaagtgtaagagacagatgctcgagaaatgagctgtggatgatgaccaatttcg
tgaaaaattgctgcgctaaccgggttaggtgcaataacacatagcgggtgtacatgtaggggtttctgatggtaagaagaaggcgcgag
tatgcatagctctcagacgctgtatgactcaagtgaaagactgatggctactatggtgagaagaaaactaaagtggtctatgctgctctt
tgctcctgaagatgttagtgacgaaggtccattactctgtgtgacggttactacatgaagaagaacgggaagatctattcgggttggagaaga
tcctctttctacattcatgactggaagagtacaagaagtatctactggtggagccagtgatccaagggaatgtgtctactcgaaccgtg
gcagggtgagaggagacacaatgcttttcgatctacaggatagctggagttccgaggaggctctatcatcgcaagagactaccgaagaata
tatcagtagatgggaaaacatggtgtgtccaatttcgatctggtcgaatcaacgcgagagttggtcaagaaagacctgtttagagaacaat
tcatggacaagtggtgattacatagctaggttatctgaccagcagctgaccataagcaatgtaaacatactgagttcaataatgggtcttattc
ataaacggggcggcgtgaagaacaagcaagtagtagattctcgagattacagttgtggctcaaaccttctagtgaaaggaacaagtgggcag
accgtgatagggaggtgctggaagcaattctgactgagacgaaacctacagctattgactgatgtgctgggttaaatcaagaaaactgtgg
aagcagttgtcaacaagatcgcagctggcgggttggtgactctaatggattctatcaagaaggtaaacctgggcgaagg
acacaccaaatgttcgaactatgttacgagaactcgcacaaaaccaagggtgatgattctgagttgtgtatgccattggggaatcaccgt
tatgctgcgagacatccgagatggactggtgaaaaaactatgtgatgtttgatatacaacggggggccatgcttagacgttgagaatccgtgc
cgctattatgaaatcaacgattcttagcagctgtatcggcatctgagctcgggtgagaccgtttaccagattatccgaggtaaaagccaagctg
ataagctattgcaagcaagaagaatcgcctgacgagtttcaagtgcaaaaattcttaactattcggcagttcgggtgagaactctccaccatcg
gtggtcgttctatcgaagcggactgggtctgttgggaagacagtaacgtgctgacccaagctagagttgagttcaagaaaggtagacgat
gaggagatcatggagcagttctgagttgcttattgacactgaagcagaaatgacgaggtgttccagcctttcagctgaatgtgaaagagggg
aaacaagcggtaacaaggtgtgtgtaaaccttaaccgccaccaggatttgagaacgtgttccagctgcaaaccttggctcagcaaggaaaa
accgtcaaacgtgtgacttccaagtgatggaggtgagagattaccaaagcgggtgtcagtgagacgatctggagcgtagaag
agagttctgactacttagatgctggagagagctcgaaggttcaaatatgtctctgtaicgactatcagagaggagttattcgaactcgcaccatcg
tcagaattaccgacagcggactgggagtggtgagatgagaactggtgcatacgtccagttgctactgaacatgcttatgtgtccaacc
agcaaacatgtgattgtgctgggatactagaagtgctgttgggaacagggatgtgtgcaacgactcgcggctgaaaggtgagtgatga
ttatgtcatgttgcgatcagactatcttgaataacaggtgatctggacaattaaagtccctggatctaggaccagttactgttcttgaatta
gtgacgggtacactggttgtaagtcgacaatgattgcaactcagtaaaccttctgtgctgagttcctctactcgggagagcagcaaccgac
gactgtgctgagagatcgcgagcaaacgggttccatgcaaatgaaaaggagagtaagacgggttgattcttttgatcattgtgtgattgtt
aacgggagcgtgttcattcgatgaagctctcatgcccattgctgttattggtacttttgcctcagatagctgggtctaaacgatgatctgcaa
ggagatcagaatcaaatcttcaagcctagggtatctcaagttgattgaggtttctagctggtcggaaagttgacattgttacagaaaaagag
aaactacagaagtcagcagatgtgctgcgctattgaacaagtaactatactggagatgctcagaacacataacgcgactgtaattcgtatgacg
gtgaggaagattgttctaaagaacaggttcttgaagcctggtgctcagtaacataaccttccactcagtgagaagaaggagttggttaaattgttg
cattgagaaagggtcagcctaaagttagtacgtaacgagctgcaaggagagacattcaagatgtagctctagtcaggacgaaacctacg
gatgactcaatcgtagaggtcgggagtaactatctggtgctgctcacaacaatcactgtgtatgaaactgtgaaagaggcagctgta
agcaaaagatcagggaaagtcccgccttcaagagcggccttggcaagattttgtactgagaccgtctatgacgggttccgtctagggttga
gtctttagacatgaagggcctgcccgttccagattcaggtacgattaccggactggagatgtgttacgacgcttgttccgggaaattcgttaa
gagactcaagcctagacgggtatttgggtgcaacgactgaittcaatttgcgattagacaatgtacgatcaaaaagtggaactggaagacaag
ttgtgtaaaaagaaactgttgaacgggttattctgactgctatgctgcaaaaaggaagactactcagttggagagttttagcattgcagaa
aaggaaaccaagcggcaccgatctacaagaaatgtgcaagcaacagttcaatcgaagagacgatgaagaagttgaaatctgtgtctacga
tggtgggaaaaactcgggctgacctattgcaatagagctcaatggagagatggtggagaatcaaaagcacagcgggtacaggctaaaggtagta
cgactgtgagagattacatgaatagacttcttcaatgatactgatacaaatcagctgaaacctaaagactgattaacccgcaatttga
atactcagctctacagactgttgtatcacgagaagttgatcaactcgttggcgtlccaatttcaagaaatgaacgcaagttggatgctatg
caaccacatttgttcaacacgagaatgacatcgatgtttaaactcagctgagtgaaagttcttaatacgggaagcggcttaccgacttgttgat
agacatgctaaattcgaacaagtcggcaaatcgtctccattcaactcagctgagattacaggttattggcgtatgagtggtggcgcctctct
ttggaggtgtgcacactcaactactgtgagatattcaaatggtatgagtcgcatatttggtaaccaaaaaagagtgagatgctgatact
tataatgcaaatcagatagaacactgtgtgcaactctgtgaattaccattgagaaaagcagctatggttataatgagagactgactcactg
gcttctcagaggaacgcagttgtgtatccgtgtccaaggttggctactaagtggaattcagtgcaagattttaaagtacgatgctccaatgtt
gggaagttctgttaagagctatcgtgttacgagttcgtccagatccggtaaaagtctcagcaagttgggaaaaagagataaaagatgtg
caacatttagccgagatctacatctcgtgaatgattccaatagagctcttggaaactacatggtgttatccaaactgcccagctgttccagaccg
gtatttgaacaagggtattctgtcagcttggcgtatggaagcatattaaagtttacagctctgtgtacattatccgagacgaaaacgata
aggaattgaaccggcctaagggtgattggaagaagccacagagagctgtgtcaaacctttacgactggttaattggaagacaagctattggtcac
cttgaagaagaagacttccaagctcaaaattctcaaatcaggggccattgaaattgttggcaggtaggaggaagagaccgaagattttcac
agaagaagagaaactgctcaaatcatgttgggtggaagaagagtgaaacacaagttagacgttttgaccaaagggattacaaaatgattaaatc
ttacgcgttctaaagatagtaggtgtacaactagttgtaacatcacatctaccctgcagatagcctgggttcaatacagatctgttggaltcgaga
cttactgagaaaagaagagaggaagactattcagagattcaagctcagagcttgcgataactgttcagttgctcagtagcaaggtgtaacag
tattccacacaggagaacgtactgtgctggaaggtgggtgtattctcagagggcgttccggtctgtgacggtacatacccttccagtagcaag
tcgctaataatgggtgctactgactgactagggcctcaatgtggaagaactgaacagttcggattacattgaaggcatttaccgatcaagaggt
ttcgggtgattcatgcttgaacaagtgagatgaagcagatgagggcgaaglacgatggtccttacagaccagctactagacctaagtca
ttattgcaagtgaaagtagagagcgtcaataagaaaaactcgttcaatgcaataagaatatttgaataatgacgtgtgactcaaggggt
gtgtgaagtagcactgttctgtcagcagagctgtgactcggctcacaacaattgcgaaagcaagttgctgacatggttgggtgcacacgt
agggtgtcgggaaaaatattgtggatggttctgtgtgtatcaatgatttacttttagtgtataattgttggcggtagtcacctgaaaagtctcgt
aaacgttgaacaagaatcgagaatattggaacaatcgcagaaatcaagctgaaaacatgctcgcgacagctaaaaagtctcataatt
cgaagaccctaaagaagaatcaagagggacagagaattgggacacaaaagattttaaagagatgatgtccttccgggattgatcgttggtt
gcttttgaattatattgtatctgttctgtatagactgttggagttggcgttggccgactcattgtcttaccataggggaacggacttgggtgtt
gttatttttttttttataaaattcctcaatgactgaaaagcctcagagctaaagattttgggggtgagtaagtaactttaaagatgatgtgtt
acaaaggcaaaagggttaaacctcgcctacgtaagcgttattacgcc

atgc: replicase (203-5326)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

atgc: movement protein (5328-6086)
atgc: 16 kDa protein (6111-6536)
atgc: synthetic sequence (2104-2154)

Solanum lycopersicum chitinase gene (AB110610)

ATG AAGTTCAATATTGTATC ACCCGTTGCACTGTCTTGTCTG TTTTCTTGTTCCTAACAGGTA
TAG CACAAAATGCCGGTTCCA TTGTAACGCGGGAATTGTTGCAACAAATGCTGAGTTTTAGGAACAA
TGACGCATGTCCGCAAGGATTCTACACTTATGATGCATTATAGCTGCAGCCAATTCGTTTCCA
GGTTTTGGTACTGCTGGTGATGATACTGCACGTAAGAAGGAAATTGCTGCCTTTTCGGTCAAACAT
CTCACGAACTAATG gtaattggatcatcctcttagcattgtaattataggaacaattgaattatcattcgctctttgcag GTGGTA
GTGCAGGAACATTCAGTGGAGGATATTGCTTTGTTAAGCAAATAGAGCAGTCAGACAGATACTATG
GCAGAGGACCTATCCAATTGACACAGtaagacaattcaatagaatcaacattggaatcattagtaattcttttatgcag CC
AATCTAACTACGAACGAGCTGGACAAGGATTGGTGGTGGACAAGAGTTAGTGAACAACCCTGATT
TAGTTGCGACAGATCCTATAATATCATTCAAACAGCAATATGGTTCTGGATGACAGAACAGGATAA
TAAACCATCATGCCACAACGTTATCATTGGACAATGGACGCCATCCCCTAAAGATACAGCAGCTAAT
AGAGTTCAGGGTACGGTGTCAATACCAACATCTTTAACGGTCAATTTGAATGTGGGATGGGTCCG
AATAATGCAGCGAAAGTCAATTGGATTTACAGGAGGATTGTGGTATGTTGAATGTTCTACTG
GTGAAAATTTGGACTGTAACAATCAAAGAACTTCGCCCCAGGGCTAA

Primers

LeCHI1-F: ACCCGTTGCACTGTCTTGTCTC
LeCHI1-R: TGGAACCGGCATTTTGTG

Solanum lycopersicum class II chitinase, mRNA (LEU30465)

ATGAGGCTTTTAGTATTGGGTTTGTAGTGTGGTCTAAAATGTGTTTTATCACAAAATATTAGT
AGTCTTATTAGTAAAAATTTATTTGAGAGAATACTTGTGCATCGAAACGATGCTGTGGTGGCA
AAGGTTTCTATACCTATGAAGCTTTTATAACAGCAACTAAAACATTTGCTGCCTTTGGAACACTGGT
GATACTAATACTCGTAACAAGGAAATTGCTGCCTTTTGGCTCAAACCTTCTCATGAACTACGGGTG
GATGGGCAACAGCACCAGATGGACCATATTCATGGGGATATTGCTACAAAACAGGAACAAGGAAGTC
CTGGAGATTACTGTGCTCAAGTCAGCAGTGGCCTTGTGCTCCTGGCAAAAAGTATTTTGGTGGAG
GTCTATCCAAATTTATACAACCTCAATTATGGGGCAGCAGGGAGTG CAATAGGTGTGAATCTGT
AAACAACCCAGATTTAGTAGCCAATGATGCAAGTGTGCTCATTCAAACAGCGTTGTGGTTCTGGATG
ACAGCACAACAGCCAAAACCATCGGCACACGATGTCATTACTGGAAGATGGAGTCCC CTGTTGGT
GATTCTGCGGTGG CCGCGTCCCGGGCTTTGGTGTAACTACTAACATCATCAATGGTGGAAATGGAA
TGTAACAGCGTTCAAATGCACTAATGGATAACAGAATTGGGTTCTATAGGAGATATTGTCAAATTT
TGGGAGTTGATCCTGGTAATAATTTGGACTGTGCTAATCAAAGGCCATTTGGATA

Primers

LeCHI2-F: ACAATTATGGGGCAGCAGGGAGTG
LeCHI2-R: CCAGCGGCAGAATCAGCAACAGA

Solanum lycopersicum chitinase, mRNA (Z15139)

ATG GTATTATGTTGTGCTTTTTGTTGTTCCCTAACGGGAAGCTTGCACAAGATGTTGGTACAATTGT
GACAAGTGACTTGTCAACGAGATGCTGAAGAATCGAAACGATGATAGATGTCCTGCCAAGGGCTT
CTACACTTATGATGCATTATAGCTGCAGCCAATTCATTCCAGGTTTTGGTACTACCGGTGATGAT
ACTGCGCGTAAGAAGGAAATTGCTGCCTTTTTCGGTCAAACCTTCTCATGAACTACTGGTGGTAGC
CTAAGTGTGATGGTCCATTTGCCGGAGGATATTGTTTTGTTAGGGAAGGCAATCAAATGGGAAGT
GGATTTTATGGCAGAGGACCTATCCAATTGACAGGGCAATCTAACTATGACTTAGCTGGGCAAGCA
ATTGGACAAGACTTAGTTAACAACCCTGACTTAGTAGCTACAGATGCAACTGTATCTTTTAAAACAG
CAATATGGTTCTGGATGACCGCACAAGGCAATAAGCCATCATGCCACGATGTTATCACAGGGCAAT
GGACGCCATCAGCCCGGATGCATCAGCAAATAGACAA SCAGGCTACGGTGTCTATTG AAACATAA
TTAACGGTGGAAATTGAATGTGGCAAAGGACAGAATCCACAAGTGGAGGATCGGATTGGATTCTACA
GAAGGTATTGTACGATACTGAATGTTGCTCCCGGGGACAACCTTGATTGCTACGACCAGAGGAAC
TTGCTGAGGCCTAG

Primers

LeCHI3-F: CCAGGCTACGGTGTCTATTAC
LeCHI3-R: TAGGCCTCAGCAAAGTTCC

Solanum lycopersicum chitinase, mRNA (Z15140)

ATGAGGCTTTCTGAATTCCTACTCTTTTCTTACTATTTTCTGTGCTTTTGTGCTGCTGCCTCTGCAGA
GCAATGTGGTTCA CAGGCCGGAGGAGCACTTTG TGCATCCGACTGTGTTGCAGTAAATTTGGTTG
GTGTGGTAACACTAATGAGTATTGGTCTGGTAAATTGTCAGAGCCAG TGTCTTGGCGGTCCCGG
TCCTTCAGGGGACCTAGGCCGGTGTATTTCAAATCCATGTTTATCAAATGCTTAATCATCGCAAT
GACAATGCTTGTCAAGGAAAGAATAATTTCTACAGTTACAATGCATTTGTTACTGCTGCTGGGTCTTT

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ACGTCTCGATCGAGGCCAAACATGGGTCAATGCGCCGAGGGGCGACTAAGATGGCACGTATAT
GGGGTCGTAATAATTGCAATTTTAATGGTGCTGGTAGAGGTTTCATGCCAAACTGGTGATTGTGGTG
GGGTCTACACTGTACCGGGTGGGCGCAAACCCCAAAACACCCTAGCTGAATATGCTTTGGACCAAT
TCAGCAACCTAGATTTCTGGGACATTTCTTTGGTTGACGGATTAAATATACCGATGACTTTGCCCC
AACCAATCCTAGTGGAGGAAAATGCCATGCAATTCATTGCACGGCTAATATAAACGGTGAATGCC
TAGTCCACTTAGGGTACCCGGAGGATGTAACAACCCTTGACCAGTTTCGGAGGACAACAATATTG
TTGTAACAAGGCCCATGTGGTCTACAAAATTTTCGAGATTTTCAAACAAAGGTGCCCTAATGCG
TATAGCTACCTCAAGATGATCCTACTAGCTTATTCACTTGCCTAGTGGTAGTACAAATTATAGGG
TTGTTTTTGGCCATAA

Primers

LePR5-F: GGCAAACCCCAAAACACC

LePR5-R: TTAAATCCGTCAACCAAGAAATG

Solanum lycopersicum beta-1,3-glucanase, mRNA (M80608)

ATGGCTACCTCACAATAGCTATTATTGTGCTTCTAGGATTACTTGTGCGCCACCAACATTCAACA
AGAGGCTCAAATAGGTGTTTGTATGGAATGATGGGGAACAACCTGCCATCACATTCTGAAGTTATA
CAGCTCTACAAGTCGAGAAACATTAGAAGACTGAGGCTTTATGATCCAAATCATGGAGCTTTGAATC
CGCTAAGAGGATCAAAACATTGAAGTGATATTAGGACTTCCAAATGTAGATGTGAAACACATTTCTC
TGGGATGGAACACGCGAGATGGTGGGTACAGAAGAACGTTAGAGATTTCTGGCCTCATGTTAAAA
TAAGTATATAGCTGTTGGTAATGAAATCAGCCCTGTTACTGGCACTTCCAATCTTGCCCCATTTCAA
GTTCTGCTTTGGTTAACATTTACAAAGCAATCGTGAAGCTGGTTTGGGAAATGACATTAAGGTCT
CAACGTCTGTAGACATGACGTTGATTGGCAATCTTATCCACCATCACAGGGTTCATTTAGGAACGA
TGTTAGATGGTTTACTGATCCAATTTGTTGGGTTTTGAGGGATACACGTGCACCTTTGCTCGTTAAC
ATTTATCCTTATTTAGCTATTCTGGTAATCCAGGACAGATTTCACTTCCGTATGCTCTTTTACAGC
ACCTAATGTAGTGGTACAAGATGGATCGCGTCAATATAGGAACCTTATTTGATGCTATGTTGGATTCT
GTTTATGCTGCGATGGATCGAACAGGAGGAGGATCTGTAGGAATAGTTGTGTCAGAGAGTGGATG
GCCATCTGCTGGTGTCTTTGGTGCAACACATGAAAATGCACAAACATACTTGAGGAACTTAATTCAA
CATGCTAAAGAAGGTAGTCCGAGAAAAGCCTGGACCTATAGAGACTTATATATTCGCCATGTTTGATG
AGAATAACAAGAATCCAGAGCTTGAGAAGCATTTTGAATGTTTTACCAAACAAGCAGCCAAAATA
CAACCTAAACTTTGGGTGTCTGAAAGAGTTTGGGACATTACTAATAGCACTGCTTCTTCACTCACT
AGTGAGATTAA

Primers

LeGLUB-F: GTCGCCACCAACATTCACA

LeGLUB-R: GATCCTTAGCGCATTCAA

Solanum lycopersicum beta-1,3-glucanase, mRNA (M80604)

ATGGCTTTTCTAAGTTCTCTTAGCTTCCCTTTACTTGTGGGCTTCTAATCCAAATAACAGGAGC
GCAGCCTATCGGAGTATGTTATGAAAAATTGCCAATAATTTACCATCGGATCAAGATGTCATAAAA
TTATATAATTCGAATAACATCAAGAAAATGAGAATTTACTTTCCAGAAAACAAATGTCTTAAATGCCCT
CAAAGGAAGTAACATTGAAATAATCTTGATGTCCCAAATCAAGATCTTGAAGCCCTAGCCAATCCT
TCCAAACGCCAAGGTTGGGTTCAAGATAATATAAGAAAATCACTTTCCGGATGTTAAATTCAAATATAT
AGCCGTTGGAAACGAAGTTGATCCAGGTAGAGACAGTGGTAAATACGCACGATTTGTTGGTCCAGC
AATGGAAAATATTTACAACGCGTTATCATCAGCAGGGTTGCAAAATCAAATCAAGGTCTCAACCGCG
ACATATTTAGGGCTTTTAAACCAACACCTACCCACCTAGAGATAGCATTTTGGGGAATGAATATAAAA
GTTTCATCAATCCATAATTTGGATTTCTATCAAGACATAATCTTCCACTTTTAGCCAATATTTACCCTT
ATTTTGGCCATGCTGATGATAATGTTCTCTTCTTATGCACCTTTCAAGCAACAAGGGCTAAACGA
TGCAGGATATCAAATCTTTTCGATGCCCTTGTGGATTCAATGTATTTGCTACTGAGAACTTGGGA
GGACAAAATATTGAGATTATTGTATCGGAAAGTGGTTGGCCTTCTGAAGGACACCCTTCCGCTACTC
TTGAAAACGCGATGACTTATTATACAACTTGATTAATCATGTGAAAGGAGGGGCGAGGAACACAAA
GAAACCAGGAAGGACTATAGAAACCTATTTATTCGCCATGTTTGATGAAAATAGAAAGGATGGAAAA
CCAAGTGAGCAACATTTTGGACTCTTTAAACCTGACCAGAGGCCAAAGTATCAACTCAAATTTGAT
AA

Primers

LeGLUA-F: ATACGCACGATTTGTTGGTC

LeGLUA-R: ATCGCGAAAAATGCTATCTCT
